



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

“Composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (*Coffea arabica* L) utilizado y la actividad de los productos de su fermentación colónica *in vitro* en un modelo de inflamación”

TESIS

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

Presenta: **I.Q. en A. Dunia María López Barrera**

Dirigido por: **Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña**

Santiago de Querétaro, Qro. Diciembre 2014



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (*Coffea arabica* L.) utilizado y la actividad de los productos de su fermentación colónica *in vitro* en un modelo de inflamación”

TESIS

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

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I. Q. en A. Dunia María López Barrera

Dirigido por:

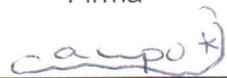
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

SINODALES

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente


Firma

Dra. Rocío Campos Vega
Secretario


Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
Vocal


Firma

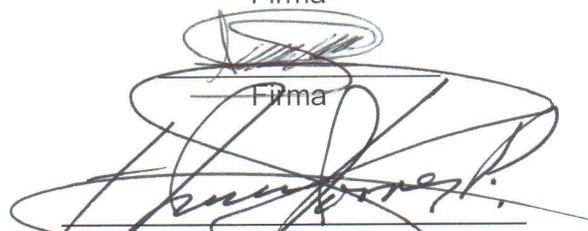
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Suplente


Firma

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Suplente


Firma


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


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México

Diciembre, 2014

RESUMEN

La industria del café genera enormes cantidades de subproductos, dentro de estos se encuentra el café utilizado (CU), uno de los principales residuos de esta industria. Por otro lado, se ha informado que el café contiene componentes bioactivos, como ácidos clorogénico, fibra dietaria, e incluso melanoidinas, en conjunto denominados fibra antioxidante. Fibra que es fermentada por la microflora colónica produciendo principalmente ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como ácido acético, propiónico y butírico, los cuales han atraído atención considerable ya que han demostrado prevenir el estado inflamatorio. Por lo que, el café y/o su residuo a través de los productos de su fermentación colónica *in vitro* (AGCC, entre otros), podrían ayudar a combatir el estado inflamatorio. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (*Coffea arabica* L.) utilizado y evaluar la actividad de los productos de su fermentación colónica *in vitro* sobre un modelo de inflamación utilizando macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos (LPS). El CU presentó mayor contenido de fibra total en comparación con el grano de café (58% y 48%, respectivamente). El contenido de fenoles totales, flavonoides y taninos condensados fue menor en el CU en comparación con el grano, con diferencias entre el grado de tostado (mayor para tostado medio). Una tendencia similar se observó para la capacidad antioxidante determinada por los ensayos de DPPH y ABTS, encontrándose en el intervalo de 78.24-387.34 μ moles eq. de trolox/g de muestra. Las concentraciones de ácido butírico generadas a partir de la fracción no digerible (FND) fueron alrededor de 7 mmol/L. El extracto de fermentación (EF) del CU tostado medio redujo casi un 40% la producción de óxido nítrico (NO) a una concentración del 25% en macrófagos RAW estimulados con LPS. Además, se comprobó que el EF no tuvo efecto citotóxico en dichas células (ensayo MTT). El CU es fuente de compuestos nutracéuticos, los cuales contribuyen a la generación de AGCC, entre otros, los cuales podrían estar contribuyendo a la reducción del estado inflamatorio en células RAW estimuladas con LPS, sugiriendo su potencial efecto benéfico a la salud.

(Palabras clave: café utilizado, fibra dietaria antioxidante, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), fermentación colónica *in vitro*, , inflamación).

ABSTRACT

The spent coffee (SC), is one of the main by-products from coffee industry, it contains polyphenols, melanoidins and dietary fiber ("antioxidant dietary fiber"), compounds that could exert protection against inflammatory diseases such as colon cancer. The antioxidant fiber can be fermented by colon microbiota producing short-chain fatty acids (SCFAs), which have brought considerable attention in maintaining the homeostasis of the gut, as well as prevent inflammation and have anti-proliferative and apoptotic effects on colon cancer cells. The aim of this study was to determinate the chemical and nutraceutical composition and antioxidant capacity of the SC, as well as to evaluate the activity of the products of its colonic *in vitro* fermentation on an inflammation model using RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharides (LPS). The SC had higher total fiber content compared to coffee bean (58 and 48%, respectively). The content of total phenols, flavonoids and condensed tannins contents were lower in the SC compared with grain, with differences between the degree of roasting. A similar trend was observed for the antioxidant capacity, determined by DPPH and ABTS assays, being in the range of 78.24-387.34 $\mu\text{mol eq. Trolox / g}$ of sample, higher than that reported for several fruits. Butyric acid concentrations generated from nondigestible fraction (NDF) were about 7 mmol/L. When evaluating the fermentation extracts (EF) of medium roast SC on a model of inflammation using LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages a reduction of almost 40% was achieved in the production of nitric oxide (NO) at a concentration of EF 25%, also by MTT cell viability assay. It was established that EF had not cytotoxic effect on RAW 264.7 cells at various concentrations tested. The SC is a source of nutraceutical compounds, which contribute to their antioxidant capacity and the generation of SCFAs, which showed help to reduce the inflammatory state in stimulated-LPS RAW 264.7 cells, suggesting its potential beneficial effect on health.

(Keywords: Spent coffee, antioxidant dietary fiber, *in vitro* fermentation, short-chain fatty acids (SCFAs), inflammation.

DEDICATORIAS

A mis padres

María Barrera Ortega y Sergio López Jiménez este logro es gracias a ustedes que cada día me han enseñado con su ejemplo, fuerza, coraje y empeño a cumplir mis sueños y anhelos, por estar siempre conmigo, que sin esperar nada a cambio, depositaron en mí su confianza, amor y apoyo incondicional SIEMPRE. Muchas gracias.

A la Fam. Ramírez Barrera

por brindarme su confianza, amor y apoyo incondicional, especialmente GRACIAS a mi segunda mamá tía Lupita Barrera. Sin ustedes este sueño no se hubiera cumplido hoy.

A mis hermanos

Cynthia, Mariana, Erick y Tere por escucharme, apoyarme y comprenderme SIEMPRE.

A toda la familia Barrera Ortega mis abuelitos, tíos, tías, primos por todo el apoyo y por encender mi vida con su chispa de alegría y amor.

A mis amigos

Elí, Luis, Rosita, Liceth, Diego, Astrid, Aurea, Nathaly, Sara, Cristy, Kenia, Pablos, Edeli, Adriana, Jorge, Marcelo, Jhony, Cecy, Carla, Monica por su apoyo, confianza, momentos felices y experiencias vividas. GRACIAS por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

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

A la **Dra. Flavia Loarca Piña** por sus conocimientos invaluable que me brindo para realizar esta investigación, y sobre todo por su tiempo, apoyo y confianza brindada.

A la **Dra. Rocio Campos Vega** por apoyarme incondicionalmente en todo, por compartirme sus valiosos conocimientos y estar siempre ahí cuando la necesite.

A los demás miembros del comité, **Dra. Sandra Olimpia mendoza Diaz, Dra. Minerva Ramos, Dra. Tere García**, por las contribuciones aportadas para el mejoramiento de este proyecto y por sus sabios consejos.

A mis amigos incondicionales con los que empecé este sueño: **Luis, Eli y Rosita**, por su valiosa amistad y apoyo a lo largo de todo este tiempo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: **Liz, Diego, Aurea, Astrid, Jimena, Cristy, Sara, Nathaly, Edelí, Adriana, Marcelo, Pablo, Kenia, Jorge, Jhony**, por su gran apoyo brindado e instantes vividos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	102
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN LITERARIA	4
II. 1 El café su historia y composición	4
II.2 Producción y exportación del café	8
II.2.1 Producción del café a nivel mundial	8
II.2.2 Producción de café en México	11
II.3. Proceso de tostado del café	13
II.4 Subproductos del café	15
II.4.1 Café utilizado	18
II.5 Compuestos bioactivos del grano de café y el café utilizado	20
II.5.1 Polifenoles	21
II.5.2 Fibra antioxidante y melanoidinas	23
II.6 Fermentación colónica <i>in vitro</i>	25
II.7 Producción de ácidos grasos de cadena corta	27
II.7.1 Inflamación y ácidos grasos de cadena corta	28
II.7.2 Inflamación y cáncer de colon	29

II.8 Macrófagos estimulados con lipopolisacárido como modelo celular de inflamación <i>in vitro</i>	32
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. HIPÓTESIS	36
V. OBJETIVOS	37
V.1 Objetivo general	37
V.2 Objetivos específicos	37
VI. METODOLOGÍA	38
VI.1 Materiales	38
VI.1.1 Compuestos químicos	38
VI.1.2 Materia Prima	38
VI.1.3 Material biológico	39
VI.2 Métodos	39
VI.2.1 Composición proximal	39
VI.2.1.1 Determinación de lípidos	39
VI.2.1.2 Determinación de proteína total	40
VI.2.1.3 Determinación de humedad	40
VI.2.1.4 Determinación de cenizas	41
VI.2.2 Determinación de fibra total	41
VI.2.2.1 Fibra insoluble	41
VI.2.2.2 Fibra soluble	42
VI.2.2.3 Almidón resistente	42
VI.2.3 Determinación de compuestos fenólicos	42
VI.2.3.1 Obtención del extracto etanólico	42
VI.2.3.2 Cuantificación de flavonoides	43
VI.2.3.3 Cuantificación de taninos condensados	43
VI.2.3.4 Cuantificación de fenoles totales	43
VI.2.4. Cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD	44
VI.2.5 Determinación de capacidad antioxidante	45

VI.2.5.1 Capacidad antioxidante método ABTS	45
VI.2.5.2 Capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH	45
VI.2.6 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	46
VI.2.6.1 Simulación de las condiciones de la boca	46
VI.2.6.2 Simulación de las condiciones del estómago	47
VI.2.6.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado	47
VI.2.6.3.1 Técnica del saco intestinal invertido utilizando ratas	47
VI.2.6.3.1.1 Manejo de los animales	47
VI.2.6.3.1.2 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal invertido	48
VI.2.6.3.1.3 Manejo de los animales después del sacrificio	49
VI.2.6.4 Fermentación <i>in vitro</i> de la FND	49
VI.2.7. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta por cromatografía de gases	50
VI.2.8 Cultivo celular	50
VI.2.8.1 Ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difentetrazol (MTT) para viabilidad celular	51
VI.2.8.2. Determinación de la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 activados con LPS	52
VI.3 Análisis estadístico	53
VII. RESULTADOS	54
VII.1 Composición proximal de los granos de café y café utilizado con dos diferentes grados de tostado	54
VII.2 Contenido de fibra total, fibra insoluble, fibra soluble y almidón resistente de los granos de café y café utilizado con diferente grado de tostado	57
VII.3 Contenido de fenoles totales, flavonoides y taninos condensados de los granos de café y café utilizado con diferente grado de tostado	58
VII.4 Cuantificación de compuestos fenólicos y cafeína por HPLC-DAD	61

VII.5 Determinación de la capacidad antioxidante de los granos de café y café utilizado con diferente grado de tostado	64
VII.6 Efecto del pH en el medio de incubación durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND del café utilizado con diferentes grados de tostado	67
VII.7 Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante la fermentación <i>in vitro</i> de la FND del café utilizado con diferentes grados de tostado	68
VII.8 Efecto del extracto de la fermentación (EF) colónica <i>in vitro</i> sobre la viabilidad celular	72
VII.9 Efecto del EF de 24 h del CU tostado medio sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos	73
VIII. CONCLUSIONES	77
IX. BIBLIOGRAFÍA	79
X. ANEXOS	101

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Composición química de los granos de café verde Arábica y Robusta	6
2 Producción mundial de café por variedad de los años 2008/09 a 2012/2013	9
3 Contenido de ácido clorogénico en función del grado de tueste	14
4 Composición química de los subproductos del café	17
5 Contenido de compuestos fenólicos en los subproductos del café	18
6 Composición química del café utilizado	19
7 Composición química del grano de café y café utilizado con dos grados de tostado	56
8 Contenido de fibra soluble, fibra insoluble y almidón resistente en grano de café y café utilizado con diferentes grados de tostado	59
9 Contenido de fenoles totales, flavonoides y taninos condensados en grano de café y café utilizado con diferentes grados de tostado	61
10 Contenido de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD en grano de café y café utilizado con diferentes grados de tostado	63
11 Capacidad antioxidante en grano de café y café utilizado con diferentes grados de tostado	66
12 Medición de pH en el medio de incubación durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café utilizado con diferente grado de tostado	69
13 Contenido de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café utilizado con diferente grado de tostado	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Planta de café	5
2 Constitución del grano de café	7
3 Principales países productores de café, 2000/2001 – 2012/2013	10
4 Consumo mundial de café de 1995 al 2012	11
5 Distribución de la producción de café convencional 2011\2012	11
6 Producción 1993-2010 de los principales estados productores de café en México	12
7 Proceso del tostado de café	13
8 Esquema de la producción de diversos subproductos de la industria del café	16
9 Concentraciones de ácido clorogénico y melanoidinas en granos de café verdes y tostados y en tazas de café expreso o filtrado	22
10 Un viaje con el cáncer: la inflamación como la fuerza impulsora	32
11 Viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos	74
12 Efecto del extracto de fermentación del café utilizado tostado medio en la producción de óxido nítrico inducida por lipopolisacáridos	75

I. INTRODUCCIÓN

El café es un producto importante y una bebida muy popular a nivel mundial, 25 millones de pequeños productores dependen del cultivo del café para su sustento. Brasil, Vietnam y Colombia representan más de la mitad de la producción mundial, la cual según la Organización Internacional del Café (OIC), se estimó en 130 millones de sacos en 2011-12. Esta misma organización también reportó que 2250 millones de tazas de café se consumen en todo el mundo todos los días .

Derivado de esto, dicha industria libera enormes cantidades de subproductos de café, los cuales constituyen una fuente de contaminación grave y plantean serios problemas ambientales, representando una amenaza para el medio ambiente debido a que su eliminación insegura conduce a la contaminación del agua y el suelo alrededor de las unidades de procesamiento. La reutilización de los subproductos del café es, por tanto, una prioridad importante tanto para países productores como consumidores, por razones de índole ecológica, económica y social (Cruz *et al.*, 2014)

Un importante residuo de la industria del café es el café utilizado (CU). En promedio una tonelada de café verde genera alrededor de 650 kg de CU, y alrededor de 2 kg de CU húmedo se obtienen por cada kg de café soluble producido (Pflugger, 1975; Murthy y Naidu, 2012), el cual generalmente se descarga al medio ambiente, siendo una considerable fuente de contaminación.

Estudios sobre estos subproductos (incluyendo la pulpa, cáscara, piel plateada y café utilizado) demuestran que tienen una alta actividad antioxidante, que va del 65-70% (Murthy y Naidu, 2010 ab; Rocha *et al.*, 2010). Sus propiedades antioxidantes se han atribuido a la presencia de cafeína, trigonelina y ácido clorogénico (Franca *et al.*, 2005; Ramalakshmi *et al.*, 2007), entre otros. También se ha reportado que son ricos en carbohidratos, proteínas, pectinas, y algunos otros compuestos bioactivos, como los polifenoles, por lo que se han considerado recursos renovables baratos (Murthy y Naidu, 2010b). Se ha informado que entre los residuos de café, la piel plateada contiene una alta cantidad de fibra total (80%), seguido de la cáscara y el café utilizado, lo que le

confiere propiedades antioxidantes al café (Murthy y Naidu, 2010ab). De igual manera, se ha informado que el café utilizado presenta una fuerte actividad antioxidante y antitumoral (Ramalakshmi *et al.*, 2008; Ramalakshmi *et al.*, 2009). Las principales características de estos subproductos es que son ricos tanto en fibra dietaria como en compuestos polifenólicos, lo que crea el concepto de fibra dietaria antioxidante, haciendo que los mismos tengan mayor preferencia en comparación con otras fuentes de fibra dietaria (Mussatto *et al.*, 2011a; Saura-Calixto, 2011).

En años recientes se ha enfatizado en la importancia de la fibra dietaria antioxidante, ya que no sufre hidrólisis enzimática durante el tracto intestinal. Se sugiere que en forma acomplejada llega al colon y pueden ser sustrato de fermentación por la microbiota colónica produciendo, entre otros compuestos, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente los ácidos acético, propiónico y butírico, así como sus conjugados fenólicos (Campos-Vega *et al.*, 2009; Cruz-Bravo *et al.*, 2011; Saura-Calixto, 2011). Estos AGCC han atraído una atención considerable en el mantenimiento de la homeostasis del intestino, ya que pueden prevenir la inflamación y tienen efectos anti-proliferativos y apoptóticos en células de cáncer de colon (Säemann *et al.*, 2000; Millard *et al.*, 2002; Klampfer *et al.*, 2003).

Los efectos fisiológicos de los AGCC han sido bien documentados (Miller S.J., 2004; Mohana *et al.*, 2007; Meijer *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 2010), los cuales incluyen la reducción de la producción de factores proinflamatorios (Miller S.J., 2004; Usami *et al.*, 2008; Cox *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009; Vinolo *et al.*, 2010). Hamer *et al.* (2009) evaluaron los efectos de diferentes AGCC (acético, propiónico, butírico, valérico, y caproico) sobre la liberación de citocinas utilizando un sistema de co-cultivo combinando células Caco-2 con cultivos de sangre entera humana y se encontró que cada AGCC evaluado, excepto el acético, disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias.

Además de estas diversas actividades, varios grupos han informado de los efectos anti-inflamatorios del ácido butírico. En particular, se ha informado que el ácido butírico tiene un efecto anti-inflamatorio prominente en la colitis mediante la

modulación de la interleucina 8 (IL-8), la actividad de la proteína inhibidora de macrófagos 2 (MIP-2) y la supresión de la actividad de NF- κ B (Ohno *et al.*, 1997; Inan *et al.*, 2000). En células RAW 264.7 (macrófagos murinos) estimulados con LPS, una alta concentración de ácido butírico redujo significativamente el nivel de la producción de óxido nítrico (NO) y previno la activación de NF- κ B mediante la estabilización de I κ B α y I κ B β (Chakravorty *et al.*, 2000). Los macrófagos han sido utilizados como modelo de inflamación, ya que son un tipo de células que juegan un papel importante en la respuesta inmune, la defensa del huésped, y la reparación de tejidos. Una vez activados, secretan un gran número de citocinas proinflamatorias tales como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), e interleucina-6 (IL-6), así como óxido nítrico (NO) (Duffield, 2003; Liu *et al.*, 2012). Además, los macrófagos pueden eliminar las células apoptóticas por fagocitosis y secretar mediadores antiinflamatorios (IL-10) y factores de crecimiento (Sergij *et al.*, 1999; Duffield, 2003).

Debido a lo anterior, el CU podría ser aprovechado como fuente de fibra dietaria antioxidante, la cual podría ser sustrato de fermentación para la microbiota colónica produciendo AGCC, entre otros compuestos nutracéuticos, con efecto sobre el estado inflamatorio. Lo anterior contribuirá a generar interés por este subproducto, cuya recuperación podría resultar económicamente atractiva.

Por lo que en este estudio el objetivo fue comparar la composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (*Coffea Arabica* L.) utilizado y la actividad de los productos de su fermentación colónica *in vitro* sobre un modelo de inflamación utilizando macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

II. REVISIÓN LITERARIA

II. 1 El café su historia y composición

El café es una de las bebidas más populares del mundo y ha crecido constantemente en importancia comercial durante los últimos 150 años (Daglia *et al.*, 2000). La palabra café tiene su origen en la palabra árabe Quahweh, que significa "estimulante". Los efectos estimulantes del grano de café tostado eran bien conocidos y los árabes trajeron semillas de *Coffea arábica* de Etiopía a Yemen (Península Arábiga) durante el siglo XIII, estableciéndose la primera plantación (Monaco *et al.*, 1977; Murthy y Naidu, 2012). La provincia de Kaffa en Etiopía se considera como el hábitat original de semillas de *café arábica*, mientras que la variedad *robusta* se considera nativa de África Central. Con el cultivo de propagación extensa y amplia gama de café en todo el mundo, en la actualidad Brasil es el mayor productor y exportador de café del mundo. La importancia económica del café se debe principalmente a su bebida, una infusión preparada a partir de los granos tostados y molidos. La bebida de café que más se consume en el mundo es producida por la especie *Coffea arabica* (Arábica) y *Coffea canephora* (Robusta); la primera es considerado superior debido a sus propiedades sensoriales (Bertrand *et al.*, 2003).

El café es una planta de hoja perenne en la naturaleza, tiene un tallo prominente vertical con sistema de raíces poco profundas; las raíces del café arábica penetran más profundamente en el suelo, mientras que las de café robusta tienen raíces que se concentran muy cerca de la superficie del suelo (Figura 1) (Murthy y Naidu, 2012).

La composición química de estas dos variedades se presenta en el Cuadro 1. Botánicamente, el café pertenece al género *Coffea* de la familia *Rubiaceae*. El subgénero *Coffea* comprende más de 80 especies, que se encuentran en África y Madagascar (Bridson y Verdcourt, 1988).



Figura 1. Planta de café

(Fonnegra y Jiménez, 2007)

El café es una planta de día corto y por lo tanto la iniciación floral se lleva a cabo en condiciones de 8-11 h de luz. La polinización se realiza dentro de 6 horas después de la floración. Café arábica es autógama con diferentes grados de polinización cruzada natural, en contraste con el café robusta, que es estrictamente alógamo. El proceso de fertilización se completa dentro de 24-48 h después de la polinización. Las semillas son elípticas o en forma de huevo y la cubierta de la semilla está representado por la piel plateada. La germinación se lleva a cabo en aproximadamente 45 días. Los árboles de café crecen en regiones tropicales, entre el trópico de Cáncer y Capricornio, que tienen abundantes precipitaciones en todo el año y temperaturas cálidas alrededor de 21 °C, y sin heladas (Esquivel y Jiménez, 2012).

Deben transcurrir al menos cinco años para que un árbol de café pueda dar su primera cosecha de granos y será productivo durante unos quince años más. Sólo los frutos maduros son cosechados por la recolección selectiva de cada variedad dominante situado a una altitud particular y se mantiene como lote independiente separado. Posteriormente, las frutas se clasifican de verdes-inmaduras a sobremaduras y se secan por separado, ya que afectan la calidad final del café mediante la impregnación de sabores desagradables (Murthy *et al.*, 2001; Murthy y Naidu, 2012).

Cuadro 1. Composición química de los granos de café verde Arábica y Robusta. ^{a,b}

Constituyente	Arábica	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 estaquirosa (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	34-44	
Hemicelulosa	5-10	3-4	Polímeros de galactosa (65-75%), arabinosa (25-30%) y manosa (0-10%).
Celulosa, mananos β (1-4)	41-43	32-40	
Ácidos y fenoles			
Ácidos volátiles	0.1		
Ácidos alifáticos no volátiles	2-2.9	1.3-2.2	Ácidos cítrico, málico, quínico, dicafeoyl y feruloylquinico.
Ácido clorogénico	6.7-9.2	7.1-12.1	
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		
Proteínas	8.5-12		Principales aminoácidos: Glutamina, y asparagina
Cafeína	0.8-1.4	1.7-4	Trazas de teobromina y teofilina.
Trigonelina	0.6-1.2	0.3-0.9	
Minerales	3-5.4		

^a. Valores en % de sólidos

^b. Contenido de agua en café crudo 7-13%

^c. Principales componentes: ácido 5- cafeoylquinico (ácido clorogénico: Arábica 3-5.6% ; Robusta 4.4-6.6%). (Belitz *et al.*, 2009)

La constitución del grano de café se representa en la Figura 2. El grano está compuesto por una superficie lisa, piel dura externa o pericarpio, generalmente de color verde en las frutas inmaduras, pero que se vuelve roja o rojo-violeta intenso cuando está maduro (incluso amarillo o naranja en genotipos particulares). El pericarpio abarca la parte amarillenta suave, fibrosa y pulpa dulce o mesocarpio externo. Esto es seguido por una capa fina de mucílago (altamente hidratada), translúcida, incolora y viscosa (también llamada capa de pectina). Después, hay un delgado endocarpio de color amarillento, también llamado pergamino. Por último, la piel plateada cubre cada hemisferio del grano de café (endospermo) (Purseglove, 1974; Berbert *et al.*, 2001; Belitz *et al.*, 2009).

