



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la
República. (PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Efecto de los productos de la fermentación colónica *in vitro* del residuo
sólido de café (*Coffea arabica* L.) usado, tostado francés, sobre la
supervivencia de células de cáncer de colon humano”**

TESIS

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

Presenta: LNCA Angélica María Hernández Arriaga

Dirigido por: Dra. Rocio Campos Vega

CU, Santiago de Querétaro, Qro. Octubre, 2016



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC)

“Efecto de los productos de la fermentación colónica *in vitro* del residuo sólido de café (*Coffea arabica* L.) usado, tostado francés, sobre la supervivencia de células de cáncer de colon humano”

Opción de titulación
Tesis

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

Presenta:

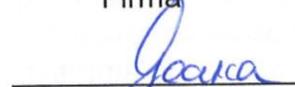
LNCA Angélica María Hernández Arriaga

Dirigido por: Dra. Rocio Campos Vega

Dra. Rocio Campos Vega
Sinodal


Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Sinodal


Firma

Dra. Sandra Mendoza Díaz
Sinodal


Firma

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda
Sinodal


Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Sinodal


Firma


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


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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2016

RESUMEN

Más de 6 toneladas de residuos de café son generados cada año, estos se desechan causando una gran contaminación al medio ambiente, sin embargo podrían ser utilizados debido a los componentes bioactivos que contienen. El café usado (CU), uno de los subproductos de la industria del café, podría emplearse en la industria farmacéutica o de nutraceuticos, principalmente para disminuir el riesgo de adquirir algunas enfermedades gastrointestinales como el cáncer de colon, debido a que sus componentes poseen capacidad antioxidantes y los compuestos derivados del metabolismo de la fibra presentan efectos antiproliferativos y apoptóticos. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de los productos de la fermentación de la fracción no digerible del CU, tostado francés, sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano *in vitro*. El CU mostró mayor contenido de fibra total, fibra insoluble y valores similares de almidón resistente en comparación con el grano, así como un alto contenido y bioaccesibilidad gastrointestinal de los compuestos fenólicos, siendo los mayoritarios el ácido clorogénico y ácido gálico. A nivel del colon, la fermentación de la fracción no digerible del CU, empleando microbiota donadores con peso normal (pn) y sobrepeso (sp), generó ácidos grasos de cadena (AGCC), siendo el ácido butírico el predominante y, con una producción mayoritaria con la microbiota de sobrepeso. La bioaccesibilidad de compuestos fenólicos a nivel del colon también se vió influenciada por la microbiota empleada. Los resultados mostraron que el extracto de la fermentación (EF) del CU (EFCU) inhibe la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano, encontrándose diferencias en los extractos de ambas microbiotas ya que, la concentración letal media (CL₅₀) usando microbiota de pn fue de 13.5% y mostró tendencia dosis-dependiente, mientras que el EFCU de sp no siguió esa tendencia y se requirió hasta el 70% del extracto para obtener la misma inhibición. Debido a esto, los siguientes ensayos se realizaron solo con la CL₅₀ del EFCU-pn. Las células tratadas con el extracto resultaron ser TUNEL positivo, sugiriendo un proceso apoptotico, pero sin citotoxicidad (ensayo lactato deshidrogenasa). Además, la inducción de catalasa y la reducción de glutatión total indican la inducción de estrés oxidativo; mientras que la inhibición de 8-iso-prostaglandina F_{2α} sugiere que no hay peroxidación lipídica. Los resultados indican que el estado de nutrición puede influir en la microbiota y/o la capacidad de absorción de los compuestos y metabolitos derivados de los alimentos, y por consiguiente en sus efectos sobre los tejidos, alterando sus efectos fisiológicos. El CU presenta potencial para ser incorporado en la industria de alimentos como un ingrediente funcional debido a sus efectos inhibitorios sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon *in vitro*, mediada por apoptosis. Se requieren estudios adicionales para confirmar y extender estos resultados.

(Palabras clave: Café usado, fibra dietaria, antioxidantes, nutraceuticos, ácidos grasos cadena corta, cáncer de colon, salud gastrointestinal)

SUMMARY

More than 6 tons of coffee residue are produced every year, these are wasted causing great pollution, those by-products can be used in the food industry as they contain important amounts of bioactive compounds such as: melanoidins, dietary fiber, polyphenols, etc... Due to this compounds, spent coffee grounds (SCG), one of the main by-products of the coffee industry could be use by nutraceutical and/or pharmaceutical industries, principally to diminish the risk of some gastrointestinal diseases as colon cancer because of the antioxidant capacity and fiber of the SCG components witch have been proved to possess antiproliferative and apoptotics effects. The objective of this work was to determine the effect of the products of the colonic fermentation of indigestible fraction of the SCG, french toasted, on the survival of cells of human colon cancer *in vitro*. The SCG showed higher total fiber content, insoluble fiber and similar values of resistant starch compared to the coffee beans, as well as a high content and gastrointestinal bioavailability of phenolic compounds, being chlorogenic acid and gallic acid the highest. The colonic fermentation of the indigestible fraction of CU using microbiota normal weight (nw) and overweight (ow) donors, generated short chain fatty acids (SCFA), being the predominant the butanoic acid, with a highest production of the overweight microbiota. The bioavailability of phenolic compounds in the colon was also influenced by the microbiota employed. The results showed that the fermentation extract (FE) of SCG (FESCG) inhibits survival of cells of human colon cancer, differing in extracts of both microbiota as the median lethal concentration (LC₅₀) using microbiota nw was 13.5% and it was dose-dependent, while the EFCU of ow did not follow the trend and required up to 70% of the extract to obtain the same inhibition. By the above, the following tests were performed using only with the CL₅₀ of FESCG-nw. Treated cells with the extract were TUNEL positive, suggesting an apoptotic process but without cytotoxicity (lactate dehydrogenase assay). Furthermore, the increase of catalase activity and the reduction total glutathione indicate the induction of oxidative stress; but the inhibition of 8-iso-prostaglandin F2 suggests no lipid peroxidation. The results indicate that the nutritional status may influence the microbiota and/or the absorption capacity of the compounds and metabolites derived from food and therefore its effects on tissues, altering its physiological effects. The CU has the potential to be incorporated as a functional ingredient in the food industry due to its inhibitory effects on colon cancer cells survival *in vitro*, mediated by apoptosis. Further studies are needed to confirm and extend these results.

(Key words: spent coffee grounds, bioctive compounds, dietary fiber, antioxidants, nutraceuticals, colon cancer, gastrointestinal health)

DEDICATORIAS

A mis padres;

Angélica Arriaga Leal y Everardo Hernández Palero por darme las herramientas necesarias para ser una persona de provecho y poder seguir con mi educación hasta este nivel, así como apoyarme en todos los momentos de mi vida incondicionalmente.

A mi hermano;

Juan Marcos Hernández Arriaga por comprenderme y darme su apoyo siempre.

A mis amigos:

Cecí, Iván, Liceth, Astrid, por su apoyo durante este tiempo, por la confianza y los momentos vividos durante el transcurso de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Se agradecen los financiamientos y apoyos recibidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

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

A la Dra. Rocío Campos Vega, por compartir sus conocimientos, sus consejos, su paciencia, así como su tiempo y apoyo en la realización de ésta tesis.

A la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña, por otorgarme el espacio para el desarrollo de mis experimentos, así como sus comentarios para la mejora del proyecto.

A demás miembros de mi comité, Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz, Dra. Angélica Feregrino Pérez y Dra. Haydé Vergara Castañeda por las contribuciones aportadas para la mejora del proyecto.

A Cecilia González de Cosío, por ser mi compañera de equipo y amiga durante el tiempo de la maestría.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 El café.....	3
II.1.1 Procesamiento del café.....	4
II.1.2 Tostado del café.....	5
II.1.3 Subproductos del café.....	6
II.1.4 Compuestos bioactivos en el café usado.....	8
II.1.5 Aplicaciones del café usado sobre la salud.....	13
II.2 Microbiota.....	15
II.2.1 Interacción entre microbiota y compuestos fenólicos.....	16
II.2.2 Acidos grasos de cadena corta.....	16
II.3 Cáncer de colon.....	18
II.3.1 Relación entre cáncer de colon y peso corporal.....	20
II.3.2 Mecanismos de muerte celular en cáncer.....	21
II.3.3 Otros mecanismos de muerte celular.....	24
II.3.4 Técnicas para identificar apoptosis.....	28
II.3.5 Técnicas para identificar necrosis.....	30
II.4 Proceso de digestión.....	30
II.4.1 Modelos <i>in vitro</i> para la evaluación de la digestión gastrointestinal.....	30
II.4.2 Modelos <i>in vitro</i> para la evaluación de la fermentación colónica.....	31
II.5 Modelos celulares utilizados en estudios <i>in vitro</i>.....	32
II.5.1 Línea celular HT-29.....	32
III. JUSTIFICACIÓN.....	34
IV. HIPÓTESIS.....	35
V. OBJETIVOS.....	35
V.1 Objetivo General.....	35

V.2 Objetivos Específicos.....	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	36
VI.1 Materiales.....	36
VI.1.1 Compuestos químicos	36
VI.1.2 Material biológico	36
VI.2 Métodos.....	37
VI.2.1 Análisis proximal	37
VI.2.2 Determinación de capacidad antioxidante	41
VI.2.3 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	42
VI.2.4 Fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND.....	45
VI.2.5 Cultivo celular.....	47
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
VII.1 Composición proximal del café usado y grano de café.....	55
VII.2 Contenido de fibra total, insoluble, soluble y almidón resistente de los granos de café y café usado.....	56
VII.3 Contenido de compuestos fenólicos totales y cuantificación de fenoles de grano de café y café usado tostado francés.	58
VII.4 Capacidad antioxidante de grano de café y café usado tostado francés.	61
VII.5 Contenido de compuestos fenólicos totales y cuantificación de fenoles por HPLC en las etapas de la digestión y fermentación colónica del CU	62
VII.6 Capacidad antioxidante durante las etapas de la digestión y fermentación colónica <i>in vitro</i>	66
VII.7 Flujo de agua durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	68
VII.8 Efecto sobre el pH en el medio de incubación durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND del CU tostado francés con microbiota de personas con peso normal y sobrepeso	70
VII.9 Cuantificación AGCC durante las etapas de la fermentación colónica con microbiota de peso normal y sobrepeso usando cromatografía de gases acoplado a masas.....	73
VII.10 Ensayos <i>in vitro</i> con línea celular HT-29	75
VII.10.1 Efecto del EFCU <i>in vitro</i> sobre la viabilidad celular	75

VII.10.2 Efecto del extracto de fermentación sobre la apoptosis de las células HT-29.	77
VII.10.3 Actividad de catalasa en células HT-29 tratadas con el CL ₅₀ del EFCU-pn..	79
VII.10.4 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en células HT-29 tratadas con el CL ₅₀ del EFCU-pn.....	81
VII.10.5 Contenido de glutatión total en células HT-29 tratadas con el CL ₅₀ del EFCU- pn	81
VII.10.6 Contenido de 8-iso-prostaglandina F ₂ α en células HT-29 tratadas con el CL ₅₀ del EFCU-pn	83
VII.10.7 Contenido de lactato deshidrogenasa en sobrenadante de células HT-29 tratadas con el CL ₅₀ del EFCU-pn.....	84
VIII. CONCLUSIONES.....	88
XI. REFERENCIAS.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del café usado	8
Tabla 2. Composición nutracéutica del CU	13
Tabla 3. Principales bacterias productoras de AGCC y sus efectos fisiológicos	17
Tabla 4. Composición proximal del grano de café y café usado tostado francés ...	56
Tabla 5. Contenido de fibra total, soluble e insoluble en el grano de café y café usado tostado francés	57
Tabla 6. Cuantificación de fenoles totales y compuestos fenólicos por HPLC-DAD en grano de café y café usado tostado francés	60
Tabla 7. Capacidad antioxidante y en grano de café y café usado tostado francés	61
Tabla 8. Cuantificación de fenoles y porcentaje de bioaccesibilidad por HPLC-DAD en extractos de digestión y fermentación colónica del café usado tostado francés	64
Tabla 9. Porcentaje de bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en las etapas de la digestión y fermentación colónica <i>in vitro</i>	65
Tabla 10. Capacidad antioxidante por DPPH y ABTS en las etapas de la digestión y fermentación colónica del café usado	67
Tabla 11. Flujo de agua de digestión <i>in vitro</i>	69
Tabla 12. Permeabilidad aparente de compuestos fenólicos totales en digestión <i>in vitro</i>	70
Tabla 13. Medición de pH en las etapas de la fermentación colónica <i>in vitro</i>	72

Tabla 14. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante GC-MS durante la fermentación <i>in vitro</i> del la FND del café usado con microbiota de peso normal y sobrepeso	74
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la cereza del café	4
Figura 2. Diferentes grados de tostado de café	6
Figura 3. Células apoptóticas identificadas con tinción TUNEL	22
Figura 4. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis	24
Figura 5. Blastocitos identificados por tinción TUNEL	29
Figura 6. Morfología de células HT-29	33
Figura 7. Inhibición de la sobrevivencia (%) de células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 por EFCU-pn y EFCU-sp.....	76
Figura 8. Regresión lineal de la curva dosis-respuesta del efecto del EFCU-pn y EFCU-sp de células de cáncer de colon humano HT-29	76
Figura 9. Fluorescencia de células en apoptosis por tinción TUNEL	78
Figura 10. Intensidad de fluorescencia de células en el ensayo TUNEL	79
Figura 12. Contenido de glutatión total en células tratadas con el CL ₅₀ del EFCU-pn.....	82
Figura 13. Contenido de la enzima 8-iso-prostaglandina f ₂ α en células tratadas con el CL ₅₀ del EFCU-pn.....	84
Figura 14. Contenido de la enzima lactato deshidrogenasa tratadas con el IC ₅₀ del EFCU-pn.....	86

I. INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo y el segundo producto con mayor comercialización después del petróleo, por lo que todos los días grandes cantidades de residuo de café son desechados. Estos desechos contienen una gran cantidad de compuestos bioactivos que podrían ser usados en la industria de alimentos o farmacéutica, generando productos con valor agregado y al mismo tiempo ayudar a aminorar el problema de contaminación que generan (Mussatto *et al.*, 2011a).

Uno de los residuos del café que tiene mayor importancia es el café usado (CU), el cual se genera al preparar la bebida de café; este contiene una amplia cantidad de antioxidantes y fibra, las cuales han sido estudiadas debido a sus efectos benéficos para la salud humana (Campos-Vega *et al.*, 2015).

Entre los compuestos benéficos se pueden encontrar las melanoidinas, compuestos fenólicos, taninos y fibra. Estudios epidemiológicos han sugerido que una dieta alta en estos compuestos disminuye los índices de cáncer de esófago, próstata, estómago y colon, siendo este último la segunda causa de muerte, clasificada en los tumores malignos, así como el cuarto tipo de cáncer más común en Estados Unidos en ambos géneros (OMS, 2012).

Para evaluar el efecto potencial que los compuestos presentes en los alimentos tienen sobre la salud, los modelos de digestión y fermentación *in vitro* han sido ampliamente utilizados. La finalidad de estos es proporcionar una alternativa útil a los modelos animales y humanos para detección rápida de componentes en los alimentos, evaluando parámetros que no se pueden realizar con seres humanos y animales, debido a las condiciones éticas. De manera particular, estas herramientas pueden ayudar a dilucidar la forma en que los compuestos presentes en los alimentos podrían prevenir enfermedades no transmisibles, como el cáncer de colon (Payne *et al.*, 2012).

Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los productos de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado, tostado francés, sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano *HT-29*. Lo anterior contribuirá a re-valorizar el CU al mostrar sus potenciales efectos sobre la salud.

II. ANTECEDENTES

II.1 El café

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo y el segundo producto con mayor comercialización después del petróleo, por lo que grandes cantidades de residuos son generados por la industria cafetera representando un problema medioambiental importante (Mussatto *et al.*, 2011a).

La humanidad ha consumido la bebida de café desde hace más de 1000 años y actualmente se consumen 400 billones de tazas por año; esto nos indica la importancia que ha tenido este producto desde la antigüedad así como en la actualidad. El grano de café (GC) proviene de un arbusto llamado cafeto del grupo de las *Rubiaceae*, es originario del continente africano donde puede llegar a medir de 12 a 14 metros de altura, pero cuando se cultiva en América sólo mide de 4 a 6 metros. Las especies que se cultivan con mayor frecuencia para ser comercializadas son: *Coffea arabica*, que representa el 75 % de la producción mundial y *Coffea canaefora*, ésta última, llamada comúnmente robusta, contiene un mayor grado de acidez y resistencia a plagas que la anterior, pero únicamente representa el 25 % de la producción mundial (Mussatto *et al.*, 2011b).

La especie arabica es un arbusto con pequeñas hojas ovaladas verde oscuro, es genéticamente distinta a otras especies, ya que contiene cuatro juegos de cromosomas en lugar de dos. Sus frutos maduran de 7 a 9 meses y su lugar de cultivo es Latinoamérica, África central y del este, India y muchas veces su cultivo se extienden hasta Indonesia. La cereza de café (Figura 1) consiste en un fruto verde cuando es inmaduro que se torna rojo-violeta u oscuro cuando madura; su piel o pericarpio es suave y cubre una pulpa amarilla, fibrosa y dulce llamada mesocarpio externo. Posteriormente, se encuentra una delgada capa de mucilago transparente, llamada capa de pectina, que cubre a un endocarpio delgado de color amarillento al que se le otorga el nombre de pergamino; finalmente la piel plateada protege cada hemisferio del grano de café (Esquivel y Jiménez, 2012).

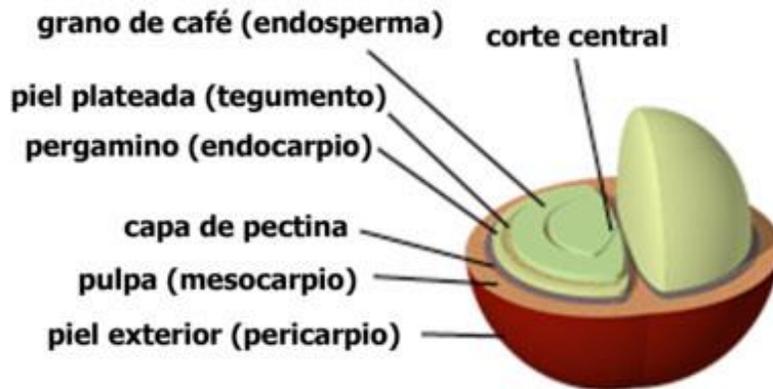


Figura 1. Partes de la cereza del café

(Imagen obtenida de: <http://www.nuestrocafe.com/imagen/articulo/Significado-Estructura.jpg>)

II.1.1 Procesamiento del café

La cereza de café es el fruto crudo de la planta de café, es cosechado cinco años a partir de la siembra del árbol, cuando ésta se torna de color rojo. El procesamiento del café comienza cuando la cereza es convertida a granos de café verde, esto inicia con la remoción de la pulpa y la cáscara, usando métodos húmedos o secos. El método seco es más simple y generalmente es usado para el café de tipo Robusta mientras que el húmedo se utiliza para los granos de café tipo Arabica. En el método húmedo la pulpa y la cáscara se retiran cuando el fruto aún está fresco; la desventaja de este proceso es que se utilizan grandes cantidades de agua. El siguiente paso es someter al fruto a una fermentación controlada para poder retirar todo el mucílago que se adhiere al grano, por lo que se generan compuestos volátiles durante esta fermentación, que resultan en un café con mayor aroma y calidad (Mussatto *et al.*, 2011a).

II.1.2 Tostado del café

El tostado del café es otro paso esencial en el procesamiento del café pues modifica completamente sus propiedades organolépticas, generando sabores, aromas y colores, que afectan tanto a la calidad del grano como a la bebida (Cruz *et al.*, 2012).

El tostado del café es un proceso en el que los granos de café se calientan entre 170-240 °C (Gonzalez-Rios *et al.*, 2007). El tostado provoca varios cambios en la composición química del producto, pues transforma los compuestos polifenólicos en productos complejos de la reacción de Maillard, además se forman compuestos orgánicos debido a la pirolisis que se lleva a cabo. El café se debe enfriar rápidamente posteriormente al tostado, ya que un tostado excesivo puede modificar la calidad del producto; por último se muele el café para la preparación de la bebida. Los compuestos solubles se extraen del grano de café molido con agua a 175 °C mediante condiciones de presurización para obtener la infusión (Mussatto *et al.*, 2011a).

Existen una gran diversidad de tipos de tostado, como se muestra en la Figura 2, pero en general se clasifican en tres grupos: claro, medio y oscuro. Los factores que se modifican en el tipo de tostado son las temperaturas y el tiempo a los que se somete el grano de café. El tostado claro se procesa en un rango de temperatura que va de 196 a 205 °C, el medio de 196 a 205 °C y el oscuro de 225 a 245 °C; el tostado francés es una subclase del oscuro (Schenker *et al.*, 2002).



Figura 2. Diferentes grados de tostado de café

(Imagen obtenida de: https://www.nescafe.pl/upload/1_roasted_coffee_beans_squarearound_6875.png)

II.1.3 Subproductos del café

Más del 50 % de la cereza de café no es usada para la producción del café verde que es comercializado, por lo que es desechado durante el proceso, de ahí la importancia de encontrar aplicaciones para estos subproductos. Algunos de los usos que se le ha encontrado a estos desechos son: producción de energía como biodiesel, adsorción de compuestos y manufactura de ciertos productos como lo son etanol y α -amilasa (Esquivel y Jiménez, 2012).

