



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
POSGRADO DE ALIMENTOS
FACULTAD DE QUÍMICA



MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)

“EFECTO DE LOS PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN
COLÓNICA DE LA FRACCIÓN NO DIGERIBLE DEL CAFÉ
(*Coffea arábica* L.) USADO SOBRE CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA HUMANO Y SU MECANISMO DE
ACCIÓN”

TESIS

PRESENTA

Q.F.B. NATALY GARCÍA GUTIÉRREZ

DIRIGIDA POR

Dra. ROCIO CAMPOS VEGA



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

Efecto de los productos de la fermentación colónica de la fracción no digerible del café (*coffea arábica* L.) usado sobre células de adenocarcinoma humano y su mecanismo de acción

TESIS

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

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

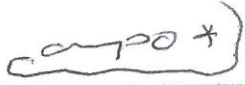
QFB. Nataly García Gutiérrez

Dirigido por:

Dra. Rocio Campos Vega

SINODALES

Dra. Rocio Campos Vega
Presidente


Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Secretario


Firma

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Vocal



Firma

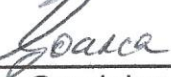
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Suplente


Firma

Dr. Ramón G. Guevara González
Suplente


Firma


MSP. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2015
México

RESUMEN

El café usado (CU), uno de principales residuos de la industria del café, contiene compuestos importantes incluyendo polifenoles y fibra dietética antioxidante. Ésta, al ser fermentada por las bacterias del colon, promueve la formación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC: acético, propiónico y butírico), que junto con los polifenoles, podrían inducir la inhibición de células de cáncer de colon. El objetivo fue evaluar el efecto de los productos de la fermentación colónica de la fracción no digerible del CU sobre células de cáncer de colon humano, y la caracterización química y nutracéutica del CU. El CU se obtuvo a partir del grano de café americano en una cafetera convencional. El CU obtenido después de la digestión gastrointestinal *in vitro* (boca-colon) se usó como tratamiento en células transformadas SW480. El CU mostró mayor contenido de proteínas, lípidos, potasio, calcio, cobre, fibra total, fibra insoluble y almidón resistente en comparación con el grano. El CU presentó alto contenido y bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos, ácido ascórbico, ácido clorogénico y ácido gálico durante su digestión gastrointestinal *in vitro*. También, se observó disminución del pH a las 6 h de tratamiento durante la fermentación colónica *in vitro*, indicativo de posible producción de AGCC. La concentración letal media fue de 19%. El efecto citotóxico y la actividad de la caspasa 3 (indicador de apoptosis), en las células tratadas, se incrementaron en forma dosis-dependiente. Además, el tratamiento indujo estrés oxidativo, determinado por la disminución en la relación del glutatión reducido con el oxidado. Los resultados de citometría de flujo, para análisis del ciclo celular, indicaron que durante el periodo de 24 h de tratamiento, se incrementó el porcentaje de células en la fase sub-G1, correspondiente a células apoptóticas. De manera adicional, el ensayo de DIOC6 mostró daño mitocondrial, con membrana intacta, sugiriendo apoptosis temprana, proceso confirmado con el ensayo de anexina V. El CU es fuente de compuestos nutritivos y nutracéuticos, que al ser digeridos y posteriormente fermentados por la microbiota colónica, inhiben la sobrevivencia de células de cáncer de colon *in vitro*, mediada por apoptosis. Estudios adicionales son necesarios para elucidar su potencial benéfico.

Palabras clave: café usado, digestión gastrointestinal *in vitro*, fermentación colónica *in vitro*, cáncer de colon *in vitro*, mecanismo de acción, apoptosis.