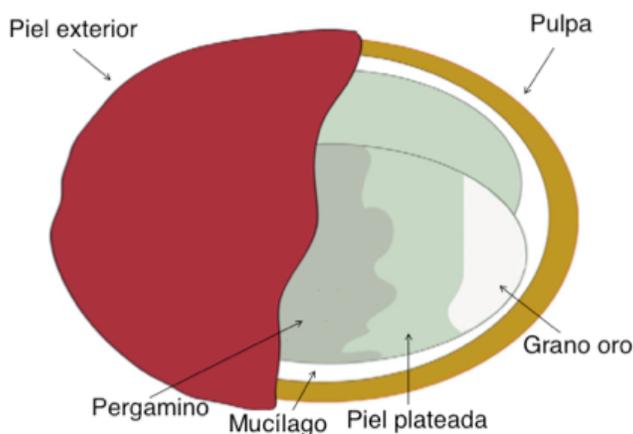


Figura 2. Constitución grano de café

(Esquivel y Jiménez, 2012)

Los granos de café verde se componen principalmente, como la mayoría de los tejidos de la planta, por polisacáridos insolubles como celulosa y hemicelulosa (50% w/w). También contienen carbohidratos solubles, los cuales actúan en la unión del aroma, la estabilización de espuma, aumento de sedimentación y viscosidad del extracto (Clifford, 1985; Arya y Rao, 2007; González-Ríos *et al.*, 2007; Belitz *et al.*, 2009)

La cafeína es el alcaloide principal en los granos de café y representa del 1 al 4% (base seca), con una gran variación en los cultivares (Dessalegn *et al.*,

2008; Belitz *et al.*, 2009; Mazzafera y Silvarolla, 2010). El contenido de cafeína está estrechamente relacionado con la calidad de las bebidas de café, ya que contribuye a su amargura (Farah *et al.*, 2006). La cafeína es conocida por sus efectos sobre el estado de alerta, a través de la estimulación del sistema nervioso central, el aumento de la circulación sanguínea y la respiración, siendo probablemente la principal razón de la popularidad de la bebida (Reich *et al.*, 2008; Belitz *et al.*, 2009). Otros posibles beneficios de la cafeína incluyen la mejora del estado de ánimo, un mejor rendimiento en el ejercicio y el tiempo de reacción y la reducción de los síntomas asociados con la enfermedad de Parkinson y los temblores (Heckman *et al.*, 2010).

Altas dosis de cafeína también pueden causar ansiedad, inquietud, tensión, nerviosismo y agitación psicomotriz (Daly y Fredholm, 1998; Esquivel y Jiménez, 2012), mientras que a largo plazo el uso de este alcaloide puede aumentar el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, con diferentes respuestas individuales a la cafeína, probablemente relacionada a factores genéticos (Yang *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos que se encuentran principalmente en los granos de café verdes, son: el ácido clorogénico, hasta 12% de sólidos y ésteres de ácido *trans* cinámico y quínico; siendo el ácido clorogénico el mayoritario en granos de café verdes. La esterificación en las posiciones 3, 4 y 5, pero no en la posición 1, forma varios isómeros, también encontrados en el café, junto con los ácidos fenólicos libres tales como los ácidos cafeíco, ferúlico y dimetoxicinámico. Además de su potencial como antioxidante (Iwai *et al.*, 2004; Esquivel y Jiménez, 2012), el ácido clorogénico tiene otras propiedades valiosas para la salud, como actividades hepatoprotectoras, hipoglucemiantes y antivirales (Esquivel y Jiménez, 2012).

II.2 Producción y exportación del café

II.2.1 Producción del café a nivel mundial

El café es un producto importante y una bebida popular. A nivel mundial, 25 millones de pequeños productores dependen de este para su sustento; Brasil,

Vietnam y Colombia representan más de la mitad de la producción mundial, que es aproximadamente 7,0 millones de toneladas por año (Cuadro 2). Más del 90% de la producción de café se lleva a cabo en los países en vías de desarrollo, mientras que el consumo se encuentra principalmente en las economías industrializadas (Ponte, 2002). Según la Organización Internacional del Café (OIC), la producción de café en 2011-2012 se estimó en 130 millones de sacos, sustentando un consumo de más de 2250 millones de tazas de café cada día a nivel mundial.

Cuadro 2. Producción mundial de café por variedad de los años 2008/2009 a 2012/2013

Producción	Años				
	2008/09	2009/10	2010/11	2011/2012	2012/2012
Miles de sacos	128, 622	122,798	133,498	135,381	144, 740
Arábica	78, 857	72,873	84,288	82,186	86,701
Robusta	49, 765	49, 925	49, 210	53, 195	58, 039
En porcentaje (%)	100	100	100	100	100
Arábica	61,31	59,34	63,14	60,71	59,90
Robusta	38,69	40,66	36,86	39,29	40,10

(OIC, www.ico.org. Febrero, 2014).

La OIC también reporta que los principales países exportadores de café a nivel mundial son Brasil (en 2010 las exportaciones de café brasileño alcanzaron un récord histórico de 5.660 millones de dólares), Vietnam, Colombia, Etiopía, Indonesia, India y México (Figura 3).

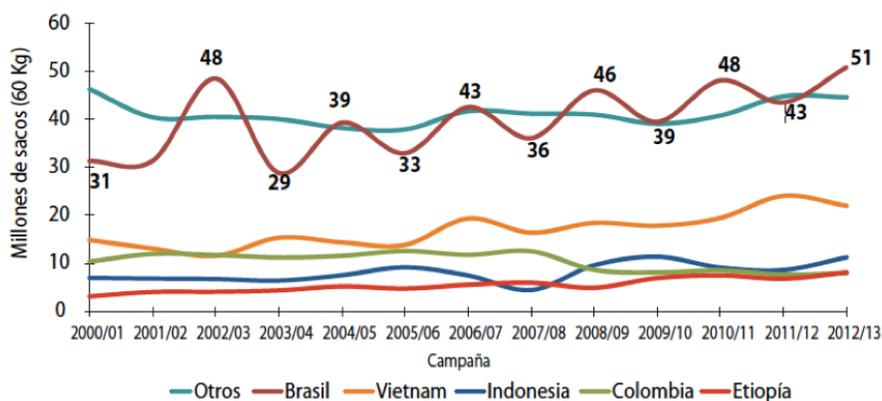


Figura 3. Principales países productores

(OIC, www.ico.org. Febrero, 2014).

Por otro lado, la OIC publicó el consumo mundial de café de 1995 a 2012. Como se puede observar en la Figura 4, el consumo se ha incrementado de una manera sostenida entre los años 1995 y 2012, aumentando en un 46,8% entre ambos picos (96,7 millones y 142 millones de sacos, respectivamente) con una tasa de crecimiento anual promedio de 2,1%.

En cuanto al porcentaje de crecimiento promedio anual, las tasas más altas se observan en los países exportadores con 3,8%, destacando mercados como Brasil, Etiopía, Indonesia, México y Filipinas. En cuanto a los mercados emergentes, han crecido a una tasa anual de 3,8%, resaltando los mercados de Rusia, Corea del Sur, Argelia y otros países de Europa del Este. El consumo de los mercados tradicionales presenta una tasa anual de solo 0,9% por año, no obstante, estos son los mercados más importantes, donde destacan Estados Unidos, la Unión Europea como bloque, y Japón. Es importante mencionar que los mercados tradicionales participan con el 50% de las compras y los países exportadores y mercados emergentes con el 30% y 20%, respectivamente (OIC, 2013).

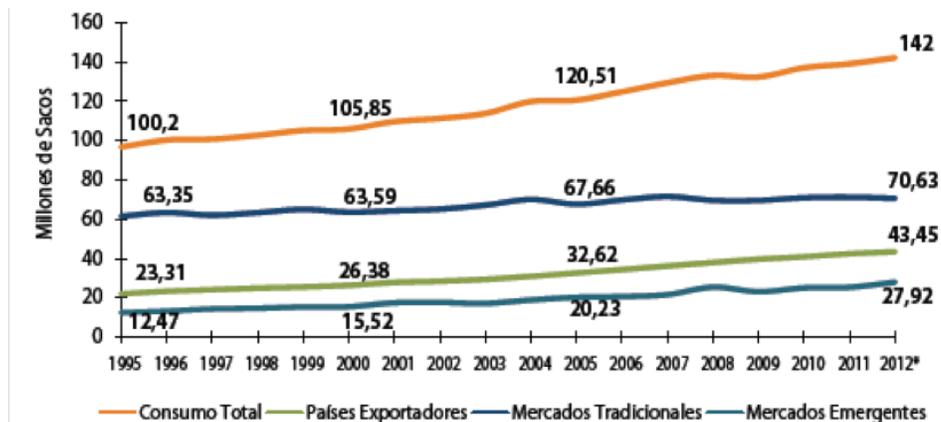


Figura 4. Consumo mundial del café

(OIC, www.ico.org, Febrero, 2014).

II.2.2 Producción de café en México

De acuerdo a datos de la SAGARPA a través del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el periodo del 2011-2012, en México se plantaron aproximadamente 765 mil 700 hectáreas de café verde, y el consumo per cápita anual es de 1.43 kg al año. Hay 15 estados productores de café; sin embargo, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Puebla y Guerrero aglutinan 688 mil 547 hectáreas, lo que representa el 90% de la superficie nacional cultivada; el resto se encuentra distribuido en los Estados de Hidalgo, San Luis Potosí, Guerrero, Colima, Nayarit, Jalisco, Tabasco y Querétaro (Figura 5).

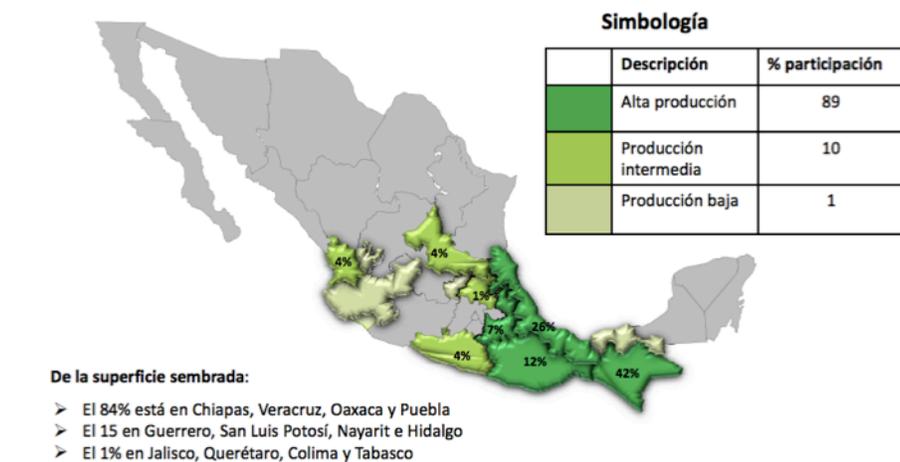


Figura 5. Distribución de la producción de café convencional 2011

(SAGARPA elaborado con datos del SIAP, Abril, 2013).

La evolución de la producción de café en nuestro país se muestra en la Figura 6, destacando el estado de Oaxaca que registró el mayor volumen de producción en 2010 con 154,595.39 toneladas, respecto a la superficie cosechada que fue de 165,971.35 hectáreas. En ese mismo año, la producción por entidad federativa registrada por SAGARPA–SIAP (2013) fue de 546,689.47 toneladas, en Chiapas; 373,725.62 toneladas, en Veracruz; 135,986.87 toneladas, en Puebla; 38,214.90 toneladas, en Guerrero y de 29,219.11 toneladas, que aparece como dato estadístico para el caso de Hidalgo.

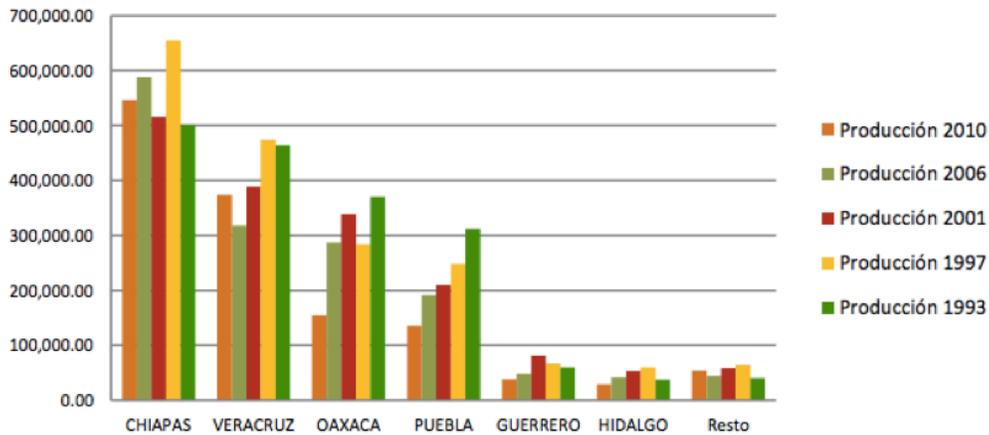


Figura 6. Producción 1993-2010 de los principales estados productores de café en México

(SAGARPA –SIAP, Abril, 2013).

De acuerdo con la Asociación Mexicana de la Cadena Productiva de Café (AMECAFE), en el 2012 México es el sexto productor en el mundo, con el 3% de la producción mundial, equivalentes a entre 4.2 y 4.4 millones de sacos de los 135 millones producidos entre 50 países. De la producción nacional, 85% corresponde a granos arábigos procesados con beneficio húmedo; 12% son arábigos naturales, y el 3% restante corresponde a la especie robusta.

En términos de exportación, el país se encuentra en onceavo lugar con 2.8 millones de sacos, lo que representa 900 millones de dólares en ingreso de divisas. También, la AMECAFE indicó que en el país el consumo per cápita de café es de 1.2 kilogramos anuales, cifra baja comparada con Guatemala y

Colombia con 2.5 kilos por persona, Brasil con 5.5 y Finlandia con 12 kilos per cápita (AMECAFE, 2012).

II.3. Proceso de tostado del café

Las propiedades características de la bebida de café, tales como sabor y aroma, se desarrollan durante el tostado, cuando los granos de café experimentan una sucesión de reacciones que causan modificaciones a su composición química (Figura 7) (Buffo y Cardelli-Freire, 2004). Por ejemplo, los polisacáridos son degradados durante el tostado a carbohidratos de bajo peso molecular (Arya y Rao, 2007).

El grado de tueste, el cual tiene una influencia sobre las características antes mencionadas, se refleja en el color externo de los granos (de marrón claro a oscuro debido a la pirólisis de compuestos orgánicos). Los tostadores funcionan típicamente con temperaturas entre 190 y 280 °C, y los granos son tostados durante un período que se extiende desde algunos minutos hasta cerca de 30 minutos (Belitz *et al.*, 2009; Franca *et al.*, 2009 a).



Figura 7. Proceso del tostado de café

(Pietro, 2010)

Durante el tostado cualquier remanente de la piel plateada se eliminan de los granos (Belitz *et al.*, 2009). Los compuestos generados durante el tostado

también son responsables de muchas actividades biológicas positivas de la bebida del café (Daglia *et al.*, 2008). Sin embargo, los compuestos carcinógenos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, también pueden formarse por la combustión incompleta de la materia orgánica durante el tostado. Afortunadamente, en bebida de café se han detectados en cantidades insignificantes (Orecchio *et al.*, 2009).

El café tostado se compone de carbohidratos (38-42% en base seca), melanoidinas (23%), lípidos (11-17%), proteínas (10%), minerales (4.5-4.7%), ácido clorogénico (2.7 a 3.1%), ácidos alifáticos (2.4 a 2.5%) y cafeína (1.3 a 2.4%), entre otros. Aproximadamente 850 compuestos volátiles se han identificado hasta ahora en el café tostado, de los cuales sólo alrededor de 40 contribuyen al aroma (Belitz *et al.*, 2009).

El ácido clorogénico también contribuye a las propiedades antioxidantes del café tostado (Sato *et al.*, 2011;. Verzelloni *et al.*, 2011); sin embargo, las altas temperaturas durante el tostado del café causan una reducción del contenido de éste (Cuadro 3) (Moon *et al.*, 2009). Las transformaciones químicas que se producen en el ácido clorogénico no están completamente elucidadas. Sin embargo, la formación de lactonas de ácido clorogénico, como consecuencia de este proceso y su influencia en la amargura de la bebida de café, han sido documentadas (Ginz y Engelhardt, 2001).

Cuadro 3. Contenido de ácido clorogénico en función del grado de tueste

Crudo\Grado de tueste	Café Arábica	Café Robusta
Crudo	6.90%	8.80%
Claro	2.70%	3.50%
Medio	2.20%	2.10%
Oscuro	0.20%	0.20%

Belitz *et al.* (2009)

También hay evidencia de que los ácidos precursores del ácido clorogénico (ácidos caféico y quínico) se incorporan a melanoidinas entre otros compuestos (Delgado-Andrade y Morales, 2005; Farah y Donangelo, 2006). Las melanoidinas son compuestos de alto peso molecular de estructura desconocida y, debido a la complejidad de las moléculas, presentan actividad antioxidante. Estas son el resultado de la combinación de azúcares y aminoácidos a través de la reacción de Maillard o de la caramelización de los carbohidratos. La reducción progresiva de la actividad antioxidante en la bebida de café es dependiente del grado de tostado del grano, mostrando el tostado medio del café la actividad más alta, debido al equilibrio entre la degradación de compuestos fenólicos y la generación de productos de la reacción de Maillard durante el proceso (del Castillo *et al.*, 2002; Bekedam *et al.*, 2008; del Castillo *et al.*, 2005; Sacchetti *et al.*, 2009; Votavová *et al.*, 2009). Budryn y Nebesny (2008) encontraron que los extractos de café robusta tuvieron mayor eficacia antioxidante que los granos de café arábica y también que el método más eficiente para la extracción de antioxidantes fue ebullición de los granos de café molidos en agua a presión elevada.

El proceso de tostado también tiene impacto en la cantidad de fibra dietética soluble presente en los granos de café. Silván *et al.* (2010) encontraron un aumento de 39.4 mg/100 mg materia seca soluble en café verde y 64.9 mg\100g en granos severamente tostados.

II.4 Subproductos del café

El café es la segunda mercancía mas comercializada en el mundo, después del petróleo; genera una gran cantidad de subproductos o residuos durante el procesamiento de la cereza hasta la obtención de la bebida (Nabais *et al.*, 2008; Mussatto *et al.*, 2011 b). Dependiendo del método de procesamiento de la cereza de café, es decir, proceso húmedo o seco, el tostado y la elaboración de la bebida, se generan diversos residuos sólidos como la cáscara de la pulpa, piel plateada y el café utilizado (CU) (Figura 8 a y b).

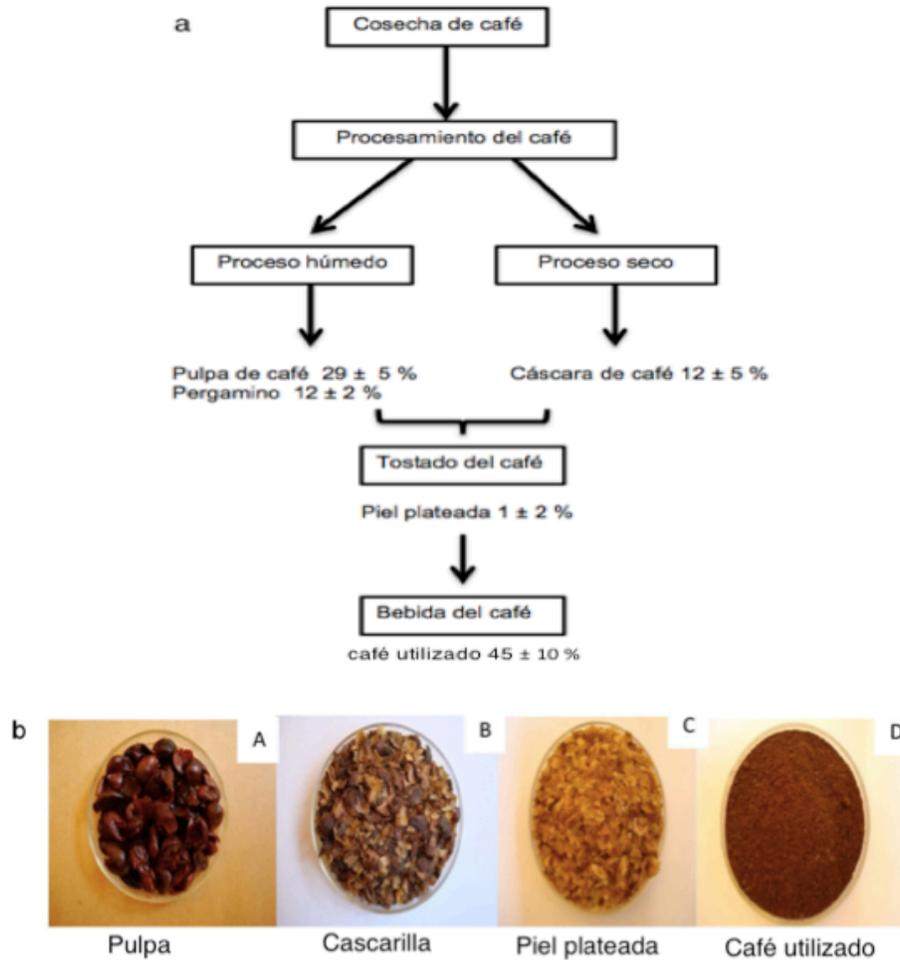


Figura 8. Esquema de la Producción de diversos subproductos de la industria del café

(Adaptado de Murthy y Naidu, 2012)

En la última década, el uso de este tipo de residuos ha sido objeto de varios estudios, pero esta preocupación no existía en 1930-1943, cuando 77 millones de sacos de café verde fueron simplemente quemados y lanzados al mar y en los rellenos sanitarios (Cunha, 1992).

Las cáscaras, pulpa y piel plateada del café comprenden casi el 45% de la cereza del café, y son los principales subproductos de esta industria; se utilizan para diversos propósitos, incluyendo la extracción de cafeína y polifenoles (Esquivel y Jiménez, 2012) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Composición química de los subproductos del café

Parámetros (%)	Pulpa	Cascarilla	Piel plateada	Café utilizado
Celulosa	63.0 ± 2.5	43.0 ± 8.0	17.8 ± 6.0	8.6 ± 1.8
Hemicelulosa	2.3 ± 1.0	7.0 ± 3.0	13.1 ± 9.0	36.7 ± 5.0
Proteína	11.5 ± 2.0	8.0 ± 5.0	18.6 ± 4.0	13.6 ± 3.8
Grasa	2.0 ± 2.6	0.5 ± 5.0	2.2 ± 1.9	ND
Fibra total	60.5 ± 2.9	24.0 ± 5.9	62.4 ± 2.5	ND
Fenoles totales	1.5 ± 1.5	0.8 ± 5.0	1.0 ± 2.0	1.5 ± 1.0
Azúcares totales	14.4 ± 0.9	58.0 ± 20.0	6.65 ± 10.0	8.5 ± 1.2
Sustancias pécticas	6.5 ± 1.0	1.6 ± 1.2	0.02 ± 0.1	0.01 ± 0.005
Lignina	17.5 ± 2.2	9.0 ± 1.6	1.0 ± 2.0	0.05 ± 0.005
Taninos	3.0 ± 5.0	5.0 ± 2.0	0.002 ± 0.1	0.02 ± 1.0
Ácido clorogénico	2.4 ± 1.0	2.5 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.3 ± 1.0
Cafeína	1.5 ± 1.0	1.0 ± 0.5	0.03 ± 0.6	0.02 ± 0.1

ND: no determinado

(Adaptado de: Franca *et al.*, 2009 b; Mutty y Naidu, 2010; Mussatto *et al.*, 2011b)

Hasta ahora, los mayores avances se han logrado en su utilización para fines industriales distintos de la industria alimentaria, como lo es la producción de energía (Saenger *et al.*, 2001; Kondamudi *et al.*, 2008), la adsorción de compuestos tóxicos (Oliveira *et al.*, 2008; Franca *et al.*, 2009b; Franca *et al.*, 2010) y la manufactura de productos industriales, tales como obtención de etanol, ácido giberélico y α -amilasa (Machado *et al.*, 2002; Murthy *et al.*, 2009; Gouvea *et al.*, 2009; Bekalo y Reinhardt, 2010).

Extractos comercializados procedentes de los frutos de café, que contienen ácido clorogénico, proantocianidinas, ácido quínico y ferúlico, han mostrado resultados interesantes para el cuidado de la piel facial (Farris, 2007). Sin embargo, a pesar de su alto nivel de compuestos antioxidantes y fitonutrientes en la fruta del café, pocos progresos se han logrado en su uso como un ingrediente funcional (Heimbach *et al.*, 2010).

Cuadro 5. Contenido de compuestos fenólicos en los subproductos del café

Compuestos			
Subproducto	fenólicos	Niveles	Referencia
Subproductos del café	Ácido clorogénico	2.3-3 %	Murthy and Madhava Naidu (2010)
Café utilizado	Ácido clorogénico	16.6 mg equivalentes de ácido gálico/g	Ramalakshmi et al. (2009)

El proceso de recuperación de los compuestos fenólicos de los subproductos de la industria del café se muestran en el Cuadro 6. Los extractos bioactivos de los subproductos del café (pulpa, cáscara, piel plateada y café utilizado) presentan una actividad antioxidante del 65-70% (Murthy y Naidu, 2010 a, b; Rocha *et al.*, 2010). La determinación de la actividad biológica (Ramalakshmi *et al.*, 2009), aminoácidos (Lago y Antoniassi, 2001), azúcares (Mussatto *et al.*, 2011a), y el contenido de aceite (Freitas *et al.*, 2000; Kondamudi *et al.*, 2008) en el café utilizado, también se han realizado con el objetivo de encontrar alternativas para la reutilización de este residuo.

II.4.1 Café utilizado

El CU es un residuo con tamaño fino de partícula, alta humedad (en el intervalo de 80% a 85%), carga orgánica, y acidez, obtenido durante el tratamiento de café tostado en polvo con agua caliente o vapor para la preparación de café instantáneo. Este es también un importante subproducto de la industria del café, teniendo en cuenta que casi el 50% de la producción mundial de café se procesa para la obtención de café soluble.. En promedio, una tonelada de café verde genera alrededor de 650 kg de CU, y alrededor de 2 kg CU húmedo se obtienen por cada kg de café soluble producido (Pfluger, 1975; Murthy and Naidu, 2012). La eliminación de los subproductos es una preocupación ambiental, por lo tanto, han atraído la atención como fuente de compuestos bioactivos (Ramalakshmi, *et al.*, 2009). El CU es rico en azúcares como manosa y galactosa, junto con una

fracción significativa de proteínas (Mussatto *et al.*, 2011a). La composición química varía de una planta a otra, y dentro de las diferentes partes de la misma planta. También varía dentro de las plantas de diferentes ubicaciones geográficas, edades, el clima y las condiciones del suelo. El conocimiento de las propiedades físicas y químicas conducirá a una mejor comprensión de la aplicación del café (Murthy y Naidu, 2012).