II.1.3.1 Cáscara, piel y pulpa

La cascara, piel y pulpa tienen una composición característica, ya que son altos en hidratos de carbono (35 %), proteína (5.2 %) y fibra (30.8 %), además de que contienen una cantidad importante de minerales (10.7 %). Se ha explorado la posibilidad de usarlos como alimento para ganado, pero su alto contenido en compuestos antinutritivos como taninos y cafeína presentes no ha hecho viable

esa opción. El alto contenido en fitoquímicos se ha empleado para la elaboración de productos en la industria farmacéutica y de alimentos, ya que se le pueden extraer compuestos como cafeína y polifenoles (Esquivel y Jiménez, 2012).

II.1.3.2 Café usado

Debido a la alta producción y consumo de la bebida de café, se generan residuos sólidos conocidos como café usado (CU), este no tiene valor comercial y generalmente se elimina como desecho sólido, en algunos casos se llega a usar como fertilizante. Debido a su alto contenido de componentes orgánicos como: cafeína, taninos y polifenoles, el CU puede generar daños en el medio ambiente por lo que su eliminación debe ser manejada adecuadamente (Panusa *et al.*, 2013).

Otro manejo que se le da es quemar el CU, este proceso genera grandes cantidades de gases con efecto invernadero que pueden afectar la atmósfera; por lo que se ha tratado de encontrar otros usos para este desecho que tengan un menor impacto ecológico o que generen productos con un valor agregado. Algunas de las aplicaciones que se ha encontrado son: producción de biocombustibles como etanol y biodiesel, sustrato de cultivo de algunos hongos y como adsorbente para remover colorantes básicos o metales pesados de aguas residuales (Mussatto *et al.*, 2011a).

El CU contiene una amplia cantidad de antioxidantes y fibra, las cuales han sido estudiadas debido a sus efectos benéficos para la salud humana (Campos-Vega *et al.*, 2015). En la Tabla 1 se muestra la composición química del CU, según lo reportado por diferentes autores.

Tabla 1. Composición química del café usado

<i>Constituyentes</i>	<i>(Caetano et al., 2012)</i>	<i>(Mussatto et al., 2011b)</i>
	(%)	(%)
Humedad	12.2	10
Cenizas	1.43	1.6
Nitrógeno	2.1	2.3
Proteína	13.3	13.6
Celulosa	13.8	8.6
Lignina total	33.6	-
Lignina soluble	1.7	-

II.1.4 Compuestos bioactivos en el café usado

El CU contiene cantidades considerables de compuestos orgánicos que pueden ser utilizados como una fuente de productos con valor agregado, mismos que generalmente son desechados entre los que se encuentran: fibra dietaria, melanoidinas, compuestos fenólicos, entre otros. (Campos-Vega *et al.*, 2015).

II.1.4.1 Fibra dietaria

Los polisacáridos de los alimentos pueden dividirse en digeribles y no digeribles, los digeribles son hidrolizados por enzimas digestivas y metabolizados por hidrólisis enzimática, mientras que los polisacáridos no digeribles no pueden ser hidrolizados ni absorbidos en el intestino delgado y son los componentes principales de la fibra dietaria. La fibra dietaria consiste en hidratos de carbono no digeribles y lignina, que generalmente provienen de las plantas. La fibra funcional

consiste en hidratos de carbono que tienen beneficios fisiológicos en los seres humanos. Tres tipos de polisacáridos predominan en el grano de café, celulosa, arabinogalactanos y galactomananos, mientras que en la bebida de café sólo predominan las últimas dos. El contenido de fibra dietaria soluble en la bebida de café soluble en polvo es significativo, ya que va de 0.47-0.75 g/100 mL de café o un 2.54-20 % (Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2007).

Estos hidratos de carbono no digeribles atraviesan el tracto gastrointestinal sin ser afectados por las enzimas y son fermentados en el colon por la microbiota colónica, lo que produce algunos metabolitos entre los que se encuentran los más importantes que son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Entre los AGCC más abundantes producidos en el colon se encuentran el ácido propiónico, el acético y el butírico, el 95 % de ellos son absorbidos por los colonocitos y el resto es secretado en las heces. Estudios han demostrado que los AGCC juegan un papel importante en la prevención y el tratamiento del síndrome metabólico, desordenes del intestino, así como algunos tipos de cáncer. Estos también afectan positivamente el tratamiento de la colitis ulcerativa, la enfermedad de Crohn y la diarrea por el consumo de antibióticos (Besten *et al.*, 2013).

La pulpa de los granos de café contienen 24- 25 % de fibra total, de la cual el 20-21 % es proveniente de fibra insoluble y el resto, menos del 4 %, es soluble (Gniechwitz *et al.*, 2007).

El CU contiene un total de 43 % de fibra total de la cual 35 % insoluble y 8% soluble, además éste posee una capacidad antioxidante de 2.4 μ moles de trolox por 100 g de peso seco, similar al de productos conocidos por su capacidad antioxidante como el vino tinto y los duraznos (Campos-Vega *et al.*, 2015).

La fibra dietaria acarrea una importante cantidad de compuestos antioxidantes, principalmente compuestos polifenólicos a través del tracto gastrointestinal. Estos polifenoles exhiben propiedades similares a la fibra dietaria, pues resisten las enzimas digestivas y parcialmente a la fermentación colónica, pero se liberan debido a la acción de la microbiota colónica produciendo

metabolitos, así como un ambiente antioxidante; a este conjunto de compuestos se le ha otorgado el nombre de fibra dietaria antioxidante (Saura-Calixto, 2011).

II.1.4.2 Melanoidinas

Las melanoidinas son compuestos con alto peso molecular con coloraciones marrones que son generadas en la reacción de Maillard durante el proceso de tueste. Representan más del 25 % del peso seco de los granos de café tostados. Las melanoidinas del café tienen alta capacidad antioxidante, debido a su capacidad de unirse de forma no covalente. Evidencia demuestra que estos compuestos pueden modular el crecimiento bacteriano en el colon, tienen propiedades antiinflamatorias y antiglicantes, pero lo más importante es que inhiben metaloproteinasas de matriz, una familia de endopeptidasas que tienen un papel importante en el crecimiento tumoral y metástasis (Mussatto *et al.*, 2011b).

El CU contiene 16 % de melanoidinas según lo estudiado por Nunes y Coimbra (2009) pero no se ha obtenido su composición por lo que se requiere mayor experimentación en esta área.

II.1.4.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos han recibido una atención importante debido a los beneficios que aportan la salud como lo son: su acción protectora contra las enfermedades no transmisibles, cáncer y enfermedades cardiovasculares, entre otras; esto se le ha asociado principalmente a su actividad antioxidante (Mussatto, 2011a).

A estos compuestos se les atribuyen actividades hepatoprotectivas, hipoglucémicas, antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, y anticarcinogénicas por lo que tienen numerosas aplicaciones en la industria de alimentos funcionales así como en la farmacéutica. En los granos de CU se han realizado varias formas de extracción para recuperar la mayor cantidad de compuestos fenólicos,

recuperándose hasta 18 mg equivalentes de ácido gálico (GAE, por sus siglas en inglés)/g (Mussatto, *et al.*, 2011c).

Panusa *et al.*, (2013) obtuvo 399 mg GAE/g en materia seca, utilizando etanol al 20 % y microondas por 40 segundos a 80 Watts. Posteriormente se probó su capacidad antioxidante por el método DPPH, sugiriendo que la capacidad antioxidante del CU es proveniente de los compuestos fenólicos, principalmente de ácido caféico (AC) y ácido clorogénico (CGA, por sus siglas en inglés).

II.1.4.4 Ácido clorogénico

El CGA es uno de los compuestos fenólicos más abundantes en el CU y se le han atribuido una gran cantidad de propiedades benéficas a la salud, debido a su potente actividad antioxidante. Los CGA se componen de una familia de ésteres formados entre ácidos trans-cinámicos, tales como el ácido caféico y el ácido ferúlico estos unidos al ácido quínico; el enlace éster se forma entre el grupo carboxilo de los ácidos trans-cinámico y los cuatro grupos hidroxilo de ácido quínico. Las subclases de CGA incluyen ácidos cafeoilquinicos (CQA), ferulilquinico (FQA) y dicafeoilquinico. Existen tres isómeros en cada subclase, dando nueve CGA en total, siendo el ácido 5-O-cafeoilquinico (5-CQA) la forma más abundante presente en los granos de café. Una taza regular de café contiene entre 20 a 675 mg CGA, dependiendo de la fuente de los granos de café, las temperaturas de tueste utilizadas y los métodos de elaboración empleados. Por ejemplo, una taza de café Arabica aporta entre 70 y 200 mg de CGA, mientras que el café robusta contiene entre 70 y 300 mg de CGA. El 5-CQA debe su capacidad antioxidante a ser un poderoso secuestrador de radicales hidroxilo y también eliminador eficaz del radical superóxido en la xantina/XOD. La capacidad de captación de radicales peroxilo de 5-CQA es de aproximadamente 12 μ mol equivalentes Trolox/g (Liang y Kitts, 2014).

Utilizando distintos métodos de extracción, dentro del CU se a encontrado

en el intervalo de 0.37 a 1.39 mg/g de CGA (Mussatto *et al.*, 2011c).

II.1.4.5 Taninos condensados

Los taninos condensados son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas, generalmente estas los contienen de un 5 a un 10 % de peso seco en sus hojas. Estos compuestos tienen la finalidad de defender a las plantas de los herbívoros debido a su astringencia y/o toxicidad (Barbehenn y Constabel, 2011).

Las proantocianidinas o taninos condensados son cadenas de unidades de flavonoles unidas; como se mencionó anteriormente, son los responsables de los sabores amargos y astringentes de las plantas, así como del café. Estos compuestos funcionan como antioxidantes, ya que interaccionan con los radicales libres de oxígeno de las células, contribuyendo a evitar ciertas enfermedades cardiovasculares e incluso el cáncer y se ha observado que también pueden ayudar a evitar infecciones en el tracto urinario. Estos compuestos constituyen el 4 % de la materia seca de los granos de café usados (Pujol *et al.*, 2013).

II.1.4.6 Flavonoides

Los flavonoides se encuentran generalmente en los frutos y les aportan su color característico. Todos poseen la estructura básica de 2-benzo-pirona; las familias más importantes son: flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, y antocianidinas (Rice-Evans *et al.*, 1996). Los flavonoides tienen un efecto fisiológico importante ya que se le han atribuido propiedades antiinflamatorias, debido a sus efectos sobre la enzima prostaglandina sintetasa; además otorgan protección vascular, tienen efecto gastroprotector y antisecretor, acción antitumoral, son antialérgicos, tienen efectos antimicrobianos y antivirales, diuréticos, antihepatotóxicos, espasmolíticos y sobre el metabolismo de los lípidos (Rice-Evans *et al.*, 1996). En el CU se han encontrado un intervalo de 0.5 a 2.5 mg

equivalentes de quercetina (QR)/g, dependiendo del solvente utilizado para extraerlos (Mussatto *et al.*, 2011b).

En base a lo indicado anteriormente, la Tabla 2 recapitula los compuestos nutraceuticos en el CU.

Tabla 2. Composición nutraceutica del CU

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Fibra dietaria	43 %
Fibra soluble	8 %
Fibra insoluble	35 %
Melanoidinas	16 %
Compuestos fenolicos	399 GAE/g.
Ácido clorogénico	1.39 mg/g
Taninos condensados	4 %
Flavonoides	2.5 mg QE/g

(Con información de: Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2007; Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2007; Mussatto, 2011a; Mussatto *et al.*, 2011b; Pujol *et al.*, 2013). GAE, equivalentes de ácido gálico; QE, equivalentes de quercetina.

II.1.5 Aplicaciones del café usado sobre la salud

El café, al ser una de las bebidas más populares es consumido por millones de personas cada día. Los efectos benéficos del café, inicialmente se le atribuían exclusivamente a la cafeína, pero ahora se conocen otros compuestos también contribuyen a las propiedades funcionales de esta bebida. La bebida de café se

clasifica como una bebida funcional, debido a el papel de su consumo en la prevención de algunas enfermedades, pues investigaciones epidemiológicas sugieren que el consumo de café se asocia con un menor riesgo de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cáncer, así como condiciones neurodegenerativas como: la enfermedad de Parkinson (Ludwig *et al.*, 2014).

Estas propiedades están determinadas por la composición del café verde y de los cambios que se producen durante el tostado de los granos de café. Por lo que, los subproductos del grano de café podrían considerarse como posibles ingredientes funcionales para la industria alimentaria (Esquivel y Jiménez, 2012).

El CU ha demostrado tener una fuerte capacidad para secuestrar radicales libres, debido a sus componentes como cafeína, ácido clorogénico y caféico y trigonelina por lo que también se le ha atribuido una actividad antitumoral, antiinflamatoria y antialérgica (Esquivel y Jiménez, 2012).

Bravo *et al.*, (2013) reportaron que el CU presenta un efecto antioxidante y genoprotector, pues reduce el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y disminuye el daño en el ADN de un 29 a un 73 %.

López-Barrera *et al.*, (2016) reportó que el CU produce AGCC y que el extracto de la fermentación colónica ejerció un efecto antiinflamatorio en macrófagos murinos, reduciendo la liberación de mediadores inflamatorios.

El CU podría ser una fuente importante para la producción de compuestos bioactivos, las tecnologías disponibles permiten el uso del CU agregando valor a un subproducto abundante, ya que su desecho supone un problema medioambiental (Campos-Vega *et al.*, 2015).

II.2 Microbiota

Una creciente atención se ha mostrado hacia el rol de la dieta, principalmente de los macronutrientes, afectando la composición y actividad metabólica de la microbiota colónica humana y las posibles afectaciones a la salud. Se ha observado que la prevalencia de microorganismos patógenos se asocia a enfermedades intestinales como obesidad y cáncer gástrico, existen medidas dietarias que han sido probadas y son eficientes en preservar una población microbiana sana (Heinritz *et al.*, 2016).

Algunas especies bacterianas del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* o *Faecalibacterium prausnitzii* han demostrado efectos benéficos a la salud de humanos y animales, y son reconocidos biomarcadores de salud intestinal. Por otro lado, la familia *Enterobacteriaceae*, por ejemplo, es considerada deterioradora para animales y humanos debido a sus miembros patogénicos como: *E. Coli* y *Shigella* (Heinritz *et al.*, 2016).

Una dieta occidental, alta en grasa y baja en fibra, ha demostrado tener efectos perjudiciales a la salud; ya que un aumentado consumo de grasa aumenta la permeabilidad colónica para productos microbianos del colon como los lipopolisacáridos (LPS) que pueden causar una desregulación inmune con inflamación colónica y sistémica, lo que puede desencadenar otras patologías como colitis, síndrome del intestino irritable y cáncer de colon (Fernández *et al.*, 2016).

Evidencia *in vivo* e *in vitro* apoya el papel de la microbiota como causante de daño en el DNA e inestabilidad cromosomal, lo que puede dar como consecuencia mutaciones responsables de la carcinogénesis. Además, la microbiota juega un papel fundamental en la transformación de los pro-carcinogénicos dietarios, la producción de ROS, especies de nitrógeno y genotoxinas, así como la producción de algunos factores protectores de cáncer como el folato y la biotina, esenciales para la síntesis y reparación del ADN (Vipperla y O'Keefe, 2016).

II.2.1 Interacción entre microbiota y compuestos fenólicos

Los metabolitos de los compuestos polifenólicos, juegan un papel importante en los beneficios a la salud de los alimentos que los contienen, algunos compuestos fenólicos provenientes de la dieta se transforman en el colon debido a las enzimas microbianas y pueden ser considerados como biomarcadores del metabolismo colónico si son absorbidos. Esto podría explicar algunos efectos fisiológicos comunes observados por el consumo de alimentos con composición fenólica diversa (Selma *et al.*, 2009).

Sin embargo, algunos fenoles se absorben sin ser modificados debido a su alta biodisponibilidad. La variedad de efectos de cada compuesto fenólico varía dependiendo de la persona, como resultado de la variabilidad interindividual de la ecología microbiana del colon, lo que determina la absorción del compuesto fenólico (Selma *et al.*, 2009).

Estudios *in vitro* sugieren que los polifenoles ejercen un efecto antimicrobiano contra los microorganismos patógenos como *Clostridiales* y *Enterobacteriales*, mientras que favorecen el crecimiento de bacterias benéficas como *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp (Anhê *et al.*, 2015).

II.2.2 Acidos grasos de cadena corta

El mayor sitio de producción de AGCC en el cuerpo humano, es el colon. Pero para ello se requiere la presencia de bacterias fermentativas específicas. Los prebióticos ingeridos (fibra), llegan intactos al colon dónde pueden ser usados como fuente de carbono por las bacterias probióticas del colon, como las bacterias ácido lácticas del género *Bifidobacterium* o *Lactobacillus*, las cuales generan AGCC como consecuencia. Buena parte del trabajo para identificar los microorganismos responsables de la producción de AGCC ha sido encaminada al ácido butírico, pues es considerado uno de los metabolitos más importantes, ya

que sirve como fuente de energía para los colonocitos, tiene propiedades antiinflamatorias y regula la expresión de genes de diferenciación y apoptosis. Además, estos compuestos disminuyen el pH del intestino grueso inhibiendo el crecimiento y la actividad de bacterias patógenas (Fernández *et al.*, 2016).

En la Tabla 3, se puede observar algunas de las principales bacterias productoras de AGCC, así como sus efectos fisiológicos más importantes.

Tabla 3. Principales bacterias productoras de AGCC y sus efectos fisiológicos

AGCC	Bacteria productora	Efecto fisiológico
Ácido acético	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Lactibacillus spp.</i> <i>Bacteroidetes thetaiotaomicron</i>	-Energía -Inducción de la síntesis de colesterol
Ácido propiónico	<i>Roseburia insulinovorans</i> <i>Veillonella spp.</i> <i>Ruminococcus obeum</i> <i>Bacteroides spp.</i> <i>Dialister spp.</i> <i>Phascolarctobacterium spp.</i>	-Energía en células normales -Gluconeogénesis -Inhibición de la biosíntesis de colesterol -Inhibición de las HDACs
Ácido butírico	<i>Roseburia spp.</i> <i>Eubacterium rectale</i> <i>Eubacterium hallii</i> <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> <i>Anaerostipes caccae</i> <i>Coprococcus eutactus</i>	-Energía en células normales -Actividad antiinflamatoria -Inducción de citoquinas inmunosupresoras -Inducción de GLP-2 inmunosupresora -Inhibición de HDACs en células tumorales -Inducción de la apoptosis en células tumorales -Sobreexpresión de enzimas detoxificantes -Aumento de la función de barrera de la mucosa

(Fernández *et al.*, 2016)

Mientras que los tres AGCC tiene efectos benéficos para la salud en la mucosa colónica, como se mencionó anteriormente, el ácido butírico es el más potente con respecto a protección contra el cáncer. Múltiples mecanismos han sido identificados sugiriendo su efecto protector contra el cáncer de colon; el ácido butírico exhibe un efecto antiproliferativo debido a la activación de la cascada de apoptosis y arresto al crecimiento de tumores por hiperacetilación de histonas. Suprime los tumores potenciando la expresión del gen p53 y transforma la señalización del factor de crecimiento- β (TGF- β) e incrementa la inmunogenicidad de células de cáncer de colon. Por otro lado, el ácido acético y propiónico son absorbidos sistemáticamente y juegan papeles importantes en el metabolismo de lípidos y glucosa (Vipperla y O'Keefe, 2016).

II.3 Cáncer de colon

El cáncer es un crecimiento anormal, rápido, desorganizado y descontrolado de nuevo tejido, que continúa una vez cesado el estímulo de proliferación celular. La masa de tejido formado como consecuencia de este proceso puede afectar la función del órgano donde se originó, puede infiltrar los tejidos vecinos y diseminarse por vía sanguínea o linfática a otros tejidos distantes, comprometiendo su funcionalidad y amenazando la vida del organismo (Lacy *et al.*, 2002).

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo y fue responsable de la muerte de 8.2 millones de personas en el 2012. Según la OMS, 694,000 millones de estas muertes estuvieron relacionadas con cáncer colorrectal. El cáncer de colon (CC) es la segunda causa de muertes, clasificada en los tumores malignos, en Estados Unidos en hombres y mujeres. En el 2012 se estimó que hubo 143, 000 millones de personas diagnosticadas con esta patología, catalogándolo como el cuarto tipo de cáncer más común en hombres después del de piel, próstata y pulmón. Asimismo en mujeres tiene el cuarto lugar en

importancia después del cáncer de piel, mama y pulmón. Los factores de riesgos asociados con el CC incluyen: la edad avanzada, los antecedentes de herencia familiar de cáncer de colon, alteraciones genéticas, consumo de tabaco y la dieta. Considerando que la función del colon es la de absorber agua y fermentar la fracción no digerible mediante la microbiota colónica, esto sugiere que existe una fuerte correlación entre la dieta y el cáncer de colon. Se ha observado que dietas altas en grasa y bajas en frutas, verduras, calcio, folatos y fibra son asociadas con mayor riesgo a padecer esta enfermedad. Diversos estudios epidemiológicos sugieren que existe una relación entre una dieta alta en frutas y verduras con bajos índices de cáncer de esófago, próstata, colon y estómago por lo que algunos compuestos, como lo son los fenólicos, han causado gran interés por sus propiedades anticarcinogénicas. Se ha sugerido que ácidos como el hidroxicinámico y el clorogénico son algunos de los responsables de la asociación inversa entre el consumo de fruta y el cáncer (OMS, 2012).