SUMMARY

Spent coffee (SC), one of the main by-products from the coffee industry, contains important antioxidant compounds including polyphenols and antioxidant dietary fiber, that is fermented by colon microbiota promoting the production of short-chain fatty acid (SCFA: acetic, propionic and butyric); together with polyphenols, could induce inhibition of transformed cells. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* colonic fermentation products (FgE-SC) from non-digestible fraction (obtained from *in vitro* gastrointestinal digestion) of SC on survival of human colon cancer cells (SW480), as well as, the chemical and nutraceutical composition of SC. The spent filter coffee residues, used as the experimental raw material, were obtained by a conventional coffee maker, from medium roasted coffee beans (CB). The SC was obtained after *in vitro* gastrointestinal digestion (mouth-colon) was used as a treatment in SW480 cells transformed. Compared with CB, spent coffee displayed higher amounts of total fiber, insoluble fiber, resistant starch, proteins, lipids, moisture, potassium, calcium and copper. The *in vitro* gastrointestinal digestion of the SC showed high bioaccessibility of phenolic compounds, ascorbic acid, chlorogenic acid and gallic acid. Also, diminution of pH was observed at 6 h of treatment for *in vitro* colonic fermentation, indicating possible production of SCFA. FgE-SC inhibited SW480 growth in a concentration-dependent manner, with a lethal concentration 50 of 19%. Cytotoxicity and caspase-3 activity (an indicator of apoptosis or programmed cell death) were increased in SW480-FgE-SC treated cells. Furthermore, the treatment decreased up to 90% total glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) (GSH/GSSG) ratio, indicating an oxidative stress process. Flow cytometry analysis demonstrated the presence of a sub G0/G1 apoptotic peak. Apoptosis, confirmed by annexin V and DIOC6 staining assays, showed mitochondrial damage, without membrane harm, suggesting an apoptotic process in early stage. SC is source of nutritious and nutraceuticals compounds, which are digested and then fermented by colon microbiota, it can inhibit the survival of *in vitro* colon cancer cell mediated by apoptosis. Additional studies focused on cell signaling and biological significance of the compounds present in the SC are needed, to elucidate the mechanisms of chemopreventive or therapeutic potential.

Keywords: spend coffee, *in vitro* digestion, *in vitro* colonic fermentation, *in vitro* colon cancer, mechanism of action, apoptosis.

DEDICATORIAS

A Dios, que en su infinita sabiduría ha guiado mis pasos día a día, en la luz y en la oscuridad.

A mis padres Jesús Antonio García Barraza, María Araceli Gutiérrez Guerrero y hermanas Guadalupe García Gutiérrez y Belinda Araceli García Gutiérrez, porque son el pilar fundamental de mi vida. Les agradezco tanto amor, apoyo, comprensión, paciencia, preocupación y por sus valiosos consejos que me guían y motivan a seguir adelante y nunca detenerme.

A mi querido esposo Alejandro Alvarado Torres por tu amor, tu paciencia, tus palabras de aliento, tu sentido del humor que me hace tan feliz. Por esos meses que la distancia nos separó y te necesité más, estuviste ahí para mí. En resumen, por estos 5 maravillosos años que han sido una luna de miel... Y vamos por más!

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a mi directora de tesis la Dra. Rocio Campos Vega, por su apoyo, paciencia y por creer en mi. Fué una maravillosa experiencia trabajar bajo su tutela. Me enseñó que con esfuerzo, planeación y dedicación siempre puedo ser mejor.

Le agradezco a la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña no solamente por transmitirme sus valiosos conocimientos, si no también por su sincera amistad, la cual, me hizo crecer profesional y personalmente.

Les agradezco a los miembros de mi comité, la Dra. Sandra O. Mendoza Díaz, la Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca y el Dr. Ramón G. Guevara González, por sus valiosas aportaciones, su tiempo y atención para la realización de este trabajo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Maria Elena Maldonado Celis de la Universidad de Antioquia y a la MSc. Sandra Sulay Arango Varela del Instituto Tecnológico Metropolitano, por su confianza, apoyo y por acogerme durante mi estancia en Colombia.

A los chicos del laboratorio de bioquímica toxicológica de la UAQ incluyendo a los adoptados Faty y Ángel del CICATA, por su amistad, ánimos, sonrisas, logros, desvelos y por apoyarme durante mis experimentos. Me llevo lo mejor de ustedes en mi corazón.

A mis compañeros de generacion que hicieron muy divertida esta aventura llamada maestría, son excelentes personas y Maestros en Ciencias.

A los administrativos Carmelita y Laurita, por su amable atención, su paciencia y sus sonrisas.

Y finalmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
II.1. Generalidades del café	2
II.1.1. Composición química del café	2
II.1.2. Procesamiento del café y subproductos generados	5
II.2. Café usado	5
II.2.1. Composición química del café usado	7
II.2.2. Compuestos nutracéuticos en el café usado	9
II.2.2.1. Fibra dietaria	9
II.2.2.2. Compuestos fenólicos	11
II.2.2.2.1. Fenoles	11
II.2.2.2.2. Flavonoides	12
II.2.2.2.3. Taninos	13
II.2.2.3. Cafeína	13
II.2.2.4. Ácido clorogénico	14
II.2.2.5. Melanoidinas	15
II.2.3. Aplicación potencial del café usado	16
II.3. Enfermedades crónico-degenerativas	17
II.3.1. Cáncer	17
II.3.1.1. Proceso de carcinogénesis	18
II.3.1.2. Cáncer de colon	19
II.3.1.2.1. Genética molecular del cáncer de colon	20
II.4. Proceso de digestión	22
II.5. Modelos <i>in vitro</i> para la evaluación de la digestión gastrointestinal	23
II.6. Modelos <i>in vitro</i> para la evaluación de la fermentación colónica	24
II.7. Modelos celulares utilizados en estudios <i>in vitro</i>	25