Cuadro 6. Composición química del café utilizado

Componentes	Base seca (g\100g)
Celulosa (glucanos)	8.6
Hemicelulosa	36.7
Arabinanos	1.7
Galactanos	13.8
Mananos	21.2
Proteínas (N x 6.25)	13.6
Grupos acetilo	2.2
Cenizas	1.6
Minerales	(mg\Kg)
Potasio	3549
Fósforo	1475.1
Magnesio	1293.3
Calcio	777.4
Aluminio	279.3
Fierro	118.7
Magnesio	40.1
Cobre	32.3
Zinc	15.1
Azufre	nd
Cromo	nd

nd: no detectable. (Adaptado de Mussatto *et al.*, 2011 a).

De esta manera, el CU ha sido aplicado en la producción de biodiesel (Caetano *et al.*, 2012.), como fuente de azúcares (Mussatto *et al.*, 2011a.), como precursor para la producción de carbón activado (Reffas *et al.*, 2010; Kante *et al.*, 2012; Pappa *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2012), como composta (Preethu *et al.*, 2007), y como absorbente para la eliminación de iones metálicos (Fiol *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008).

Por otro lado los extractos de CU también han sido evaluados por su actividad biológica. Estos han demostrado ser fuente de compuestos con capacidad antioxidante y antitumorale, aunque poseen limitadas acciones anti-inflamatorias y anti-alérgicas (Ramalakshmi *et al.*, 2008). Sus propiedades antioxidantes podrían ser la consecuencia de la presencia de cafeína, trigonelina y ácidos clorogénicos derivados del proceso de la extracción incompleta de la preparación de la bebida (Ramalakshmi *et al.*, 2009).

II.5 Compuestos bioactivos del grano de café y el café utilizado

Como se ha venido mencionando, el café es una de las bebidas más consumidas en todo el mundo con un consumo medio mundial anual de 1.1 kg *per cápita*, llegando a 4.5 kg en los países industrializados (FAO, 2013). Por esta razón, la asociación entre su consumo y el desarrollo de enfermedades crónicas, que pueden ser modulados por el medio ambiente y factores de estilo de vida, se ha descrito en varios estudios epidemiológicos (La Vecchia y Tavani, 2007).

Durante varios años los efectos fisiológicos del café se han centrado en su contenido de cafeína, pero en realidad, el café contiene cientos de compuestos que potencialmente pueden actuar *in vivo*, tales como polifenoles, melanoidinas, fibra dietaria, diterpenos, entre otros. Estos compuestos pueden ejercer su potencial protector contra diversas enfermedades en términos de sus propiedades antimutagénicas (por ejemplo, la hemicelulosa de la fibra insoluble, melanoidinas y polifenoles de alto peso molecular) y propiedades antioxidantes (por ejemplo, ácido clorogénico) (Je *et al.*, 2009).

II.5.1 Polifenoles

De acuerdo a los reportes en la literatura, la actividad antioxidante del café está potencialmente relacionada a su alto contenido de compuestos fenólicos (Cämmerer y Kroh, 2006; Farah y Donangelo, 2006; Santos *et al.*, 2007). Dentro de los compuestos fenólicos encontrados en el café, la clase predominante es la de los ácidos clorogénicos (Paquin, 2009; Farah y Donangelo, 2006). La mayoría de estos compuestos han recibido interés por sus efectos potencialmente protectores en el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes mellitus, cardiovasculares y cáncer (Farah y Donangelo, 2006), e incluso neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Boudet, 2007). En el café, estos compuestos contribuyen en el aroma y sabor del producto final (Rosseti, 2007), siendo los principales determinantes del sabor, además de ser los precursores de los pigmentos característicos en la bebida (Duarte *et al.*, 2005).

En lo que se refiere a la variedad de café, *Coffea robusta* tiene una mayor cantidad de polifenoles que *Coffea arabica* (Cuadro 1), pero su contenido se puede reducir del 60 a 98% por el proceso de tostado claro u oscuro, respectivamente (Ky *et al.*, 2001; Silván *et al.*, 2010).

La Figura 10 muestra el destino cuantitativo del ácido clorogénico y melanoidinas en los granos verdes. Dependiendo de la variedad de café, estos llegan al colon después de consumir una taza de café expresso o filtrado. Aunque la preparación de café expresso produce una bebida más concentrada, los tamaños de las porciones (30 ml para expresso vs 130 ml de café filtrado) es el factor clave que influye en el importe final del ácido clorogénico y melanoidinas presentes en la taza: cuanto mayor sea el volumen, mayor será la ingesta de ácido clorogénico y de melanoidinas (Vitaglione *et al.*, 2012).

La cantidad de ácido clorogénico en la taza tiene un significado importante para la funcionalidad en el colon; de hecho, alrededor del 70% del ácido clorogénico presente en la taza alcanzan el colon. Los estudios de biodisponibilidad en pacientes de colostomía que ingirieren ácido clorogénico puro o proveniente de café muestran que sólo el 30% de los compuestos ingeridos es absorbido por el intestino delgado (Olthof, *et al.*, 2001; Stalmach *et al.*, 2010),

mientras que la parte restante llega al colon, donde puede ser metabolizado por la microbiota colónica (Olthof *et al.*, 2003; Stalmach *et al.*, 2010).

Los dos estudios realizados por Stalmach *et al.*, en 2009 y 2010 demostraron que el colon desempeña un papel fundamental en el metabolismo del ácido clorogénico: el colon es el sitio para la conversión de ácido ferúlico a feruloilglicina y ácido dihidroferulico y para el metabolismo del ácido cafeíco a ácido dihidrocafeíco, que se convierte posteriormente en ácido dihidro (iso) ferúlico.

La capacidad del café y sus compuestos no digeribles para influir en la salud del colon, principalmente, puede pasar a través de la modulación de la microbiota colónica así como de los marcadores de las funciones del intestino, tales como la producción de heces, la frecuencia de evacuación, etc. (Vitaglione *et al.*, 2012).

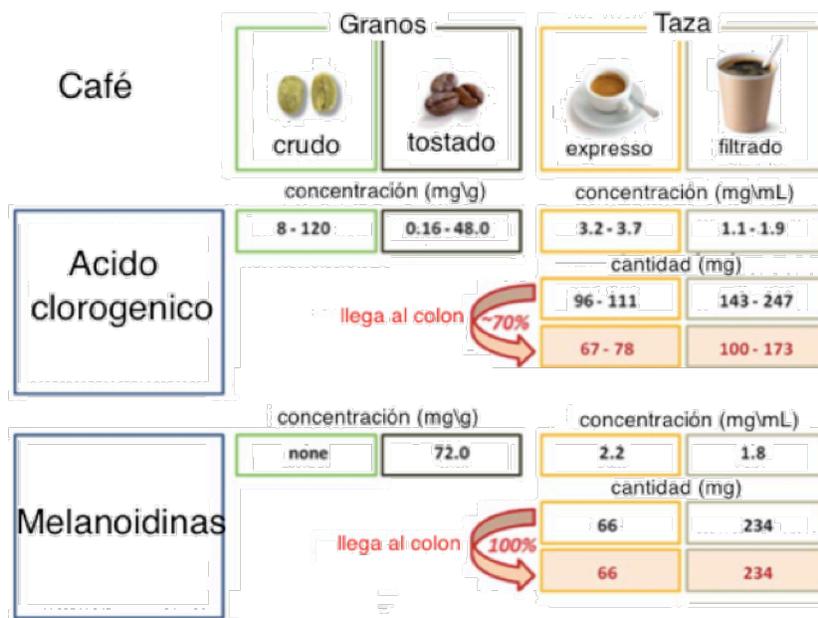


Figura 9. Concentraciones de ácido clorogénico y melanoidinas en café verde y tostado y en tazas de café expresso o filtrado.

* Las cantidades de cada uno de estos componentes con la ingesta de una taza de café y la cantidad probable que llega al colon (Adaptado de Vitaglione *et al.*, 2012).

Aunque estudios *in vitro* han revelado varias propiedades farmacológicas del ácido clorogénico puro tales como la actividad antioxidante (Kono *et al.*, 1997; Vitaglione *et al.*, 2012), capacidad para aumentar la utilización de glucosa hepática (Herling *et al.*, 1998; Johnston *et al.*, 2003), y la inhibición de compuestos mutagénicos y carcinogénicos, (Herling *et al.*, 1998; Johnston *et al.*, 2003), la literatura carece de investigaciones centradas en los efectos directos de los polifenoles del café en este órgano.

Por otra parte, debido al extenso metabolismo del ácido clorogénico, una vez en el colon no está claro cuánta actividad antioxidante *in vivo* contribuye a nivel local y sistémico; en forma de metabolitos circulantes (principalmente compuestos conjugados), a menudo tiene una menor actividad antioxidante que los ácidos clorogénico y cafeico (Iwai *et al.*, 2004).

II.5.2 Fibra antioxidante y melanoidinas

Los residuos del café son también una gran fuente de fibra dietaria, que incluyen celulosa, hemicelulosas, lignina, pectina, gomas y otros polisacáridos. Las fracciones de fibra dietética solubles e insolubles se sabe que confieren una amplia gama de beneficios para la salud, incluida la reducción de los riesgos de enfermedades gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares y obesidad (Figuerola *et al.*, 2005). Entre los residuos de café, la piel plateada contiene una alta cantidad de fibra total (80%), seguido de la cáscara y el café utilizado. Esta fracción también confiere propiedades antioxidantes al café (Murthy y Naidu, 2010a,b).

La principal ventaja de la fibra dietaria de los subproductos agroindustriales, en comparación con otras fuentes alternativas, como los cereales, es su mayor proporción de fibra dietaria soluble (Saura-Calixto, 1998). Las principales características de estos subproductos es que son ricos tanto en fibra dietaria como en compuestos polifenólicos, lo que crea el concepto de “fibra dietaria antioxidante”, haciendo que los mismos tengan mayor preferencia en comparación con otras fuentes de fibra dietaria, debido a la presencia de

compuestos bioactivos (compuestos fenólicos), asociados con propiedades antioxidantes, que contribuyen con beneficios adicionales a la salud.

Además, durante el tostado se da la formación de una fracción de alto peso molecular constituida por melanoidinas de café en un proceso paralelo a la reducción de polifenoles. En este proceso los polisacáridos contenidos en los granos de café verdes, tales como galactomananos y arabinogalactanos, polifenoles, proteínas y aminoácidos libres, están unidos covalentemente entre sí contribuyendo a la formación de melanoidinas del café. El grado de tostado aumenta su complejidad mediante la vinculación de nuevos compuestos de bajo peso molecular a la cadena principal polimérica (Bekedam *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2006). Cuanto más oscuro sea el grado tostado, mayor es la cantidad de melanoidinas presentes en la bebida final, su complejidad estructural y actividad antioxidante (Borrelli *et al.*, 2002; Nunes y Coimbra, 2007; Silván *et al.*, 2010). En cuanto al contenido de melanoidinas en la taza de café, sólo el material soluble en agua debe ser considerado mientras que las melanoidinas insolubles permanecen en el residuo de café utilizado (Vitaglione *et al.*, 2012).

En referencia al contenido de melanoidinas, la separación estructural entre melanoidinas de café “verdadero” y fibra dietética de café constituida por los polisacáridos restantes no derivados después del tostado, es muy difícil (Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2007; Silván *et al.*, 2010), como claramente es explicado por Silván *et al.* (2010), quienes introdujeron el concepto de Maillardización de fibra dietaria del café. Esta coincidencia entre la fibra dietaria y las melanoidinas también existe desde el punto de vista nutricional. De hecho, por un lado las melanoidinas no caen dentro de la definición de fibra dietaria porque no son exactamente “polisacáridos presentes de forma natural en los alimentos crudos”.

Algunos intentos se han hecho para ampliar la definición de fibra dietaria a los otros compuestos no digeribles, tales como las melanoidinas formados tras el procesamiento; sin embargo, la presencia de un resto de proteínas y la incertidumbre de su estructura representa una seria limitación a tener en cuenta sobre su papel fisiológico como fibra dietética. Por otro lado, las melanoidinas de café se puede considerar como una fibra dietética *de facto*: llegan en su forma

intacta al colon y son parcialmente fermentados por los microorganismos del colon (Morales *et al.*, 2012). La cantidad de melanoidinas del café que llegan al colon se ha estimado recientemente en el intervalo de 0.5-2.0 g por día (Fogliano y Morales, 2011), si se considera que 10 g es la ingesta diaria recomendada de fibra dietética soluble y que la mayoría de la gente no puede llegar a este objetivo (Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2007), las melanoidinas de café podrían contribuir significativamente a su ingesta y a la obtención de los beneficios a la salud asociados a este componente alimentario (Vitaglione *et al.*, 2012).

Existe considerable evidencia *in vitro* de que, una vez en el colon, las melanoidinas de café pueden ser fermentadas por los microorganismos del colon. En tres trabajos recientes del mismo grupo de investigación, la degradación de las diferentes fracciones de café, es decir, la fibra dietética soluble y la fracción no digerible de alto peso molecular solubles en etanol, por la microbiota fecal humana, ha sido reportado (Gniechwitz *et al.*, 2007; Gniechwitz *et al.*, 2008; Reichardt *et al.* 2009). Los resultados demostraron que después de 24 h de fermentación: i) se degradó el 85% de carbohidratos totales (arabinogalactanos siendo generalmente menos utilizados que los galactomananos), mientras que sólo el 29% del producto de la reacción de Maillard aislado fue parcialmente degradado o modificado; ii) ácido acético, propiónico y butírico fueron liberados con una alta proporción molar de los ácidos acético y propiónico; iii) las células bacterianas que pertenecen al grupo *Bacteroides-Prevotella* aumentaron en un 60% en la fermentación de la fibra dietética soluble del café y de 2-40 veces dependiendo del peso molecular de la fracción y el grado de tostado (Gniechwitz *et al.*, 2007; Gniechwitz *et al.*, 2008; Reichardt *et al.* 2009).

II.6 Fermentación colónica *in vitro*

La flora bacteriana colónica produce enzimas capaces de digerir carbohidratos que se escapan del proceso de digestión común en el intestino delgado, llevándose a cabo en condiciones anaeróbicas, denominándose fermentación colónica (Roberfroid *et al.*, 1995). Se ha calculado que en el colon pueden habitar cerca de 400 especies de bacterias que producen enzimas y son

capaces de metabolizar diversos tipos de polisacáridos, así como proteínas y grasas (Mateu de Antonio, 2004).

La fibra dietética soluble llega a fermentarse completamente y las celulosas suelen fermentarse en un 50%, pero el resto de las fibras no se fermentan. Durante el proceso de fermentación se genera ATP, metano y ácidos grasos de cadena corta (AGCC): como el ácido acético, propiónico y butírico, entre otros. Algunos de estos AGCC favorecen la proliferación de las bacterias colónicas cuya población puede ser modulada con el tipo y cantidad de sustratos indigeribles presentes en el ecosistema intestinal (oligosacáridos no digeribles, almidón resistente y componentes hidrocarbonados de la fibra dietética) (Goñi y Carron, 2001).

Los factores que influyen en la fermentación son múltiples: la composición y la cantidad de fibra, el tiempo de su consumo, el tiempo de tránsito colónico, así como la composición y cantidad de microflora bacteriana, entre otros. La producción total de AGCC es de aproximadamente 220 a 270 mmol/día en una dieta de tipo occidental, equivalente a la fermentación de 20 – 70 g de sustrato/día (Mateu de Antonio, 2004).

Un gran número de compuestos pueden degradarse simultáneamente en diferente magnitud y, tanto sustrato como producto originados, pueden influenciar en el metabolismo y actividad enzimática de la flora ya existente. La fermentación de cada sustrato no se considera un hecho aislado, debido a que varios sustratos puedan ser degradados simultáneamente por la acción de diferentes especies bacterianas y es frecuente la existencia de interacciones sinérgicas y competitivas entre diferentes microorganismos. Los productos originados pueden ser utilizados por otras especies y provocar la inhibición o estimulación del crecimiento (Goñi y Carrón, 2001).

Dada la importancia del potencial de los productos de la fermentación de los compuestos no digeribles del alimento por la población microbiana a nivel de colon, se han propuesto simulaciones a nivel de laboratorio como alternativas *in vitro* que permitan estimar las características de la fermentación microbiana (Fondevilla, 2006).

Enfoques actuales para determinar la fermentabilidad bacteriana son los sistemas de fermentación *in vitro* con cultivos estáticos discontinuos conteniendo una suspensión fecal, o cultivos definidos incubados anaeróbicamente a 37 °C en un corto periodo (Wang y Gibson, 1993). Esta metodología es un procedimiento rápido, se emplean volúmenes pequeños, pero solo puede ser empleado en experimentos de curso corto al ser limitante el sustrato (Gibson y Furler, 2000).

II.7 Producción de ácidos grasos de cadena corta

Durante el proceso de la fermentación colónica a partir de la fibra y compuestos asociados se genera ATP, AGCC (como ácido acético, propiónico y butírico, entre otros), además de otros compuestos, y se incrementa la proliferación de las bacterias colónicas, principalmente las bifidobacterias (Goñi y Carrón, 2001).

Existen marcadas diferencias regionales en cuanto a las concentraciones intestinales de AGCC. El proceso de fermentación tiene lugar principalmente en el primer tramo del intestino grueso, debido a la alta densidad bacteriana y a que recibe el mayor aporte de sustratos del intestino delgado; por tanto, es en el ciego y en el colon ascendente donde se encuentra la mayor concentración del AGCC (142 mM), que va disminuyendo progresivamente hacia el colon distal (96 mM) (Cummings y Macfarlane, 1991; Macfarlane et al., 1992). Debido a que los AGCC son generados a nivel de colon por las bacterias de esta zona, una medida indirecta de la formación de éstos es el pH en el contenido colónico. Al generarse la fermentación de la fibra y otros compuestos, el pH disminuye induciendo acidificación del medio, estas condiciones son apropiadas para aumentar el desarrollo de bacterias como las *Bifidobacterias* y *Lactobacterias* (Kulkarni y Reddy, 1994).

El ácido acético es un sustrato muy útil para el músculo (Casanueva y Bourges, 2001). El ácido butírico y parte del ácido propiónico, más del 80%, son metabolizados por la mucosa colónica como principal fuente de energía anaeróbica (Emenaker y Basson, 2001). El ácido propiónico favorece el correcto manejo de las sales biliares y se ha sugerido que inhibe la síntesis hepática del

colesterol, disminuyendo los niveles de lípidos sanguíneos relacionados con las enfermedades cardiovasculares (Finley *et al.*, 2007).

II.7.1 Inflamación y ácidos grasos de cadena corta

Como se mencionó anteriormente, los AGCC son los principales subproductos de la fermentación de la fibra en el tracto gastrointestinal y han atraído una atención considerable en el mantenimiento de la homeostasis del intestino, ya que pueden prevenir la inflamación y tienen efectos anti-proliferativos y apoptóticos en las células de cáncer de colon (Säemann *et al.*, 2000; Millard *et al.*, 2002; Klampfer *et al.*, 2003).

Varios grupos han informado de los efectos anti-inflamatorios de ácido butírico. En particular, se ha informado que el ácido butírico tiene un efecto anti-inflamatorio prominente en la colitis mediante la modulación de la IL-8, la actividad de la proteína inhibidora de macrófagos 2 (MIP-2) y la supresión de la actividad de NF- κ B (Ohno *et al.*, 1997; Inan *et al.*, 2000). Además, mostró efectos anti-inflamatorios en monocitos humanos mediante la inhibición de IL-12 y regulación positiva en la producción de IL-10 (Säemann *et al.*, 2000). En células RAW 264.7 (macrófagos murinos) estimuladas con LPS, una alta concentración de ácido butírico redujo significativamente el nivel de la producción de NO y previno la activación de NF- κ B mediante la estabilización de I κ B α y I κ B β (Chakravortty *et al.*, 2000). Además, enemas de ácido butírico o una dieta alta en fibra que aumente la concentración de ácido butírico en el colon y han demostrado ser eficaces en el tratamiento de inflamación de la mucosa en seres humanos así como en modelos animales de colitis (Butzner *et al.*, 1996; Kanauchi, 1999).

Hamer *et al.* (2009) evaluaron los efectos de diferentes AGCC (acético, propiónico, butírico, valérico y caproico) sobre la liberación de citocinas utilizando un sistema de co-cultivo combinando células Caco-2 de cáncer de colon con cultivos de sangre entera humana y se encontró que cada AGCC evaluado, excepto el acético, disminuyeron la producción de citoquinas proinflamatorias. Vinolo *et al.* (2010) informaron que el ácido propiónico también podría disminuir TNF- α , CINC-2 $\alpha\beta$, y la producción de óxido nítrico (NO) en neutrófilos estimulados por lipopolisacárido (LPS) . Además, Tedelind *et al.* (2007) informaron que los

ácidos acético, propiónico y butírico a 30 mmol/L disminuyeron la liberación de TNF- α a partir de neutrófilos estimulados con LPS.

Además de estas diversas actividades, también se informó de la función del ácido butírico como inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), la cual regula la transcripción de genes en el contexto de la estructura de la cromatina (Chen *et al.*, 2003; Davie, 2003). Basado en su función como inhibidor de HDAC, el ácido butírico se ha desarrollado como fármaco contra el cáncer y actualmente se encuentran en fase I de evaluación clínica (Thibault *et al.*, 1996; Hinnebusch *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2007). Los AGCC aromáticos tales como el fenilbutirato (PB) y fenilacetato de metilo (PA) han mostrado actividad antitumoral en células de carcinoma colorrectal, la cual fue mediada a través de la activación del receptor de peroxisoma-proliferador activado- γ (PPAR- γ) (Samid *et al.*, 2000). También se ha reportado que estos ácidos regulan el crecimiento, la diferenciación y proliferación celular, así como la inducción en la detención del ciclo celular y la apoptosis (Heerdt *et al.*, 1997; Klampfer *et al.*, 2003).

II.7.2 Inflamación y cáncer de colon

Reportes científicos avalan que la inflamación es una de las características importantes de varias enfermedades. En primer lugar, la inflamación puede ser una imagen de la presencia de una lesión aguda o daño al tejido ocasionada por lesiones físicas, agentes tóxicos y biológicos. En segundo lugar en las últimas décadas se ha incrementado el interés de la inflamación por su relación con el desarrollo de enfermedades no transmisibles (Prasad *et al.*, 2012). Hay varios biomarcadores en un proceso inflamatorio, tales como, la interleucina-1 β (IL-1 β), IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α y la proteína C-reactiva (PCR), ya que un aumento en su concentración es efecto de la respuesta inmune inespecífica (Galas *et al.*, 2014).

La inflamación crónica representa una base patológica importante para la mayoría de tumores malignos humanos. El papel de la inflamación en la carcinogénesis fue propuesto por Rudolf Virchow en 1863, cuando se dio cuenta de la presencia de leucocitos en los tejidos neoplásicos (Balkwill y Montavini,

2001). Desde principios de lo informado por Virchow donde se fundamenta la relación entre la inflamación y el cáncer, la acumulación de datos ha apoyado que los tumores se pueden originar en los sitios de infección o inflamación crónica (Balkwill y Mantovani, 2001; Mueller y Fusenig, 2004; Kumer *et al.*, 2008); se considera que proximadamente, el 25% de todos los tipos de cáncer son de alguna manera asociada con la infección y la inflamación crónica (Perwez y Harris, 2007). Aunque la inflamación actúa como una defensa del huésped contra la infección de adaptación o lesión y es principalmente un proceso auto-limitante, una resolución inadecuada de las respuestas inflamatorias a menudo conduce a diversas enfermedades crónicas, incluyendo cáncer (Jackson y Evers, 2006; Schottenfeld y Beebe-Dimmer, 2006).

Múltiples evidencias en estudios de laboratorio y basados en poblaciones sugieren que la carcinogénesis de órganos específicos está parcialmente asociada con un estado inflamatorio local persistente (O'Byrne y Dalglish, 2001; Itzkowitz y Yio, 2004; Nelson, 2004; Whitcomb , 2004). Por ejemplo los pacientes que sufren de trastornos inflamatorios del intestino, tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon (Seril *et al.*, 2003; Itzkowitz and Yio, 2004; Herszenyi *et al.*, 2007), mientras que la gestión de la colitis con fármacos anti-inflamatorios reduce este riesgo (Eaden *et al.*, 2000).

Diversas células inflamatorias inmunes innatas (por ejemplo, mastocitos, neutrófilos, leucocitos, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células dendríticas, los fagocitos y células asesinas naturales) a menudo son reclutadas en el sitio de infección o inflamación. En respuesta a los estímulos proinflamatorios, activan las células inmunes/inflamatorias generando especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), que pueden funcionar como efectores químicos en la carcinogénesis impulsada por la inflamación (Kumar *et al.*, 2008).