Las células cancerosas son genéticamente menos estables que las normales, por lo tanto desarrollan mutaciones genéticas a medida que van proliferando. Las mutaciones, los re-arreglos, duplicaciones, entre otras, les otorgan nuevas características que son adquiridas por la tumorigénesis (Hanahan y Weinberg, 2000).

El CC es una enfermedad heterogénea con tres fenotipos diferentes, pero en ocasiones traslapados, reflejando diferentes formas de inestabilidad del ADN. La vía de la inestabilidad cromosómica (CIN) es el fenotipo más común, representando el 85 % de todos los CC esporádicos. Las células malignas en tumores con fenotipo CIN son típicamente aneuploides, lo que significa que hay un cambio en el número cromosómico y revelan reordenamientos cromosómicos en gran escala. La inestabilidad de microsátélites (MSI) del fenotipo representa 15 % de todos los CC y es causada por diversas deficiencias en el sistema de ADN reparador de desajustes, lo que lleva a un gran aumento en el grado de mutaciones, 15 cánceres con el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) exhiben la

metilación del ADN aberrante, conduciendo a un promotor hipermetilación concordante de múltiples genes (Ahmed *et al.*, 2013).

En un estudio analizando 276 muestras de CC, indicaron que el 16 % de los carcinomas colorrectales resultaron estar hipermutados: tres cuartas partes de ellos tenía la inestabilidad de microsatélites alta, por lo general con hipermetilación y silenciamiento de MLH1, y una cuarta parte tenía mutaciones en el gen reparador de desajustes y las mutaciones ϵ polimerasa (POLE). Veinticuatro genes también estaban mutados de manera significativa y además de las mutaciones de APC, P53, SMAD4, PIK3CA y KRAS que eran de esperarse, se encontraron mutaciones frecuentes en ARID1A, SOX9 y FAM123B (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

II.3.1 Relación entre cáncer de colon y peso corporal

La obesidad está relacionada como factor de riesgo al CC, ya que numerosos estudios han observado que existe una relación entre el peso corporal y los filos dominantes de bacterias en el colon, además de que se ha mostrado que la microbiota tiene un impacto en la resistencia a la insulina, inflamación y adiposidad con interacciones en células epiteliales y endocrinas (Zhu *et al.*, 2011).

Alrededor el 11% de los casos de cáncer colorrectal (CCR) han sido atribuidos al sobrepeso y la obesidad en Europa. Los datos epidemiológicos sugieren que la obesidad está asociada con un mayor riesgo (30-70%) de cáncer de colon en los hombres, mientras que la asociación es menos consistente en las mujeres. Existen tendencias similares para adenoma colorrectal, aunque el riesgo parece ser menor (Bardou *et al.*, 2013).

Una posibilidad es que la activación inducida por la obesidad de RAS-RAF-ERK y la señalización de PI3K-AKT-mTOR tanto en individuos jóvenes y mayores acelera la carcinogénesis sustituyendo mutaciones somáticas que activan genéticamente las mismas vías pero durante un período de largo de tiempo. Esta

idea es compatible con que las mutaciones en KRAS, BRAF y p53 son las principales impulsoras de la progresión del CCR y son las que se encuentran mutadas con mayor frecuencia que otros genes, a excepción de APC (el gen que usualmente inicia el CCR) (Bultman, 2016).

Además de los efectos directos de la dieta sobre la progresión del CC; como se mencionó anteriormente, la dieta puede influir indirectamente a la progresión del CC por la modulación de la composición y el metabolismo de la microbiota intestinal y la regulación epigenética de la expresión génica (Bultman, 2016).

II.3.2 Mecanismos de muerte celular en cáncer

La muerte celular se puede definir como la incapacidad de la célula para mantener la integridad de la membrana, pero se indica que una célula está muerta cuando además de esto, el núcleo se ha fragmentado y/o los cuerpos apoptóticos han sido fagocitados. La importancia de la muerte celular radica en que es necesario eliminar las células innecesarias, envejecidas, dañadas o perjudiciales para mantener una homeostasis. La muerte celular convencionalmente se divide en tres tipos: apoptosis (tipo I), autofagia (tipo II) y necrosis (tipo III); a continuación se describirán las que presentan mayor importancia en cáncer (Ouyang et al., 2012).

II.3.2.1 Apoptosis

La apoptosis o muerte celular tipo I, se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos específicos de las células que mueren, incluyendo el encogimiento celular, la condensación y la fragmentación nuclear, formación de cuerpos apoptóticos en la membrana dinámica y la pérdida de adhesión a las células vecinas o a la matriz extracelular (Figura 3). Los cambios bioquímicos incluyen la escisión de ADN cromosómico en fragmentos internucleosomales, la

externalización de fosfatidilserina y un número de divisiones de sustrato intracelulares mediante proteólisis específica (Ouyang *et al.*, 2012).

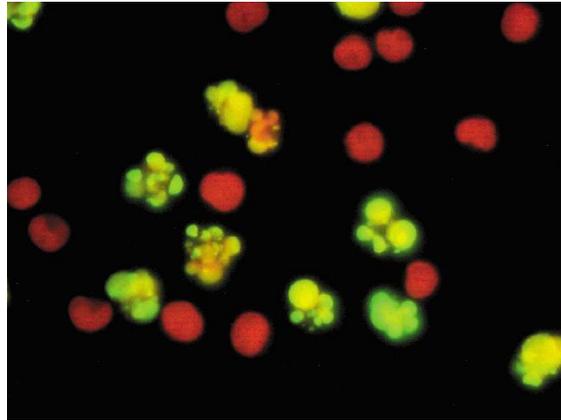


Figura 3. Células apoptóticas identificadas con tinción TUNEL

(Imagen obtenida de: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A23210>)

II.3.2.1.1 Vía extrínseca de la apoptosis

La activación de la apoptosis (Figura 4) por la vía extrínseca activa a los receptores de la membrana celular, tales como Fas (First apoptosis signal, por sus siglas en inglés), TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1, por sus siglas en inglés), TRAIL-R1 (TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1, por sus siglas en inglés), TRAIL-R2, p75-NGFR (p75-Nerve Growth Factor Receptor, por sus siglas en inglés), entre otros (Wajant *et al.*, 2003).

La vía extrínseca inicia con la activación de la caspasa iniciadora (caspasa-8) que a su vez, puede activar a la caspasa-3 o bien fragmentar al miembro de la familia Bcl-2, Bid, lo cual conduce a la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9 (Hengartner, 2000).

Una de las cascadas de señalización inducida de manera extrínseca, se lleva a cabo en la superficie de la célula y se da inicio por la unión de los

receptores Fas con su ligando FasL (Figura 4). Esta unión trae los dominios citoplasmáticos de los receptores de membrana a una proximidad que permite inducir un cambio conformacional que ayuda a la formación de un complejo de señalización, denominado complejo de señalización inductor de muerte (DISC, por sus siglas en inglés) en el extremo citoplasmático de los receptores. El DISC comprende a los receptores y ligandos, así como una proteína adaptadora FADD (Fas associated death domain), en algunas células, la caspasa-8 conduce a una amplificación que involucra la ruptura del miembro de la familia Bcl-2, Bid. Cuando Bid es fragmentado puede inducir la liberación mitocondrial del citocromo C mediado por Bax, llevando a la célula a un destino apoptótico (Johnstone *et al.*, 2002).

Otro mecanismo que sigue la muerte extrínseca es el de la citocina proinflamatoria, el factor de necrosis tumoral (TNF), el cual se secreta principalmente por células del sistema inmune, tales como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T. La síntesis del TNF- α se puede inducir por células tumorales (Johnstone *et al.*, 2002).

II.3.2.1.2 Vía intrínseca de la apoptosis

La vía intrínseca (Figura 4) puede activarse por la vía de los receptores de muerte o por otros estímulos que son independientes de los receptores de muerte, incluyendo el daño al ADN, la inhibición de la topoisomerasa o el retiro de factores tróficos (Arnoult *et al.*, 2002).

Esta vía involucra a los miembros de la familia Bcl-2, estos regulan la liberación del Citocromo C por la despolarización de la mitocondria al citoplasma, donde APAF-1 (apoptotic protease-activating factor 1) y la procaspasa 9 forma un complejo proteico llamado apoptosoma. La caspasa 9 es procesada y activada cuando forma parte del apoptosoma, que a su vez promueve la activación de la caspasa 3, caspasa 6 y la caspasa 7 (Nicholson y Thornberry, 2003).

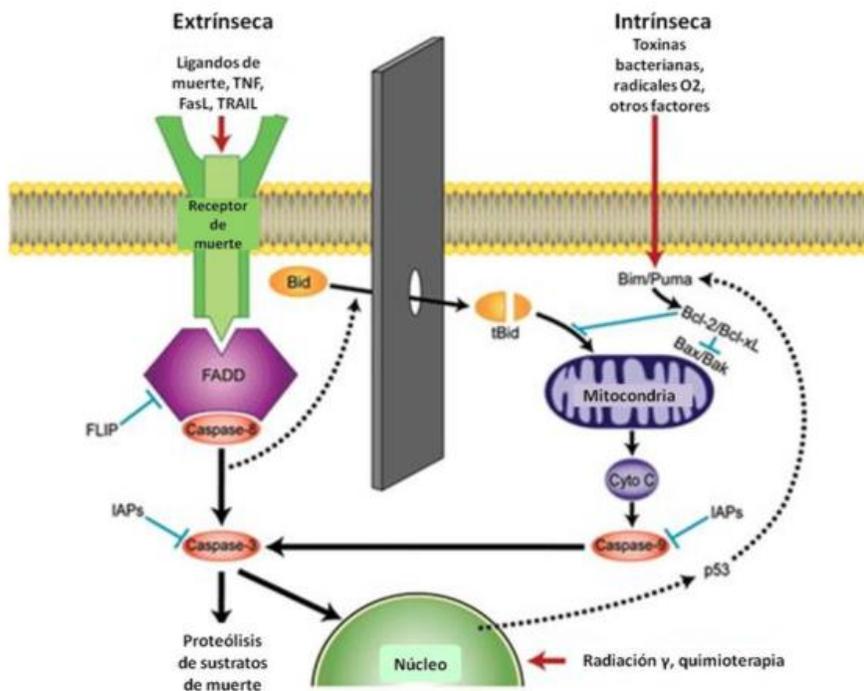


Figura 4. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis

(Imagen obtenida de: http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v6n1/coto_files/image004.jpg)

II.3.3 Otros mecanismos de muerte celular

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son una consecuencia de la atmósfera rica en oxígeno, en la que vivimos y son productos de desecho del metabolismo del oxígeno, estos son importantes mediadores de distintos procesos celulares, incluyendo la adhesión celular, la respuesta inmune, la apoptosis, el crecimiento celular y diferenciación y son segundos mensajeros en la señalización intracelular. Bajos niveles de ROS son importantes para llevar a cabo los procesos antes mencionados, pero una producción aberrante de ROS provoca en los mecanismos de distintas enfermedades algunos desordenes neurológicos y cánceres. La mitocondria, es la mayor fuente de ROS y el anión superóxido es el ROS inicial producido por este organelo. El superóxido es producido principalmente por el complejo I y complejo III de la cadena transportadora de electrones. Los radicales superóxido participan en la formación de especies

reactivas de nitrógeno (RNS) peroxinitrito, así como centros de ataque de sulfuro de hierro para enzimas mitocondriales claves que participan en la producción de radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Holley *et al.*, 2010).

La célula se encuentra equipada con una variedad de sistema de enzimas para detoxificarse de ROS. El peróxido de hidrógeno producido en la mitocondria es descompuesto a agua por glutatión peroxidasa (GPX) específico de la mitocondria, así como peroxiredoxinas (PRX) y catalasa (Holley *et al.*, 2010).

II.3.3.1 Superóxido dismutasa

Superóxido dismutasa (SOD) es la primera línea de defensa antioxidante en contra de los ROS generados por respiración dentro de los organismos eucariotas. La SOD actúa convirtiendo el anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno que puede ser transformado en agua por catalasa o peroxiredoxina, protegiendo así a la célula de daños inducidos por radicales libres. Existen 3 formas de SOD, la forma encontrada en el citoplasma que contiene Cu y Zn (Cu/ZnSOD), la forma mitocondrial que contiene Mn (Mn-SOD) y la extracelular Ec-SOD (Raamsdonk y Hekimi, 2012).

La inhibición de SOD causa la acumulación en la célula de ROS, lo cual conlleva a daño mediado por radicales libres de la membrana mitocondrial, la liberación del citocromo C de la mitocondria y la apoptosis en células de cáncer. Por lo que buscar inhibidores de SOD podría ayudar a eliminar selectivamente a las células de cáncer (Huang, *et al.*, 2000).

II.3.3.2 Catalasa

Catalasa es una enzima omnipresente en todos los organismos, en las células eucariotas se encuentra en los peroxisomas. La enzima contiene un grupo heme en su sitio activo responsable de su actividad catalítica convirtiendo dos moléculas de peróxido (H_2O_2) en dos moléculas de agua (H_2O) y oxígeno (O_2),

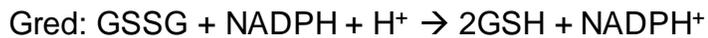
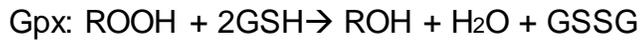
recibiendo el nombre de dismutación. Las más altas concentraciones de catalasa se encuentran en los riñones, hígado y eritrocitos; en menor concentración se encuentran en el tejido conectivo (Michiels *et al.*, 1994).

Siendo que el SOD cataliza la dismutación del anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este puede ser transformado en agua y oxígeno posteriormente mediante la enzima catalasa (Kaynar *et al.*, 2005).

Un aumento en la peroxidación de lípidos, junto con una disminución en la actividad de catalasa aumenta el estrés oxidativo durante alteraciones malignas inducidas, se ha observado que al disminuir la actividad de la catalasa en el tejido canceroso promueve la el crecimiento del cáncer y su infiltración en los tejidos que lo rodean lo cual es importante para la invasión y la metástasis (Aachary *et al.*, 2015).

II.3.3.3 Glutación peroxidasa- reductasa

Glutación peroxidasa (Gpx) es una selenoproteína, además de ser la enzima tetramérica con cuatro subunidades idénticas de alrededor 22 kD; cada una de ellas contiene un átomo de selenio, ya que una selenocisteína está involucrada en su actividad catalítica. Del 60-70 % de la actividad de la enzima se encuentra en el citoplasma y 25 a 40 % en la mitocondria. Gpx reduce los hidroperóxidos lipídicos y no lipídicos como el peróxido de hidrógeno mientras oxida dos moléculas de glutatión (GSH), esto tiene muy alta especificidad para el donador de electrones (GSH) pero menos específico para el sustrato, además la tasa de reacción incrementa linealmente con la concentración del sustrato y la enzima no se puede saturar por GSH. El Gpx requiere GSH reducido para detoxificar peróxidos, por lo que una concentración elevada de GSH reducido es mantenido en la célula ($0.5-10 \times 10^{-1}$ M). Cuando se oxida GSSG es reducido de nuevo a GSH por la glutatión reductasa (Gred). Gred es una enzima dimérica conteniendo FAD en sus sitios activos, la cual utiliza NADPH para reducir GSSH (Michiels *et al.*, 1994).



Se ha observado que los niveles de Gpx disminuyen durante el desarrollo de cáncer de colon, produciendo una mayor cantidad de peróxido de hidrógeno y aumentando el estrés oxidativo (Gladyshev *et al.*, 1998).

II.3.3.3 Isoprostanos F2

Los isoprostanos F2, son formados de manera no enzimática mediante el daño catalizado de los radicales libres hacia el ácido araquidónico esterificado seguido por la liberación enzimática de los fosfolípidos de celulares o de lipoproteínas. Los isoprostanos se forman *in situ* en el dominio de fosfolípido de las membranas celulares y lipoproteínas circulantes, para posteriormente unirse a las fosfolipasas, liberarse extracelularmente para circular en la sangre y ser excretadas en orina. Las mediciones de los isoprostanos F2 proporcionan un índice específico y sensible de la peroxidación lipídica no enzimática y se han utilizado para evaluar la peroxidación lipídica *in vivo* en varios estadios de enfermedad (Tacconelli *et al.*, 2010).

Las especies reactivas producidas durante el estrés oxidativo, pueden alterar las bicapas de membrana y causar peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), lo que da como resultado a la formación del radical lipoperoxilo, el cual reacciona con los lípidos para producir radicales lipídicos y un lípidos hidroperóxilados. Los lípidos hidroperóxilados son inestables y generan nuevos radicales peroxilo y alcoxi, además de descomponerse en productos secundarios, estos radicales libres producidos durante peroxidación lipídica tienen algunos efectos locales, debido a su corta vida, pero los productos de descomposición de peróxidos lipídicos pueden servir como segundos mensajeros de estrés oxidativo, debido a su vida media y su capacidad para difundirse desde el sitio de su formación. Los compuestos formados por la peroxidación lipídica y la ruptura de lípidos, puede conducir a cambios en la permeabilidad y la fluidez de la

bicapa lipídica de la membrana, así alterando drásticamente la integridad celular (Barrera, 2012).

II.3.4 Técnicas para identificar apoptosis

II.3.4.1 Técnica de TUNEL

El estudio de los daños en el ADN tiene un amplio interés a nivel básico como en campos aplicados de la investigación. Elucidar los mecanismos implicados en la generación de daño en el ADN y las consecuencias de este daño, tiene un enorme impacto en múltiples campos de la investigación científica y en última instancia conducir a una mejor comprensión de las enfermedades humanas. Uno de los métodos más utilizados para la detección de daño en el ADN *in situ* es TDT mediada por dUTP-biotina, llamada tinción TUNEL (Figura 8). La tinción TUNEL fue descrita inicialmente como un método para la tinción de las células que han sufrido muerte celular programada, o apoptosis, y exhibe el sello bioquímico de la apoptosis-internucleosomal: la fragmentación del ADN. La técnica TUNEL se basa en la capacidad de la enzima transferasa terminal desoxinucleotidil incorporar dUTP marcada en el extremo libre terminal 3'-hidroxilo generados por la fragmentación de ADN genómico en ADN de doble cadena de bajo peso molecular y ADN de una sola cadena de alto peso molecular. Mientras que la tinción de TUNEL ha sido adoptada universalmente casi como el método de elección para la detección de apoptosis *in situ*, se debe reconocer que esta técnica no se limita a la detección de células apoptóticas. Este ensayo también se puede usar para detectar el daño al ADN asociado con eventos no-apoptóticos, tales como la muerte celular necrótica inducida por la exposición a compuestos tóxicos y otras causas, así como para teñir las células sometidas a la reparación del ADN activa. Por lo tanto la tinción de TUNEL puede ser considerada generalmente como un método para la detección de daño en el DNA (fragmentación) y más

específicamente como un método para la identificación de células apoptóticas (Kyrylkova *et al.*, 2012).

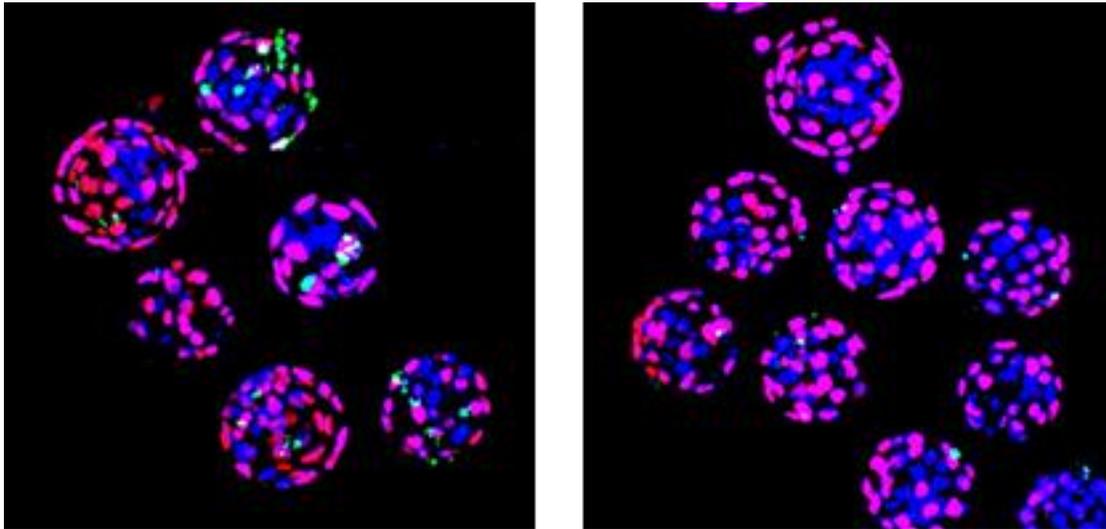


Figura 5. Blastocitos identificados por tinción TUNEL

(Imagen obtenida de: http://www.cdb.riken.jp/eng/04_news/articles/10/101218_bettercloning.html)

II.3.5 Técnicas para identificar necrosis

II.3.5.1 Medición de enzima lactato deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa (LDH), es una enzima presente en las células de mamíferos que sale de la célula debido a daños de la membrana plasmática o la ruptura. El ensayo de LDH está basado en cuantificar la actividad de la enzima en el medio celular y puede ser usado de distintas maneras. El ensayo de LDH puede usarse para medir directamente la citotoxicidad debido a la salida de la enzima de células en con daño severo o muerte celular (en este caso necrosis) pero el ensayo también se puede usar para contar el número de células (por lisis completa) o el número de células después de quitar las células muertas (ensayo de viabilidad) (Parhamifar *et al.*, 2013).