II.7.1. Línea celular SW480	25
II.8. Mecanismo de acción de los productos de la digestión sobre modelos celulares <i>in vitro</i>	26
II.8.1. Arresto al ciclo celular	27
II.8.2. Inducción de apoptosis	31
II.8.2.1. Membrana mitocondrial durante la apoptosis	35
II.8.2.2. Reconocimiento de apoptosis por Anexina V	37
II.8.2.3. Estrés oxidativo en la apoptosis	38
III. JUSTIFICACIÓN	42
IV. HIPOTESIS	43
V. OBJETIVOS	44
V.1. Objetivo general	44
V.2. Objetivos específicos	44
VI. METODOLOGÍA	45
VI.1. Materiales	45
VI.1.1. Material biológico	45
VI.1.2. Reactivos	45
VI.1.3. Equipos	46
VI.2. Métodos	46
VI.2.1. Composición química	46
VI.2.1.1. Determinación de humedad	47
VI.2.1.2. Determinación de cenizas	47
VI.2.1.3. Determinación de lípidos	47
VI.2.1.4. Determinación de proteína	48
VI.2.1.5. Determinación de minerales	49
VI.2.2. Composición nutracéutica	49
VI.2.2.1. Obtención del extracto etanólico	49
VI.2.2.2. Compuestos fenólicos	50
VI.2.2.2.1. Cuantificación de flavonoides totales	50
VI.2.2.2.2. Cuantificación de taninos condensados	50
VI.2.2.2.3. Cuantificación de fenoles totales	50
VI.2.2.2.4. Cuantificación de compuestos fenólicos específicos por HPLC	51
VI.2.2.3. Capacidad antioxidante	51
VI.2.2.3.1. Cuantificación de capacidad antioxidante por ABTS	51

VI.2.2.3.2. Cuantificación de capacidad antioxidante por DPPH	52
VI.2.2.3.3. Cuantificación de capacidad antioxidante por FRAP	52
VI.2.2.4. Fibra dietaria	53
VI.2.2.4.1. Cuantificación de fibra dietaria insoluble	53
VI.2.2.4.2. Cuantificación de fibra soluble	53
VI.2.2.4.3. Cuantificación de almidón resistente	54
VI.2.3. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	54
VI.2.3.1. Simulación de las condiciones de la boca	55
VI.2.3.2. Simulación de las condiciones del estomago	55
VI.2.3.3. Simulación de las condiciones del intestino delgado	55
VI.2.3.3.1. Técnica del saco intestinal invertido	56
VI.2.3.3.2. Manejo de los animales	56
VI.2.3.3.3. Sacrificio de animales y elaboración del saco intestinal invertido	56
VI.2.3.3.4. Ensayo de viabilidad	57
VI.2.3.3.5. Determinación del flujo de agua	57
VI.2.3.4. Simulación de fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND	57
VI.2.4. Cultivo celular	58
VI.2.4.1. Elaboración de la curva dosis-respuesta	59
VI.2.4.2. Cuantificación de la actividad de la caspasa 3	59
VI.2.4.3. Cuantificación del contenido de glutatión	60
VI.2.4.4. Ensayos de citometría de flujo	60
VI.2.4.4.1. Cuantificación del DNA en las fases del ciclo celular	60
VI.2.4.4.2. Cuantificación del daño en la membrana mitocondrial por DIOC-6	61
VI.2.4.4.3. Cuantificación de apoptosis por anexina V	62
VI.3. Análisis estadístico	63
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
VII.1. Composición proximal del grano de café y café usado	64
VII.2. Contenido de fibra total, insoluble, soluble y almidón resistente de los granos de café y café utilizado	67
VII.3. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del grano de café y café usado	69
VII.4. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in</i> <i>vitro</i> del café usado	73