Por lo tanto, uno de los posibles mecanismos por los que la inflamación crónica puede iniciar la tumorigénesis es la generación de ERO y/o ERN en el tejido inflamado y posterior daño del ADN que conduce a la activación de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores, entre ellos *Ras* y

p53, mutados en muchos tipos de cáncer humano (Rajalingam *et al.*, 2007; Strano *et al.*, 2007).

Además el NO, una de las ERN, juega un papel importante en la carcinogénesis asociada con la inflamación mediante la modificación directa de ADN y la inactivación de las enzimas de reparación del ADN (Jaiswal *et al.*, 2000). Mientras que el peroxinitrito, un producto formado por una reacción entre el radical NO y el anión superóxido, provoca daños en el ADN mediante la formación de 8-nitroguanine (Yermilov *et al.*, 1995; Ohshima *et al.*, 2006), que es un posible biomarcador de la inflamación asociada a cáncer (Kawanishi and Hiraku, 2006). Por ejemplo, se ha demostrado que el NO hiperfosforila e inactiva la proteína del retinoblastoma, (Rb) lo que resulta en un aumento de la proliferación de células de cáncer de colon humano (Ying *et al.*, 2007).

La inflamación crónica está implicada en todas las etapas de la carcinogénesis, es decir, la iniciación, promoción y progresión (Kumer *et al.*, 2008). En un tejido inflamado persistentemente, la generación excesiva de ROS puede causar inestabilidad genómica que conduce a la iniciación del cáncer (Lu *et al.*, 2006; Perwez y Harris, 2007). Una célula iniciada solo se somete a la proliferación para producir un clon de células mutadas que forman la masa premaligna, el evento denomina generalmente la promoción de tumores. Algunas de las células preneoplásicas se encuentran con mutaciones adicionales y se convierten en malignas, y a este proceso se conoce como la progresión tumoral (Kumer *et al.*, 2008). La proliferación de las células tumorales, la acogida de sus células del estroma vecinas y células inmunes/inflamatorias que infiltran el tumor, crean un microambiente tumoral que refleja un estado inflamatorio persistente (Balkwill y Mantovani, 2001; Ariztia *et al.*, 2006). Dentro del microambiente del tumor, diversos mediadores proinflamatorios participan en un complejo de señalización inflamatorio que facilita la extravasación de las células tumorales a través del estroma, fomentando así la progresión tumoral (Balkwill y Mantovani, 2001; Ariztia *et al.*, 2006) (Figura 10).

La inflamación actúa como un regulador clave de la promoción y progresión del tumor por varios mecanismos incluyendo la aceleración de la

progresión del ciclo celular y la proliferación celular, la evasión de la muerte celular apoptótica, y la estimulación de la neovascularización del tumor (Surh *et al.*, 2001; Philip *et al.*, 2004). Entre los principales actores moleculares implicados en el eje inflamación-cáncer, se encuentran las citocinas, quimocinas, COX-2, prostaglandinas, receptores prostanoideos (EP 1-4), iNOS, NO y NF- κ B (Kumer *et al.*, 2008).

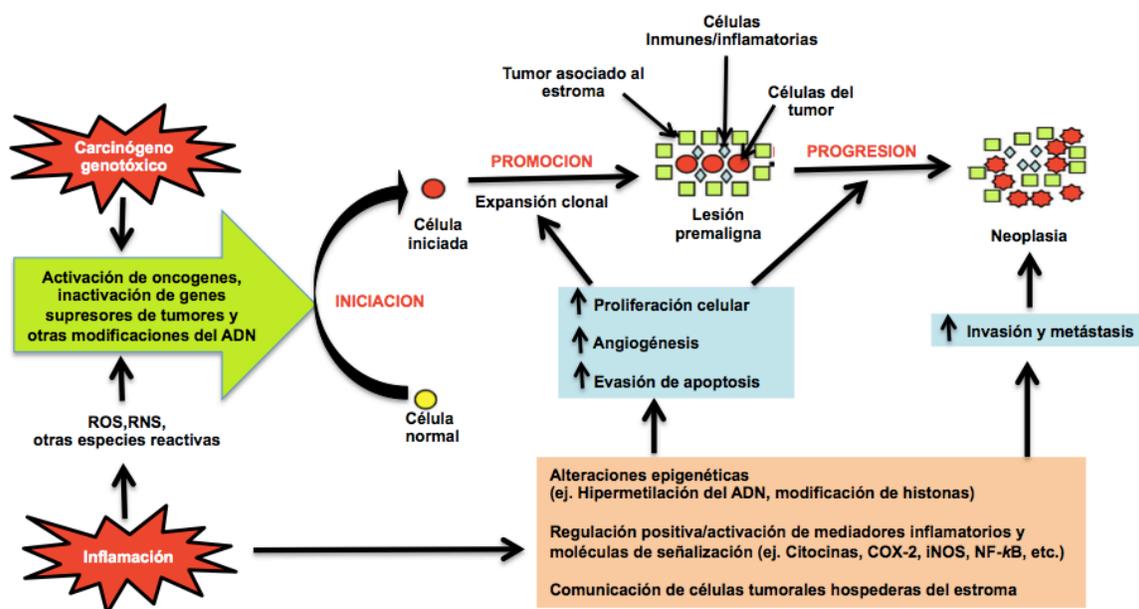


Figura 10. Un viaje con el cáncer: la inflamación como la fuerza impulsora.

(Adaptado de Kumet *et al.*, 2008)

II.8 Macrófagos estimulados con lipopolisacárido como modelo celular de inflamación *in vitro*.

Los macrófagos son componentes importantes del sistema inmunitario de los mamíferos, y juegan un papel clave al proporcionar una defensa inmediata contra los agentes externos antes de la migración de leucocitos y la producción de diversos mediadores pro-inflamatorios, incluyendo el NO de los radicales libres de corta duración (Moncada *et al.*, 1991). Los LPS, son componentes de las paredes

celulares de las bacterias gram-negativas y son uno de los más potentes activadores de macrófagos (Nicholas *et al.*, 2007).

Los macrófagos una vez activados, secretan NO y citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Duffield, 2003), así como proteasas e inducen apoptosis en células residentes del estroma y parénquima. Además, los macrófagos pueden eliminar las células apoptóticas por fagocitosis y secretar mediadores antiinflamatorios (IL-10), factores de crecimiento (Sergij *et al.*, 1999; Duffield, 2003), lo que conduce a la cicatrización y reparación de heridas (Goerdts *et al.*, 1999; Duffield, 2003). Por lo tanto, la modulación de la citotoxicidad mediada por macrófagos ha sido probada como una estrategia terapéutica para diversas enfermedades inflamatorias.

Es evidente la idoneidad de los sistemas *in vitro* como modelos celulares para la identificación de compuestos bioactivos de alimentos vegetales y el estudio de sus mecanismos de acción a nivel de células y tejidos. Los modelos celulares presentan una serie de ventajas frente a otros modelos experimentales con animales, entre las que se incluyen: un menor costo económico, la posibilidad de crio-conservación de las líneas celulares durante largos periodos de tiempo, la capacidad para desarrollar estudios a nivel molecular o la facilidad de control de las condiciones experimentales (O'Brien *et al.*, 2000; Liu y Finley, 2005).

Es por ello que los macrófagos son considerados buenos modelos celulares, ya que estos modelos han demostrado ser una herramienta útil en investigación nutricional así como en investigación encaminada a la validación de alimentos funcionales, al proporcionar información valiosa sobre los mecanismos de acción y la eficacia protectora de sustancias bioactivas puras, extractos de alimentos y/o productos de su metabolismo (O'Brien *et al.*, 2000; Liu y Finley, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

La industria del café libera enormes cantidades de subproductos, los cuales son ricos en hidratos de carbono, proteínas, pectinas y compuestos bioactivos, como los polifenoles. Con la alta producción de café proyectada para los próximos años, hay una necesidad imperativa de equilibrar esta producción con la utilización adecuada de dichos subproductos, por lo que resulta interesante encontrar aplicaciones para estos. Los intentos recientes se han centrado en su aplicación como sustrato en bioprocesos y compostaje, y no tanto relacionado a la industria alimentaria.

Dentro de estos subproductos, el café utilizado (CU) es el principal residuo de la industria del café; éste es obtenido en grandes cantidades durante el tratamiento de café tostado en polvo con agua caliente o vapor para la preparación de café instantáneo. En promedio una tonelada de café verde genera alrededor de 650 kg de café utilizado, y alrededor de 2 kg de café utilizado húmedo se obtienen por cada kg de café soluble producido, residuo que por lo general se descarga al medio ambiente, siendo una considerable fuente de contaminación.

Aunado a lo anterior, desde hace varios años los efectos fisiológicos del café han sido reportados por varios autores, con poca atención en los componentes bioactivos, que permanecen en el café utilizado tales como el ácido clorogénico, la fibra dietaria, e incluso melanoidinas, conocidos en conjunto como fibra antioxidante, y que podrían ayudar a combatir el estado inflamatorio al ser esta fibra antioxidante fermentada por la microflora colónica produciendo principalmente AGCC como el ácido acético, propiónico y butírico. Estos AGCC han atraído una atención por su papel positivo en el mantenimiento de la homeostasis del intestino, ya que pueden prevenir la inflamación y tienen efectos anti-proliferativos y apoptóticos en las células de cáncer de colon. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (*Coffea Arabica* L.) utilizado y la actividad de los productos de su fermentación colónica *in vitro* sobre un modelo de inflamación utilizando macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

Los resultados de este trabajo permitirán proponer a este residuo para futuras aplicaciones en la industria de alimentos, como ingrediente nutraceútico, y a la vez reducir la contaminación ambiental que éste genera hoy en día.

IV. HIPÓTESIS

El residuo de café utilizado es fuente de compuestos bioactivos, tales como polifenoles, fibra dietaria y melanoidinas, entre otros, en conjunto conocidos como fibra antioxidante. Fibra que puede fermentarse *in vitro* y, cuyo producto de fermentación, pueden inhibir el estado inflamatorio en macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Determinar la composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (*Coffea Arabica* L.) utilizado y la actividad de los productos de su fermentación colónica *in vitro* sobre un modelo de inflamación.

V.2 Objetivos específicos

1. Comparar el grano de café con dos diferentes grados de tostado y sus respectivos residuos sólidos (café utilizado) en su composición química y nutracéutica.
2. Simular mediante un sistema *in vitro* la digestión del residuo sólido (café utilizado) para la obtención de su fracción no digerible (FND).
3. Evaluar el extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del residuo sólido (café utilizado) sobre un modelo de inflamación de macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados con lipopolisacáridos.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Materiales

VI.1.1 Compuestos químicos

Los reactivos y solventes fueron adquiridos de la marca J. T. Baker. El medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle médium (DMEM) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EU). El suero fetal bovino (SFB), los antibióticos y antimicóticos fueron de la marca Gibco (Gibco, Grand Island, NY). Proteasa, α -amilasa, amilogucosidasa, pepsina, pancreatina y bilis bovina fueron obtenidas de Sigma (Sigma-Aldrich, Canada Ltd).

VI.1.2 Materia Prima

Se trabajó con granos de café tostados y molidos de la marca Tuytz café ecogourmet, es decir, el café fue cultivado sin usar agroquímicos y dada las propiedades del suelo, tierra volcánica, le otorga propiedades organolépticas como aroma y sabor, haciéndolo más agradable al paladar, especialmente debido a los minerales presentes en el suelo.

Dicho café se utilizó con dos grados de tostado el americano que equivale a un tostado medio y el francés que equivale a un tostado oscuro, ambos pertenecientes a la variedad arábica, los cuales fueron cultivados en el estado de Chiapas, México, y se adquirieron directamente con el fabricante; éstos se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Los residuos de café se obtuvieron a partir de los granos de café con diferente tostado, mencionados anteriormente, como se describe a continuación, se tomaron 7 g de cada tipo de café (por separado) por cada 100 mL de agua y se preparó la bebida de café en una cafetera casera; los residuos de café utilizado se obtuvieron del filtro de la cafetera; posteriormente cada residuo se secó a 60 °C por 24 h y se almacenó protegiéndolos de la luz en refrigeración hasta su uso.

VI.1.3 Material biológico

Se utilizaron 6 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 250-300 g, los cuales se adquirieron del bioterio de la UNAM, Campus Juriquilla.

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EU).

VI.2 Métodos

VI.2.1 Composición proximal

La composición proximal (proteína total, lípidos, cenizas y humedad) en el grano de café, bebida de café, el residuo de café denominado café utilizado y su fracción no digerible (FND) se realizó de acuerdo a las metodologías descritas para cada determinación en la AOAC (2002). El contenido de carbohidratos (%) se obtuvo por diferencia de los componentes.

VI.2.1.1 Determinación de lípidos

Los lípidos totales se determinaron por el método 920.39 (extracto etéreo) descrito en la AOAC (2002). Brevemente, en un cartucho de celulosa se colocaron 5 g de muestra, se cubrieron con algodón y se colocaron en el compartimento de extracción de Soxhlet, donde el matraz (a peso constante) contuvo 2/3 partes de su volumen de éter de petróleo. Se mantuvo la extracción a un flujo de 10 reflujos/h durante 5 h. Posteriormente, se destiló el solvente, se secó el matraz en estufa con la finalidad de retirar la humedad y residuos de solvente. Se pesó el matraz.

Cálculos:

$$\% \text{ grasa} = (P_f - P_o) / M * 100$$

donde:

P_f = peso final del matraz,

P_o = peso inicial del matraz,

M = peso de la muestra.

VI.2.1.2 Determinación de proteína total

La proteína total se determinó empleando el método 920.105 (Kjeldhal) descrito en la AOAC (2002). Brevemente, en un matraz de digestión tipo Kjeldhal se colocaron 2 g de muestra desgrasada, 3.5 g de sulfato de sodio, 0.4 g de sulfato de cobre y se adicionaron 10 mL de ácido sulfúrico. Se colocó el matraz en el digestor durante una hora hasta el cambio de color de la muestra a verde claro.

Se atemperó y se colocó el tubo en el destilador adicionando agua e hidróxido de sodio al 40%. Se recibió el destilado en un matraz con 25 mL de ácido bórico y se emplearon como indicadores rojo de metilo y verde de bromocresol. Se tituló con ácido clorhídrico 0.08 N. Finalmente, se determinó el porcentaje nitrógeno (%N) total multiplicado por un factor de conversión equivalente al % de proteína presente en el alimento.

Cálculos:

$$\% N = (A - B) * C * D * 100$$
$$\% P = \% N (6.25)$$

donde:

A = mL HCl usados en la titulación de la muestra,

B = mL HCl usados en la titulación del blanco,

C = meq N₂ 0.014,

D = normalidad del ácido,

M = peso de la muestra.

VI.2.1.3 Determinación de humedad

La humedad se determinó por el método 925.23 descrito en la AOAC (2002). Brevemente, en una cápsula de porcelana a peso constante, se pesaron exactamente 5 g de muestra, posteriormente se introdujeron a la estufa a 100 °C durante 30 min. Se enfriaron en desecador y se pesaron.

Cálculos:

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

donde:

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

W2 = peso final de la cápsula + muestra.

VI.2.1.4 Determinación de cenizas

El contenido de cenizas en las muestras se determinó por el método 945.46 descrito en la AOAC (2002). Se pesó 1 g de muestra en un crisol, se puso previamente a peso constante, se sometió a calcinación en una mufla a 550 – 600 °C durante 3 h. Se enfrió en desecador y se pesó.

Cálculos:

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

donde:

W1 = peso constante del crisol

M1 = peso muestra

M2 = peso crisol + cenizas.

VI.2.2 Determinación de fibra total

VI.2.2.1 Fibra insoluble

Se siguió la metodología establecida por Shiga *et al.*, (2003). Brevemente, se pulverizó y desgrasó la muestra, se adicionaron 50 mL de buffer de fosfato 0.08 mmol a pH 6, se adicionaron también 100 µL de α-amilasa. El frasco fue protegido de la luz, se incubó en baño María a 95°C por 30 min, se agitó cada 5 mn y se ajustó el pH a 7.5 con la muestra atemperada. Se adicionaron 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 la muestra atemperada. Posteriormente se adicionaron 300 µL de amiloglucosidasa y se incubó por 30 min a 60°C con agitación continua. Después de incubar se filtró con papel Whatman No. 4 previamente pesado, y se realizaron 2 lavados con 15 mL agua a 60°C, 2 lavados con 15 mL de etanol al 80%. Se llevó a peso constante el filtro a 60°C por 24 h, finalmente se pesó. La fibra insoluble fue lo que quede en el filtro.

VI.2.2.2 Fibra soluble

De la prueba anterior, se conservó el residuo del filtrado, y se adicionó un volumen igual de etanol al 80% y se dejó en reposo por 12 h. Se filtró en papel Whatman No. 42 previamente pesado, se hicieron 2 lavados con 15 mL de etanol al 80% y 2 con 15 mL de acetona. Se dejó secar el papel filtro por 24 h a 60°C. Se registró el peso.

VI.2.2.3 Almidón resistente

El contenido de almidón resistente se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Saura-Calixto *et al.*, (1993) y Shiga *et al.*, (2003). Brevemente, se utilizaron la fracción insoluble de los pasos anteriores, se raspó el filtro hasta obtener 100 mg. Se adicionaron 6 mL de KOH 2M en agitación continua por 30 min. Se agregaron 3 mL de buffer de acetato de sodio (0.4 M, pH 4.73) y se ajustó a pH 4.75 y se adicionaron 60 µL de amilogucosidasa, se mezclaron e incubaron a 60°C por 30 min con agitación continua.

Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 15 min, la pastilla se lavó por lo menos una vez con agua destilada, el agua de lavado se aforó a 100 mL. La glucosa se cuantificó colorimétricamente y se calculó el contenido de almidón resistente, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Almidón resistente} = \frac{\text{glucosa } (\mu\text{g/mL}) \times \text{Volumen} \times \text{Dilución} \times 100 \times 0.9}{1000 \times \text{peso de la muestra (mg)}}$$

VI.2.3 Determinación de compuestos fenólicos

VI.2.3.1 Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Pavlovic' *et al.* (2013) con ligeras modificaciones. Un gramo de muestra se suspendió en 9 mL de etanol al 20%, se sometió a extracción por microondas usando un microondas convencional (LG, modelo MS-1145KYL); las muestras se calentaron por 20 seg con una potencia de 80 watts, se esperó a que la muestra se enfriará y se sometió a una segunda extracción con las condiciones mencionadas anteriormente. Una vez fríos los extractos se centrifugaron a 5000

rpm por 10 min 4°C. Se tomó el sobrenadante, el cual fue utilizado para las siguientes pruebas.

VI.2.3.2 Cuantificación de flavonoides

Los flavonoides se cuantificaron en las diferentes muestras de café (granos, bebida, residuo y FND), se siguió la metodología de Oomah *et al.* (2005) con una adaptación a microplaca, donde a 50 µL del extracto etanólico se le adicionaron 180 µL de metanol y 20 µL de solución 2-aminoetil-difenilborato al 10%. Se tomó lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 404 nm en un MULTISKAN. Se empleó rutina para la realización de la curva estándar en una concentración de 0–50 mg/mL, la cual se preparó en metanol al 80%. La concentración de flavonoides fue expresada como mg equivalentes de rutina/g de muestra.

VI.2.3.3 Cuantificación de taninos condensados

La cuantificación de taninos condensados se determinó en las diferentes muestras de café (granos, CU) de acuerdo a la metodología de Feregrino-Pérez *et al.*, (2008). Brevemente, se adicionaron 200 µL del reactivo de vainillina-HCl (1:1) (vainillina 1%-HCl 4%) de manera dosificada de 50 µL hasta completar los 200 µL, a 50 µL del extracto etanólico de la muestra y se leyó la microplaca a una longitud de onda de 540 nm en un MULTISKAN. Se realizó el experimento por triplicado de forma independiente.

También se hizo una curva de calibración de (+)-catequina en un intervalo de concentración de 0–1 mg/mL. Se empleó como blanco la muestra sin la adición de la de vainillina, para corregir interferencias potenciales de los pigmentos naturales del café. La concentración de taninos condensados se expresó como mg equivalentes de (+)-catequina/g muestra.

VI.2.3.4 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo por la técnica propuesta por Singleton y Rossi, (1965). Se tomaron 500µl de extracto etanólico,

enseguida se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10), la reacción se neutralizó con NaCO_3 (60 g/L), se mantuvo en reposo por 2 horas procurando evitar el contacto con la luz. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro (UV-visible, Perkin-Elmer Lambda 40, Software UV Win Lab v.2. 85. 04, 2000) a una longitud de onda de 760 nm. Se realizó una comparación de los resultados obtenidos con una curva de calibración de ácido gálico (0-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El contenido de fenoles totales se expresará como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

VI.2.4. Cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD

Estas determinaciones de llevarón a cabo a partir del extracto etanólico obtenido anteriormente a partir de las diferentes muestras evaluadas, bajo la metodología de Ramírez-Jiménez *et al.*, (2014) . Donde dicho extracto fue filtrado e inyectado bajo las siguientes condiciones: se utilizó cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) el análisis se llevó a cabo en un sistema HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, 4, 6 x 250 mm, 5,0 micras). La columna fue controlada por termostato a $35\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,6$ y la tasa de flujo se ajustó a 1 mL/min. La fase móvil consistió de dos disolventes. El disolvente A fue agua ajustada con ácido acético al 1% y el disolvente B fue acetonitrilo. Un gradiente lineal se utilizó como se describe a continuación: se mantuvo una concentración del disolvente A del 80-83% durante 7 min, de 83-60% durante 5 min, de 60-50% durante 1 min y finalmente 50-85% durante 2 min. La detección se realizó a 280 nm con una velocidad de adquisición de 1 s. Se inyectó un volumen de 20 μL y se analizaron las muestras por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método de estándar externo con los estándares comerciales de cafeína, (+)-catequina, rutina, quercetina y los ácidos clorogénico, cafeico, p-cumárico, ferúlico y gálico.

VI.2.5 Determinación de capacidad antioxidante

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

VI.2.5.1 Capacidad antioxidante método ABTS

La determinación de actividad antioxidante 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 7mmol de ABTS y una solución de $K_2S_2O_8$ 140 mmol, se mezclaron 5 mL y 88 μ L respectivamente cuidando de no exponerlo a la luz durante 12 h, esperando la generación del radical. 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 leyó a una longitud de onda de 734 nm, esperando valores entre 0.7 y 1 de absorbancia.

Se adicionaron a una microplaca de 96 pozos, 20 μ L del extracto etanólico y un control con solo 20 μ L metanol. Se adicionaron 230 μ L de ABTS a cada pozo. Lo anterior se llevó a cabo por triplicado. La lectura de la placa se realizó en un lector de Elisa (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices). La placa se mantuvo cubierta en la obscuridad y a una temperatura de 27 °C.

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.

VI.2.5.2 Capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH

La capacidad antioxidante también se midió utilizando el ensayo de decoloración 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) se llevó a cabo de acuerdo a la técnica propuesta por Fukumoto and Mazza, (2000) adaptado a microplaca. Se añadieron 20 μ L de extracto etanólico y 200 μ L de solución DPPH en una microplaca de 96 pozos. Se preparó un control de 20 μ L de metanol y 200 μ L de DPPH. Las muestras se prepararon por triplicado y se leyeron cada 10 min

durante 90 min a una longitud de onda de 540 nm en un lector de Elisa (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices). La placa se mantuvo cubierta en la oscuridad y a temperatura ambiente entre lecturas.

Se elaboró una curva de calibración de trolox (0-800 μ M). Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalentes de trolox (TEAC) en μ mol equivalentes de trolox /g de muestra.

VI.2.6 Digestión gastrointestinal *in vitro*

En esta parte se simuló todo el proceso digestivo (desde la boca hasta su fermentación en el colón) del café utilizado con diferentes grado de tostado. A continuación se describirá la metodología. Además se incluyó la participación de sujetos sanos y se utilizaron intestinos de rata, por lo que el protocolo fue analizado y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, en Abril, 2014 (Anexo 1). A continuación se describe la metodología por etapas.

VI.2.6.1 Simulación de las condiciones de la boca

Para esta parte se siguió la técnica descrita por Granfeldt *et al.*, (1992), con ligeras modificaciones como se describe a continuación: se reunieron 4 voluntarios sanos, los cuales debieron consumir su último alimento al menos 90 minutos antes del inicio del ensayo. Se les pidió enjuagarse la boca con agua justo antes de masticar la muestra.

Los 4 voluntarios masticaron 1 g de muestra (café utilizado) 15 veces, durante 15 seg, descargando el contenido en un vaso de precipitados conteniendo 5mL de agua destilada. Inmediatamente después, cada sujeto se enjuagó la boca por 60 seg con otros 5 mL de agua destilada, depositando el líquido en el vaso anterior. Posteriormente, se mezclaron las suspensiones de cada muestra en un solo vaso, para proceder al siguiente paso. Por otro lado, también se preparó un blanco en el cual se utilizó solo agua destilada en lugar de muestra y se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

VI.2.6.2 Simulación de las condiciones del estómago

En esta parte se siguió la metodología descrita por Stein *et al.*, (2011) en donde a 10 mL de la suspensión anterior, se les añadió una solución de HCl 2 N en cantidad necesaria para bajar el pH a 2.0. La pepsina (0.055 g, Sigma) se disolvió en 0.94 mL de HCl 20 mmol y se añadió a cada muestra para ser incubadas con agitación durante 2 h a 37°C.