II.4 Proceso de digestión

II.4.1 Modelos *in vitro* para la evaluación de la digestión gastrointestinal

El principio de los modelos de digestión *in vitro* es proporcionar una alternativa útil a los modelos animales y humanos para detección rápida de componentes en los alimentos. El modelo ideal de digestión *in vitro* proporcionaría resultados precisos en un corto tiempo (Coles *et al.*, 2005) y podría servir como una herramienta de análisis rápido para alimentos. En la práctica, cualquier método *in vitro* tiene un margen de error debido a la complejidad del proceso *in vivo* (Hur *et al.*, 2011).

Dentro de los modelos de digestión, es frecuente utilizar enzimas y otras moléculas biológicas como lo son: pepsina, pancreatina, tripsina, quimotripsina, peptidasa, α -amilasa, lipasa, sales biliares y mucina. Varios estudios han utilizado enzimas obtenidas de humanos, mientras que otros han usado enzimas extraídas a partir de fuentes animales o vegetales. Los tipos de enzima utilizados dentro de

un modelo *in vitro* de la digestión tienden a reflejar los principales componentes de los alimentos que se están investigando, por ejemplo, lipasas para la digestión de lípidos, proteasas para la digestión de proteínas, y amilasas para la digestión de almidón, las enzimas se añaden en secuencia con el fin de simular las diferentes etapas del proceso digestivo. La composición enzimática de un fluido digestivo particular a menudo se puede simular mediante la mezcla de cantidades apropiadas de enzimas puras (Boisen y Eggum, 1991) y muchas veces estas enzimas a menudo requieren componentes adicionales dentro de los fluidos digestivos para actuar de manera eficiente; por ejemplo, la lipasa pancreática requiere la presencia de calcio y las sales biliares. Además si la concentración de la sustancia diana (proteína, lípidos o carbohidratos) aumenta, entonces la concentración de enzimas o el tiempo de digestión se debe aumentar incluso si el resto del procedimiento de digestión *in vitro* se mantiene el mismo. Las características de los alimentos, el tipo de enzima, y las concentraciones de la enzima son factores clave que controlan la digestión de los alimentos durante el proceso de digestión *in vitro* (Hur *et al.*, 2011).

II.4.2 Modelos *in vitro* para la evaluación de la fermentación colónica

La microbiota intestinal es un órgano altamente especializado que contiene conjuntos microbianos específicos del huésped, su actividad metabólica afecta directamente la salud y la enfermedad en seres humanos. Los modelos colónicos de fermentación *in vitro* presentan una oportunidad para realizar estudios que no se pueden realizar con seres humanos y animales, debido a las condiciones éticas. La experimentación con un modelo *in vitro* utilizando la combinación de fermentación colónica *in vitro* y células humanas representan un enfoque avanzado en la identificación de complejas interacciones huésped-microbiota y procesos de fermentación colónica (Payne *et al.*, 2012).

II.5 Modelos celulares utilizados en estudios *in vitro*

II.5.1 Línea celular HT-29

HT-29, mostrada en la Figura 6, es una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano con morfología epitelial. Estas células son sensibles a los fármacos quimioterapéuticos 5-fluorouracilo y oxaliplatino, que son tratamientos estándar para el cáncer colorrectal. Además de ser un modelo de xenoinjerto de tumor para el cáncer colorrectal, la línea celular HT-29 también se utiliza como un modelo *in vitro* para estudiar la absorción, el transporte, y la secreción por las células intestinales. Bajo condiciones estándar de cultivo, estas células crecen como una multicapa polarizada no diferenciada. La alteración de las condiciones de cultivo o el tratamiento de las células con diversos inductores resulta en una morfología diferenciada y polarizada, caracterizada por la redistribución de los antígenos de la membrana y el desarrollo de una membrana del borde de cepillo apical. Estas células son provenientes de un *Homo sapiens* caucásico de 44 años de edad y sus genes expresados son: componente secretor de IgA; antígeno carcinoembrionario (CEA); factor de crecimiento transformador para proteína de unión beta; mucina, myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -, tipo de sangre A; Rh +; HLA A1, A3, B12, B17, Cw5. Las células HT-29 son negativas para CD4, pero no hay expresión en la superficie celular de la ceramida galactosa (un posible receptor alternativo para el VIH) (Huang *et al.*, 2012).

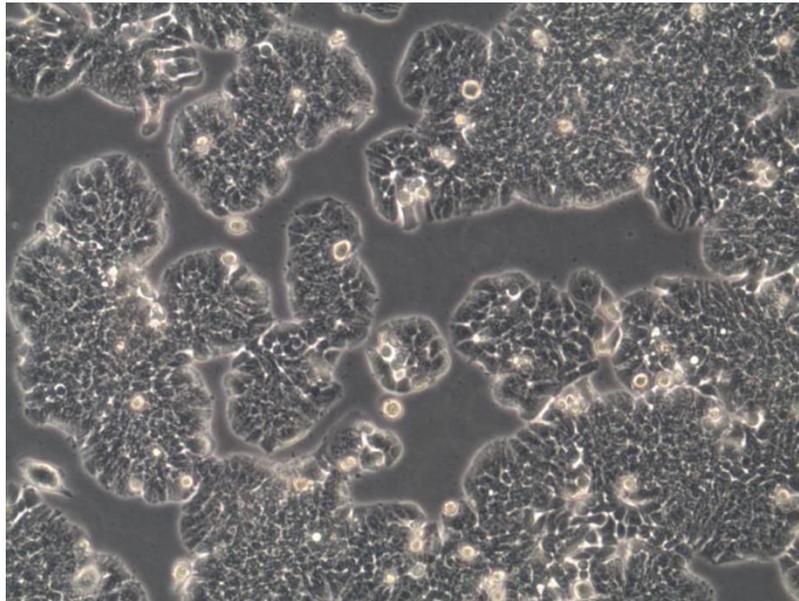


Figura 6. Morfología de células HT-29

(Imagen obtenida de: <http://www.itqb.unl.pt/labs/disease-and-stress-biology/resources/ht29-10x.jpg>)

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, se ha buscado disminuir la cantidad de contaminantes emitidos al medioambiente, principalmente por los daños que se han causado a nuestro planeta y que podrían ser irreversibles.

El CU es una fuente importante de contaminación, ya que no se le ha encontrado un uso específico y tiene una cantidad importante de compuestos que hace que sea más difícil su degradación. En los últimos años, la industria del café ha tenido un auge importante, lo cual ha generado mayor cantidad de desechos, provocando un aumento en los últimos años.

Los compuestos bioactivos contenidos en el grano y la bebida café, relacionados con efectos benéficos a la salud, se encuentran también en el CU. Estos compuestos tienen efectos quimioprotectores, antiproliferativos y favorecen la muerte celular de células carcinogénicas de colon; también funcionan como antioxidantes y la fibra contenida en este producto es degradada por la microbiota colónica generando AGCC. Sin embargo, la producción y liberación de compuestos benéficos se puede ver afectada por el tipo de microbiota predominante en el colon, la cual se ve modificada por el tipo de dieta y el peso corporal.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los productos de la fermentación de la fracción no digerible del CU, con tostado francés, sobre la sobrevivencia de células provenientes de cáncer de colon humano *HT-29* usando microbiota de sujetos con peso normal y de sobrepeso. Este trabajo ayudará a proponer en un futuro otras aplicaciones del CU en el área de la industria de alimentos y agentes nutracéuticos, por lo que le otorgaría un valor agregado a un subproducto que genera contaminación y es desechado.

IV. HIPÓTESIS

Los productos de la fermentación de la fracción no digerible del café usado, tostado francés, por sus componentes bioactivos (AGCC), son capaces de inhibir la sobrevivencia de células de cáncer de colon *in vitro*, a través de la inducción de apoptosis.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo General

Determinar el efecto de los productos de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado, tostado francés, sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano *in vitro*.

V.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar, parcialmente, la composición química y nutracéutica del café usado.
- Simular, mediante un sistema *in vitro*, la digestión para la obtención de su fracción no digerible
- Someter la fracción no digerible del café usado a la fermentación colónica utilizando dos tipos de microbiotas, peso normal y sobrepeso.
- Evaluar el extractos de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado, tostado francés, sobre células de cáncer de colon.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Materiales

VI.1.1 Compuestos químicos

Los reactivos y solventes de uso general fueron de J. T. Baker, el medio de cultivo DMEM se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EUA). El medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (Gibco, Grand Island, NY), el suero fetal bovino (SFB), los antibióticos y antimicóticos se obtuvieron de la marca Gibco (Gibco, Grand Island, NY). La α -amilasa salival obtenida de la boca de personas sanas, la pepsina y pancreatina de origen porcino, y las sales biliares, se adquirieron de Sigma (Sigma-Aldrich, Canada Ltd).

VI.1.2 Material biológico

Se utilizaron granos de café tostado oscuro, llamado comúnmente francés, de la marca Tuyz café ecogourmet. El CU se obtuvo preparando la bebida con 7 g de grano de café molido por cada 100 mL de agua destilada, en una cafetera convencional. El residuo de café que quedó atrapado en el filtro se denominó café utilizado y se secó a 60 °C durante 24 horas para posteriormente molerlo y pasarlo por una malla 40, para disminuir y homogeneizar su tamaño de partícula.

La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29, se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EUA).

VI.2 Métodos

VI.2.1 Análisis proximal

VI.2.1.1 Humedad total

La humedad se determinó por el método 925.23 descrito en la AOAC (2002). Para ello se colocaron los crisoles necesarios a peso constante en la estufa a 80 °C durante 12 horas o por 3 horas a 105 °C, transcurrido el tiempo se pusieron en el desecador durante 40 minutos. Se pesaron los crisoles y se registró el peso; dentro de los crisoles se colocaron 3 g de muestra registrando el peso exacto con decimales. Se procedió a meter el crisol con la muestra en la estufa a 130 °C durante 3 horas, se sacaron los crisoles con la muestra y se dejaron enfriar en el desecador durante 40 minutos. Finalmente se pesaron de nuevo y se realizó el cálculo con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de humedad: } [(W_{\text{crisol}} + W_{\text{muestra}}) - W_{\text{final}}] / W_{\text{muestra}} * 100$$

W: peso

VI.2.1.2 Cenizas

El contenido de cenizas en las muestras se determinó por el método 945.46 descrito en la AOAC (2002). Se colocaron a peso constante, los crisoles necesarios, en la estufa a 80 °C por 12 horas o en la mufla a 550 °C por 2 horas. Transcurrido el tiempo se sacaron y se dejaron en el desecador durante 40 minutos para que se enfríen, posteriormente se pesó el crisol y se registró su peso. Se colocaron 4 g de muestra dentro del crisol, se registró su peso exacto y se calcinó en la mufla a 550 °C hasta obtener cenizas blancas (5-6 horas aprox.). Una vez obtenidas las cenizas se bajó la temperatura de la mufla gradualmente y se sacaron para dejarse enfriar en el desecador durante 40 minutos.

Finalmente se pesaron y se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{W_{\text{final}} - W_{\text{crisol}}}{W_{\text{muestra}}} \times 100$$

W: peso

VI.2.1.3 Lípidos totales

Los lípidos totales se determinaron por el método 920.39 (extracto etéreo) descrito en la AOAC. Se colocaron 3 g de muestra en papel filtro del No. 1 y se registró el peso exacto; se metieron en los cartuchos y se taparon con algodón. Se vertió en los vasos de precipitado o matraz (previamente a peso constante), suficiente éter de petróleo como solvente y se calentó suavemente refluendo de 5 a 6 gotas por segundo durante 4 horas; el tiempo comenzó a contar a partir del primer reflujo. Transcurrido el tiempo de extracción se recuperó el solvente, se secó el extracto en estufa a 100 °C por 12 horas a peso constante.

Una vez frío se pesó el matraz o vaso con el extracto y se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ extracto etéreo} = \frac{W \text{ final} - W \text{ vaso o matraz}}{W \text{ muestra}} \times 100$$

W: peso

VI.2.1.4 Proteínas

La proteína total se determinó empleando el método 920.105 (Kjeldhal) descrito en la AOAC (2002). En un matraz de digestión tipo Kjeldhal se colocó 1 g de muestra desgrasada, 3.5 g de sulfato de sodio, 0.4 g de sulfato de cobre y se adicionó 15 mL de ácido sulfúrico. Se colocó el matraz en el digestor durante una hora hasta el cambio de color de la muestra a verde agua.

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 nitrógeno (N) total multiplicado por un factor de conversión equivalente al % de proteína presente en el alimento.

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

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

*El factor utilizado fué 6.25

VI.2.1.5 Fibra dietaria

VI.2.1.5.1 Insoluble

Se siguió la metodología establecida por Shiga *et al.*, (2003).

Se utilizó la muestra desgrasada y pulverizada, se adicionaron 50 ml de buffer de fosfato 0.08 mM a pH 6, así como 100 µL de α-amilasa. El frasco protegido de la luz, se incubó en baño María a 95 °C por 30 min., se agitó cada 5 minutos y se ajustó el pH a 7.5 con la muestra atemperada. Se adicionó 100 µL de proteasa (5 mg/mL) y se incubó en baño María a 60 °C por 30 min. con agitación continua, se ajustó pH a 4 la muestra atemperada. Posteriormente se adicionó 300 µL de amilogucosidasa 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 horas, finalmente se pesó. La fibra insoluble se consideró lo que quedo en el filtro.

El cálculo se realizó en base seca y de acuerdo al porcentaje de hidratos de carbono de la muestra.

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

W: peso

VI.2.1.5.1 Insoluble

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

Se realizó el cálculo con la siguiente fórmula.

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

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

W: peso

VI.2.1.5.1 Almidón resistente

El contenido de almidón resistente se realizó según la metodología descrita por Saura-Calixto *et al.*, (1993) y Shiga *et al.*, (2003). Por lo que se utilizó la fracción insoluble de los pasos anteriores, se raspó el filtro hasta obtener 100 mg. Se adicionaron 6 mL de KOH 2 M 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 adicionó 60 µL de amiloglucosidasa, se mezcló e incubó a 60 °C por 30 min con agitación continua. Posteriormente se centrifugó a 3000 rps 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.2.2 Determinación de capacidad antioxidante

VI.2.2.1. Obtención del extracto etanólico

Se suspendió un 1 g de muestra en 9 ml de etanol al 20%, y se sometió a extracción por microondas; las muestras se calentaron por 20 segundos con una potencia de 80 watts. Al finalizar este proceso, la muestra se atemperó y se sometió a una segunda extracción bajo las mismas condiciones. La muestra fue nuevamente atemperada y centrifugada a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue usado en las siguientes pruebas.

VI.2.2.2 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 7mM de ABTS y una solución de $K_2S_2O_8$ 140mM, se mezclaron 5 mL y 88 μ L respectivamente cuidando de no exponerlo a la luz durante 12 horas, esperando la generación del radical. Pasado el tiempo, se realizó una dilución, mezclando 500 μ L de la solución y se le agregaron 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, así como 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 Eq de trolox/g de muestra.

VI.2.2.2 Capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH

La capacidad antioxidante también se midió utilizando el ensayo de decoloración 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), por la técnica propuesta por Fukumoto y Mazza, (2000) adaptado a microplaca. Se añadieron 20 µL de extracto etanólico y 200 µL de solución DPPH en una microplaca de 96 pozos. Se preparó un control de 20 µL de metanol y 200 µL de DPPH. Las muestras se prepararon por triplicado y se leyó cada 10 minutos durante 90 minutos 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 con concentraciones entre 0-800 µM. Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalentes de trolox (TEAC) en µmol equivalentes de trolox /g de muestra.

VI.2.3 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Se simuló todo el proceso digestivo (desde la boca hasta su fermentación en el colón) del café usado tipo francés, empleando diferentes enzimas. Se emplearon los métodos de Grandfeldt *et al.* (1992), Stein *et al.* (2011), Patil *et al.* (2010) and Ma *et al.* (2012), con las modificaciones y adaptaciones sugeridas por Campos-Vega *et al.*, (2015), para simular las condiciones fisiológicas. Además se contó con la participación de sujetos sanos y se utilizaron intestinos de rata, por lo que el protocolo fue sometido a aprobación por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ y los voluntarios firmaron un consentimiento informado.

VI.2.3.1 Simulación de las condiciones de la boca

Para simular las condiciones de la boca, 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 gramo de muestra (café utilizado)

durante 15 segundos, descargando el contenido en un vaso de precipitados conteniendo 5 mL de agua destilada. Inmediatamente después, cada sujeto se enjuagó la boca por 60 segundos 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.2.3.2 Simulación de condiciones del estómago

A 10 mL de la suspensión anterior, se les añadió una solución de HCl 2N en cantidad necesaria para disminuir el pH a 2,0. La pepsina (0.055 g, Sigma) se disolvió en 0.94 mL de HCl 20 mM y se añadió a cada muestra para ser incubadas con agitación durante 2 horas a 37 °C.

VI.2.3.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado

Un extracto intestinal se preparó por disolución de 3 mg de hiel de buey mas 2.6 mg de pancreatina, los cuales se disolvieron en 5 mL de solución tampón de Krebs-Ringer [conteniendo 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glucosa y 2.5 mM CaCl₂, 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) se transfirió a un recipiente que contenía un saco intestinal invertido.

VI.2.3.4 Técnica del saco intestinal invertido utilizando ratas

VI.2.3.4.1 Manejo de los animales

Para llevar a cabo esta técnica se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (UNAM, Campus Juriquilla) con un peso entre 250 y 300 gramos, clínicamente sanas, al llegar las ratas se verificó el sexo, el peso y la constancia de salud, las ratas tendrán un ayuno de 12 horas, sólo se dejó el agua, pues es requerido por la técnica para evitar absorción de otros compuestos.

VI.2.3.4.2 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal invertido

Para el sacrificio las ratas fueron anestesiadas con éter etílico y posteriormente se realizó una incisión abdominal y se cortó la aorta para que tuvieran una muerte instantánea. El intestino fue expuesto, 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 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 metálica y se cortaron 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 horas, 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 de CU (FND), la cual fue sometida a una fermentación colónica *in vitro*. Los experimentos se realizaron por triplicado.

VI.2.3.4.3 Manejo de los animales después del sacrificio

Puesto que sólo 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 horas, posteriormente se lavó y esterilizó para su posterior almacenamiento.

VI.2.4 Fermentación colónica *in vitro* de la FND

El método de fermentación se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Campos-Vega *et al.*, (2009). La inulina (100 mg) se empleó como control positivo de carbohidrato fermentable bajo las mismas condiciones. El inóculo fecal humano, empleado como fuente de microbiota representativa del colon, se obtuvo de 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. Para este trabajo se eligieron dos condiciones distintas de peso: normal y sobrepeso con las que se realizaron ensayos independientes. El índice de masa corporal (IMC) de la persona con sobrepeso fue de 29.7 y el de la persona en el intervalo de normalidad de 23.3. 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) fueron preparados. 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 contuvieron el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 mL de homogenizado fecal y se adicionaron 500 mg de la fase sólida de la FND y 500 µL de la fase líquida de la FND después de la inoculación, 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 ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se determinaron a las 0, 12 y 24 h. La fermentación se detuvo mediante un centrifugado, posteriormente se congelaron las muestras y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

VI.2.4.1 Caracterización y cuantificación de los AGCC por SPME/GC-MS

Esta metodología se llevó a cabo para las muestras obtenidas en la fermentación *in vitro* de acuerdo con lo sugerido por Zamora-Gasca *et al.*, (2014).

VI.2.4.1.1 Microextracción en fase sólida (SPME)

Se tomaron muestras de los recipientes de cultivo por lotes y se centrifugaron (Hermle Z 323 K; Wehinger, Alemania) a 3500 x g durante 15 min a 4°C. Del sobrenadante de 500 mg se pesaron en un vial 20 mL que se taparon y se colocaron en un automuestreador Gerstel MPS2. Se utilizó una fibra de 2 cm de polidimetilsiloxan-divinilbencen-carboxano para la microextracción en fase sólida (SPME) donde las condiciones de extracción fueron las siguientes: la temperatura de extracción fue de 45°C, el tiempo de incubación de 5 min, la velocidad de agitación de 250 rpm por 120 min de extracción, se utilizó una temperatura de desorción de 240°C durante 10 min. Lo anterior mencionado se realizó para tres extracciones repetidas independientes para cada muestra.

4.2.4.1.2 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)

Las muestras fueron analizadas en un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (CG-MS) Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) equipado con un detector selectivo de masas Agilent 597C VL y un automuestreador de usos múltiples MPS2 XL (Gerstel). La separación de las muestras en el CG se llevó a cabo en una columna capilar DB-5MS (60 m x 250 μm x 0.25 μm ; Agilent) utilizando helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min. La inyección se llevó a cabo a una temperatura de 250°C y el origen del espectrómetro de masas y cuadrupolo se mantuvo a 230°C y 150°C respectivamente. El inyector se utilizó en un modo de sin división. La temperatura del horno se inició a los 40°C durante 5 min y se programó a 5°C/min desde 40 a 200°C, se mantuvo a 200°C durante 2 min, luego se programó a 20°C/min hasta 230°C y se mantuvo durante 15 min. La cuantificación de las muestras se obtuvo a través de curvas de calibración de los ácidos acético, propiónico y butírico.