VII.5. Coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del café usado digerido <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido	80
VII.6. Flujo de agua y viabilidad del saco intestinal invertido durante el ensayo de permeabilidad <i>in vitro</i> del café usado	84
VII.7. Efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado sobre el pH del medio de incubación	86
VII.8. Efecto del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado sobre células de adenocarcinoma humano SW480 ...	87
VII.8.1. Efecto del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado sobre la sobrevivencia de células de adenocarcinoma humano SW480.....	87
VII.8.2. Efecto del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado sobre la actividad de la caspasa 3 en células de adenocarcinoma humano SW480.....	89
VII.8.3. Efecto del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado sobre el contenido de glutatión en células de adenocarcinoma humano SW480.....	91
VII.8.4. Efecto del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado sobre las fases del ciclo celular, en células de adenocarcinoma humano SW480.....	93
VII.8.5. Efecto del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado sobre la membrana mitocondrial en células de adenocarcinoma humano SW480.....	94
VII.8.6. Efecto apoptótico del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado en células de adenocarcinoma humano SW480	95
VIII. CONCLUSIONES	98
IX. BIBLIOGRAFÍA	100

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición química de los granos de café, variedad arábica	3
2	Aplicaciones del café usado en la industria.	6
3	Composición química del café usado.	7
4	Comparación de la composición de química del grano y café usado de la variedad arábica.	8
5	Expresión, efectos y regulación de complejos CDKs/ciclinas durante el ciclo celular.	29
6	Composición química del grano de café y café usado.	64
7	Contenido de minerales en el grano de café y café usado	66
8	Contenido de fibra total, fibra soluble, fibra insoluble y almidón resistente en el grano de café y café usado	67
9	Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del grano de café y café usado	69
10	Contenido de compuestos fenólicos, determinados por HPLC, en el grano de café y café usado.	72
11	Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado.	73
12	Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, determinados por HPLC, en los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in vitro</i> del café usado.	78
13	Coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos fenólicos del café usado digerido <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido.	80
14	Coeficiente de permeabilidad aparente de compuestos fenólicos, determinados por HPLC, del café usado digerido <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido.	82
15	Capacidad antioxidante de los compuestos del café usado que fueron permeables/absorbidos <i>in vitro</i> usando un modelo de saco intestinal invertido.	83
16	Flujo de agua durante el ensayo de permeabilidad <i>in vitro</i> (saco intestinal invertido) del café usado.	84
17	Transporte de glucosa en un modelo de saco intestinal invertido	85
18	Efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del café usado sobre el pH del medio de incubación.	86
19	Efecto del FgE-CU sobre la relación de glutatión reducido vs glutatión oxidado.	92
20	Efecto del FgE-CU sobre las fases del ciclo celular de las células SW480.	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Café usado	5
2	Etapas del proceso del cáncer	18
3	Porcentaje de mortalidad por principales tumores malignos según el género en una población de más de 20 años	20
4	Desarrollo molecular del carcinoma colorrectal.	21
5	Fases del ciclo celular	28
6	Representación esquemática de las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca	33
7	Curva dosis-respuesta del FgE-CU en células de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento.	88
8	Efecto citotóxico, determinado colorimétricamente, del FgE-CU sobre la línea celular de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento.	89
9	Actividad de la caspasa 3 en células de adenocarcinoma humano SW480, sometidas a 24 h de tratamiento con el FgE-CU.	90
10	Contenido de glutatión total y glutatión oxidado (GSSG) en la línea celular de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento con el FgE-CU.	91
11	Efecto de FgE-CU sobre la membrana mitocondrial (ensayo DIOC6) de células de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento.	94
12	Efecto apoptótico (ensayo anexina V) del FgE-CU sobre células de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento.	96

I. INTRODUCCIÓN

El café usado (CU) es uno de los principales residuos de la industria del café. Éste es un subproducto de desecho que a menudo no es tratado adecuadamente, generando volúmenes altos, pero de bajo valor, lo que se traduce en una reducción de interés de la economía mundial, así como una preocupación de problema ambiental (Nabais *et al.*, 2008; Esquivel *et al.*, 2010). A pesar de esta característica negativa y las grandes cantidades que se generan, son pocos los estudios que se centran en su reutilización para añadir valor a este material.

El CU es una importante fuente de compuestos bioactivos, con propiedades funcionales tales como proteínas, lípidos, minerales, polifenoles, fibra dietética (denominados “fibra dietaria antioxidante”), entre otros, los cuales podrían ejercer protección contra el cáncer de colon, el cuarto tipo de cáncer más común en el mundo (Esquivel *et al.*, 2010; Naranjo *et al.*, 2011).