VI.2.6.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado

La simulación del intestino delgado se siguió adaptando las metodologías propuestas por Stein *et al.*, (2011) y Ma *et al.*, (2012), con algunas modificaciones, en donde un extracto intestinal se preparó por disolución de 3 mg de hiel de buey mas 2.6 mg de pancreatina, los cuales fueron disueltos en 5 mL de solución tampón de Krebs-Ringer [conteniendo 118 mmol NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mmol MgSO₄, 1.2 mmol KH₂PO₄, 25 mmol NaHCO₃, 11 mmol glucosa y 2.5 mmol CaCl₂, pH 6.8 (preparar 30 min antes de utilizarse)]. 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.

VI.2.6.3.1 Técnica del saco intestinal invertido utilizando ratas

El saco se preparó siguiendo la metodología descrita por Patil *et al.*, (2010).

VI.2.6.3.1.1 Manejo de los animales

Para llevar a cabo esta técnica se emplearon 6 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (UNAM, Campus Juriquilla) con un peso entre 250 y 300 g, clínicamente sanas, al llegar se verificó el sexo de las ratas, el peso y la constancia de salud. Las ratas se mantuvieron solamente por 24 h en el bioterio de la Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se alojaron 2 ratas por jaula (187 cm² de ancho y 18 cm de alto por rata de 100-300 g) de acero inoxidable, las cuales permitieron la entrada de aire y

luz y tuvieron un clip a prueba de escape. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10\%$), ciclos día/noche de 12/12 h, temperatura adecuada (23 ± 2 °C), condiciones aceptables de limpieza y ventilación constante (NOM-062-200-199). Se alimentaron con alimento comercial Rodent Lab Chow 5001 (Nupec, Querétaro) y agua potable *ad libitu*. Al faltar 16 h para el sacrificio se retiró el alimento y solo se dejó el agua, ya que esta técnica de saco invertido requiere que los animales tengan un ayuno de 16 h.

VI.2.6.3.1.2 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal invertido

Para el sacrificio, las ratas fueron anestesiadas (pentobarbital 60 mg/kg) y el intestino fue expuesto por una incisión abdominal en la línea media, posteriormente un segmento de 20-25 cm del yeyuno proximal de cada rata fue escindido y se colocó en la solución tampón de Krebs-Ringer gasificado con CO₂ y mantenida a 37°C. El segmento de intestino removido se lavó con la misma solución tampón para retirar residuos, y posteriormente se volteó suavemente sobre una varilla de vidrio, y se cortó en segmentos de longitud de aproximadamente 6 cm, los cuales se ligaron de un extremo (este procedimiento se realizó con los segmentos de intestino sumergidos en la solución tampón de Krebs-Ringer para evitar la pérdida de viabilidad del tejido). El intestino se llenó con 2 mL de la solución tampón de Krebs-Ringer y el otro extremo del intestino se ligó para crear un saco, el cual 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 h, en agitación continua (80 ciclos por minuto) y en atmósfera anaerobia (CO₂).

Después del periodo de incubación, los sacos fueron retirados y la parte de las muestras contenida en el recipiente (posterior a retirar el saco intestinal), se denominó fracción no digerible (FND), la cual fue sometida a una fermentación colónica *in vitro*. Los experimentos se realizaron por triplicado.

VI.2.6.3.1.3 Manejo de los animales después del sacrificio

Puesto que solo fue de interés para este estudio el intestino de los animales, los restos de las ratas no requeridos fueron destinados a desecho; se almacenaron en una bolsa grande color amarillo en un congelador (temperatura máxima 4°C), la bolsa se marcó con la leyenda “desechos patológicos”, éstas fueron almacenadas por un periodo de 15 días hasta su debido transporte e incineración (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

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

VI.2.6.4 Fermentación *in vitro* de la FND

El método de fermentación se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Campos-Vega *et al.* (2009). Las fermentaciones se realizaron en tres experimentos independientes con duplicado para cada FND de las dos variedades en estudio. Rafinosa (100 mg) se empleó como control positivo de carbohidrato fermentable bajo las mismas condiciones. El inóculo fecal humano, empleado como fuente de flora bacteriana representativa del colon, se obtuvo de dos individuos voluntarios sanos en su primer evacuación del día, con ausencia de enfermedades gastrointestinales y sin haber consumido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de muestra.

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). Se sellaron los tubos y se mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia que contenía una mezcla de gases (H₂-CO₂-N₂: 10:10:80, volumen) durante 12 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 1 mL de la FND, excepto para el control negativo. Se agitaron los tubos

con vortex durante 30 s y se incubaron en baño de agua a 37 °C. Se mantuvo un flujo continuo de la mezcla de gases hasta el término de la fermentación (24 h). Durante la fermentación, el pH y la producción de AGCC se determinaron a las 0, 6, 12 y 24 h. La fermentación se detuvo centrifugando y congelando las muestras a – 70 °C hasta su análisis.

VI.2.7. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta por cromatografía de gases

La concentración de ácidos grasos de cadena corta se cuantificó por cromatografía de gases por la metodología descrita por Campos-Vega *et al.* (2009). Los extractos fermentados (EF) de la fracción no digerible (FND) (1.5 mL) se descongelaron rápidamente en agua tibia, se centrifugó a 4500 rpm por 15 min a 4 °C. Se alicuotaron 800 mL de sobrenadante a un tubo de 8 mL, se ajustó el pH entre 2.9 – 3.1 con HCl 1 M. Se alicuotaron 750 mL de muestra, se añadieron 120 mL de ácido fórmico y ésta fue la muestra que se inyectó en el cromatógrafo de gases. Se empleó un detector de ionización de flama (DIF), una columna capilar Carbowax 20 M (25 x 320 x 0.30 mm) y gas helio como acarreador con un flujo de 1 mL/min. La temperatura inicial del horno fue de 95°C, mantenida durante 2 minutos, seguida de una elevación de temperatura de 20°C por min hasta alcanzar 180°C. Las temperaturas del DIF y el puerto de inyección fueron de 240 y 200°C, respectivamente. Los flujos de hidrógeno, aire y nitrógeno fueron de 30, 300 y 20 mL/min, respectivamente. Se emplearon estándares externos puros (ácidos: acético, propiónico y butírico; 0-100 mM/mL) para cuantificar los AGCC como principales productos de la fermentación.

VI.2.8 Cultivo celular

La línea celular RAW 267.4, de macrófagos murinos, se cultivó en medio Dulbecco's modified Eagle médium (DMEM) (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10%, Gibco, Grand Island, NY), antibióticos y antimicóticos (1%). El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada tercer día hasta alcanzar la

confluencia. Las células se mantuvieron en incubación bajo una atmósfera humificada de 5% CO₂ a 37 °C en una incubadora Thermo scientific 3100, y se manejaron las células en una cámara de bioseguridad (NuAire).

VI.2.8.1 Ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para viabilidad celular

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las células RAW 264.7 se sembraron en cajas de 96 pozos (1x10⁴ células/pozo) en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) adicionado con suero fetal bovino (10%), antibióticos y antimicóticos (1%). A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por el mismo medio DMEM pero ahora suplementado con 0.5% de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd), conteniendo 0 (control), 5, 7.5, 10, 15, 20 y 25% del EF del CU tostado medio, ya que presentó el mayor contenido de compuestos nutraceuticos y la mayor producción de AGCC. A cada una de estas soluciones se les agregó 200 µm de lipolisácaridos (1 µg/mL) para activar los macrófagos, y fueron esterilizadas por filtración (Campos-Vega *et al.*, 2009); para esta técnica se trabajó con la luz apagada y protegiendo los reactivos y la placa de la luz. Como control positivo se utilizó una solución solo con lipopolisacáridos (1 µg/mL); todos los tratamientos se incubaron por otras 24 h.

Pasado este tiempo, el medio gastado se retiró y se apartó para medir la producción de NO. A las células tratadas se les añadió una solución de MTT disuelto en medio DMEM a una concentración de 0.5 mg MTT/mL libre de suero fetal bovino, 200 µL de esta solución se añadieron a cada pocillo y la placa se incubó durante otras 2 h. Pasado este tiempo, el colorante que quedo sin reaccionar fue retirado y los cristales de formazán de MTT formados fueron

disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO), una vez disueltos los cristales la placa se incubó por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se leyó la absorbancia a $\lambda = 570$ nm en un espectrofotómetro. La viabilidad de las muestras se calculó usando la siguiente ecuación:

$$(\% \text{ de viabilidad}) = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

Los experimentos se hicieron por duplicado para su evaluación estadística.

VI.2.8.2. Determinación de la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 activados con LPS

La acumulación de nitrito, un indicador de la producción de NO se determinó en el sobrenadante del cultivo mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo de Griess. Brevemente los macrófagos RAW 264.7 se trataron de manera similar a la descrita para la viabilidad celular. En resumen, las células fueron incubadas con medio base o LPS mas el EF del CU tostado medio a diferentes concentraciones conteniendo (0 (control), 5, 7.5, 10, 15, 20 y 25%), durante 24 h. Pasado este tiempo se retiraron 100 μ L de el medio gastado con la ayuda de una pipeta multicanal y se pasaron a otra placa de 96 pozos, posteriormente, a cada pocillo de la placa que contenia el medio gastado se le añadieron 100 μ l del reactivo de Griess [sulfanilamida al 1% disuelta en 5% ácido fosfórico y 0.1% N (1-naftil) etilendiamina dihidrocloruro disuelta en agua], y se incubaron durante 10 min en oscuridad. La cantidad total de nitrito presente se calculó sobre la base de la absorbancia de las muestras a $\lambda = 550$ nm, a partir de una curva estándar de nitrito de sodio. Los experimentos se hicieron por duplicado para su evaluación estadística.

VI.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de los resultados se analizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA). Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar seguido de una comparación de medias por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) con el programa estadístico JMP 8.0.1. Para los ensayos biológicos se utilizó la prueba de Dunnette.

VII. RESULTADOS

VII.1 Composición proximal del los granos de café y café utilizado con dos diferentes grados de tostado

El contenido de proteína, lípidos, carbohidratos, cenizas y humedad en las diferentes muestras bajo estudio se presenta en el Cuadro 7. El contenido de proteínas en el CU tostado oscuro mostró una reducción significativa (3.61%), mientras que el CU de tostado medio ésta fue sólo de 0.31%, (valores totales 17.17% y 15.52% tostado medio y oscuro) en comparación con su respectivo grano tostado y molido (valores 11.91% y 16.86% tostado medio y oscuro). Esta reducción puede atribuirse a que durante el proceso de tostado se producen compuestos aromáticos nitrogenados, como la piridina, sin embargo, otros compuestos como las pirazinas, oxazoles y tiazoles, son también componentes del aroma del café y proceden probablemente de la ruptura de las proteínas.

Cuadro 7. Composición química del grano de café y café utilizado con dos grados de tostado.

	<u>TOSTADO MEDIO</u>		<u>TOSTADO OSCURO</u>	
	<u>GRANO DE CAFÉ</u>	<u>CAFÉ UTILIZADO</u>	<u>GRANO DE CAFÉ</u>	<u>CAFÉ UTILIZADO</u>
PROTEÍNA	17.17 ± 0.46 ^a	16.86 ± 0.11 ^{ab}	15.52 ± 0.10 ^b	11.91 ± 0.40 ^c
LÍPIDOS	16.52 ± 0.04 ^a	16.08 ± 0.02 ^b	16.07 ± 0.09 ^b	15.92 ± 0.06 ^b
CARBOHIDRATOS	56.00 ± 0.44 ^d	58.89 ± 0.16 ^c	61.61 ± 0.22 ^b	67.33 ± 0.47 ^a
CENIZAS	6.45 ± 0.06 ^a	1.88 ± 0.02 ^c	4.39 ± 0.04 ^b	1.14 ± 0.01 ^d
HUMEDAD	3.86 ± 0.05 ^b	6.30 ± 0.03 ^a	2.41 ± 0.04 ^c	3.70 ± 0.02 ^b

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

Los porcentajes de proteínas obtenidos en el presente trabajo son ligeramente mayores a lo reportado en la literatura por Belitz *et al.* (2009), quienes reportan para grano de café un porcentaje de proteínas del 8.5-12%. Mientras que Mussatto *et al.*, (2011) reportan un contenido de proteína en CU del 13.6%.

De igual manera, se ha reportado que el proceso de tostado provoca desnaturalización de proteínas, las cuales constituyen un 10-12% del café verde y un 20-25% de la fracción soluble en agua fría. Durante dicho proceso los aminoácidos también se degradan o se combinan con otros componentes para dar una mezcla compleja de compuestos volátiles y no volátiles (Montero *et al.*, 1999).

En cuanto al contenido de lípidos no hubo diferencia estadística significativa entre el CU y los granos de café, presentando éstos últimos los mayores porcentajes (16.52% y 16.07% para tostado medio y oscuro respectivamente). Mientras que el CU mostró porcentajes ligeramente mas bajos (16.08% y 15.92% tostado medio y oscuro respectivamente), eran los esperados, puesto que durante la elaboración de la bebida de café la extracción de lípidos es limitada. Resultados similares de poca lixiviación han sido reportado por Belitz *et al.*, (2009) con un contenido de lípidos en la bebida del café del 0.8% y del 15-18% en el grano. En lo referente a CU no se ha encontrado reportado en la literatura su contenido de lípidos, hasta nuestro conocimiento son los primeros resultados al respecto.

Por otro lado, los carbohidratos, son el constituyente principal del grano, lo cual se refleja en el CU. En el cuadro 7 se pueden observar diferencias estadísticas significativas entre todas las muestras analizadas, encontrándose el mayor porcentaje en el CU de tostado oscuro (61.61) seguido por el grano de café del mismo tostado (67.33), el CU de tostado medio (58.89) y por último el grano de café del mismo tostado (56.00). Se ha reportado para café utilizado (Mussatto *et al.*, 2011) un contenido de 45.3%, solo para celulosa y hemicelulosa. Del mismo modo para café tostado Montero *et al.*, (1999) reportan porcentajes de 24-39%, este autor determino otros compuestos, como oligosacáridos entre otros, y por esta razón la diferencia es menor que los resultados obtenidos en el presente trabajo. También ha sido reportado por Delgado *et al.*, (2008) un contenido de carbohidratos en grano de café del 50% en peso seco. De igual manera no se ha encontrado reportado el contenido de carbohidratos el CU, por lo que los resultados obtenidos no pudieron ser comparados.

En el contenido de cenizas también se observaron diferencias estadísticas significativas entre las muestras, presentándose un mayor contenido de cenizas en los granos de café (6.45% y 4.39% tostado medio y oscuro, respectivamente). Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura por Belitz *et al.*, (2009) reportando porcentajes del 3-5.4% para granos de café. Mientras que para CU se han reportado 1.6 g / 100 g de muestra (Mussatto *et al.*, 2011), lo que coincide con lo reportado en este trabajo.

En lo que a humedad se refiere, se presentaron diferencias estadísticas significativas para todas las muestras, observándose que en los granos de café se tiene un menor porcentaje de humedad en comparación con el CU. Esto puede atribuirse a que el grano de café en el proceso de tostado sufre una pérdida de humedad, ocurriendo lo contrario en el café utilizado, el cual se humedece al percolar el agua para la preparación la bebida.

Tomando en cuenta el grado de tostado, tanto el grano como el CU de tostado oscuro tienen un menor porcentaje de humedad en comparación con sus homólogos de tostado medio, lo que se puede atribuir a las temperaturas alcanzadas durante el tostado oscuro, el cual elimina aún más la cantidad de humedad. Estos resultados coinciden con lo reportado por Gaafar *et al.*, (2013) quienes informan una pérdida de humedad al aumentar la temperatura de tostado, variando de 11.45% en los granos de café verdes a 2.13% en los granos de café de tostado ligero, y de 1.32% en los granos de tostado oscuro.

En general las diferencias presentadas en la composición química del grano de café y el CU, en comparación con la literatura citada, pueden atribuirse a distintos factores. Por ejemplo ha sido reportado que la composición química del grano de café es claramente dependiente de la variedad, y en menor medida, de otros factores tales como la altitud, la calidad del suelo, el grado de maduración, las prácticas agrícolas y las condiciones de almacenamiento (Hui, 1992; Montero *et al.*, 1999). Así como también debido a las variaciones durante el proceso de tostado y a los diferentes métodos empleados para obtener el CU.

VII.2 Contenido de fibra total, fibra insoluble, fibra soluble y almidón resistente de los granos de café y café utilizado con diferente grado de tostado

En el Cuadro 8 se presenta el contenido de fibra total, fibra soluble, fibra insoluble y almidón resistente de las diferentes muestras evaluadas. En el contenido de fibra total se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los granos y el CU de los diferentes tostados, siendo este contenido mayor para el CU con valores de 57.07% y 58.62% y de 48.62% y 48.16%. en el grano, tostado medio y oscuro, respectivamente. Ó

Cuadro 8. Contenido de fibra soluble, fibra insoluble y almidón resistente en grano de café y café utilizado con diferentes grados de tostado.

	TOSTADO MEDIO		TOSTADO OSCURO	
	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ UTILIZADO	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ UTILIZADO
FIBRA TOTAL	48.62 ± 0.51 ^b	57.07 ± 0.87 ^a	48.16 ± 1.55 ^b	58.62 ± 0.59 ^a
FIBRA SOLUBLE	2.13 ± 0.06 ^a	1.58 ± 0.12 ^b	2.24 ± 0.18 ^{bc}	1.55 ± 0.16 ^c
FIBRA INSOLUBLE	46.49 ± 0.46 ^b	55.49 ± 0.93 ^a	45.93 ± 1.73 ^b	57.07 ± 0.73 ^a
ALMIDÓN RESISTENTE	4.8 ± 0.82 ^a	5.56 ± 0.19 ^a	5.66 ± 0.03 ^a	6.24 ± 0.03 ^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 renglón indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

De igual manera, los contenidos de fibra soluble e insoluble presentarán diferencias estadísticas significativas entre las diferentes muestras, encontrándose el mayor contenido de fibra soluble en los granos de café con valores de 2.13% y 2.24%, tostado medio y oscuro respectivamente. Mientras que la fibra insoluble se presentó en mayor cantidad en el CU con porcentajes de 55.49% y 57.07% (tostado medio y oscuro, respectivamente).

Los resultados para CU difieren con lo informado por Ferreira *et al.*, (2012) encontrando un porcentaje de fibra dietarla total de 64.19%, y valores de 0.58% y 63.61% para fibra dietarla soluble e insoluble, respectivamente. Estas diferencias

se pueden deber a que dichos autores aplicaron un tratamiento al CU con peróxido de hidrógeno alcalino, para modificar sus propiedades de hidratación, ya que las investigaciones han demostrado que la acción del peróxido de hidrógeno provoca la remoción de lignina por solubilización y al mismo tiempo, interviene en la destrucción de la estructura cristalina de la celulosa promoviendo un aumento del grado de hidratación de la misma (Gould, 1985).

Por otro lado, cabe destacar que se ha reportado que la fibra dietética consumida llega al intestino grueso con antioxidantes, principalmente compuestos polifenólicos ligados a ella, sin haber sufrido alguna hidrólisis en el tracto gastrointestinal. Al igual que la fibra, estos antioxidantes son sustrato de ser fermentados o liberados en el colon, produciendo efectos benéficos a la salud (Saura-Calixto, 2011).

El contenido de almidón resistente no presentó diferencia estadística significativa entre las muestras evaluadas, con valores de 4.85% y 5.66% para grano de café y de 5.56% y 6.24% para CU, tostado medio y oscuro respectivamente, donde se puede notar un ligero aumento en el café utilizado con diferente tostado de aproximadamente 0.67% con respecto al grano, en ambas muestras. Hasta el momento no se encontraron valores de almidón resistente en la literatura, por lo que no se pudieron comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por otro lado, se ha reportado que el almidón resistente tiene un impacto en la salud, al alterar el ambiente luminal del colon y ser sustrato fermentable produciendo AGCC, principalmente ácido butírico, y disminuyendo la producción de productos tóxicos provenientes de la fermentación de proteínas (Richard *et al.*, 2007).

VII.3 Contenido de fenoles totales, flavonoides y taninos condensados de los granos de café y café utilizado con diferente grado de tostado

En el Cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos condensados en las muestras evaluadas.

El mayor contenido de fenoles totales lo presentó en grano de café de tostado medio, seguido por el grano de café de tostado oscuro, el café utilizado de tostado medio y por último el café utilizado de tostado oscuro, con valores que van de 26.70 a 6.77 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra. Cabe destacar que esta tendencia se repitió para los otros dos compuestos fenólicos determinados (taninos condensados y flavonoides). Resultados que eran de esperarse, ya que dichos compuestos fenólicos tienen una alta solubilidad en el agua caliente y son transportados a la bebida. De igual forma, tanto los granos de café como el café utilizado de tostado medio, como su nombre lo indica, al ser un tostado más suave que el oscuro, permitió que los compuestos fenólicos se degradaran en menor proporción.

Parliament (2000) ha sugerido que dentro de los principales cambios de composición ocurridos durante el tostado se encuentra la disminución de compuestos fenólicos y la formación de polímeros solubles en agua de color marrón llamados melanoidinas, aunque disminución de proteína, aminoácidos y otros compuestos también se han descrito. De igual manera, se puede observar que el contenido de compuestos fenólicos en los granos de café fue influenciado por el grado de tostado. Observaciones similares fueron hechas por Baggenstoss *et al.* (2008)

Cuadro 9. Contenido de fenoles totales, flavonoides y taninos condensados en grano de café y café utilizado con diferentes grados de tostado.

	TOSTADO MEDIO		TOSTADO OSCURO	
	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ UTILIZADO	GRANO DE CAFÉ	CAFÉ UTILIZADO
FENOLES TOTALES*	26.70 ± 0.26 ^a	10.27 ± 0.11 ^c	24.54 ± 0.493 ^b	6.77 ± 0.15 ^d
FLAVONOIDES **	53.44 ± 3.65 ^a	11.47 ± 0.69 ^b	46.80 ± 5.04 ^a	8.10 ± 0.51 ^b
TANINOS CONDENSADOS***	38.35 ± 1.75 ^a	18.27 ± 0.23 ^c	26.95 ± 1.83 ^b	8.00 ± 0.29 ^d

Cada valor representa el promedio de tres experimentos ± ES. *mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra. ** mg equivalentes de rutina/g de muestra.***mg equivalentes de (+)-catequina/ g muestra. Letras diferentes por renglón indican diferencia estadística significativa ($\alpha \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

Además el tratamiento térmico tiene tanto efectos adversos como favorables sobre el contenido de ácidos fenólicos totales. Roy *et al.*(2007) y Chan *et al.* (2009) encontraron que en vegetales, el contenido de fenoles se redujo por el tratamiento térmico.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo reportado por Páscoa *et al.* (2013), para CU este contenido varia de 30.5 a 3.9 $\mu\text{mol trolox/g}$ de muestra. En lo que respecta al grano de café, también se encuentran dentro de lo reportado por Oliveira *et al.* (2011), quienes informan un contenido de fenoles totales de 29.96 g equivalentes de ácido gálico en 100 g de muestra.

En lo que respecta al contenido de flavonoides, los mayores valores se encontraron en el grano (53.44 y 46.80 mg equivalentes de rutina/g de muestra para tostado medio y oscuro respectivamente), presentándose una reducción significativa en el CU (11.47 y 8.10 mg equivalentes de rutina/g de muestra para tostado medio y oscuro respectivamente). Valores similares en CU han sido informados por Páscoa *et al.*, (2013) (2.20 a 19.50 mg (+)catequina/g de muestra).

En el contenido de taninos condensados, de igual manera se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las muestras de café utilizado y las de grano de café con diferentes tostados, obteniendo en estas últimas los mayores valores (38.35 y 26.95 mg equivalentes de (+)-catequina/ g muestra para tostado medio y oscuro respectivamente). Los resultados obtenidos para café utilizado se encuentran cercanos a lo encontrado por Wong y Wang (1991) con valores de 14.5 ± 0.04 mg/g de peso seco.

Cabe destacar que trabajos similares, en cuanto al contenido de compuestos fenólicos, en las diferentes muestras evaluadas se han encontrado muy pocos reportados en la literatura; por lo cual no se pudieron comparar los resultados obtenidos. Contribuyendo de esta manera a la generación de datos en lo que respecta a la composición nutraceútica de las muestras evaluadas.

VII.4 Cuantificación de compuestos fenólicos y cafeína por HPLC-DAD

Con la finalidad de tener una caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos presentes en las muestras de grano de café y café utilizado con diferente tostado se realizó la cuantificación de los mismos mediante HPLC-DAD. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método de estándar externo con los estándares comerciales de (+)-catequina, rutina, quercetina y los ácidos clorogénico, cafeico, p-cumárico, ferúlico y gálico, así como cafeína se puede. Las muestras de café utilizado con distinto tostado presentaron un menor contenido de compuestos fenólicos en comparación con las de grano de café de ambos tostados (Cuadro 10). Sin embargo se puede notar un mayor contenido de los mismos en el grano y café utilizado de tostado medio en comparación con sus respectivas muestras de tostado oscuro.

Cuadro 10. Contenido de compuestos fenólicos y cafeína mediante HPLC-DAD en grano de café y café utilizado con diferentes grados de tostado.