VI.2.5 Cultivo celular

Las células HT-29 se manejaron en una cámara de bioseguridad donde se cultivaron en medio base Dulbecco's Modified Eagle Medium (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 bajo una atmósfera humificada de 10 % CO₂ a 37 °C en una incubadora con cámaras de gasificación automática.

VI.2.5.1 *Elaboración de la curva dosis-respuesta de las células HT-29*

Las células HT-29 se sembraron en cajas de 96 pozos (3 x 10⁴ células/pozo) en medio de cultivo DMEM (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10 %), antibióticos y antimicóticos (1 %). A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por medio DMEM al 0.5 % de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd), conteniendo 0 (control) 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40 % del extracto de la fermentación colónica de la fracción no digerible del CU usando microbiota de peso normal (EFCU-pn) y del extracto de la fermentación colónica de la fracción no digerible del CU usando microbiota de sobrepeso (EFCU-sp), previamente esterilizado por filtración.

Después de 24 h de tratamiento se aspiró el medio de cultivo y las células adheridas se lavaron con PBS (1x) dos veces, se aspiró el PBS y se les añadió 50 µl de la solución de cristal violeta (0,5 % w/v de cristal violeta, 4 % w/v de formaldehído, 30 % v/v de etanol, y 0,17 % w/v NaCl) posteriormente se incubó a 37 °C durante 10 minutos. La solución de tinción se lavó con agua destilada y se secó durante 1 hora a 50 °C. Las células teñidas se disolvieron en ácido acético al 33 % para medir la absorbancia a 570 nm en un lector de microplaca (Voigt *et al.*, 2014).

$$\% \text{ sobrevivencia} = \frac{\# \text{ de células después del tratamiento}}{\# \text{ de células iniciales (Co)}} \times 100$$

VI.2.5.2 *Cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)*

La medida de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) es un ensayo de citotoxicidad de amplio espectro. Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células que han sido afectadas por un agente tóxico. El incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas .

El porcentaje de LDH se determinó mediante un kit de citotoxicidad-LDH (BioVision), basado en una reacción enzimática que resulta en la conversión de la sal de tetrazolium en un producto de formazán (rojo). El incremento en la cantidad de formazán en el medio de cultivo correlaciona directamente con el incremento en el número de células lisadas. Se emplearon tritón al 1 % como control de daño celular. La concentración de formazán se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm.

El porcentaje de citotoxicidad se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{\text{Abs}_{\text{tratamiento}} - \text{Abs}_{\text{controles con 0.1\% ASB}} \times 100}{\text{Abs}_{\text{control alto}} - \text{Abs}_{\text{controles con 0.1\% ASB}}}$$

VI.2.5.3 Determinación de núcleos apoptóticos TUNEL

Para determinar la muerte celular, se empleó el kit ROCHE *In Situ* Cell Death Detection Kit, POD. Se sembraron 5×10^5 células/caja de 33 mm con un cubre objetos estéril por debajo del medio de cultivo con células y se trataron con el IC₅₀ del EFCU-pn por 24 horas, pasado el tiempo se absorbió el tratamiento

Antes de comenzar se preparó la mezcla para la reacción de TUNEL, se guardaron 100 µL de la solución etiquetadora (vial 2) para los 2 controles negativos. Se adicionó en el volumen total (50 µL) de la solución de enzima (vial 1) a la solución etiquetadora restante (450 µL) (vial 1) para obtener 500 µL de la mezcla de la reacción de TUNEL. Esta solución se utilizó inmediatamente y se almacenó en hielo hasta su uso.

Se fijaron las células previamente secadas al aire con una solución de fijación recién preparada durante 1 hora entre 15 y 25 °C, se lavaron los lados con solución PBS. Posteriormente se incubaron en solución bloqueadora durante 10 minutos entre 15 y 25 °C, igualmente se lavaron los lados con solución PBS. Se incubaron las células en solución de permeabilización durante 2 minutos en hielo. Se fijaron y permeabilizaron el control negativo y el positivo.

Para el control negativo, a las células previamente fijadas y permeabilizadas se les añadieron 50 µL de solución etiquetadora (sin la transferasa terminal) en lugar de la mezcla para la reacción de TUNEL.

Para el control positivo, se utilizaron células previamente fijadas y permeabilizadas con nucleasa micrococcal oDNAsa recombinante de grado 1 (3000 U/mL- 5 U/mL en 50 mM de Tris-HCL, pH 7.5, 10 mM MgCl₂ 1 mg/mL BSA) por 10 minutos a una temperatura entre 15 y 25 °C y se cubrieron con parafilm para evitar la evaporación.

Se lavaron los lados de la placa con PBS, se secó al área alrededor de la muestra. Se añadieron 50 µL de la mezcla para la reacción de TUNEL a cada muestra, se añadió la tapa y se incubó durante 60 minutos a 37 °C en una atmósfera humificada en la oscuridad.

Se lavó la placa 3 veces con PBS, las muestras se analizaron en una gota de PBS bajo el microscopio de fluorescencia usando la longitud de onda de excitación en un rango de 450 a 500 nm en un rango de detección en el rango de 515 a 565 nm (verde).

El porcentaje de células apoptóticas se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células apoptóticas} = \frac{\# \text{ de células TUNEL positivo} \times 100}{\# \text{ de células campo visual}}$$

Para determinar la inducción de apoptosis de las células tratadas, el porcentaje de células positivas de TUNEL fue comparado estadísticamente con las células tratadas, las células no tratadas.

VI.2.5.5 Ensayo de glutatión total

Para medir el glutatión total se empleó el Kit OxiSelect™ Total Glutathione (GSSG/GSH) assay. Las células se desprendieron por tripsinización, se contaron y se centrifugaron a 500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se lavaron las células con PBS 1X, se repitió la centrifugación y se quitó la solución. Inmediatamente se resuspendió la pastilla en 200-500 µL de MPA frío al 5 % en una concentración de $1-5 \times 10^6$ células. Se mezcló muy bien y se homogeneizó o sonicó la suspensión celular para almacenarla en hielo hasta su uso. Se transfirió la suspensión a un microtubos y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante y se almacenó en hielo hasta su uso o se congeló a -80 °C.

Se prepararon y mezclaron todos los reactivos antes de usar, así como los estándares de glutatión simultáneamente con las muestras para realizar los ensayos en conjunto. Cada muestra, incluyendo el estándar, se analizaron por duplicado o triplicado.

En una placa de 96 pocillos, se añadieron 25 µL de la solución 1X glutatión reductasa y posteriormente se añadieron 25 µL de la solución 1X NADPH a cada pocillo. Se añadieron 100 µL de los estándares de glutatión preparados, así como las muestras a medir y se mezcló bien.

Se preparó el lector de placas para que leyera a 405 nm y se añadieron 50 µL del cromógeno 1X a cada pocillo con las soluciones y se mezcló suavemente. Se leyó inmediatamente la absorbancia a intervalos de 1 minuto durante 10 minutos. (Si se utilizan todos los pozos dentro de la placa a la vez, es necesario registrar la absorbancia a intervalos de 2 minutos.) Se calcularon las concentración de los estándares y las muestras.

VI.2.5.6 Ensayo de superóxido dismutasa

Para medir el superóxido dismutasa se empleó el Kit OxiSelect™ Superoxide Dismutase Activity assay. Las células desprendidas ($3-6 \times 10^6$) se centrifugaron a 700 x g por dos minutos y se desechó el sobrenadante. Se lavó la pastilla una vez con PBS helado y se centrifugó. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en 0.5 mL de tapón del lisis 1X (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM de NaCl, 0.1 mM de EDTA) y se lisaron las células por sonicación u homogeneización. Se centrifugaron por 10 minutos y se recogió el sobrenadante del listado celular.

Se prepararon las muestras incluido el blanco (se preincubó en caso de usar inhibidor), se añadió solución de xantina oxidada 1X a cada pocillo, se mezcló bien y se incubó por 1 hora a 37 °C. Se leyó la absorbancia a 490 nm.

La preparación de las muestras se llevó a cabo de la siguiente manera:

Componente	Blanco	Muestra
Muestra SOD	0 µL	X µL
Inhibidor (opcional)	0 µL	Y µL
Solución xantina	5 µL	5 µL
Solución cromógena	5 µL	5 µL
Tampón de ensayo SOD 10X	10 µL	10 µL
Agua destilada	70 µL	70-(X+Y) µL
Total	90 µL	90 µL

VI.2.5.7 Medición de actividad catalasa

Se utilizó el Kit OxiSelect™ Catalase Activity Assay. Para la preparación del lisado celular, se centrifugaron las células a 2000 x g durante 10 minutos a 4 °C. (Para células adherentes no se usaron enzimas proteolíticas sino una espátula). Se sonicó u homogeneizó la pastilla de células en hielo con 1-2 mL de PBS frío, 1mM EDTA.

Se centrifugó a 10000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se almacenó en hielo, se tomaron alícuotas y se almacenaron (a -70 °C por hasta 1 mes) para utilizarse posteriormente. Previo al ensayo se realizó una curva de catalasa con los estándares, se añadieron 20 µL de las muestras a la placa de 96 pocillos. Se añadieron 50 µL de la solución de trabajo de peróxido de hidrógeno (12mM) a cada placa, se mezcló bien y se incubó exactamente 1 minuto. Se paró la reacción añadiendo 50 µL del secuestrador de catalasa en cada pocillo y se mezcló bien. Se transfirieron 5 µL de cada pocillo de reacción en un pocillo nuevo, se añadieron 250 µL de la solución de trabajo cromogénica en cada pocillo y se incubó la placa durante 40-60 min en agitación vigorosa. Se leyó la placa a una absorbancia de 520 nm.

VI.2.5.8 Medición de 8-iso-Prostaglandina F2α

Se empleó el Kit OxiSelect™ 8-iso-Prostaglandin F2α ELISA. Para hidrolizar el enlace éster, la mezcla de células lisadas se trató con NaOH 2N a 45 °C durante 2 horas.

Se añadieron 100 µL del anticuerpo Anti-8-iso-PGF2α la placa cubierta con anticuerpo de cabra anti-conejo. Se incubó durante 1 hora a 25 °C en movimiento constante orbital. Se quitó la solución de anticuerpo de los pocillos y se lavaron 5 veces con 300 µL de solución tampón de lavado 1X. Después del último lavado, se quitó el exceso de la solución sacudiéndola en una toalla de papel. Se combinaron 55 µL del estándar 8-iso-PGF2α o de la muestra y el conjugado 8-iso-PGF2α-HRP

en un microtubos y se mezcló vigorosamente. Se transfirieron 100 μL de la solución combinada por pocillo. (Se utilizó como control un pocillo conteniendo el diluyente de la muestra) Se incubó durante 1 hora en movimiento orbital y se quitó la solución combinada de los pocillos para posteriormente lavarse 5 veces con 300 μL de solución tampón de lavado 1X e igualmente se removió el exceso de humedad mediante una toalla de papel. Se añadieron 100 μL de la solución sustrato a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente de 10-30 minutos en un agitador orbital. Se paró la reacción enzimática añadiendo 100 μL de la solución Stop a cada pocillo. Los resultados se leyeron inmediatamente a 450 nm de absorbancia.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Composición proximal del café usado y grano de café

Existen varios factores que pueden modificar la composición química y nutracéutica del grano de café como lo son: el tiempo en el que es cosechado, el grado de madurez del fruto, el tueste, la técnica de secado y el almacenamiento.

Se observa en la Tabla 4, que el contenido de humedad fue estadísticamente mayor en el CU (4.5 %) comparado con el GC (1.3 %), esto podría deberse a que, a pesar de que ambas muestras se someten al mismo proceso de secado, durante el mismo tiempo y temperatura, el CU lleva un proceso previo de percolación con agua para la preparación de la bebida, por lo que durante este proceso absorbe una mayor cantidad de humedad, al presentar una alta porosidad y retención de agua.

El contenido de proteínas no presentó diferencia estadística significativa, siendo mayor en el CU (16.4 % en GC y 17.9 % en CU), resultados que fueron similares a lo reportado por Cruz *et al.*, (2012) donde al evaluar distintas marcas de CU se obtuvieron valores entre 12.8% y 16.9%. Los resultados fueron mayores a los reportados por Tokimoto *et al.*, (2005) quienes obtuvieron un contenido de proteína entre 10.9 y 12.9 %. Estas diferencias se deben a la variedad del grano (arabica o robusta) y de otros factores entre ellos la cosecha y lugar de siembra, así como su almacenamiento posterior. Las cenizas fueron mayores en el GC (4.5 %) comparado con el CU (1.6 %) y es igual a lo reportado por Mussato *et al.*, (2011c) pues indican un valor de 1.6 % en el CU y se debe a la solubilización de distintos compuestos en la bebida de café al momento de su preparación.

El contenido de lípidos fue mayor en el CU (16.5 %), esto se podría corresponder a su hidrofobicidad, pues no se solubilizan durante la preparación de la bebida, sin embargo al perderse otros compuestos se genera una mayor proporción que en el GC (13 %) debido al efecto de concentración. Akgün *et al.*,

(2014) reportan menor contenido de lípidos al utilizar distintos solventes y tiempos de extracción, en condiciones optimizadas (entre 11.4 y 10.3 %).

Los carbohidratos fueron los componentes mayoritarios en el GC así como en el CU, con un 64.1 y 59.02 %, respectivamente.

Tabla 4. Composición proximal del grano de café y café usado tostado francés

	%	
	GC	CU
Humedad	1.32 ± 0.06 ^a	4.55 ± 0.23 ^b
Cenizas	4.57 ± 0.05 ^a	1.69 ± 0.02 ^b
Proteínas	16.38 ± 1.79 ^a	17.99 ± 0.79 ^a
Lípidos	13.00 ± 0.51 ^a	16.54 ± 0.43 ^b
Carbohidratos	64.14 ± 1.62 ^a	59.02 ± 1.11 ^b

GC: grano de café. CU: café usado. Cada valor representa la media de tres repeticiones ± ES y son expresados como porcentaje en base seca. Letras diferentes por renglón, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.2 Contenido de fibra total, insoluble, soluble y almidón resistente de los granos de café y café usado.

La fibra dietaria proviene de componentes celulares de plantas (polisacáridos no almidonosos), los cuales son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas humanas y consisten generalmente de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (Murthy *et al.*, 2012).

Mussato *et al.*, (2011c) reportan que casi la mitad del CU (45.3 %) corresponde a azúcares polimerizados en estructuras de celulosa y hemicelulosa. Entre los carbohidratos mayoritarios del CU y el GC, se encuentra la fibra dietaria, de la cual la mayor parte es insoluble siendo mayor en el CU con un contenido de 50.8 % (Tabla 5). Los valores de fibra total (51.54 %) son mayores a lo establecido

por Murthy y Naidu (2010) que reportaron valores de 43 % de fibra total en el residuo de CU.

El almidón resistente se define como la porción de almidón que resiste la digestión, atravesando el intestino delgado sin modificaciones para llegar al colon donde se somete a una fermentación anaerobica por las bacterias locales para producir diversos compuestos asociados con la homeostásis intestinal (Fabbri *et al.*, 2016).

El contenido de almidón resistente tanto en GC (5.60 %) como en CU (5.63 %) tostado francés es similar al reportado por García-Gutierrez, (2015) en GC y CU tostado americano donde se muestran valores que van de 6 a 6.1%. Estos valores son comparables con otros granos, ya que Fabbri *et al.*, (2016) reportaron valores en frijol pinto, negro y garbanzo de almidón resistente entre 3 y 5 g por cada 100 g de producto.

Tabla 5. Contenido de fibra total, soluble e insoluble en el grano de café y café usado tostado francés

	(%)	
	GC	CU
Fibra total	43.88 ± 1.39 ^a	51.54 ± 2.40 ^b
Fibra soluble	1.71 ± 0.12 ^a	0.71 ± 0.33 ^b
Fibra insoluble	42.17 ± 1.51 ^a	50.82 ± 2.48 ^b
Almidón resistente	5.60 ± 0.60 ^a	5.63 ± 1.40 ^a

GC: grano de café. CU: café usado. Cada valor representa la media de tres repeticiones ± ES y son expresados como porcentaje en base seca. Letras diferentes por renglón, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.3 Contenido de compuestos fenólicos totales y cuantificación de fenoles de grano de café y café usado tostado francés.

La cantidad de fenoles totales para GC (21.02 mg) (Tabla 6), fueron menores a los reportados por Campos-Vega *et al.*, (2015), pues reportan valores de 24.5 mg GAE, sin embargo, son comparables a lo reportado por Cruz *et al.*, (2012) con valores de 29.96 mg GAE. En cambio los valores de fenoles totales para CU se encontraron por arriba de lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2015) para CU tostado francés, con 6.8 mg GAE, pero fueron menores a lo reportado por Páscoa, *et al.*, (2013) (12.1 mg GAE) y es comparable con los valores de Bravo *et al.*, (2013), que reportaron valores de 10.2-17.44 mg GAE estas modificaciones se deben a varios factores como la cosecha, el tostado, el almacenamiento y la preparación de la bebida.

En la Tabla 6 se observa que el ácido clorogénico es el compuesto fenólico más abundante tanto en GC (882.1 mg/mL) como en CU (270.9 mg/mL), seguido por el ácido gálico (405.7 mg/mL para GC y 138.8 mg/mL para CU) y el flavonoide quercetina (438.3 mg/mL para CU y 138.8 mg/mL para GC). Los resultados son similares a lo reportado por López-Barrera *et al.*, (2016) que indicaron que los ácidos clorogénico y gálico fueron los compuestos fenólicos más abundantes en del GC y CU, pues representaron ≥ 80 % de los fenoles totales identificados, los ácidos fenólicos cafeico, *p*-cumárico, elágico, así como la rutina se detectaron en cantidades muy pequeñas (< 3 % de los fenoles totales). Se puede observar que la mayoría de los compuestos disminuyeron su concentración considerablemente después de la preparación de la bebida, debido a su migración por su carácter hidrosoluble.

Los valores antes reportados, son similares a los de García *et al.*, (2015) que cuantificaron ácido clorogénico, caféico y rutina en pulpa y cáscara de café fermentados, encontrando valores de ácido clorogénico de 132.0 mg/g en la cáscara y 22.83 mg/g en la pulpa. Así como de ácido caféico 28.27 mg/g de en la

cáscara y 4.29 mg/g en la pulpa y de rutina (11.2 mg/mL en el CU) 8.26 mg/g en cáscara y 1.95 mg/g en la pulpa.

Se ha identificado que el ácido clorogénico es el principal componente fenólicos de la bebida de café, es generado durante el proceso de tostado, por lo que el CU también tiene concentraciones importantes de compuestos fenólicos (Monente *et al.*, 2015).

Monente *et al.*, (2015) pretrataron el CU de forma ácida, alcalina y salina para obtener distintos extractos y encontró que los ácidos clorogénicos libres y ligados fueron los compuestos fenólicos más abundantes, aún en las muestras sin tratamiento reportando valores de 258.24 μmol de ácido clorogénico por g de extracto liofilizado.

Tabla 6. Cuantificación de fenoles totales y compuestos fenólicos por HPLC-DAD en grano de café y café usado tostado francés

	GC	CU
Fenoles totales*	21.02 ± 0.4 ^a	10.66 ± 0.5 ^b
<u>Ácidos fenólicos</u>		
Ácido clorogénico	882.1 ± 70.1 ^a	270.9 ± 2.2 ^b
Ácido gálico	405.7 ± 6.7 ^a	138.8 ± 1.0 ^b
Ácido caféico	27.5 ± 0.6 ^a	9.1 ± 0.0 ^d
Ácido cumárico	19.0 ± 13.1 ^a	6.23 ± 0.0 ^a
Ácido sinápico	18.91 ± 7.44 ^{ab}	11.0 ± 4.0 ^{bc}
Ácido ferúlico	7.67 ± 0.0 ^a	1.8 ± 0.0 ^b
Vainillina	2.48 ± 1.5 ^a	-
<u>Flavonoides</u>		
Quercetina	438.3 ± 127.6 ^a	75.6 ± 23.3 ^{ab}
(+) Catequina	256.6 ± 13.1 ^f	67.4 ± 0.3 ^g
Rutina	19.7 ± 4.0 ^a	11.2 ± 0.1 ^b

GC: grano de café. CU: café usado. -: No detectado. Cada valor representa la media de tres repeticiones ± DS y son expresados como mg de compuesto fenólico/mL. Letras diferentes por renglón, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.* Expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE).

VII.4 Capacidad antioxidante de grano de café y café usado tostado francés.

El la Tabla 7, se muestra que la capacidad antioxidante en los extractos etanólicos del CU fue mayor por ambos métodos colorimétricos que el GC, aunque no se presentó diferencia estadística, mientras que los fenoles totales disminuyeron su concentración hasta en un 50 % debido, a la migración de estos compuestos en la bebida.

Los valores de DPPH del CU son similares a lo reportado por Bravo *et al.*, (2012), los cuales indican valores entre 38.65 y 82.40 μ moles equivalentes de Trolox para CU dependiendo del método de extracción usado, pero los valores de ABTS fueron menores, sin embargo comparables, ya que se reportan valores entre 92.98 y 140.3 μ moles equivalentes de Trolox. Los valores de DPPH para GC y CU son menores a los reportados por Campos-Vega *et al.*, (2015), que reportan valores de DPPH 112.06 y 107.4 μ moles equivalentes de Trolox para GC y CU respectivamente.