COMPUESTOS FENOLICOS	CAFÉ UTILIZADO		GRANO DE CAFÉ	
	TOSTADO MEDIO	TOSTADO OSCURO	TOSTADO MEDIO	TOSTADO OSCURO
Ácido gálico	2089.5 ± 447.9 ^{bc}	1334.5 ± 34.7 ^c	3922.4 ± 329.0 ^a	3065.8 ± 299.1 ^{ab}
Ácido clorogénico	5061.7 ± 611.3 ^{ab}	1842.8 ± 55.7 ^b	11180.0 ± 2805.8 ^a	6477.1 ± 1407.4 ^{ab}
Catequina	639.1 ± 61.0 ^{ab}	340.7 ± 9.9 ^b	1193.2 ± 350.4 ^a	636.0 ± 77.6 ^{ab}
Ácido cafeico	71.5 ± 4.2 ^{bc}	28.3 ± 0.6 ^c	299.4 ± 4.4 ^a	222.7 ± 77.6 ^{ab}
Rutina	68.5 ± 0.3 ^b	25.5 ± 9.8 ^b	265.2 ± 60.5 ^a	160.7 ± 41.4 ^{ab}
Ácido elágico	121.6 ± 17.2 ^a	58.8 ± 2.5 ^a	131.6 ± 51.9 ^a	234.17 ± 58.9 ^a
Ácido cumárico	13.6 ± 0.7 ^b	11.1 ± 0.4 ^b	25.6 ± 1.9 ^a	22.3 ± 1.3 ^a
Ácido ferúlico	4.1 ± 0.5 ^a	9.6 ± 0.7 ^a	8.4 ± 0.7 ^a	8.9 ± 3.1 ^a
Quercetina	959.1 ± 8.0 ^{ab}	1011.7 ± 41.8 ^b	69.4 ± 89.9 ^a	635.2 ± 68.2 ^{ab}
Cafeina	957.8 ± 3.8 ^a	412.2 ± 4.4 ^b	927.6 ± 30.9 ^a	393.4 ± 11.02 ^b

Los resultados son expresados como µg/g de muestra. Cada valor representa el promedio de tres experimentos ± ES. Letras diferentes por renglón indican diferencia estadística significativa ($\alpha \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

Estos resultados corroboran los obtenidos por las técnicas espectrofotométricas de fenoles totales, taninos y flavonoides, ya que se mantuvo la tendencia en el contenido de dichos compuestos la cual se presento de la

siguiente manera: grano de café de tostado medio > grano de café tostado oscuro > CU tostado medio > CU tostado oscuro.

Ha sido reportado por diversos autores que el compuesto fenólico mayoritario en los granos de café es el ácido clorogénico, el cual es uno de los componentes clave en el café responsables de determinar la calidad de la bebida, así como su actividad antioxidante y a su vez sus beneficios a la salud. En los resultados obtenidos se puede comprobar que dicho compuesto supera por mucho a los demás compuestos fenólicos evaluados, con valores que van de 11.18 – 1.84 mg/g de muestra.

El contenido de compuestos fenólicos presentó la siguiente tendencia; ácido clorogénico > ácido gálico > catequina > quercetina > ácido cafeico > rutina > ácido elálgico > ácido cumárico > ácido ferúlico.

Dupas *et. al.* (2006), informaron una concentración de ácido clorogénico similar al encontrado en el presente estudio (8.75-14.21 mg/g), para grano de café. Además, en el mismo estudio también se encontraron cantidades mayores de ácido cafeico (13.93 - 27.41 mg/g) y ácido ferúlico (1.28 - 1.98 mg/g), y la presencia de ácido cumárico fue identificada.

Según Materska y Perucka (2005), los compuestos fenólicos producidos por las plantas son el resultado de la adaptación a las condiciones de estrés biótico y abiótico (infección, heridas, estrés por agua, estrés por frío, elevada luz visible). Por lo tanto, las diferencias en la composición fenólica y la actividad antioxidante de los granos de café de diferentes orígenes se puede deber a los factores ambientales a los que estuvo sometida la planta de café.

En años recientes se ha enfatizado en la importancia de los compuestos fenólicos, ya que al ligarse con la fibra dietética no sufren hidrólisis enzimática durante el tracto intestinal. Se sugiere que en forma acomplexada llegan al colon y pueden ser sustrato de fermentación por la microbiota endémica, produciendo efectos benéficos a la salud atribuidos a la fibra dietética y antioxidantes ligados como ácido ferúlico, ácido cafeico, catequina, epicatequina, derivados de ácido gálico, protocatequinas, ácido parahidroxibenzoico, entre otros (Arranz *et al.*, 2010). Los productos de la fermentación de compuestos fenólicos por la

microbiota colónica incluyen ácido hidroxifenilacético, fenilpropiónico, fenilbutírico, entre otros, proporcionando efectos benéficos a la salud (Selma *et al.*, 2009; Saura-Calixto *et al.*, 2010).

Aparte de los compuestos fenólicos también se determinó la concentración de cafeína, éste es quizás el componente químico más importante estudiado en el café debido a sus efectos fisiológicos reportados (Ramalasky *et al.*, 2009). El principal efecto fisiológico de la cafeína parece ser como estimulante del sistema nervioso central. Tiene efecto sobre el sistema cardiovascular con un ligero aumento en la presión arterial y el gasto cardíaco. La cafeína también aumenta la secreción de ácido gástrico; sufre biotransformación en el cuerpo humano para formar derivados metilados de ácido úrico. La cafeína no es definitivamente letal para el sistema humano si se ingiere en forma de bebidas, a menos que se consuman 75 tazas de café, 125 tazas de té o 200 bebidas de cola dentro de un período de 30 minutos (Ramalakshmi y Raghavan, 1999).

En el Cuadro 10 se presentan los resultados obtenidos, donde se puede observar, como es de esperar, que el grano con diferente tostado presentó la mayor concentración de cafeína (957.80 y 927.60 $\mu\text{g/g}$ de muestra para tostado medio y oscuro respectivamente), en cambio en las muestras de café utilizado se redujo más de la mitad la concentración de dicho compuesto (412.2 y 393.4 $\mu\text{g/g}$ de muestra para tostado medio y oscuro respectivamente). Estos resultados son cercanos a los reportados por otros autores; por ejemplo Ramalakshmi y Raghavan, (1998) encontraron que el contenido de cafeína de los granos de café varía de acuerdo con la especie encontrando para café arábica una concentración de aproximadamente 1.20%. También informaron que durante el tostado no hay pérdida significativa en términos de la cafeína. Este resultado es concordante con el presente trabajo, ya que, la variación en el contenido de cafeína en el grano con diferente tostado no fue significativa. De igual manera, Belitz *et al.* (2009) encontraron rangos de cafeína en granos de café de 0.8-1.4%. En lo que respecta a café utilizado Mutty y Naidu (2012) presentan contenidos de cafeína de tan sólo 0.02%.

De esta manera se comprueba que el café utilizado es buena fuente de ambos compuestos tanto fenólicos como fibra dietaria, además de tener un bajo contenido de cafeína, menos de la mitad que el grano de café. Por lo cual podemos decir que dicho residuo es buena fuente de fibra dietaria antioxidante, lo que nos permite proponerlo como un buen candidato para su uso en el desarrollo de nuevos productos como ingrediente nutraceútico.

VII.5 Determinación de la capacidad antioxidante de los granos de café y café utilizado con diferente grado de tostado

La alta capacidad antioxidante del café se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos, principalmente el ácido clorogénico, cafeína, ácido ferúlico y la cumarina, además de los productos formados por la reacción de Maillard durante el tostado, representando por lo tanto las sustancias de mayor actividad antioxidante del café tostado (Daglia *et al.*, 2000; Krings y Berger, 2001; Andueza *et al.*, 2004).

La medición de la capacidad antioxidante en las diferentes muestras se determinó por dos métodos diferentes ABTS y DPPH , a partir de los extractos etanólicos; los resultados son presentados en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Capacidad antioxidante en grano de café y café utilizado con diferentes grados de tostado.

TOSTADO	MUESTRA	DPPH*	ABTS*
	CAFÉ UTILIZADO	107.36 ± 0.76 ^c	243.66 ± 1.97 ^b
MEDIO	GRANO DE CAFÉ	436.07 ± 1.82 ^b	416.94 ± 14.5 ^a
	CAFÉ UTILIZADO	387.34 ± 4.97 ^b	78.24 ± 4.46 ^d
OSCURO	GRANO DE CAFÉ	556.70 ± 44.85 ^a	127.15 ± 1.20 ^c

Los resultados se presentan a los 90 minutos de incubación. *La capacidad antioxidante expresada como μ moles eq de trolox/g de muestra. Cada valor representa el promedio de tres experimentos \pm ES. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas $\alpha \leq 0.05$ en la prueba de Tukey.

Para el método de DPPH, la mayor capacidad antioxidante se presentó en los granos de café con valores 556.70 y 436.07 μ moles eq. de trolox/g de muestra, para tostado oscuro y medio respectivamente. En lo que respecta a las muestras de café utilizado se obtuvo un decremento de 30.4% y 75% para tostado oscuro y medio respectivamente. Cabe destacar que a pesar del decremento presentado en dichas muestras la capacidad antioxidante de las mismas sigue siendo aceptable. La reducción en la capacidad antioxidante de las muestras de café utilizado podría explicarse ya que se ha reportado que durante el procesamiento del café el tostado afecta marcadamente su composición, debido a que las altas temperaturas conllevan a la pérdida de parte de los antioxidantes naturales presentes originalmente en el café, principalmente ácidos hidroxicinámicos (clorogénico, cafeico, ferúlico, cumárico, entre otros.) (Sacchetti *et al.*, 2009). Sin embargo, ha sido reportado que la actividad antioxidante del café se mantiene durante el proceso de tostado, debido a la formación de compuestos nuevos, que también presentan actividad antioxidante, los llamados productos de la reacción de Maillard, ya que durante la última etapa de la reacción de Maillard, se forman compuestos poliméricos de color café llamados melanoidinas, esto debido a la baja actividad de agua y las elevadas temperaturas, las cuales favorecen el desarrollo de estas reacciones (Budryn *et al.*, 2009). Ha sido informada la probabilidad de la participación de los compuestos fenólicos en estas reacciones, especialmente el ácido clorogénico, formando parte de las melanoidinas del café (Bekedam *et al.*, 2008).

Por otro lado se ha informado que las melanoidinas son las responsables del color y el aroma del café tostado. A pesar de que estos compuestos suponen más del 25% del peso seco del café, su estructura química es extremadamente compleja y todavía no se conoce con exactitud, aunque se piensa que parte de su capacidad antioxidante se deba a los compuestos de bajo peso molecular unidos no covalentemente a ellas (Rufián-Henares y Morales, 2007). Puesto que el desarrollo de las reacciones de Maillard parece tener un importante papel en contrarrestar la degradación de los antioxidantes fenólicos presentes naturalmente en el café, se espera que la capacidad antioxidante global del café tostado

dependa en gran medida de la extensión en que tengan lugar dichas reacciones durante el proceso de tostado (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos se encuentran cercanos a lo reportado en la literatura por Bravo *et al.*, (2013) para CU una actividad antioxidante de 112.06 μ moles eq. Trolox/g muestra. Por otro lado Pérez-Hernández *et al.*, (2012) encontraron una actividad antioxidante en granos de café tostado de 938.58 μ moles eq. Trolox/g muestra.

En lo que respecta a la capacidad antioxidante evaluada por el método de ABTS, se presentó la misma tendencia que para la técnica de DPPH donde el grano de café con diferente tostado mostró una mayor capacidad antioxidante que sus homologas de CU, con resultados que van de 243.66 a 78.24 μ moles eq. de trolox/g de muestra. Presentándose de nuevo la misma tendencia que se siguió en la cuantificación de compuestos fenólicos por los métodos espectrofotométricos y por HPLC-DAD.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son cercanos a lo informado por Páscoa *et al.* (2013) para las muestras de CU, con una media de 176 μ moles de Trolox/ g de muestra, con un máximo de 367 y un mínimo de 85 μ moles de Trolox/ g de muestra. Estos autores correlacionaron el contenido de fenoles totales y flavonoides con la capacidad antioxidante teniendo resultados de $R= 0.977$ y $R=0.969$, respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, de igual manera se puede observar esta misma tendencia, ya que las muestras con mayor capacidad antioxidante son las que presentan un mayor contenido de fenoles totales, taninos y flavonoides. Bravo *et al.* (2013) reportan una capacidad antioxidante para CU de 215.51 μ moles eq. Trolox/g muestra. Sin embargo, aunque los efectos del grado de tostado de los granos de café sobre su capacidad antioxidante han sido investigados en numerosos estudios, existe bastante discrepancia en cuanto a los resultados obtenidos, ya que algunos autores reportan un incremento de la actividad antioxidante en los granos de café de tostado medio y un descenso en los de grado de tostado oscuro (Nicoli *et al.*, 1997; Del Castillo *et al.*, 2002; Sacchetti *et al.*, 2009). Otros autores informan sobre un aumento de la capacidad antioxidante con el grado de tostado (Daglia *et*

al., 2000; Anese y Nicoli, 2003) y otros más un descenso de la actividad antioxidante con el grado de tostado (Richelle *et al.*, 2001; Borrelli *et al.*, 2002; Cämmerer y Kroh, 2006; Hečimović *et al.*, 2011).

De manera que varias pueden ser las causas que justifiquen estas diferencias por citar algunas serían: el empleo de diferentes métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante, las diferencias en el tipo de café empleado, la posibilidad de llegar a un mismo grado de tostado variando las condiciones de tiempo-temperatura, la falta de una definición estándar del grado de tostado (ya que puede ser determinado por los cambios en el color, el descenso de la densidad o la pérdida de peso), la manera de obtener el CU, entre otros (Sacchetti *et al.*, 2009).

VII.6 Efecto del pH en el medio de incubación durante la fermentación colónica *in vitro* de la FND del café utilizado con diferentes grados de tostado

La medición del pH en el medio de incubación es un indicador indirecto de la producción de AGCC producidos por la fermentación *in vitro* de sustratos fermentables. 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 tostado se muestra en el Cuadro 12. En este ensayo se empleó rafinosa como control positivo de carbohidrato fermentable; mientras que, como control negativo se consideró el blanco del proceso de digestión mencionado anteriormente, sin ningún carbohidrato disponible para ser fermentado.

En general, la tendencia del valor de pH durante la fermentación colónica *in vitro* de las FND de los diferentes residuos de café evaluados, fue en decremento; siendo la fermentación de la rafinosa la que presentó la mayor acidificación con respecto al tiempo. Guillon y Champ (2002) atribuyen el marcado decremento en el pH del medio a la rápida fermentación de la rafinosa y a su mayor biodisponibilidad para ser degradada por la carga bacteriana del inóculo, en comparación con la complejidad de los carbohidratos presentes en la FND de los diferentes residuos de café evaluados.

Cuadro 12. Medición de pH en el medio de incubación durante la fermentación colónica *in vitro* de la FND del café utilizado con diferente grado de tostado.

MUESTRA	pH			
	0 h	6 h	12 h	24 h
TOSTADO OSCURO	7.41 ± 0.02 ^{Aa}	6.75 ± 0.05 ^{Ac}	6.86 ± 0.04 ^{Abc}	6.98 ± 0.02 ^{Ab}
TOSTADO MEDIO	7.40 ± 0.03 ^{Aa}	6.78 ± 0.06 ^{Ac}	6.91 ± 0.02 ^{Abc}	7.07 ± 0.02 ^{Ab}
CTR +	7.43 ± 0.04 ^{Aa}	4.88 ± 0.21 ^{Bb}	4.61 ± 0.23 ^{Bb}	4.54 ± 0.03 ^{Bb}
CTR -	7.41 ± 0.03 ^{Aa}	6.79 ± 0.05 ^{Ac}	6.93 ± 0.05 ^{Ac}	7.14 ± 0.04 ^{Ab}

CTR + = rafinosa, CTR- = blanco de la fermentación. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con dos repeticiones ± ES. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre las diferentes muestras bajo las mismas condiciones ($\alpha \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

Letras minúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre los tiempos de fermentación ($\alpha \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

De igual manera McBain y Macfarlane (1998) reportaron que la hidrólisis de los carbohidratos por las bacterias colónicas genera un ambiente ácido, mejorando las condiciones para el crecimiento de poblaciones acidófilas que generan AGCC, predominantemente el ácido acético, precursor de los ácidos propiónico y butírico.

Al observarse la acidificación del medio empleando como fuente fermentable la FND de las muestras de café utilizado bajo estudio, se sugiere que las mismas, son buenos sustratos de fuente fermentable en el colon, y capaces de producir la acidificación de éste debido, como se mostrará mas adelante, a la producción de AGCC, favoreciendo de esta manera la proliferación de bacterias benéficas y por tanto causando efectos benéficos a la salud.

VII.7 Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante la fermentación *in vitro* de la FND del café utilizado con diferentes grados de tostado

Durante la fermentación de la FND de los diferentes residuos de café se producen, entre otros compuestos, AGCC que son generados a nivel del colon por

las bacterias endémicas, ocurriendo con ello una disminución del pH en el contenido colónico como efecto colateral, acidificando el medio y propiciando así el desarrollo de *Bifidobacterias* y *Lactobacterias*, entre otras (Kulkarni y Reddy, 1994).

En el Cuadro 13 se muestra el contenido de AGCC como resultado de la fermentación *in vitro* del CU sometido a un proceso de digestión gastrointestinal previo, pudiéndose observar que la FND del café utilizado con diferentes tostados fue capaz de producir AGCC, teniendo una mayor proporción de ácido acético, seguido del propiónico y, en menor concentración, ácido butírico. A pesar de que no se observó diferencia estadística significativa entre las diferentes muestras evaluadas, se puede notar un ligero aumento en la producción de AGCC en el café utilizado de tostado medio en comparación con el de tostado oscuro. A las 24 horas se observó la mayor cantidad de ácidos propiónico y butírico 10.58 ± 0.6 y 7.86 ± 0.3 mmol/L para tostado medio y 10.43 ± 0.4 y 7.79 ± 0.2 mmol/L para tostado oscuro, respectivamente.

Los AGCC, como los ácido acético, propiónico y butírico, son de gran importancia ya que se les ha relacionado con la reducción de la producción de factores proinflamatorios. (Park *et al.*, 2007; Usami *et al.*, 2008; Kawamura *et al.*, 2009; Cox *et al.*, 2009; Ni, *et al.*, 2010; Vinolo *et al.*, 2010). Jin-Sun *et al.*, (2007) probaron los efectos anti-inflamatorios de butirato de sodio (NAB), fenilbutirato de sodio (NaPB) y fenilacetato de sodio (NaPA) en las células RAW 264.7 estimuladas por IFN- γ demostrando que los mismos inhiben la expresión de iNOS, TNF- α e IL-6 inducidas por IFN- γ , mientras que mejoran la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Por su parte Liu *et al.*, (2012) encontraron que los tres tipos de AGCC (ácidos acético, propiónico, y butírico) redujeron la producción de factores proinflamatorios incluyendo TNF- α , IL-1 β , IL-6, y óxido nítrico, e inhibieron la vitalidad de la iNOS. Además se ha reportado que estos efectos protectores pueden ser potenciados por los compuestos fenólicos asociados a la fibra. Por ejemplo, en estudios *in vitro* se ha inhibido la proliferación e inducción de apoptosis en células tumorales (Kawaii *et al.*, 1999; Wenzel *et al.*, 2000; Saura-Calixto, 2011).

Cuadro 13. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante la fermentación *in vitro* de la FND del café utilizado con diferente grado de tostado.

	<u>6 horas</u>			<u>12 horas</u>			<u>24 horas</u>		
	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico
CUM	37.54 ± 2.9 ^{cd}	9.02 ± 0.6 ^b	7.17 ± 0.3 ^b	37.62 ± 9.2 ^c	9.28 ± 1.2 ^b	7.28 ± 0.5 ^b	29.41 ± 4.3 ^{cd}	10.58 ± 0.6 ^b	7.86 ± 0.3 ^b
CUO	42.51 ± 5.1 ^c	10.13 ± 1 ^b	7.66 ± 0.4 ^b	28.08 ± 6.2 ^{cd}	7.54 ± 0.6 ^b	6.65 ± 0.2 ^b	18.79 ± 3.6 ^d	10.43 ± 0.4 ^b	7.79 ± 0.2 ^b
CTR (+)	65.74 ± 2.6 ^b	8.07 ± 0.4 ^b	6.75 ± 0.2 ^b	104.31 ± 2.0 ^a	8.04 ± 0.5 ^b	6.48 ± 0.2 ^b	80.09 ± 1.8 ^b	18.79 ± 1.2 ^a	11.49 ± 0.5 ^a

CUM café utilizado tostado medio, CUO café utilizado tostado oscuro, CTR(+) como control positivo se utilizó rafinosa. Los resultados se expresaron como mmol/L. Cada valor representa la media de dos análisis independientes ± error estándar. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha \leq 0.05$).

La rafinosa presentó la mayor producción de AGCC en comparación con las muestras de café utilizadas evaluadas, esto se puede deber, a lo mencionado anteriormente, que la rafinosa al ser un carbohidrato fermentable y adicionarse solo, lo hace más biodisponible para las bacterias colónicas, en comparación con la compleja matriz de la FND de las muestras de café utilizadas con diferente tostado.

Diversos datos poblacionales han demostrado que la producción AGCC esta en el orden de ácido acético > propiónico > butírico en una relación molar de aproximadamente 60:20:20 o 3:1:1, respectivamente, en el colon proximal y distal (Cummings, 1981; Cummings *et al.*, 1987; Topping y Clifton, 2001). La relación molar obtenida en las diferentes muestras evaluadas fue de 62:22:16 para café utilizado tostado medio, 51:28:21 para tostado oscuro y 73:17:10 para rafinosa, presentándose en el café utilizado de tostado medio la relación molar mas cercana a la relación molar ideal.

Cabe destacar que trabajos de fermentación *in vitro* del café utilizado tal como se realizó en el presente trabajo, no se han llevado a cabo, sólo se tiene conocimiento de algunos estudios similares como el realizado por Asano *et al.* (2003) donde dichos autores extrajeron monooligosacáridos del café utilizado por hidrólisis térmica, y además los sometieron a un proceso de digestión, demostrando que éstos fueron resistentes a enzimas digestivas α -amilasa salival humana, jugo gástrico, pancreátina y enzimas de mucosa intestinal de rata, así mismo fueron fermentados por las bacterias colónicas y los productos de fermentación fueron AGCC acético, propiónico y butírico; obteniendo cantidades de ácido acético propiónico y butírico de 348.7 ± 69.9 mg, 118.7 ± 30.1 mg, 136.1 ± 42.4 mg, respectivamente. También compararon el tiempo de fermentación con fructooligosacáridos y se vio que estos se fermentaban por completo a las 8 horas, mientras que los monooligosacáridos lo hicieron después de 15 horas de fermentación, explicando que estas diferencias en el tiempo podrían ser debidas a la diferencia en las especies y la cantidad de bacterias en las heces que utilizan cada oligosacárido (Hidaka *et al.*, 1986; Asano *et al.*, 2001.).

En otro estudio realizado por Gniechwitz *et al.*, (2007) de fermentación de fibra dietaria proveniente de la bebida de café, reportaron que una taza de café de 150 mL contiene aproximadamente 0.5 g de fibra dietaria soluble, después de 24 horas de fermentación con heces humanas se obtuvieron cantidades de los ácidos

acético, propiónico y butírico de 7.44 ± 0.07 , 1.34 ± 0.03 y 0.41 ± 0.03 mmol respectivamente.

El extracto de la fermentación (EF) del CU tostado medio resultante de 24 h de fermentación se empleó para evaluar su efecto sobre un modelo inflamatorio empleando macrófagos RAW 264.7 murinos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) debido a su mayor contenido de AGCC, en especial ácido butírico, en su composición.

VII.8 Efecto del extracto de la fermentación (EF) colónica *in vitro* sobre la viabilidad celular

En el presente estudio, se evaluó el efecto del EF del café utilizado tostado medio sobre la viabilidad de células RAW 264.7 por medio del ensayo MTT, con la finalidad de evaluar la citotoxicidad de dicho extracto. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

En la figura 11 se presentan los resultados obtenidos, en la cual se puede notar que no se presentó diferencia entre todos los tratamientos analizados y el control. Por lo cual podemos concluir que no se observó citotoxicidad en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones del EF del café utilizado tostado medio que fue desde 5% hasta 25%. Lo cual nos es de gran ayuda, ya que esto nos permitió seguir adelante con la siguiente etapa del presente trabajo, la cual consistió en probar dichos extractos para evaluar la disminución de la producción de óxido nítrico (NO). Además de permitirnos demostrar que el uso de dichos extractos era seguro, ya que fue capaz de mantener la viabilidad celular.

TRATAMIENTO	% VIABILIDAD
CONTROL	100.0 ± 8.8 ^a
EF 5%	91.9 ± 4.1 ^a
EF 7.5%	87.0 ± 7.5 ^a
EF 10%	88.6 ± 3.9 ^a
EF 15%	87.0 ± 1.9 ^a
EF 20%	90.9 ± 6.0 ^a
EF 25%	90.3 ± 3.1 ^a

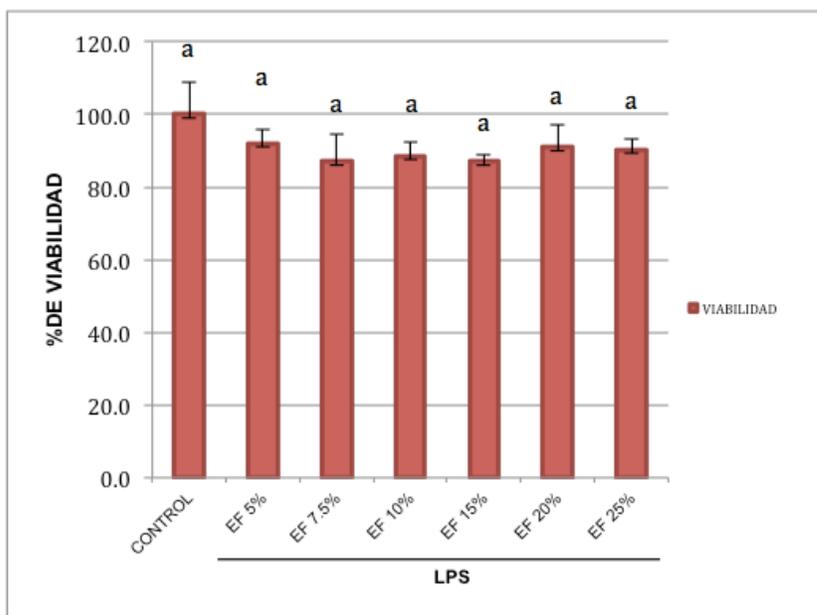


Figura 11. Viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacárido (LPS).

EF=Extracto de la Fermentación de CU tostado medio a las 24 horas. CONTROL= se utilizaron las células solo en medio DMEM con albúmina sérica bovina 0.5%. Cada valor representa la media de dos análisis independientes ± ES. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha \leq 0.05$) por la prueba de Dunnett.

VII.9 Efecto del EF de 24 h del CU tostado medio sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos

Se ha reportado que el NO es un factor proinflamatorio comúnmente conocido en las diferentes enfermedades inflamatorias agudas y crónicas y es generado principalmente por la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) en los macrófagos; los LPS aumentan notablemente la producción de dicho compuesto (Liu *et al.*, 2012).

Una vez comprobada la producción de AGCC durante la fermentación colónica *in vitro* de la FND de las muestras de café utilizado, se decidió probar el EF del CU tostado medio, en un modelo de inflamación. En dicho modelo se trabajó con macrófagos RAW 264.7 murinos, los cuales fueron estimulados con LPS para activarlos e inducirles el estado inflamatorio, al mismo tiempo que se les indujo el estado inflamatorio se trato con el EF del CU tostado medio a las 24 h de

fermentación, esto debido a que fue el que presentó un mayor contenido de AGCC. Se probaron diferentes concentraciones del EF 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20% y 25%, los resultados obtenidos se presentan en el Figura 12.

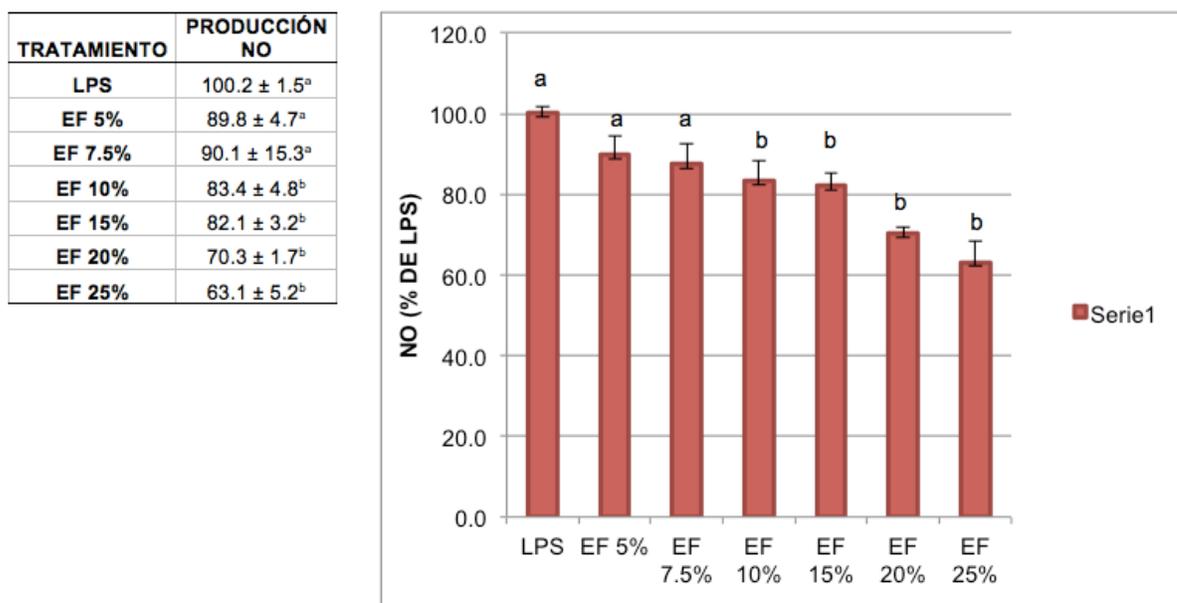


Figura 12. Efecto de EF de CU tostado medio en la producción de NO inducida por LPS.

EF=Extracto de la Fermentación de CU tostado medio a las 24 horas. LPS=lipopolisacáridos. Los resultados se expresan como % de LPS. Cada valor representa la media de dos análisis independientes ± ES. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha \leq 0.05$) por la prueba de Dunnett.

En la Figura 12 se puede notar una disminución en la producción de NO dosis dependiente, ya que ha mayor concentración del EF del café utilizado tostado medio mayor fue la disminución en la producción de NO, encontrándose una reducción máxima del 36.9% con una concentración del EF del 25%, la cual equivale a concentraciones de AGCC acético propiónico y butírico de 7.35, 2.64 y 1.97 mmol/L respectivamente. Cabe destacar que esta diferencia fue significativa a partir de la concentración del EF al 10% en comparación con las muestras tratadas únicamente con LPS. Evaluaciones adicionales son necesarias para determinar la concentración que inhibe la inflamación en este modelo al menos en un 50%.

El único trabajo encontrado en la literatura que se asemeja al realizado en la presente tesis ha sido reportado por Ramalakshmi *et al.* (2009) estos autores prepararon, a partir del grano de café con agua, el CU usando una columna de extracción y extrajeron durante 6 horas. A partir del CU se realizó la extracción con metanol en proporción material a disolvente de 1: 8 a 1:12 por 8 horas. El potencial antiinflamatorio del extracto se evaluó en macrófagos J774A.1 murinos estimulados con LPS a tres diferentes concentraciones (1, 3 and 10 $\mu\text{g/mL}$). Los macrófagos fueron incubados con los tratamientos mas lipopolisacáridos (1 $\mu\text{g/mL}$) por 3 horas y posteriormente midieron TNF- α mediante un Kit de ELISA para raton. Los autores concluyen que a pesar de que los extractos de café contienen una cantidad sustancial de polifenoles, los extractos de CU no mostraron actividad anti-inflamatoria contra la producción de TNF- α inducida por LPS.

En lo que respecta a otros estudios similares, la mayoría de ellos se han llevado a cabo con AGCC en su forma pura y no provenientes de todo un proceso digestivo y fermentativo en el colon. Por ejemplo, se tiene el trabajo de Sun Park *et al.* (2007) quienes evaluaron los efectos antiinflamatorios de AGCC en macrófagos RAW 264.7 estimulados con el Interferón gamma (IFN- γ) probaron tres tipos de ácidos grasos puros: butirato de sodio (NaB), fenilbutirato de sodio (NaPB) y fenilacetato de sodio (NaPA) reportando que los AGCC reprimieron significativamente la generación de NO mediada por IFN- γ el orden de dicha inhibición fue NaB>NaPB>NaPA. A la concentración máxima de 1.0 mmol, NaB inhibió casi completamente la producción de NO, mientras que una inhibición del 50% y 30% se observó en las células tratadas con NaPA y NaPB, respectivamente.

Otro estudio similar al anterior lo llevaron a cabo por Liu *et al.* (2012) quienes probaron tres tipos de ácidos grasos puros acetato de sodio (NaAc), propionato de sodio (NaP), y butirato de sódio (NaB), encontrando que los AGCC (NaAc, NaP, y NaB) redujeron significativamente el nivel de NO en una forma dependiente de la concentración de 1 a 1,200 $\mu\text{mol/L}$, donde la producción de NO se redujo en 39.83, 70.74, y 57.12%, respectivamente, a la dosis mas alta de 1,200 $\mu\text{mol/L}$.

Las diferencias obtenidas en el presente estudio y los expuestos anteriormente (Park *et al.*, 2007; Ramalakshmi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012) se pueden deber a varias causas, entre ellas la preparación del café utilizado, la obtención del extracto, así como la aplicación en forma pura de los AGCC.

VIII. CONCLUSIONES

La composición química del café utilizado fue muy similar al compararla con su respectivo grano de café, demostrando que dicho residuo es rico en proteínas, lípidos y carbohidratos.

También se pudo comprobar que dicho residuo presentó una buena composición nutracéutica, la cual incluyó un alto contenido de compuestos fenólicos, (ácidos clorogénico y gálico, quercetina, entre otros), taninos condensados y flavonoides, los cuales contribuyeron a su alta capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH, incluso mayor que lo reportado para varias frutas. De igual manera también presentó un alto contenido de fibra, así como de almidón resistente.

Todos estos compuestos bioactivos están relacionados con efectos benéficos a la salud del consumidor debido a que en años recientes se ha enfatizado en la importancia de la fibra antioxidante, ya que al ligarse los compuestos fenólicos con la fibra dietética no sufren hidrólisis enzimática durante el tracto intestinal. Se sugiere que en forma acoplejada llegan al colon y pueden ser sustrato de fermentación por la microbiota endémica, produciendo efectos benéficos a la salud atribuidos a la fibra dietética y antioxidantes ligados, como lo es la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Los resultados obtenidos, en conjunto, dan evidencia de que la fracción no digerible (FND) del café utilizado puede ser fermentada por las bacterias colónicas siendo capaz de producir AGCC, como los ácidos acético, propiónico y butírico, entre otros compuestos y que los productos de fermentación del café utilizado tostado medio evaluados en un modelo de inflamación con células RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos inducen una reducción de casi el 40% en la producción de óxido nítrico a una concentración del EF del 25% lo que equivale a concentraciones de ácidos acético propiónico y butírico de 7.35, 2.64 y 1.97 mmol/L respectivamente, sin presentar efecto citotóxico sobre estas células.

Estos resultados nos permite inferir que el café utilizado es buena fuente de compuestos nutracéuticos, los cuales contribuyen a su capacidad antioxidante y a la generación de AGCC, los cuales pueden contribuir a la reducción del estado

inflamatorio, sugiriendo de esta manera que el café utilizado tiene un potencial efecto benéfico a la salud. Por lo cual podría utilizarse como ingrediente nutraceútico para el desarrollo de nuevos productos, e introducirlo de esta manera en la industria de los alimentos. De este modo se pretende contribuir a generar interés por este subproducto, cuya recuperación podría resultar económicamente atractiva.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alves R., Casal S., Oliveira M. 2010. Tocopherols in coffee brews: Influence of coffee species, roast degree and brewing procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 802–808.
- Anese M. and Nicoli M.C. 2003. Antioxidant Properties of Ready-to-Drink Coffee Brews. *J. Agric. Food Chem.* 51, 942-946.
- AOAC. 2002. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist. 920.39, 920.105, 925.23, 945.46, 965.25, 957.04. Ed. Washington, EEUU, II (32).
- Ariztia E., Lee C., Gogoi R., Fishman D. 2006. The tumor microenvironment: key to early detection, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 43: 393–425.
- Arranz, S, Silván, J M, Saura-Calixto, f. 2010. Non extractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spain diet. *Mol Nutr Food Res.* 54: 1.
- Arya M. and Rao L. 2007. An impression of coffee carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 51–67.
- Asociación Mexicana de la Cadena Productiva de Café (AMECAFE), 2012, www.amecafe.org.mx. Abril, 2013.
- Baggenstoss, J., L. Poisson, R. Kaegi, R. Perren and F. Escher, 2008. Coffee roasting and aroma formation: Application of different time- temperature conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 5836-5846.
- Balkwill F., Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539–545.
- Balkwill F., Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet* 357: 539–545.
- Bekalo S. and Reinhardt H. 2010. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. *Materials and Structures*, 43, 1049–1060.
- Bekedam E., Schols H., Cämmerer B., Kroh L., van Beekel M., Smit, G. 2008. Electron spin resonance (ESR) studies on the formation of roasting-induced antioxidative

- structures in coffee brews at different degrees of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4597–4604.
- Bekedam E., Schols H., Van Boekel M., Smit G. 2006. High molecular weight melanoidins from coffee brew. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7658–7666.
- Bekedam E.K., Loots M.J., Schols H.A., Van-Boekel M.A.J.S. and Smit G. 2008. Roasting Effects on Formation Mechanisms of Coffee Brew Melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7138-7145.
- Belitz H., Grosch W., Schieberle P. 2009. *Food chemistry* (4th ed.). Heidelberg: Springer . Chapter 21. Pp. 938-950.
- Berbert P., Queiroz D., Sousa E., Molina M., Melo E., Faroni L. 2001. Dielectric properties of parchment coffee. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 80, 65–80.
- Borrelli R., Visconti A., Mennella C., Aneseand M., Fogliano V. 2002. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6527–6533.
- Boudet, A-M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2722–2735.
- Bravo J., Monente C., Juániz I., De Peña M., Cid C. 2013. Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*. 50: 610–616.
- Bridson D. and Verdcourt B. 1988. *Flora of tropical East Africa. Rubiaceae (Part 2)*. Rotterdam: Balkema. p. 415–747.
- Budryn G. and Nebesny E. 2008. Antioxidant properties of Arabica and Robusta coffee extracts prepared under different conditions. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 104, 69–78.
- Budryn, G., Nebesny, E., Podsedek, A., Zyzelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S., et al. 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.
- Buffo R. and Cardelli-Freire C. 2004. Coffee flavour: An overview. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 99–104.

- Butzner J., Parmar R., Bell C., Dalal V. 1996. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut*;38:568–73.
- Caetano, N., Silva, V., Mata, T. 2012. Valorisation of coffee grounds for biodiesel production. *Chem. Eng. Trans.* 26, 267–272.
- Cämmerer B. and Kroh L.W. 2006. Antioxidant activity of coffee brews. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 469-474.
- Campos-Vega R., Reynoso-Camacho R., Pedraza-Aboytes G., Acosta-Gallegos J., Guzmán-Maldonado S., Paredes-López O., Oomah B., Loarca- Piña G. 2009. Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.* 74(7): T59.
- Cardador-Martínez A., Castaño-Tostado E., Loarca-Piña G. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Addit Contam.* 19(1):62.
- Casanueva, E, Bourges, H. 2001. Los nutrimentos. En: Casanueva, E, Kaufer, H M, Pérez, L A B, Arroyo, P. *Nutriología médica*. 2ª. ed. Ed. Médica Panamericana. 459.
- Chakravorty D., Koide N., Kato Y., Sugiyama T., Mu M., Yoshida T. 2000. The inhibitory action of butyrate on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 murine macrophage cells. *J Endotoxin Res*;6:243–7.
- Chakravorty D., Koide N., Kato Y., Sugiyama T., Mu M., Yoshida T., et al. 2000. The inhibitory action of butyrate on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 murine macrophage cells. *J Endotoxin Res*;6:243–7.
- Chan, E.W.C., Y.Y. Lim, S.K. Wong, K.K. Lim, F.S. Tan and M.Y. Lianto, 2009. Effect of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chem.*, 113: 892-895.
- Chen J., Faller D., Spanjaard R. 2003. Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets*;3:219–36.
- Clifford M. N. 1985. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In M. N. Clifford, & K. C. Wilson (Eds.), *Coffee — Botany, biochemistry and production of beans and beverage*. pp. 305–374. London: Croom Helm.

- Cox M., Jackson J., Stanton M., Rojas-Triana A., Bober L., Lavery M., Yang X., Zhu F., Liu J., and Wang S.. 2009. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E2 and cytokines. *World Journal of Gastroenterology*: WJG 15: 5549–5557.
- Cruz-Bravo R., Guevara-Gonzalez R., Ramos-Gomez M., García-Gasca T., Campos-Vega R., Oomah B., Loarca-Piña G. 2011. Fermented nondigestible fraction from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Negro 8025 modulates HT-29 cell behavior. *J Food Sci.* 76(2): T41.
- Cummings J., Bingham S., Heaton K., Eastwood M. 1992. Fecal weight, colon cancer risk and dietary intake of nonstarch polysaccharide (dietary fiber). *Gastroenterology*, 103, 1783–1789.
- Cummings, J H, MacFarlane, G T. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol.* 70: 443.
- Cunha M. R. 1992. Apêndice estatístico. In E. L. Bacha & R. Greenhill (Eds.), 150 años de café (pp. 286–388). Rio de Janeiro: Marcellino Martins & E. Johnston.
- Daglia M., Papetti A., Aceti C., Sordelli B., Gregotti C., Gazzani G. 2008. Isolation of high molecular weight components and contribution to the protective activity of coffee against lipid peroxidation in a rat liver microsome system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11653–11660.
- Daglia M., Papetti A., Gregotti C., Bertè F. and Gazzani G. 2000. In Vitro Antioxidant and ex Vivo Protective Activities of Green and Roasted Coffee. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1449-1454.
- Daly J. and Fredholm, B. 1998. Caffeine — An atypical drug of dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 51, 199–206.
- Davie JR. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*;133:2485S–93S.
- Del Castillo M., Ames J., Gordon M. 2002. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3698–3703.
- Del Castillo M., Gordon M., Ames, J. 2005. Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, 221, 471–477.

- Delgado-Andrade C. and Morales F. 2005. Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1403–1407.
- 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, 168–176.
- Dessalegn Y., Labuschagne M., Osthoff G., Herselman, L. 2008. Genetic diversity and correlation of bean caffeine content with cup quality and green bean physical characteristics in coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1726–1730.
- Duarte S., Abreu C., Menezes H., Santos M., Gouvêa C. Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. 2005. *Ciênc. Tecnol. Alimentos*, v. 25(2), p. 387-393.
- Duffield J. 2003. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci*;104:27–38.
- Dupas C., Marsset-Baglieri A., Ordonaud C., Ducept F., Maillard M. 2006. Coffee Antioxidant Properties: Effects of Milk Addition and Processing Conditions. *Journal of Food Science*. 71: S253–S258.
- Eaden J., Abrams K., Ekbohm A., Jackson E., Mayberry J. 2000. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case–control study, *Aliment Pharmacol. Ther.* 14:145–153.
- Emenaker, N J, Basson, M D. 2001. Short chain fatty acids differentially modulate cellular phenotype and c-myc protein levels in primary human nonmalignant and malignant colonocytes. *Dig dis Sci*. 46: 96.
- Esquivel P. and Jiménez V. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*. 46, 488–495
- FAO, Food and Agricultural Organization, Food balance sheets, <http://www.fao.org/>.
- Farah A. and Donangelo, C. 2006. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 23–26.
- Farah A., Monteiro M., Calado V., Franca A., Trugo, L. 2006. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98, 373-380.

- Farris P. 2007. Idebenone, green tea, and Coffeeberry® extract: New and innovative antioxidants. *Dermatologic Therapy*, 20, 322–329.
- Feregrino-Pérez A., Berumen L., García-Alcocer G., Guevara-González R., Ramos-González M., Reynoso-Camacho R., Acosta-Gallegos J., Loarca-Piña G. 2008. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *J. Agric.*
- Ferreira L., Oliveira R., Pimenta C., Torres L., Leal R., García T. 2012. Characterization of Fiber Modified Spent Coffee Grounds for Treatment with Alkaline Hydrogen Peroxide. The 24th International Conference on Coffee Science. November 11-16. San José, Costa Rica.
- Figuerola F., Hurtado M., Estevez A., Chiffelle I., Asenjo F. 2005. Fiber concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fiber sources for food enrichment. *Food Chemistry*;91:395–8.
- Finley, J W, Burell, B J, Reeves, G P. 2007. Pinto bean consumption changes SCFA profiles in fecal fermentations, bacterial populations of the lower bowel, and lipid profiles in blood of humans. *J. Nutr.* 2391.
- Fiol, N., Escudero, C., Villaescusa, I. 2008. Re-use of exhausted ground coffee wastefor Cr(VI) sorption. *Sep. Sci. Technol.* 43, 582–596.
- Fogliano V. and Morales F. 2011. Estimation of dietary intake of melanoidins from coffee and bread. *Food Funct.*, 2, 117–123.
- Fondevilla, M. 2006. Sistema sencillo de fermentación in vitro con flujo discontinuo de las fases líquida y sólida. Patente no. P 200600043, Oficina Española de Patentes y Marcas (ministerio de Industria, Turismo y Comercio) Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
- Fonnegra R. and Jiménez S. 2007. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*, 2ª Edición, Editorial Universidad de Antioquia. Pp. 71.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2012. www.fao.org, Abril, 2013.
- Franca A, Oliveira L and Ferreira M. 2009 b. Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds. *Desalination*, 249, 267–272

- Franca A, Oliveira L, Mendonça J and Silva X. 2005. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Food Chemistry*, 90, 89–94.
- Franca A., Oliveira L., Nunes A., Alves C. 2010. Microwave assisted thermal treatment of defective coffee beans press cake for the production of adsorbents. *Bioresource Technology*, 101, 1068–1074.
- Franca A., Oliveira L., Oliveira R., Ferreira M., Agresti P. 2009 a. A preliminary evaluation of the effect of processing temperature on coffee roasting degree assessment. *Journal of Food Engineering*, 92, 345–352.
- Freitas S., Monteiro P., Lago R. 2000. Extração do óleo da borra de café solúvel com etanol comercial. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. p. 740–3 [book of expanded abstracts].
- Fu, H, Shi, Q Y, Jin, S. 2004. Effect of short-chain fatty acids on the proliferation and differentiation of the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2. *Chin. J. Dig. Dis.* 5(3): 115.
- Fukumoto, L. R. and Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compound. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3597-3604.
- Gaafar M., Ahmed and Heba E. El-Ghamery and Mahmud F. Samy. 2013. Effect of Green and Degree of Roasted Arabic Coffee on Hyperlipidemia and Antioxidant Status in Diabetic Rats. *Advance Journal of Food Science and Technology* 5(5): 619-626.
- Galas A., Kulig P., Kulig J. 2014. Dietary inflammatory index as a potential determinant of a length of hospitalization among surgical patients treated for colorectal cancer. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1–7.
- Gibson, R G, Fuller, R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human user. *J Nutr.* 130: 391S.
- Ginz M. and Engelhardt U. 2001. Analysis of bitter fractions of roasted coffee by LC-ESI-MS-new chlorogenic acid derivatives: Association Scientifique Internationale du Café (ASIC).
- Gniechwitz D., Reichardt N., Blaut M., Steinhart H., Bunzel M. 2007. Dietary fiber from coffee beverage - degradation by human fecal microbiota. *J. Agric. Food Chem.*,

55, 6989–6996.

- Gniechwitz D., Reichardt N., Meiss E., Ralph J., Steinhart H., Blaut M., Bunzel M. 2008. Characterization and fermentability of an ethanol-soluble high molecular weight coffee fraction. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 5960–5969.
- Goerdts S., Politz O., Schledzewski K., Birk R., Gratchev A., Guillot P. 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology*;67(5–6):222–6.
- Goñi, I, Carron, M N. 2001. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. En: Lajolo, F, Saura-Calixto, F, Witting de R E, Menezes. *Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos.* Ed. Varela. Brasil. 311.
- Gould, M. 1985. Enhanced Polysaccharide Recovery from Agricultural Residue and Perennial Grasses treated with Alkaline Hydrogen Peroxide. *Biotechnol & Bioeng*, New York, v.27, p.893-896.
- Gouvea B., Torres C., Franca A., Oliveira L., Oliveira E. 2009. Feasibility of ethanol production from coffee husks. *Biotechnology Letters*, 31, 1315–1319.
- Granfeldt Y., Björck I., Drews A. and Tovar J. 1992. An in vitro method based on chewing to predict metabolic responses to starch in cereal and legumes products. *Eur J Clin Nutr* 46: 649–660.
- Guillon, F, Champ, M M. 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br J Nutr.* 88: 293.
- Hamer H., Jonkers D., Stein G., Schmolz M., Troost F., Bast A., Venema K. and Brummer R. 2009. C3– C6 but not C2 short chain fatty acids affect cytokine release in a co-culture system of Caco-2 cells and whole blood. In *Short chain fatty acids and colonic health.* Maastricht University. 49–69.
- Hečimović I., Belš čak-Cvitanović A., Horžić D. and Komes D. 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.Foodchem.2011.05.059.
- Heckman M., Weil J., González de Mejía, E. 2010. Caffeine (1, 3, 7 trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *Journal of Food Science*, 75, R77–R87.