Bravo *et al.*, (2013), reportaron en ABTS una actividad antioxidante del CU de 92.98 a 140.3 μ moles equivalentes de Trolox, valores similares a los reportados en la Tabla 7, pero menores a lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2015), quienes reportan valores de 416.9 μ moles equivalentes de Trolox para GC y 243.7 μ moles equivalentes de Trolox para CU.

Tabla 7. Capacidad antioxidante y en grano de café y café usado tostado francés

	ABTS	DPPH
GC	83.89 \pm 6.12 ^a	72.92 \pm 0.38 ^a
CU	91.12 \pm 0.42 ^a	79.57 \pm 0.38 ^a

GC: grano de café. CU: café usado. Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm DS y son expresados como μ moles equivalentes de trolox/100g. Letras diferentes por columna, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.5 Contenido de compuestos fenólicos totales y cuantificación de fenoles por HPLC en las etapas de la digestión y fermentación colónica del CU

Los compuestos fenólicos se encuentran en el matriz del alimento unido a otras estructuras tales como proteínas y polisacáridos por interacciones como las de hidrógeno, enlaces covalentes y iónicos. Estos compuestos bioactivos, libres y ligados, se encuentran biodisponibles después de su liberación de las matrices alimentarias por acción enzimática gastrointestinal o debido la actividad de la microbiota (Monente *et al.*, 2015).

En la Tabla 8, se observa que las etapas de la digestión con mayor concentración de compuestos fenólicos totales fueron la boca y en el intestino delgado a los 30 y 60 minutos. Estos compuestos se cuantificaron del lado basolateral del intestino delgado por lo que se sugiere que los compuestos fenólicos son permeables y pueden ser transportados a través de la membrana intestinal. Además, la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos fue mayor en la fermentación colónica llevada a cabo con microbiota de un sujeto con sobrepeso.

Tanto para el GC como en el CU, en las distintas etapas de la digestión y fermentación colónica, el compuesto fenólico mayoritario fue el ácido clorogénico, seguido por gálico y catequina. Este último no se identificó en la etapa del estómago, sin embargo sus concentraciones se elevaron considerablemente durante la fermentación colónica esto puede sugerir que fue liberada de la matriz del alimento por efecto de las bacterias colónicas.

La liberación de ácido clorogénico y catequina fue mayor usando microbiota de sobrepeso comparado con peso normal debido posiblemente a la diferencia de microbiota colónica. La presencia de compuestos fenólicos liberados, y sus propiedades antioxidantes en el colon, pueden ejercer un efecto local y su posterior absorción a través del epitelio celular lo que pueden proporcionar beneficios para la salud sistémica en diferentes tejidos y órganos (Oliveras-López *et al.*, 2014).

No se identificó al ácido clorogénico en las etapas de la fermentación colónica, usando ambas microbiotas, lo que podría sugerirse que esto se debe a su metabolismo por la microbiota colónica. Se tiene poca información sobre el efecto que podrían tener los polifenoles sobre la microbiota colónica, sin embargo sus efectos antioxidantes, estrogénicos y anticarcinogénicos se encuentran ampliamente reportados; además algunos polifenoles tienen un efecto antimicrobiano contra microorganismos patógenos (Cardona *et al.*, 2013) .

García-Gutierrez *et al.*, (2015) cuantificaron compuestos fenólicos en la digestión y fermentación colónica del CU tostado americano e igualmente el ácido clorogénico y gálico fueron los componentes mayoritarios, así mismo se mostró una mayor liberación de catequina a las 12 y 24 horas de la fermentación colónica obteniendo valores de 518-1306 µg equivalentes de catequina.

Únicamente se pudo calcular el porcentaje de bioaccesibilidad de ácido gálico, clorogénico y caféico (Tabla 9.) ya que los demás no se pudieron identificar en las demás etapas de la digestión y fermentación colónica. En la etapa del colon, la mayor bioaccesibilidad la tuvo el ácido gálico y fue mayor en la microbiota con sobrepeso, mientras que en las etapas de la digestión, el ácido caféico tuvo una mayor bioaccesibilidad.

Tabla 8. Cuantificación de fenoles y porcentaje de bioaccesibilidad por HPLC-DAD en extractos de digestión y fermentación colónica del café usado tostado francés

	Boca	Estómago	Int. 15	Int. 30	Int. 60	EFCU-pn 6h	EFCU-pn 12h	EFCU-pn 24h	EFCU-sp 6h	EFCU-sp 12h	EFCU-sp 24 h
Fenoles totales*	2.7 ± 0.0 ^{ef}	3.8 ± 0.1 ^d	4.9 ± 0.2 ^c	6.0 ± 0.1 ^b	8.6 ± 0.8 ^a	2.9 ± 0.2 ^e	2.6 ± 0.0 ^{fg}	2.3 ± 0.1 ^g	2.7 ± 0.0 ^{ef}	2.6 ± 0.0 ^{ef}	2.6 ± 0.1 ^{fg}
Ac. Gálico	60.9 ± 11.4 ^{cd}	61.1 ± 0.3 ^{cd}	55.0 ± 0.8 ^{cde}	63.9 ± 9.9 ^c	47.5 ± 0.13 ^{de}	33.2 ± 0.0 ^{fg}	32.1 ± 0.0 ^{fg}	42.8 ± 0.1 ^{efg}	32.1 ± 0.1 ^{fg}	29.4 ± 0.1 ^g	44.5 ± 0.1 ^{ef}
Ac clorogénico	156.3 ± 11.3 ^c	74.8 ± 1.2 ^{def}	69.3 ± 0.4 ^{efg}	138.5 ± 8.5 ^{cd}	93.0 ± 0.9 ^{cde}	6.2 ± 0.1 ^{fg}	-	-	5.2 ± 0.0 ^{efg}	4.9 ± 0.0 ^g	17.2 ± 0.0 ^{fg}
Catequina	49.9 ± 0.7 ⁱ	-	50.6 ± 0.5 ^{hi}	22.5 ± 0.4 ^j	62.2 ± 1.5 ^{gh}	459.6 ± 0.2 ^e	498.9 ± 0.1 ^b	528.2 ± 0.2 ^b	531.5 ± 0.8 ^b	478.9 ± 0.8 ^d	672.8 ± 0.5 ^a
Ac caféico	21.7 ± 0.4 ^b	10.6 ± 0.3 ^b	14.3 ± 0.2 ^c	14.0 ± 0.4 ^c	4.9 ± 0.1 ^e	1.8 ± 0.0 ^f	-	1.6 ± 0.0 ^f	4.6 ± 0.0 ^e	-	-
Rutina	7.4 ± 0.0 ^{bc}	5.5 ± 0.3 ^c	-	4.9 ± 0.1 ^c	-	4.7 ± 0.1 ^c	6.01 ± 0.0 ^c	6.4 ± 0.0 ^c	-	-	-
Ac. p- cumárico	1.3 ± 0.0 ^b	3.6 ± 0.0 ^b	3.3 ± 1.3 ^b	4.7 ± 0.0 ^{ab}	-	0.7 ± 0.0 ^c	-	-	-	-	-
Ac. sinápico	3.6 ± 0.0 ^c	5.5 ± 0.0 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ac. Ferúlico	-	-	-	2.5 ± 0.0 ^b	1.8 ± 0.0 ^b	-	-	-	-	-	-
Quercetina	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.0 ^b

-: No detectado. EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. EFCU-sp: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de sobrepeso. Cada valor representa la media de tres repeticiones ± DS y son expresados como mg de compuesto fenólico/mL. Letras diferentes por renglón, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.* Expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE).

Tabla 9. Porcentaje de bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en las etapas de la digestión y fermentación colónica *in vitro*

	Bioaccesibilidad (%)										
	Boca	Estómago	Int. 15	Int. 30	Int. 60	EFCU-pn 6h	EFCU-pn 12h	EFCU-pn 24 h	EFCU-sp 6h	EFCU-sp 12 h	EFCU-sp 24 h
Ac. Gálico	30.50	50.11	47.36	53.72	42.64	41.14	49.16	57.14	40.33	47.80	58.09
Ac. clorogénico	36.62	32.43	48.10	68.27	40.17	6.25	-	-	5.30	48.51	77.83
Ac. caféico	70.45	53.81	57.57	49.33	25.93	26.87	-	24.62	48.42	-	-

-: No detectado. EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. EFCU-sp: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de sobrepeso. Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm DS y son expresados como mg de compuesto fenólico/mL. Letras diferentes por renglón, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.6 Capacidad antioxidante durante las etapas de la digestión y fermentación colónica *in vitro*

Las etapas con mayor capacidad antioxidante de la digestión del CU fueron la boca, así como a los 15 y 30 min del lado apical del intestino delgado (Tabla 10) Se puede observar también que el CU ejerce capacidad antioxidante en el lado basolateral del saco intestinal invertido, ejercida por los compuestos que lograron atravesar la membrana intestinal.

La capacidad antioxidante medida por las técnicas de DPPH, ABTS en la digestión gastrointestinal, se redujo considerablemente en boca (59.40 mmol eq trolox ABTS y 49.65 mmol eq trolox de DPPH) y estómago (57.54 mmol eq trolox ABTS y 49.04 mmol eq trolox de DPPH) y aumento en intestino.

Campos-Vega *et al.*, (2015), reportaron porcentajes superiores de actividad antioxidante por DPPH y ABTS a lo reportado por este estudio, los valores fueron de 325 y 637 mmol equivalentes de Trolox/g en DPPH y 82.3 y 484.2 mmol equivalentes de Trolox en ABTS para boca y estómago respectivamente.

En cuanto a la digestión en el intestino delgado, la actividad antioxidante usando el método de ABTS, disminuyó considerablemente al paso del tiempo. Mientras que se cuantificó una mayor capacidad antioxidante en el lado basolateral del intestino delgado mediante el método DPPH.

Durante la fermentación colónica, se obtuvieron valores mayores en la cuantificación por ABTS en el EFCU-pn que en el EFCU-sp, sin embargo los valores de DPPH fueron muy similares. Campos-Vega *et al.*, (2015), reportaron porcentajes superiores al 100%, después de 24 horas de fermentación.

Tabla 10. Capacidad antioxidante por DPPH y ABTS en las etapas de la digestión y fermentación colónica del café usado

	ABTS	DPPH
Boca	59.40 ± 3.20 ^b	49.65 ± 1.20 ^b
Estómago	57.54 ± 5.43 ^b	49.04 ± 1.14 ^b
Int. Del. A. 15 min	113.75 ± 1.86 ^a	73.04 ± 2.44 ^a
Int. Del. A. 30 min	50.99 ± 0.21 ^c	73.68 ± 2.08 ^a
Int. Del. A. 60 min	15.54 ± 0.26 ^{ef}	7.09 ± 0.09 ^e
Int. Del. B. 15 min	17.78 ± 1.46 ^e	33.04 ± 3.98 ^c
Int. Del. B. 30 min	11.66 ± 0.26 ^{ef}	53.45 ± 15.0 ^b
Colon		
EFCU-pn 6h	48.06 ± 0.93 ^c	11.63 ± 4.28 ^{de}
EFCU-pn12h	32.18 ± 3.20 ^d	11.09 ± 3.93 ^{de}
EFCU-pn 24h	50.92 ± 0.95 ^c	21.81 ± 1.00 ^{cd}
EFCU-sp 6h	19.41 ± 0.18 ^e	10.32 ± 7.27 ^{de}
EFCU-sp 12h	4.84 ± 0.25 ^{fg}	17.95 ± 4.00 ^{de}
EFCU-sp 24h	3.16 ± 0.12 ^g	20.68 ± 5.0 ^{cde}

Int. Del. B.: Intestino delgado basolateral Int. Del. A.: Intestino delgado apical. EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. EFCU-sp: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de sobrepeso. Cada valor representa la media de tres repeticiones ± DS y son expresados como mmol eq trolox/ g. Letras diferentes por renglón, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.7 Flujo de agua durante la digestión gastrointestinal *in vitro*

Durante la digestión *in vitro* a nivel del intestino delgado, utilizando el saco intestinal invertido, se da una transferencia de moléculas de agua en el tejido, desde el lado apical al lado basolateral, y viceversa, como se puede observar en la Tabla 11, indicando que hubo transporte de algunos compuestos (Campos-Vega *et al.*, 2015).

El peso del intestino aumentó de manera no significativa durante el proceso de digestión del minuto 15 al 30 (2.72 ± 0.31 , 3.41 ± 0.29 , respectivamente) (Tabla 11) debido a la absorción de moléculas de agua así como de ciertos compuestos considerando la humectabilidad del tejido, posteriormente el peso disminuyó en el minuto 60 (3.10 ± 0.71) indicando que también hubo transporte de compuestos de forma inversa. En el blanco ocurrió un fenómeno similar al explicado anteriormente.

Tabla 11. Flujo de agua de digestión *in vitro*

Muestra	Flujo de agua			
	I1	I2	I3	FA
CU				
15 min	1.33 ± 0.13 ^{aX}	2.75 ± 0.35 ^{bW}	2.72 ± 0.31 ^{cW}	0.02 ± 0.08 ^{dW}
30 min	1.44 ± 0.17 ^{aX}	3.26 ± 0.61 ^{bW}	3.41 ± 0.29 ^{cW}	0.02 ± 0.28 ^{dY}
60 min	1.46 ± 0.19 ^{aX}	3.21 ± 0.48 ^{bW}	3.10 ± 0.71 ^{cW}	0.07 ± 0.23 ^{dY}
Blanco				
15 min	1.24 ± 0.12 ^{aY}	2.45 ± 0.35 ^{bWX}	2.48 ± 0.31 ^{cWX}	0.03 ± 0.03 ^{dZ}
30 min	1.61 ± 0.01 ^{aX}	3.16 ± 0.41 ^{bW}	3.19 ± 0.36 ^{cW}	0.02 ± 0.06 ^{dY}
60 min	1.35 ± 0.19 ^{aX}	3.06 ± 0.48 ^{bW}	3.09 ± 0.49 ^{cW}	0.01 ± 0.19 ^{dZ}

CU: café usado. I1= Saco intestinal sin solución amortiguadora previo a la incubación. I2= Saco intestinal con solución amortiguadora previo a la incubación. I3= Saco intestinal con solución amortiguadora posterior a la incubación. FA= Flujo de Agua. Los resultados de los parámetros I1, I2 y I3 son expresados en gramos. Los resultados de FA son expresados como gramo de agua por gramo de intestino fresco. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado ± ES. Letras minúsculas (abcde) diferentes por renglón y letras mayúsculas por columna (WXY) expresan diferencia significativa de cada tiempo de incubación de ambas muestras bajo diferentes parámetros ($p < 0.05$) por prueba de Tukey. Signos diferentes por columna expresan diferencia significativa de los diferentes tiempos de incubación de ambas muestras por separado.

Se evaluó la permeabilidad de los compuestos fenólicos del CU en el modelo del intestino invertido y se observó un aumento en los valores de permeabilidad del lado apical al basolateral conforme el paso del tiempo. Los valores fueron mayores a $>1 \times 10^{-6} \text{cm/s}$, que son considerados valores altos, de acuerdo a lo sugerido por Artursson *et al.*, (2001)

El flujo potencial activo que se obtuvo mediante el radio de permeabilidad en sentido apical a basolateral (A-B) y de basolateral a apical (B-A), fue mayor a 0.5 y manores a 2 indicando flujo activo (Hubatsch *et al.*, 2007).

El radio de flujo se encontró (Tabla 12) entre los valores de 1.29 y 0.74 cm/s, estos valores sugieren que el mecanismo de transporte de los compuestos

fenólicos a través de la membrana intestinal es difusión pasiva (Campos-Vega *et al.*, 2015).

Campos-Vega *et al.*, (2015) mostraron valores de transporte de compuestos fenólicos totales en el CU tostado francés de 1.14 a 1.81 cm/s en todo el intestino (B a A), por lo que sugirieron que los polifenoles del CU podían actuar como sustrato para transportadores de flujo, como la glicoproteína-P.

Tabla 12. Permeabilidad aparente de compuestos fenólicos totales en digestión *in vitro*

<i>Muestra</i>	<i>Permeabilidad aparente</i>		
	Paap A a B X 10⁻⁴	Paap B a A X 10⁻⁴	Radio de flujo (B a A)/(A a B)
CU			
15 min	1.34 ± 0.23 ^c	1.34 ± 0.06 ^c	1
30 min	1.65 ± 0.14 ^b	1.87 ± 0.06 ^b	1.29
60 min	2.49 ± 0.13 ^a	1.86 ± 0.07 ^b	0.74

CU: café usado Paap A a B: transporte del lado apical al basolateral. Paap A a B: transporte del lado apical al basolateral. Los datos se representan como la media ± DE (n=4) y son presentados como cm/s.

VII.8 Efecto sobre el pH en el medio de incubación durante la fermentación colónica *in vitro* de la FND del CU tostado francés con microbiota de personas con peso normal y sobrepeso

Durante el proceso de fermentación colónica se evaluó el pH de las diferentes muestras, así como de blancos y controles para asegurar que se esté llevando a cabo de manera adecuada. Se espera una disminución del mismo debido a la producción de ácidos orgánicos entre los que se encuentran los AGCC, así como la hidrólisis de carbohidratos y la liberación de otros compuestos (Jiang y Savaiano, 1997).

El pH durante la fermentación colónica con las distintas microbiotas se muestra en la Tabla 13 y se puede observar que el origen del a microbiota no afectó el pH del CU durante la fermentación *in vitro* de la FND del CU, sin embargo el control positivo (inulina) mostró un descenso significativo en el pH a las 24 horas de fermentación en la microbiota de peso normal.

Mientras que inicialmente (tiempo 0) el pH no mostró diferencia estadísticamente significativa, a las 12 horas mostraron los valores más bajos, mismos que no se modificaron significativamente a las 24 horas. Durante el experimento se utilizó como control positivo la inulina, ya que es un carbohidrato fermentable y funciona como un control de que está llevando a cabo correctamente la fermentación por parte las bacterias del colon.

López-Barrera *et al.*, (2016) reportaron valores neutros de pH a las 0 horas (7.4) mismos que disminuyeron de 0.3 a 0.5 unidades de potencial de hidrógeno a las 24 horas de fermentación en el CU, valores similares a los reportados en este trabajo. Estos autores usaron como control positivo la rafinosa, y también mostró una disminución más importante que el CU para llegar a un pH final a las 24 horas de 4.5.

Tabla 13. Medición de pH en las etapas de la fermentación colónica *in vitro*

		0 horas	6 horas	12 horas	24 horas
EFCU-sp	CU	6.95 ± 0.23 ^{abW}	6.78 ± 0.39 ^{bcW}	6.40 ± 0.23 ^{abW}	6.40 ± 0.19 ^{abX}
	Control (+)	7.08 ± 0.23 ^{aW}	5.19 ± 1.12 ^{cdX}	4.36 ± 0.12 ^{dX}	5.15 ± 1.33 ^{cdY}
	Control (-)	6.98 ± 0.28 ^{aW}	6.46 ± 0.47 ^{abWX}	6.61 ± 0.26 ^{abW}	6.94 ± 0.29 ^{abW}
EFCU-pn	CU	6.96 ± 0.07 ^{aW}	6.36 ± 0.15 ^{abcWX}	6.45 ± 0.33 ^{abW}	6.43 ± 0.30 ^{abX}
	Control (+)	7.08 ± 0.14 ^{aW}	5.33 ± 1.09 ^{cdY}	4.46 ± 0.36 ^{deX}	4.22 ± 0.25 ^{eY}
	Control (-)	7.05 ± 0.12 ^{aW}	6.00 ± 0.79 ^{bcXY}	6.78 ± 0.35 ^{abW}	7.02 ± 0.34 ^{abW}

CU: Café usado en inóculo. EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. EFCU-sp: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de sobrepeso. Los resultados son expresados como potencial de hidrógeno. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado ± ES. Letras minúsculas (abcde) diferentes por renglón y letras mayúsculas por columna (WXY) expresan diferencia significativa de cada tiempo de incubación de ambas muestras bajo diferentes parámetros ($p < 0.05$) por prueba de Tukey. Signos diferentes por columna expresan diferencia significativa de los diferentes tiempos de incubación de ambas muestras por separado.

VII.9 Cuantificación AGCC durante las etapas de la fermentación colónica con microbiota de peso normal y sobrepeso usando cromatografía de gases acoplado a masas

El ácido butírico fue el ácido graso de cadena corta predominante producido durante la fermentación colónica de la fracción no digerible del CU (Tabla 14); no se pudo identificar el ácido propiónico ni acético en los extractos usando microbiota con peso normal. En la fermentación colónica usando microbiota de sobrepeso se identificó al ácido acético como el segundo compuesto más abundante y el propiónico se produjo en menor concentración. Las diferencias en la producción de los AGCC, se deben a los distintos tipos de bacterias predominantes en el colon como se había mencionado anteriormente (Hinnebusch *et al.*, 2002).

La mayor producción de AGCC por la fermentación del CU con ambas microbiotas se alcanzó a las 24 horas del experimento, lo cual nos sugiere que los sustratos del CU son más difíciles de degradar debido a la complejidad de la estructura de los polisacáridos de la fibra.