- Heerdt B., Houston M., Augenlicht L. 1997. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ*;8: 523–32.
- Heimbach J., Marone P., Hunter J., Nemzer B., Stanley S., Kennephol E. 2010. Safety studies on products from whole coffee fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2517–2525.
- Herling W., Burger H., Schwab D., Hemmerle H., Below P., Schubert G. 1998. *Am. J. Physiol.*, 274, 1087–1093.
- Herszenyi L., Miheller P., Tulassay Z. 2007. Carcinogenesis in inflammatory bowel disease, *Dig. Dis.* 25 267–269.
- Hinnebusch B., Meng S., Wu J., Archer S., Hodin R. 2002. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr*;132:1012–7.
- Inan M., Rasoulpour R., Yin L., Hubbard A., Rosenberg D., Giardina C. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappa B activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*;118(4):798–801.
- Inan M., Rasoulpour R., Yin L., Hubbard A., Rosenberg D., Giardina C. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappa B activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*;118(4):798–801.
- Itzkowitz S., Yio X. 2004. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287 G7–G17.
- Iwai K., Kishimoto N., Kakino Y., Mochida K., Fujita T. 2004. *In vitro* antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4893–4898.
- Jackson L., Evers B. 2006. Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers, *Cancer Treat. Res.* 130 39–65.
- Jaiswal M., LaRusso N., Burgart L., Gores G. 2000. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism, *Cancer Res.* 60:184–190.

- Je Y., Liu W., Giovannucci E. 2009. Coffee consumption and risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Int. J. Cancer*, 124, 1662–1668.
- Johnston K., Clifford M., Morgan L. 2003. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 728–733.
- Kanauchi O., Andoh A., Iwanaga T., Fujiyama Y., Mitsuyama K., Toyonaga A. 1999. Germinated barley foodstuffs attenuate colonic mucosa damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model. *J Gastroenterol Hepatol*;14:1173–9.
- Kante, K., Nieto-Delgado, C., Rangel-Méndez, J.R., Bandosz, T.J. 2012. Spent coffee-based activated carbon: specific surface features and their importance for H₂S separation process. *J. Hazard. Mater.* 201, 141–147.
- Kawaii, S, Tomono, Y, Katase, E, Ogawa, K, Yano, M. 1999. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(5): 896.
- Kawamura T., Andoh A., Shioya T., Nishimura T., Hashimoto T., Tsujikawa H., Yasui T. and Fujiyama Y. 2009. Inhibitory effects of short-chain fatty acids on matrix metalloproteinase secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts. *Digestive Diseases and Sciences* 54: 238–245.
- Kawanishi S., Hiraku Y. 2006. Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation, *Antioxid. Redox Signal.* 8: 1047–1058.
- Kinne R., Bräuer R., Stuhlmüller B., Palombo-Kinne E., Burmester G. 2000. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*;2:189–202.
- Klampfer L., Huang J., Sasazuki T., Shirasawa S., Augenlicht L. 2003. Inhibition of interferon γ signaling by the short chain fatty acid butyrate. *Mol Cancer Res*;1:855–62.
- Kondamudi N., Mohapatra S., Misra M. 2008. Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11757–11760.
- Kono Y., Kobayashi K., Tagawa S., Adachi K., Ueda A., Sawa Y., Shibata H. 1997.

- Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj. 1335, 335–342.
- Kulkarni, N, Reddy, B S. 1994. Inhibitory effect of Bifidobacterium longum cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial betaglucoronidase. Proc Soc Exp biol Med. 207(3): 278.
- Kumar Joydeb and Young-Joon S. 2008. Inflammation: Gearing the journey to cáncer. Mutation Research 659:15–30.
- Ky L., Louarn J., Dussert S., Guyot B., Hamon S., Noriot M. 2001. Food Chem,75, 223–230.
- La Vecchia and Tavani A. 2007. Coffee and cancer risk: an update. Eur J Cancer Prev 16: 385-389.
- Lago R. and Antoniassi R. 2001. Composição centesimal e deaminoácidos em cafés. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil.
- Liu R. and Finley J. 2005. Potential cell culture models for antioxidant research. *J Agric Food Chem.* 53: 4311.
- Liu T., Li J., Liu Y, Xiao N., Suo H., Xie K., Yang Chunliu and Wu C. 2012. Short-Chain Fatty Acids Suppress Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide and Proinflammatory Cytokines Through Inhibition of NF- κ B Pathway in RAW264.7 Cells. Inflammation, Vol. 35, No. 5. Pp 1676-1684.
- Lu H., Ouyang W., Huang C. 2006. Inflammation, a key event in cáncer development, Mol. Cancer Res. 4 221–233.
- Ma B., Yao M., Zhong J., Ma Y., Gao C., Wu J., Qiu F., Wang C., Wang X. 2011. Increased systemic exposure to rhizoma coptidis alkaloids in lipopolysaccharide-pretreated rats attributable to enhanced intestinal absorption. Drug Metab Dispos. 40(2):381-8.
- MacFarlane, G., Gibson, G., Cummings, J. 1992. Comparision of fermentation reactions in different regions of the human colon. J. Appl. Bacteriol. 72: 57.
- Machado C., Soccol C., de Oliveira B., Pandey A. 2002. Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. Applied Biochemistry and Biotechnology, 102–103, 179–191.

- Materska, M. and Peruka, I. 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1750-1756.
- Mateu de Antonio, X. 2004. La fibra en la alimentación. *Farmcia hospitalaria*. Hospital del Mar. Barcelona. Edikamed S.L. Barcelona. 1.
- Mazzafera P. and Silvarolla, M. 2010. Caffeine content variation in single Green Arabica coffee seeds. *Seed Science Research*, 20, 163–167.
- McBain, A J, Macfarlane, G T. 1998. Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J Med Microbiol*. 47(5): 407.
- Meijer, K., P. de Vos, and M.G. Priebe. 2010. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: What relevance for health? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 13: 715–721.
- Millard A., Mertes P., Ittelet D., Villard F., Jeannesson P., Bernard J. 2002. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol*;130:245–55.
- Miller, S.J. 2004. Cellular and physiological effects of short-chain fatty acids. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 4: 839–845.
- Mohana Kumar, B., H.J. Song, S.K. Cho, S. Balasubramanian, S.Y. Choe, and G.J. Rho. 2007. Effect of histone acetylation modification with sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, on cell cycle, apoptosis, ploidy and gene expression in porcine fetal fibroblasts. *The Journal of Reproduction and Development* 53: 903–913.
- Monaco L., Sondahl M., Carvalho A., Crocomo O., Sharp W.1977. Applications of tissue cultures in the improvement of coffee. In: Reinert J, Bajaj YPS, editors. *Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture*. Berlin: Springer- Verlag. p. 109–29.
- Moncada, S., Palmer, R., Higgs, E. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109–142.

- Moon J., Yoo H., 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, 5365–5369.
- Morales F., Somoza V., Fogliano V. 2012. Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids*, 42: 1097–1109.
- Mueller M., Fusenig N. 2004. Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer, *Nat. Rev. Cancer* 4: 839–849.
- Murthy P. and Naidu M. 2010 a. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. *Food and Bioprocess Technology*; 5(2):657–64.
- Murthy P. and Naidu M. 2010 b. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*; 5(3):897–903.
- Murthy P. y Naidu M. 2012. Sustainable management of coffee industry by products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*. 66. 45–58
- Murthy P., Basavaraj K., Naidu R. 2001. Journey of Indian coffee quality. *Journal of Indian Coffee*;3:18–21.
- Murthy P., Naidu M., Srinivas P. 2009. Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 1246–1249.
- Mussatto S., Carneiro L., Silva J., Roberto I., Teixeira J. 2011 a. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*; 83:368–74.
- Mussatto S., Ercília E., Martins S., José A. 2011 b. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*;4:661–72.
- Nabais J., Nunes P., Carrott P., Carrott M., García A., Díez M. 2008. Production of activated carbons from coffee endocarp by CO₂ and steam activation. *Fuel Processing Technology*;89:262–8.

- Nelson W., De Marzo A., DeWeese T., Isaacs W.B. 2004. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer, *J. Urol.* 172: S6–S11.
- Nenadis N., Wang L., Tsimidou M, and Zhang H. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS+ assay. *J. Agric. Food Chem.*, 52(15): 4669-4674.
- Ni, Y.F., J. Wang, X.L. Yan, F. Tian, J.B. Zhao, Y.J. Wang, and T. Jiang. 2010. Histone deacetylase inhibitor, butyrate, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Respiratory Research* 11: 33.
- Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M.A., Voss, O.H., Gavrilin, M.A., Wewers, M.D., Guttridge, D.C., Grotewold, E., Doseff, A. 2007. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J. Immunol.* 179: 7121–7127.
- Nicoli M.C., Anesse M., Manzocco L. and Lericci C.R. 1997. Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.* 30, 282-297.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. www.senasica.gob.mx. Consultado en febrero 2014.
- Nunes F. and Coimbra M., 2007. Melanoidins from coffee infusions. Fractionation, chemical characterization, and effect of the degree of roast. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 3967–3977.
- Nunes F., Reis A., Domingues M., Coimbra M. 2006. Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3428–3439.
- O’Brien N., Woods J., Aherne S., O’Callaghan Y. 2000. Citotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell cultura models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem Soc Trans.* 28: 22.
- Ohno Y., Lee J., Fusunyan R., MacDermott R., Sanderson I. 1997. Macrophage inflammatory protein-2: chromosomal regulation in rat small intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;94(19):10279–84.

- Ohno Y., Lee J., Fusunyan R., MacDermott R., Sanderson I. 1997. Macrophage inflammatory protein-2: chromosomal regulation in rat small intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;94(19):10279–84.
- Ohshima H., Sawa T., Akaike T. 2006. 8-Nitroguanine, a product of nitrate DNA damage caused by reactive nitrogen species: formation, occurrence, and implications in inflammation and carcinogenesis, *Antioxid. Redox Signal.* 8: 1033–1045.
- Oliveira A., Paludo G., Santana S., Bizzo H., Cabral L., Freitas S. 2011. Determinación de compuestos fenólicos totales en los residuos sólidos de lo café instantáneo. Alice Brasil. Congreso Universidad Mackenzie. Rio de Janeiro Brasil.
- Oliveira W., Franca A., Oliveira L., Rocha S. 2008. Untreated coffee husks as biosorbents for the removal of heavy metals from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 152, 1073–1081.
- Olthof M., Hollman P., Katan M. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.*, 131: 66–71.
- Olthof M., Hollman P., Buijsman M., van Amelsvoort J., Katan M. 2003. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.*, 133, 1806–1814.
- Oomah B., Cardador-Martínez A., Loarca-Piña G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Sci Food Agric.* 85: 935.
- Orchel, A, Dzierzewicz, Z, Parfiniewicz, B, Weglsrz, L, Wilczok, T. 2005. Butyrateinduced differentiation of colon cáncer cells in PKS and JNK dependent. *Dig Dis Sci.* 50(3): 490.
- Orecchio S., Ciotti V., Culotta L. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC–MS, profile, levels and sources. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 819–826.
- Organización Internacional del Café (OIC), 2013. www.ico.org, Febrero, 2014.
- Pappa, P., Pellerá, F.M., Gidaracos, E. 2012. Characterization of biochar produced from spent coffee waste. In: *Proceedings of 3rd International Conference on Industrial and Hazardous Waste Management*, September 12–14, Crete, Greece, pp. 1–8.

- Paquin, P. (2009). Functional and speciality beverage technology. 1ª. edição. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Park J., Lee E. Lee J., Kim W., Kim H. 2007. Antiinflammatory effects of short chain fatty acids in IFN- γ -stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: Involvement of NF- κ B and ERK signaling pathways. *International Immunopharmacology* 7: 70–77.
- Parliament, T.H., 2000. An Overview of Coffee Roasting. In: Parliament, T.H., C.T. Ho and P. Schieberle (Eds.), *Caffeinated Beverages: Health Benefits, Physiological Effects and Chemistry*. Proceeding of the ACS Symposium Series 754. American Chemical Society, Washington, DC, pp: 188-201.
- Páscoa R., Magalhães L., Lopes J. 2013. FT-NIR spectroscopy as a tool for valorization of spent coffee grounds: Application to assessment of antioxidant properties. *Food Research International* 51: 579–586.
- Patil, A. N. A. N. D., Raheja, V. A. R. U. N., & Damre, A. N. A. G. H. A. 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 J Pharm Clin Res*, 3, 204-207.
- Pavlovic´ M., Buntic´ A, Šiler-Marinkovic´ S., Dimitrijevic´-Brankovic S. 2013. Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. *Separation and Purification Technology* 118: 503–510
- Pérez-Hernández L., Chávez-Quiroz K., Medina-Juárez L. y Gámez-Meza N. 2012. Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de cafe verde y procesado de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. Vol. 15. No 1. Pp. 51-56.
- Perwez S., Harris C. 2007. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials, *Int. J. Cancer* 121: 2373–2380.
- Pfluger R. 1975. Soluble coffee processing. In: Mantell CL, editor. *Solid wastes: origin, collection, processing, and disposal*. New York: Wiley.
- Philip M., Rowley D., Schreiber H. 2004. Inflammation as a tumor promoter in cáncer induction, *Semin. Cancer Biol.* 14:433–439.

- Pietro Carbone. 2010. <http://elgourmeturbano.blogspot.mx/2010/11/pietro-carbone-carbonespresso-el.html>. Abril, 2013.
- Ponte S. 2002. The 'Latte Revolution'? Regulation, Markets and Consumption in the Global Coffee Chain. *World Development* Vol. 30, No. 7, pp. 1099–1122, 2002
- Prasad S., Sung B., Aggarwal B. 2012. Age-associated chronic diseases require age-old medicine: role of chronic inflammation. *Prev Med*; 54(Suppl): S29–S37.
- Preethu, D.C., Prakash, B.N.U.H., Srinivasamurthy, C.A., Vasanthi, B.G. 2007. Maturity indices as an index to evaluate the quality of compost of coffee wastebled with other organic wastes. In: *Proceedings of the International Conference on Sustainable Solid Waste Management*, September 5–7, Chennai, India, pp. 270–275.
- Purseglove, J. W. 1974. Rubiaceae. In J. W. Purseglove (Ed.), *Tropical crops dicotyledons*. pp. 451–492. London: The English Language Book Society and Longman Group Ltd.
- Rajalingam K., Schreck R., Rapp U., Albert S. 2007. Ras oncogenes and their downstream targets, *Biochim. Biophys. Acta* 1773: 1177–1195.
- Ramalakshmi K., Kubra I., Rao L. 2007. Physicochemical characteristics of green coffee: Comparison of graded and defective beans. *Journal of Food Science*, 72, S333–S337.
- Ramalakshmi K., Kubra I., Rao L. 2008. Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Research International*, 41, 96–103.
- Ramalakshmi K., Rao L., Takano-Ishikawa Y., Goto M. 2009. Bioactivities of low grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food Chemistry*; 115:79–85.
- Ramalakshmi, K. and Raghavan, B. 1998. Coffee: Chemistry and Technology of its processing. *Indian Coffee*, LXII: 3-11.
- Ramírez-Jiménez A., Reynoso-Camacho R., Mendoza-Díaz. S., Loarca-Piña G. 2014. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. Flours. *Food Chemistry* 161:254–260.

- Reffas, A., Bernadet, V., David, B., Reinert, L., Bencheikh Lehocine, M., Dubois, M., Batisse, N., Duclaux, L., 2010. Carbons prepared from coffee grounds by H₃PO₄ activation: characterization and adsorption of methylene blue and Nylosan RedN-2RBL. *J. Hazard. Mater.* B119, 175, 779–788.
- Reich M., Dietrich M., Finlayson A., Fischer E., Martin P. 2008. Coffee and cigarette consumption and perceived effects in recovering alcoholics participating in Alcoholics Anonymous in Nashville, Tennessee. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 32, 1799–1806.
- Reichardt N., Gniechwitz D., Steinhart H., Bunzel M., Blaut M. 2009. Characterization of high molecular weight coffee fractions and their fermentation by human intestinal microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53, 287–299.
- Richard, K, Le, L, Ian, L, Brown, Y H, Tatsuya, M, Adrian, E, Graeme, P Y. 2007. Effect of dietary resistant starch and protein on colonic fermentation and intestinal tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*. 28(2): 240.
- Richelle M., Tavazzi I. and Offord E. 2001. Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa and Tea) Prepared per Cup Serving. *Agric. Food Chem.* 49, 3438-3442.
- Roberfroid, M B, Bornet, F, Bouley, C, Cummings, J H. 1995. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutr Rev.* 53: 127.
- Rocha B., Batista B., Duarte S., Dos Santos M. 2010. Comparison between the antioxidant properties of slurry of the coffee (*Coffea Arabica*) and coffee beverage. *Pharmacological Research*;1(5):245–9.
- Rosseti, R P. (2007). Determinação de fenóis totais em frutos do café: avaliações em diferentes fases de maturação. Dissertação (Mestre em Ciências), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP). São Carlos, 72p.
- Roy, M.K., M. Takenaka, E.S. Isob and T. Tsushida, 2007. Antioxidant potential, antiproliferative and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effect of thermal treatment. *Food Chem.*, 103: 106-114.

- Rufián-Henares J. y Morales F. 2007. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 40, 995–1002.
- Sacchetti G., Di Mattia C. Pittia P. and Mastrocola D. 2009. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J. Food Eng.* 90, 74-80.
- Säemann M., Böhmig G., Österreicher C., Burtscher H., Parolini O., Diakos C. 2000. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and upregulation of IL-10 production. *FASEB J.*;14:2380–2.
- Saenger M., Hartge E., Werther J., Ogada T., Siagi Z. 2001. Combustion of coffee husks. *Renewable Energy*, 23, 103–121.
- Samid D., Wells M., Greene M., Shen W., Palmer C., Thibault A. 2000. Peroxisome proliferators-activated receptor γ as a novel target in cancer therapy: binding and activation by an aromatic fatty acid with clinical antitumor activity. *Clin Cancer Res*; 6: 933–41.
- Sato Y., Itagaki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T. 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 136–138.
- Saura-Calixto F. 1998. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4303–4306.
- Saura-Calixto F., Goñi I., Bravo L., Mañas E. 1993. Resistant Starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *J. Food Sci.* 58(3): 642-643.
- Saura-Calixto, F, Pérez-Jímenez, 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. *Mol Nutr Food Res.* 54: 1.
- Saura-Calixto, F. 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *J Agric Food Chem.* 59: 43.
- Schottenfeld D., Beebe-Dimmer J. 2006. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia, *CA Cancer J. Clin.* 56: 69–83.

- Secretaria de Agricultura Ganaderia Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2012. www.sagarpa.gob.mx, Abril, 2013.
- Selma, M V, Espin, J C, Tomás Barberan, T. 2009. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric food Chem.* 57: 6485.
- Sergij , O.P., Schledzewski K., Birk R., Gratchev A., Guillot P., Hakiy N., D. Klemke C., Dippel E., Kodelja V., and Orfanos C.E.. 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67: 5–6.
- Sergij G., Schledzewski K, Birk R., Gratchev A., Guillot P., Hakiy N., Klemke C., Dippel E., Kodelja V. and C.E. Orfanos. 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67: 5–6.
- Seril D., Liao J., Yang G., Yang C. 2003. Oxidative stress and ulcerative colitis associated carcinogenesis: studies in humans and animal models, *Carcinogenesis* 24:353–362.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2012. www.siap.gob.mx , Abril, 2013.
- Shiga M., Lajolo M., Filisetti M. 2003. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris L.*) *Cienc. Tenol. Aliment. Caminas* 23:141-148.
- Silván J., Morales F., Saura-Calixto F. 2010. Conceptual study on Maillardized dietary fiber in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12244-12249.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-58.
- Stalmach A., Mullen W., Barron D., Uchida K., Yokota T., Cavin C., Steiling H., Williamson G., Crozier A. 2009. *Drug Metab. Dispos.*, 37, 1749–1758.
- Stalmach A., Steiling H., Williamson G., Crozier A. 2010. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Arch. Biochem. Biophys.*, 501, 98–105.
- Stein K., Borowicki A., Scharlau D., Scheu K., Brenner-Weiß Gerald, Obst Ursula, Hollmann J., Lindhauer M., Wachter N., 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, 678–687.

- Strano S., Dell'Orso S., Di Agostino S., Fontemaggi G., Sacchi A., Blandino G. 2007. Mutant p53: an oncogenic transcription factor, *Oncogene* 26: 2212–2219.
- Surh Y., Chun K., Cha H., Han S., Keum Y., Park K., Lee S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kB activation, *Mutat. Res.* 480–481:243–268.
- Taewoo J., Kandhasamy S., Sunghyun H., Jaehak L., Sun-Young P., Songmun K., Jin-Woo J. 2014. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. *Saudi Journal of Biological Sciences.* xx: xxx–xxx.
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E. y Conte, A. 2010. Effect of Dietary Melanoidins on Lipid Peroxidation during Simulated Gastric Digestion: Their Possible Role in the Prevention of Oxidative Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 58: 2513–2519.
- Tedelind S., Westberg F., Kjerrulf M. and Vidal A. 2007. Antiinflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 13: 2826.
- The Statistics Division of the FAO (Faostat), 2012. <http://faostat.fao.org> , Abril, 2013.
- Thibault A., Figg W., Samid D. A phase I study of the differentiating agent phenylbutyrate in patients with cancer. 1996. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol*;15:A1539.
- Tipping P., Leong T., Holdsworth S. 1991. Tumor necrosis factor production by glomerular macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rabbits. *Lab Invest*;65:272–9.
- Tsai, W.T., Liu, S.C., Hsieh, C.H. 2012. Preparation and fuel properties of biochars from the pyrolysis of exhausted coffee residue. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 93,63–67.
- Usami, M., K. Kishimoto, A. Ohata, M. Miyoshi, M. Aoyama, Y. Fueda, and J. Kotani. 2008. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition Research (New York, N.Y)* 28: 321–328.

- Verzelloni E., Tagliazucchi D., Del Rio D., Calani L., Conte A. 2011. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. *Food Chemistry*, 124, 1430–1435.
- Vinolo M., Rodrigues H., Hatanaka E., Sato F., Sampaio S. and Curi R. 2010. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils.
- Vitaglione P., Fogliano V., Pellegrini, N. 2012. Coffee, colon function and colorectal cancer. *Food Funct.* 3, 916–922.
- Votavová L., Voldřich M., Ěvřík R., Ěřková H., Mlejnecká J., Stolař M. 2009. Changes of antioxidant capacity of Robusta coffee during roasting. *Czech Journal of Food Science*, 27, S49–S52.
- Wang, X, Gibson, G R.1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol.* 75: 373.
- Wenzel, U, Kuntz, S, Brendel, M D, Daniel, H. 2000. Dietary flavones is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 60(14): 3823.
- Whitcomb D. 2004. Inflammation and cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287 G315–G319.
- Wong and Wang, 1991. Degradation of tannins in spent coffee grounds by *Pleurotus sajor-caju*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* Vol 7. Pp. 573-574.
- Yang A., Palmer A., de Wit H. 2010. Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology*, 211, 245–257.
- Yermilov V., Rubio J., Becchi M., Friesen M.D, Pignatelli B., Ohshima H. 1995. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro, *Carcinogenesis* 16:2045–2050.
- Ying L., Hofseth A., Browning D., Nagarkatti M., Nagarkatti P., Hofseth L. 2007. Nitric oxide inactivates the retinoblastoma pathway in chronic inflammation, *Cancer Res.* 67:9286–9293.

X. ANEXOS



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales



Querétaro, Qro, 17 de abril de 2014

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Investigadora
Facultad de Ciencias Naturales

Estimada Dra. Loarca:

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de investigación del cual usted es responsable:

Titulo	Resolución
Comparación de la composición química y nutracéutica del grano tostado, bebida y residuo sólido del café (<i>Coffea arabica</i> L.), y su actividad sobre la sobrevivencia de células de colon	Aprobado

Se anexan comentarios mínimos por parte del Comité para ser atendidos antes de la realización del proyecto.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente,

Dra. Olga P. García O.
Comité de Bioética
Facultad de Ciencias Naturales

Anexo 1. Aprobación del proyecto por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

ABREVIATURAS

ABTS	: 2,2- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
AGCC	: Ácidos grasos de cadena corta
AMECAFE	: Asociación Mexicana de la Cadena Productiva de Café
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenosín trifosfato
CU	: Café utilizado
DIF	: Detector de ionización de flama
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle médium
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DPPH	: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EF	: Extracto de fermentación
ERN	: Especies reactivas de nitrógeno
ERO	: Especies reactivas de oxígeno
ES	: Error estándar
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
FND	: Fracción no digerible
g	: gramos
h	: horas
HDAC	: Histona desacetilasa
IFN- γ	: Interferón gamma
IL-10	: Interleucina 10
IL-1 β	: Interleucina 1 β
IL-4	: Interleucina 4
IL-8	: Interleucina 8 , la actividad de la
IL12	: Interleucina 12
LPS	: Lipopolisacáridos
M	: Molar
mg:	: Miligramos
min	: Minutos

MIP-2	: Proteína inhibidora de macrófagos
mL	: Mililitros
mM	: Milimolar
nm	: Nanómetros
Mmol	: Milimol
MTT	: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
N	: Normal
NaAc	: Acetato de sodio
NaB	: Butirato de sódio
NaB	: Butirato de sodio
NaP	: Propionato de sodio
NaPA	: Fenilacetato de sodio
NaPB	: Fenilbutirato de sodio
NF- κ B	: Factor nuclear kappa de las células β
NO	: Óxido nítrico
OIC	: Organización Internacional del Café
PA	: Fenilacetato de metilo
PB	: Fenilbutirato
PCR	: Proteína C-reactiva
PPAR- γ	: Receptor de peroxisoma-proliferador activado- γ
Rb	: Proteína del retinoblastoma
rpm	: Revoluciones por minuto
SAGARPA	: Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación
SIAP	: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TNF- α	: Factor de necrosis tumoral- α
μ g	: Microgramos
μ L	: Microlitros