López-Barrera *et al.*, (2016), obtuvieron valores a las 24 horas de fermentación del CU de ácido butírico entre 7.8-7.9 mmol/litro superiores a los reportados en este trabajo, donde se obtuvieron de 3.08 a 5.67 mmol/litro (Tabla 14). Así mismo los valores de ácido acético fueron mayores pues reporta entre 18.8-29.4 mmol/ litro y de propiónico 10.4 a 10.6 mmol/ litro, mientras que en este trabajo se obtuvieron rangos de 2.9-2.96 mmol/ litro de ácido acético y 1.7 de propiónico. Las diferencias pueden atribuirse el inóculo fue distinto así como los métodos de cuantificación también difirieron.

Jaquet *et al.*, (2009), estudiaron el impacto que tuvo el consumo de cantidades moderadas de café instantáneo en la microbiota intestinal, encontrando que aumentaba la población de *Bifidobacterium*, atribuyéndosele a los

polisacáridos solubles, conteniendo un 20 % de proteínas de arabinogalactano, lo cual aumentó la producción de AGCC como el butírico y el propiónico, atribuyéndole propiedades prebióticas.

Se ha reportado que los AGCC poseen actividad antiinflamatoria y juegan un papel vital en la regulación de la función inmune de la superficie celular de la mucosa intestinal, además de tener la capacidad de activar la cascada de apoptosis y reducir el crecimiento de algunos tumores mediante la hiperacetilación de las histonas, el arresto al ciclo celular y la activación de genes proapoptóticos. Éstos compuestos disminuyen el pH del colon, el cuál es necesario para la efectividad de ciertas enzimas e inhibir el metabolismo de agentes carcinogénicos, además actúan como fuente de energía para los colonocitos, propician el crecimiento de bacterias ácido lácticas y estimulan la irrigación sanguínea en este órgano (Kumar *et al.*, 2013).

Tabla 14. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante GC-MS durante la fermentación *in vitro* del la FND del café usado con microbiota de peso normal y sobrepeso

	<i>Ac. Butírico</i>	<i>Ac. Propiónico</i>	<i>Ac. Acético</i>
<i>EFCU-pn</i>			
24 horas	3.08 ± 0.00	-	-
<i>EFCU-sp</i>			
6 horas	4.61 ± 0.00	-	2.90 ± 0.00
24 horas	5.67 ± 0.00	1.70 ± 0.00	2.96 ± 0.00

EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. EFCU-sp:extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de sobrepeso. Cada valor representa la media de tres repeticiones ± DS y son expresados como mmol/L. Letras diferentes por renglón, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.10 Ensayos *in vitro* con línea celular HT-29

VII.10.1 Efecto del EFCU *in vitro* sobre la viabilidad celular

Dado que el CU es una fuente importante de polifenoles con potencial anticancerígeno, así como de fibra dietaria que al fermentarse por las bacterias colónicas tiene potencial para producir AGCC, de los cuales se conoce su efecto para la prevención de cáncer de colon (Gingras y Béliveau, 2011), se evaluó el efecto de los extractos de la fermentación colónica sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano.

Los extractos de la fermentación de ambas microbiotas inhibieron la sobrevivencia de células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 (Figura 7), sin embargo el EFCU-pn mostró un efecto dosis-dependiente obteniendo una CL₅₀ de 13.5 %, mientras que el EFCU-sp no fue dosis dependiente requiriéndose de hasta 73 % del extracto de la fermentación para lograr la inhibición (Figura 8). Es por eso que para las siguientes pruebas *in vitro* usando células HT-29, únicamente se utilizó el CL₅₀ EFCU-pn.

García-Gutierrez *et al.*, (2015) midieron el extracto de la fermentación del CU tostado medio sobre células de cáncer de colon SW-480 obteniendo una CL₅₀ de 19%. Sin embargo, en frijól común (*Phaseolus vulgaris* L.) Campos-Vega *et al.*, (2013), reportan una tendencia similar en productos de la fermentación de la fracción no digerible del frijól variedad bayo madero sobre células de adenocarcinoma humano HT-29, donde se obtuvo una CL₅₀ del 17%. Las diferencias pueden atribuirse a la matriz fermentada, la microbiota utilizada en la fermentación y la línea celular.

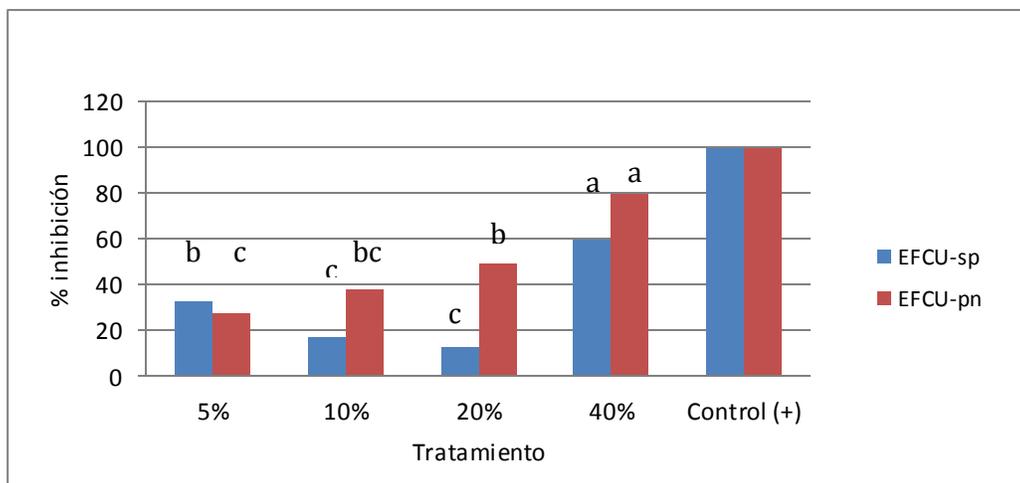


Figura 7. Inhibición de la sobrevivencia (%) de células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 por EFCU-pn y EFCU-sp

EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. EFCU-sp: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de sobrepeso. Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm DS y son expresados como % de inhibición. Letras diferentes por barra de distinto color, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

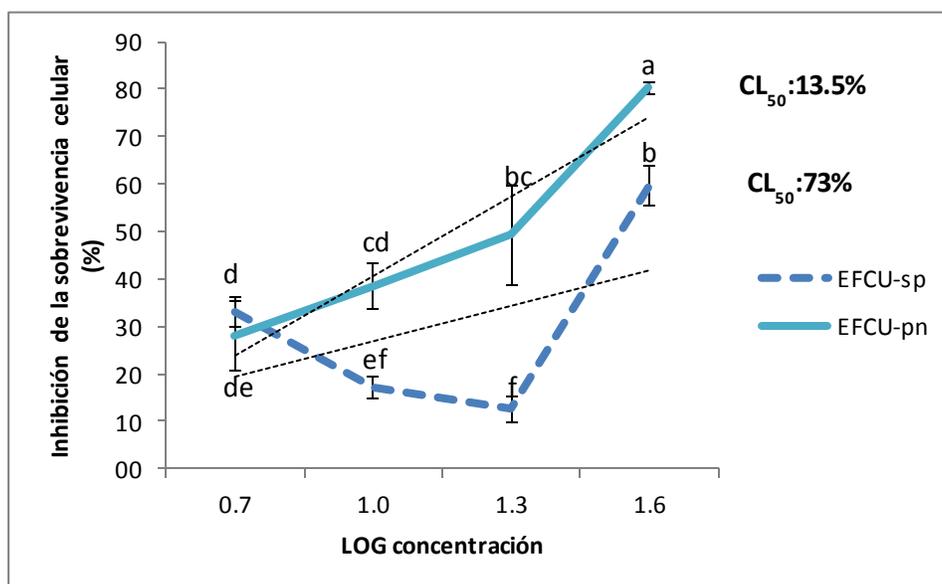


Figura 8. Regresión lineal de la curva dosis-respuesta del efecto del EFCU-pn y EFCU-sp de células de cáncer de colon humano HT-29

EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. EFCU-sp: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de sobrepeso. Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm DS y son expresados como % de inhibición. Letras diferentes por barra de distinto color, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

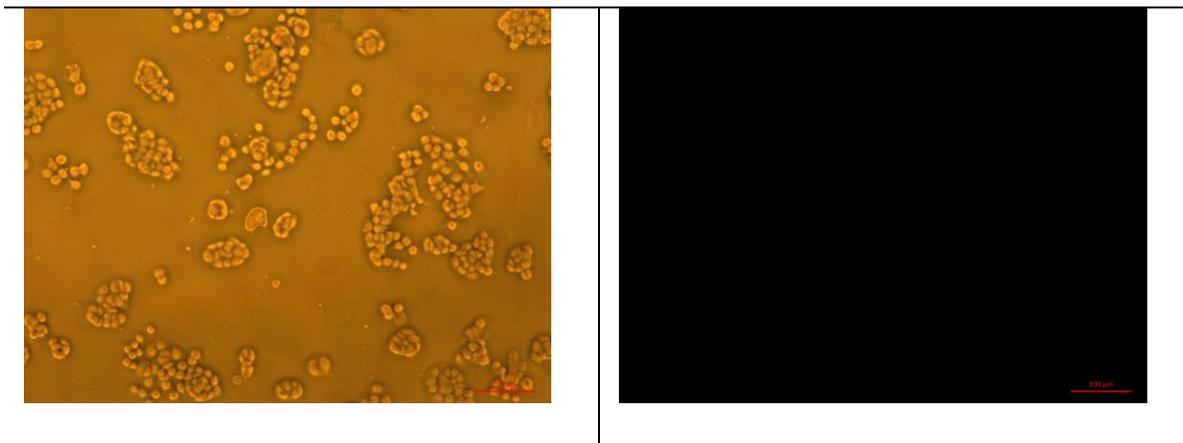
VII.10.2 Efecto del extracto de fermentación sobre la apoptosis de las células HT-29.

Se observó inducción de apoptosis en células tratadas con la CL₅₀ del EFCU-pn, esto al realizar la evaluación mediante la tinción de TUNEL (Figura 9), que revela la apoptosis debido a la fragmentación de ADN nuclear. Las células del grupo sin tratamiento (control negativo) no mostraron fluorescencia, mientras las células tratadas en se muestran en verde brillante, lo que indica apoptosis.

En la Figura 10, se puede observar el aumento en la intensidad de fluorescencia de las células tratadas, en base al control negativo de células sin tratamiento, infiriendo que ese aumento en la fluorescencia se debe a la apoptosis.

Campos-Vega *et al.*, (2009) trataron células HT-29 con el CL₅₀ de los extractos de fermentación de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y observaron apoptóticos citoplasmáticos además de que el 28 % de las células fue TUNEL positivo.

Control (-) de células sin tratamiento



Células tratadas por el CL₅₀ del EFCU-pn

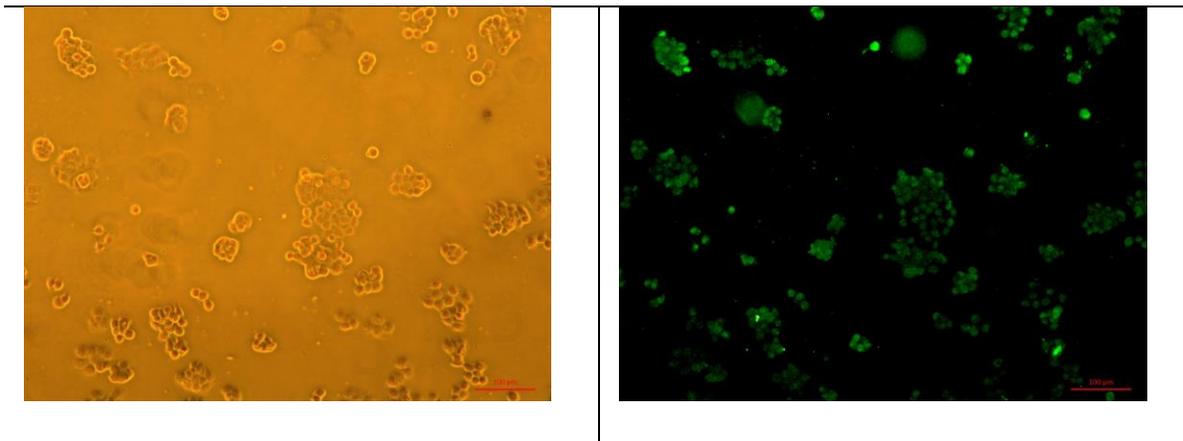


Figura 9. Fluorescencia de células en apoptosis por tinción TUNEL

CL₅₀ del EFCU-pn: concentración letal media del extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. Del lado izquierdo se observa la imagen de las células sin fluorescencia, del lado derecho se observa la imagen de las mismas células con fluorescencia las células en apoptosis.

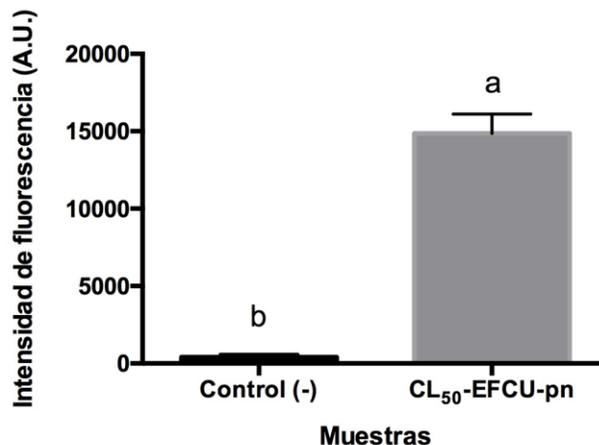


Figura 10. Intensidad de fluorescencia de células en el ensayo TUNEL

EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm DS y son expresados como intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (A.U.). Letras diferentes por barra, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.10.3 Actividad de catalasa en células HT-29 tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn

Como se observa en la Figura 11, la actividad de la enzima catalasa en las células tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn (1.78 U/mL) incrementó significativamente al compararlo con el control negativo (1.76 U/mL). Una disminución en la actividad de catalasa, promueve el crecimiento del cáncer y la infiltración en tejidos que lo rodean, lo cual es de una vital importancia para la invasión y metástasis y un aumento en la actividad de esta enzima es necesaria para inhibir la carcinogénesis (Aachary *et al.*, 2015).

Kwon *et al.*, (2015) trataron células HT-29 con epigallocatequina del té verde y adicionaron SOD y catalasa al medio de cultivo celular. Observando que se redujo el efecto de estimulación del crecimiento celular por el SFB y que el H₂O₂ fue degradado por el SOD concluyendo que la modulación de SOD junto con los ROS juegan un papel en la estimulación del crecimiento de células de cáncer de colon.

Manju y Nalini, (2005) cuantificaron catalasa en ratas inducidas con cáncer de colon, las cuales trataron con gengibre y observaron un aumento en la concentración de catalasa comparando con el grupo control, concluyendo que el aumento protegía contra la peroxidación lipídica mediada por H_2O_2 y O_2^{\ominus} y que al aumentar la actividad de enzimas antioxidantes y detoxificantes podría ser un mecanismo importante para disminuir los efectos nocivos de la DMH.

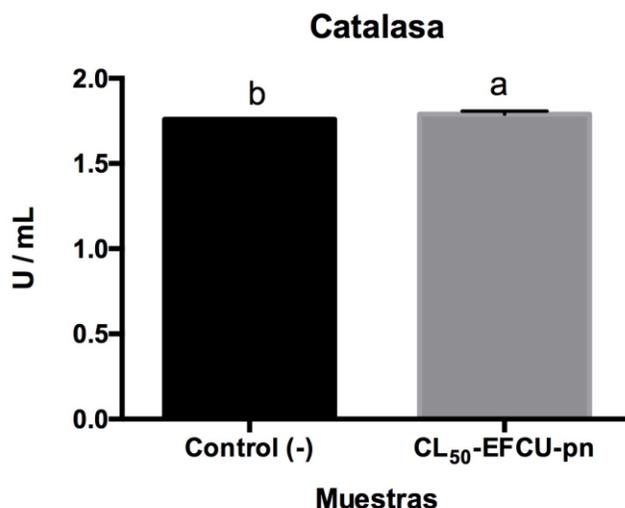


Figura 11. Actividad de la enzima catalasa en lisados celulares de células HT-29 tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn

EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm DS y son expresados como unidades por mililitro de muestra. Letras diferentes por barra, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.10.4 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en células HT-29 tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn

En la apoptosis, las ROS son una señal reguladora muy importante, los inhibidores de SOD promueven la apoptosis en lugar de la proliferación, por lo que la sobreexpresión de algunos tipos de SOD como el Mn-SOD reducen los niveles de ROS intracelular y previenen la muerte celular (Miar *et al.*, 2015)

No se observó diferencia en la actividad de la enzima SOD al tratar las células HT-29 con la IC₅₀ del EFCU-pn, en comparación con las células no tratadas (datos no mostrados). Esto podría deberse a la especificidad del kit, pues únicamente se cuantificó SOD total y existen distintas isoformas de SOD como la dependiente de cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) y la dependiente de manganeso (Mn-SOD). Se ha observado un aumento en la Mn-SOD durante la progresión de tumores y metástasis de cáncer de colon, así como en células de cáncer temprano (Miar *et al.*, 2015).

La inducción de la apoptosis por el CL₅₀ de los EFCU-pn podría no darse mediante mecanismo dependiente de la enzima SOD, sino a través de la modulación de diferentes enzimas que sí tuvieron una modificación en este trabajo. Sin embargo se requiere mayor experimentación con distintas líneas celulares, para poder descartar la diferencia intracelular de la modulación de esta enzima en el mecanismo de acción del CL₅₀ de los EFCU-pn para la inducción de apoptosis.

VII.10.5 Contenido de glutatión total en células HT-29 tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn

El contenido total de glutatión total (Figura 12), fue reducido en el tratamiento usando el IC₅₀ del EFCU-pn (4.5 μm para el control y 4.2 μm para el tratamiento). La reducción en los niveles de glutatión puede elevar el contenido de ROS,

desencadenando muerte celular y apoptosis mediada por receptores mitocondriales y de muerte celular (Kaynar *et al.*, 2005).

Deorukhkar *et al.*, (2015) evaluaron el zerumbone, un compuesto del gengibre, sobre varias líneas celulares de cáncer de colon, demostrando una radiosensibilización de las células a través del aumento al daño en el ADN inducido por radiación mostrando un mecanismo dependiente de glutatión no dependiente de ROS mediante una disminución del mismo.

Se ha observado que la depleción de glutatión puede perturbar las funciones celulares de múltiples maneras, ya que la disminución del glutatión intracelular puede inducir la apoptosis en células de cáncer, independientemente de la generación de ROS. Además recientemente el glutatión, se ha reconocido para regular las funciones celulares importantes más allá del equilibrio redox celular, como la síntesis de ADN, la expresión génica y la reparación del daño.

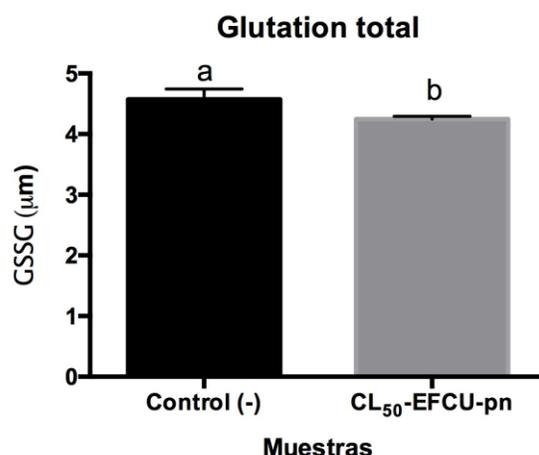


Figura 11. Contenido de glutatión total en células tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn

EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm DS y son expresados como μm de glutatión total. Letras diferentes por barra muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.10.6 Contenido de 8-iso-prostaglandina F2 α en células HT-29 tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn

Las 8-iso-prostaglandinas F2 α son productos del ácido araquidónico que fue dañado por ROS o radicales libres, esterificados, hidrolizados y se liberan en el fluido extracelular a través de la actividad de la fosfolipasa A2, aunque la 8-iso-prostaglandina F2 α ha sido ampliamente empleada como un biomarcador cuantitativo *in vivo* del daño oxidativo, su papel y función son controversiales aún (Mannello *et al.*, 2007).

En la Figura 13, se observa una disminución de la concentración de 8-iso-PGF2 α en las células tratadas con el IC₅₀ del extracto de la fermentación colónica del CU (de 29.7 pg/mL en el control negativo y 28 pg/mL para el tratamiento), por lo que se sugiere que existió una menor peroxidación de lípidos celulares.

Menghini *et al.*, (2016) indujeron inflamación de colon a ratas y posteriormente las trato con extractos de manzanilla, mostrando una disminución en los niveles de 8-iso-prostaglandinas F2 α de manera dosis dependiente después de la exposición a los extractos concluyendo que se redujo eficazmente, la inflamación y la respuesta inmune de los biomarcadores.

El aumento de la peroxidación de los lípidos celulares, por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados, ácido linoleico libre y conjugado y el ácido araquidónico, genera compuestos que inhiben el crecimiento de células tanto *in vivo* como en *in vitro*. Del mismo modo, los productos de peroxidación de lípidos tales como la 8-iso-prostaglandina F2 α pueden inhibir la proliferación celular e inducir la diferenciación, la maduración y el recambio apoptótico (Mannello *et al.*, 2007).

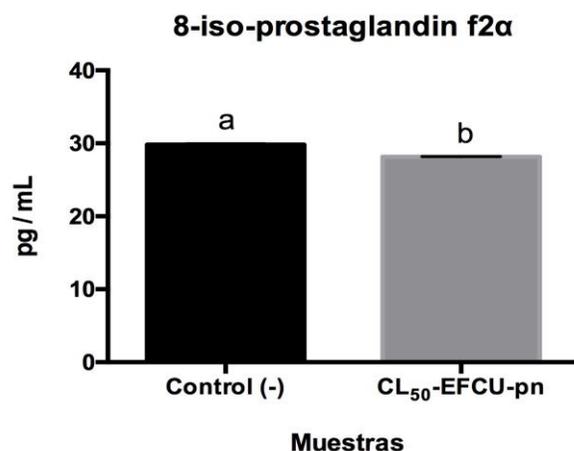


Figura 12. Contenido de la enzima 8-iso-prostaglandina f2 α en células tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn.

EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm DS y son expresados como picogramos por mililitro de muestra. Letras diferentes por barra, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

VII.10.7 Contenido de lactato deshidrogenasa en sobrenadante de células HT-29 tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn

Una de las diferencias principales de las células de cáncer comparado con células sanas es su metabolismo modificado para disminuir la fosforilación oxidativa y aumentar la glucólisis y así generar suficiente energía, ya que las demandas de las células de cáncer al proliferar rápidamente son mayores; aún en concentraciones normales de oxígeno, esto es llamado efecto Warburg. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima soluble citoplasmática que cataliza la conversión de piruvato a lactato y es considerada un punto de control clave en la glucólisis anaerobia (Philipp *et al.*, 2014).

Esta enzima citoplasmática se encuentra presente en casi todas las células y es liberada en el espacio extracelular cuando la membrana plasmática es dañada. Las fugas de contenido plasmático de la membrana celular cuando ocurre la

necrosis, provoca la liberación de contenidos intracelulares en el medio extracelular (Chan *et al.*, 2013).

En la Figura 14 se observa que hubo una mayor concentración de lactato deshidrogenasa en las células sin tratamiento (control negativo) (6.70 miliunidades/mL) comparado con el tratamiento con el CL₅₀ del EFCU-pn (5.94 miliunidades/mL). Por lo que se sugiere que las células no murieron por necrosis debido a la toxicidad del EFCU-pn.

Se ha observado que la inactivación o inhibición de LDH conduce a la producción de ROS, que se exacerba por la hipoxia e impulsa la glucólisis. Mientras que el aumento de ROS podría ser debido a la reorientación de piruvato hacia metabolismo oxidativo, estudios mecanísticos de los inhibidores de MCT1 (transportador de lactato) sugieren que la pérdida de la actividad LDH puede desencadenar un aumento de ROS a través de efectos de retroalimentación negativa sobre la glucólisis y una disminución en la síntesis de la principal antioxidante de la célula, el glutatión (Millimouno *et al.*, 2014).

Esto se puede relacionar con los resultados de este trabajo, ya que al haber una disminución de la enzima lactato deshidrogenasa y glutatión total, se puede inferir que hubo un aumento en el estrés oxidativo celular desencadenando apoptosis mediante el aumento de ROS.

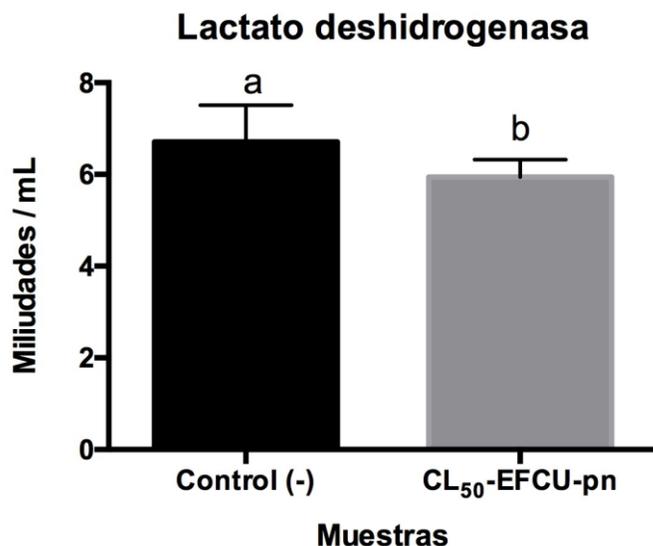


Figura 13. Contenido de la enzima lactato deshidrogenasa tratadas con el IC₅₀ del EFCU-pn

EFCU-pn: extracto de la fermentación de la fracción no digerible del CU con microbiota de peso normal. Cada valor representa la media de tres repeticiones \pm DS y son expresados como miliunidades por mililitro de muestra. Letras diferentes por barra, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey.

Los organismos aeróbicos no pueden evitar la generación de radicales libres y ROS, que se producen durante el metabolismo normal del oxígeno. En una situación fisiológica, las células mantienen el equilibrio entre la generación y la neutralización de ROS a través de procesos no enzimáticos, principalmente glutatión (GSH), y defensas enzimáticas como: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión -S -transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), entre otras. Sin embargo, cuando el equilibrio celular se altera y las defensas antioxidantes no funcionan adecuadamente, las células pueden dañarse. Por lo tanto, la sobreproducción de ROS puede conducir a la formación de productos de oxidación altamente reactivos, a la activación de carcinógenos, formación de bases de ADN oxidadas y cadena de ADN con daños. Todas estas modificaciones podría provocar errores durante la replicación del ADN y alteraciones genéticas, así como modular la transcripción de las proteínas redox

reguladas, lo que aumenta la proliferación celular descontrolada, así como la progresión de tumores (Martín *et al.*, 2016).

La evidencia de estudios recientes sugiere que células de cáncer, en comparación con las células normales, están bajo un mayor estrés oxidativo asociado con la transformación oncogénica, las alteraciones en la actividad metabólica y tienen una mayor generación de ROS. El aumento de las cantidades de ROS en las células cancerosas puede tener consecuencias significativas, como la estimulación de la proliferación celular, la promoción de mutaciones y inestabilidad genética, así como alteraciones en la sensibilidad celular a los agentes contra el cáncer. Por otro lado, el aumento del estrés causado por ROS en las células del cáncer también puede proporcionar una base bioquímica para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, ya que aumentando aún más la producción de ROS y/o inhibiendo las defensas antioxidantes puede disminuir la viabilidad de las células cancerosas (Pelicano *et al.*, 2004).

Las mitocondrias son las principales generadoras de ROS, por lo que a menudo se convierten en el blanco de la exposición elevada a estos compuestos, teniendo consecuencias mortales para las células como el daño oxidativo mitocondrial de ADN, lo cual juega un papel principal en la apoptosis celular (Sinha *et al.*, 2013).

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que el café usado mostró ser fuente importante de compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos, siendo el ácido clorogénico el mayoritario. El CU puede ser metabolizado, por una simulación de diestion gastro intestinal *in vitro* hasta obtener la fracción no digerible mostrando capacidad antioxidante importante, en los extractos etanólicos del GC y CU además en las etapas de la digestión y fermentación colónica, sugiriendo efectos protectores contra los radicales libres.

Así mismo, el CU mostró que puede ser fermentado por las bacterias del colon, usando dos tipos de microbiota colónica (peso normal y sobrepeso) liberando compuestos como: la catequina y pueden producirse ácidos grasos de cadena corta, siendo el mayoritario el ácido butírico teniendo un potencial efecto benéfico en el colon y pudiendo prevenir enfermedades.

Los EFCU-pn, inhibieron la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano *in vitro* (HT-29) con una concentración letal media de 13.5% (43.2 microlitros por mL) mostrando un efecto dosis-dependiente; no se observó la misma tendencia en los EFCU-sp. En las células tratadas con el CL₅₀ del EFCU-pn se observó un incremento en la fluorescencia usando la técnica de TUNEL, sugiriendo que las células de cáncer murieron por apoptosis.

Posterior al tratamiento con la CL₅₀ del EFCU-pn, se observó un incremento en la actividad de catalasa, indicando una protección contra la peroxidación lipídica y disminuyendo los efectos de los productos de la misma (8-iso-prostaglandina F_{2α}).

También se obtuvo una reducción en el contenido de glutatión total, el cual es un mecanismo probado para inducir apoptosis de células de cáncer de colon debido al aumento en la producción de ROS, relacionado posiblemente con la inhibición de lactato deshidrogenasa.

Se requieren más evaluaciones moleculares para proporcionar información sobre el equilibrio entre los productos de peroxidación de lípidos y antioxidantes

celulares en la inhibición de la viabilidad de células de cáncer de colon, así como el estudio de otros mecanismos a través de los cuáles los extractos de la fermentación colónica del CU pueden inducir la inhibición de la carcinogénesis.

XI. REFERENCIAS

- Aachary, A., Gobinath, D., Srinivasan, K., and Prapulla, G. 2015. Protective effect of xylooligosaccharides from corncob on 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer in rats. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(2), 146–152.
- Ahmed, D., Eide, W., Eilertsen, A., Danielsen, A., Eknæs, M., Hektoen, M., and Lothe, A. 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71.
- Anhê, F., Varin, T., Barz, M., Desjardins, Y., Levy, E., Roy, D., and Marette, A. 2015. Gut microbiota dysbiosis in obesity-linked metabolic diseases and prebiotic potential of polyphenol-rich extracts. *Current Obesity Reports*, 4(4), 389–400.
- AOAC. 2002. Official methods of AOAC international., 2.
- Arnoult, D., Parone, P., Martinou, C., Antonsson, B., Estaquier, J., and Ameisen, C. 2002. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *The Journal of Cell Biology*, 159(6), 923–929.
- Artursson, P., Palm, K., and Luthman, K. 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 27–43.
- Barbehenn, V., and Peter Constabel, C. 2011. Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), 1551–1565.
- Bardou, M., Barkun, A., and Martel, M. 2013. Obesity and colorectal cancer. *Gut*, 62(6), 933–947.
- Barrera, G. 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, 2012, 137–289.
- Besten, G., Eunen, K., Groen, A., Venema, K., Reijngoud, D., and Bakker, B. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325–2340.

- Bravo, J., Juárez, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L., De Peña, M., and Cid, C. 2012. Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12565–12573.
- Bravo, J., Monente, C., Juárez, I., De Peña, M., and Cid, C. 2013. Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, 50(2), 610–616.
- Bultman, S. 2016. Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. *Molecular Nutrition y Food Research*.
- Caetano, N., Silva, V., and Mata, T. 2012. Valorization of coffee grounds for biodiesel production. *Chemica Engineering Transactions*, 26, 267–272.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H., y Oomah, D. 2015. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science y Technology*.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J., Guzman-Maldonado, S., Paredes-Lopez, O., and Loarca-Piña, G. 2009. Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), T59–T65.
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., and Oomah, D. 2015. Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*.
- Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330–337.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F., and Queipo-Ortuño, M. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422.
- Chan, F, Moriwaki, K., and De Rosa, M. 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Immune Homeostasis*, 65–70.

- Cruz, R., Cardoso, M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., and Casal, S. 2012. Espresso coffee residues: A valuable source of unextracted compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7777–7784.
- Deorukhkar, A., Ahuja, N., Mercado, A., Diagaradjane, P., Raju, U., Patel, N., and Krishnan, S. 2015. Zerumbone increases oxidative stress in a thiol-dependent ROS-independent manner to increase DNA damage and sensitize colorectal cancer cells to radiation. *Cancer Medicine*, 4(2), 278–292.
- Díaz-Rubio, M., and Saura-Calixto, F. 2007. Dietary fiber in brewed coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1999–2003.
- Esquivel, P., and Jiménez, V. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495.
- Fabbri, A., Schacht, R., and Crosby, G. 2016. Evaluation of resistant starch content of cooked black beans, pinto beans, and chickpeas. *NFS Journal*, 3, 8–12.
- Fernández, J., Redondo-Blanco, S., Gutiérrez-del-Río, I., Miguélez, E., Villar, C., and Lombó, F. 2016. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *Journal of Functional Foods*, 25, 511–522.
- García Gutierrez, N. 2015. Efecto de los productos de la fermentación colónica de la fracción no digerible del café (*Coffea arábica* L.) usado sobre células de colon y su mecanismo de acción. Trabajo de Tesis.
- García, P., Rossana, Lady, Biasetto, C., Araujo, A., and Bianchi, V., 2015. Enhanced extraction of phenolic compounds from coffee industry's residues through solid state fermentation by *Penicillium purpurogenum*. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(4), 704–711.
- Gingras, D., and Béliveau, R. 2011. Colorectal cancer prevention through dietary and Lifestyle Modifications. *Cancer Microenvironment*, 4(2), 133–139.
- Gladyshev, V., Factor, V., Housseau, F., and Hatfield, D. 1998. Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(2), 488–493.

- Gniechwitz, D., Reichardt, N., Blaut, M., Steinhart, H., and Bunzel, M. 2007. Dietary fiber from coffee beverage: Degradation by human fecal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6989–6996.
- Gonzalez-Rios, O., Suarez-Quiroz, M., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J., and Schorr-Galindo, S. 2007. Impact of “ecological” post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 297–307.
- Grandfeldt Y, Björck I, Drews A, and Tovar J. 1992. An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(9), 649–660.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Heinritz, S., Weiss, E., Eklund, M., Aumiller, T., Heyer, C., Messner, S., and Mosenthin, R. 2016. Impact of a high-fat or high-fiber diet on intestinal microbiota and metabolic markers in a pig model. *Nutrients*, 8(5).
- Hengartner, M. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770–776.
- Hinnebusch, B., Meng, S., Wu, J., Archer, S., y Hodin, R. 2002. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *The Journal of Nutrition*, 132(5), 1012–1017.
- Holley, A., Dhar, S., Xu, and Clair, D. 2010. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids*, 42(1), 139–158.
- Huang, L., Savoly, D., Sidi, A., Adelson, M., Mordechai, E., and Trama, J. 2012. CIP2A protein expression in high-grade, high-stage bladder cancer. *Cancer Medicine*, 1(1), 76–81.
- Huang, P., Feng, L., Oldham, E., Keating, M., and Plunkett, W. 2000. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, 407(6802), 390–395.
- Hur, S., Lim, B., Decker, E., and McClements, D. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12.

- Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J., Cavin, C., and Bibiloni, R. 2009. Impact of coffee consumption on the gut microbiota: A human volunteer study. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2), 117–121.
- Jiang, T., and Savaiano, D. 1997. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. *Digestive Diseases and Sciences*, 42(11), 2370–2377.
- Johnstone, R., Ruefli, A., and Lowe, S. 2002. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108(2), 153–164.
- Kaynar, H., Meral, M., Turhan, H., Keles, M., Celik, G., and Akcay, F. 2005. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu–Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, 227(2), 133–139.
- Kumar, M., Nagpal, R., Verma, V., Kumar, A., Kaur, N., Hemalatha, R., and Singh, B. 2013. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutrition Reviews*, 71(1), 23–34.
- Kwon, S., Lambert, J., Yang, C., and Hong, J. 2015. Role of reactive oxygen species from the green tea catechin, (–)-epigallocatechin-3-gallate in growth modulation of intestinal cells. *Food Science and Biotechnology*, 24(4), 1541–1548.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., and Kioussi, C. 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 887, 41–47.
- Lacy, A., García-Valdecasas, J., Delgado, S., Castells, A., Taurá, P., Piqué, J., and Visa, J. 2002. Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomised trial. *The Lancet*, 359(9325), 2224–2229.

- Liang, N., and Kitts, D. 2014. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208.
- López-Barrera, D., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, G., and Campos-Vega, R. 2016. Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. *Food Chemistry*, 212, 282–290.
- Ludwig, I., Clifford, M., Lean, M., Ashihara, H., and Crozier, A. 2014. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food y Function*, 5(8), 1695–1717.
- Ma, B., Yao, M., Zhong, J., Ma, Y., Gao, C., Wu, J., and Wang, X. 2012. Increased systemic exposure to rhizoma coptidis alkaloids in lipopolysaccharide-pretreated rats attributable to enhanced intestinal absorption. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(2), 381–388.
- Manju, V., and Nalini, N. 2005. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clinica Chimica Acta*, 358(1–2), 60–67.
- Mannello, F., Tonti, G., Pagliarani, S., Benedetti, S., Canestrari, F., Zhu, W., and Sauter, E. 2007. The 8-epimer of prostaglandin F₂ α , a marker of lipid peroxidation and oxidative stress, is decreased in the nipple aspirate fluid of women with breast cancer. *International Journal of Cancer*, 120(9), 1971–1976.
- Martín, M., Goya, L., and Ramos, S. 2016. Preventive effects of cocoa and cocoa antioxidants in colon cancer. *Diseases*, 4(1), 6.
- Menghini, L., Ferrante, C., Leporini, L., Recinella, L., Chiavaroli, A., Leone, S., and Brunetti, L. 2016. An hydroalcoholic chamomile extract modulates inflammatory and immune response in HT-29 cells and isolated rat colon. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1513–1518.

- Miar, A., Hevia, D., Muñoz-Cimadevilla, H., Astudillo, A., Velasco, J., Sainz, R., and Mayo, J. 2015. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 45–55.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., and Remacle, J. 1994. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 235–248.
- Millimouno, F. M., Dong, J., Yang, L., Li, J., and Li, X. 2014. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prevention Research*, 7(11), 1081–1107.
- Monente, C., Ludwig, I., Irigoyen, A., De Peña, M., and Cid, C. 2015. Assessment of total (Free and Bound) phenolic compounds in spent coffee extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(17), 4327–4334.
- Murthy, P., and Madhava Naidu, M. 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45–58.
- Mussatto, S., Machado, E., Martins, S., and Teixeira, J. 2011a. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661–672.
- Mussatto, S., Carneiro, L., Silva, J., Roberto, I., and Teixeira, J. 2011b. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 368–374.
- Mussatto, S., Ballesteros, L., Martins, S., and Teixeira, J. 2011c. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173–179
- Nenadis, N., Wang, L., Tsimidou, M., and Zhang, H. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674.

- Nicholson, D., and Thornberry, N. 2003. Life and death decisions. *Science*, 299(5604), 214–215.
- Nunes, F., and Coimbra, M. 2009. Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 171–185.
- Oliveras-López, M., Berná, G., Jurado-Ruiz, E., López-García de la Serrana, H., and Martín, F. 2014. Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *Journal of Functional Foods*, 10, 475–484.
- OMS | Cáncer. 2012. Recuperado el 24 de abril de 2015, a partir de <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F., Zhou, T., Liu, B., and Bao, J. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–498.
- Panusa, A., Zorro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., and Petrucci, R. 2013. Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4162–4168.
- Parhamifar, L., Andersen, H., and Moghimi, S. 2013. Lactate dehydrogenase assay for assessment of polycation cytotoxicity. *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery* 13–22.
- Páscoa, R., Magalhães, L., and 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(2), 579–586.
- Patil, A, Raheja, V., and Damre, 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 Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(3), 204–207.
- Payne, A., Zihler, A., Chassard, C., and Lacroix, C. 2012. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 17–25.

- Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2), 97–110.
- Philipp, A., Nagel, D., Stieber, P., Lamerz, R., Thalhammer, I., Herbst, A., and Kolligs, F. 2014. Circulating cell-free methylated DNA and lactate dehydrogenase release in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 14, 245.
- Pujol, D., Liu, C., Gominho, J., Olivella, M., Fiol, N., Villaescusa, I., and Pereira, H. 2013. The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops and Products*, 50, 423–429.
- Raamsdonk, J., and Hekimi, S. 2012. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(15), 5785–5790.
- Rice-Evans, C., Miller, N., and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology y Medicine*, 20(7), 933–956.
- Saura-Calixto, F. 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43–49.
- Schenker, S., Heinemann, C., Huber, M., Pompizzi, R., Perren, R., and Escher, R. 2002. Impact of roasting conditions on the formation of aroma compounds in coffee beans. *Journal of Food Science*, 67(1), 60–66.
- Selma, M., Espín, J., and Tomás-Barberán, F. 2009. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485–6501.
- Shiga, K., Hara, H., Okano, G., and Aoyama, Y. 2003. Ingestion of water-soluble soybean fiber prevents gastrectomy-induced iron malabsorption, anemia and impairment of voluntary running exercise performance in rats. *The Journal of Nutrition*, 133(4), 1120–1126.
- Sinha, K., Das, J., Pal, P., and Sil, P. 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1157–1180.

- Stein, K., Borowicki, A., Scharlau, D., Scheu, K., Brenner-Weiss, G., Obst, U., and Gleib, M. 2011. Modification of an in vitro model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention. *British Journal of Nutrition*, 105(5), 678–687.
- Tacconelli, S., Capone, M., and Patrignani, P. 2010. Measurement of 8-Iso-Prostaglandin F₂α in biological fluids as a measure of lipid peroxidation. *Cyclooxygenases* (pp. 165–178).
- Vipperla, K., and O’Keefe, S. J. 2016. Diet, microbiota, and dysbiosis: a “recipe” for colorectal cancer. *Food y Function*, 7(4), 1731–1740.
- Voigt, S., Philipp, S., Davarnia, P., Winoto-Morbach, S., Röder, C., Arenz, C., and Adam, D. 2014. TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells. *BMC Cancer*, 14, 74.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. 2003. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine y Growth Factor Reviews*, 14(1), 53–66.
- Zhu, Y., Michelle Luo, T., Jobin, C., and Young, H. 2011. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Letters*, 309(2), 119–127.