Se ha informado que la fibra dietaria antioxidante, proveniente de otras matrices, puede ser sustrato de fermentación para las bacterias colónicas, promoviendo la producción de compuestos relacionados directamente con la inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis en células cancerosas (Campos-Vega *et al.*, 2010).

Hasta el momento, no se cuenta con información sobre la digestión gastrointestinal humana (boca-colon) del CU. Más aún, no se ha considerado evaluar el potencial quimioprotector del CU usado sobre células de cáncer de colon humano.

Estudios previos con otros materiales, sugieren que los productos de la fermentación del café usado, como los compuestos antioxidantes y la fibra no digerible, pueden tener un efecto positivo en la disminución de la incidencia de cáncer de colon; sin embargo, los mecanismos de acción involucrados en este proceso no se han estudiado. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los productos de la fermentación colónica de la fracción no digerible del CU sobre células de cáncer de colon humano, y la caracterización química y nutracéutica del CU.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1. Generalidades del café

El café (*Coffea* L.) ha sido consumido durante más de 1000 años y hoy en día es la bebida más consumida en el mundo (más de 400 mil millones de tazas al año) (Sobésa Café, 2008). Este grano es cultivado en casi 80 países tropicales y subtropicales (Clay, 2004), constituyendo uno de los productos básicos más valiosos del comercio mundial (León, 2000; ICO, 2007). México se encuentra dentro de los 10 principales países productores de café (Anzueto *et al.*, 2005).

El café es un arbusto cultivado, nativo de África, que pertenece a la familia Rubiaceae. Se conocen más de 100 especies, no obstante, las que se cultivan extensivamente con fines comerciales internacionalmente son: *Coffea arábica* L. y *Coffea canephora* L. (Belitz *et al.*, 2004; Anzueto *et al.*, 2005), siendo la primera la más importante, ya que representa, aproximadamente, el 70% de la producción comercial (Etienne, 2005; Belitz *et al.*, 2009).

II.1.1. Composición química del café

El café se compone químicamente de agua y materia seca (Belitz *et al.*, 2009). Sin embargo, también está constituido por varios otros componentes, incluyendo celulosa, minerales, azúcares, lípidos, taninos y polifenoles. Además de minerales que incluyen potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro, manganeso, rubidio, zinc, cobre, estroncio, cromo, vanadio, bario, níquel, cobalto, plomo, molibdeno, titanio y cadmio. Entre los azúcares se encuentran sacarosa, glucosa, fructosa, arabinosa, galactosa y manosa, entre otros. Varios aminoácidos, tales como alanina, arginina, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina y valina pueden ser identificados (Santos y Oliveira, 2001; Grembecka *et al.*, 2007; Belitz *et al.*, 2009). Además, contiene vitaminas del complejo B, como la niacina (vitamina B3), y ácido clorogénico en proporciones que pueden variar de 7 a 12%, tres a cinco veces más que su contenido de cafeína (Lima, 2003; Trugo, 2003; Belitz *et al.*,

2009). En el Cuadro 1 se muestra la composición química de los granos de café de la variedad *arábica*.

Cuadro 1. Composición química de los granos de café, variedad arábica.

<u>Componente</u>	<u>%</u>
<u>Carbohidratos solubles</u>	9.0 – 12.5
Monosacáridos	0.2 – 0.5
Oligosacáridos	6.0 – 9.0
Polisacáridos	3.0 – 4.0
<u>Polisacáridos insolubles</u>	46.0 – 53.0
Hemicelulosa	5.0 – 10.0
Celulosa	41.0 – 43.0
<u>Ácidos y fenoles</u>	
Ácidos volátiles	0.1
Ácidos alifáticos no volátiles	2 – 2.9
Lignina	1.0 – 3.0
<u>Lípidos</u>	15.0 – 18.0
Cera	0.2 – 0.3
Aceite	7.7 – 17.7
<u>Componentes nitrogenados</u>	11.0 – 15.0
Aminoácidos libres	0.2 – 0.8
Proteínas	8.5 – 12.0
Cafeína	0.8 – 1.4
Trigonelina	0.6 – 1-2
<u>Minerales</u>	3 – 5.4

Valores en porcentaje de base seca (Belitz *et al.*, 2009).

El café contiene varios alcaloides que contribuyen a su sabor amargo como la cafeína, la trigonelina, y otros en menor concentración, como paraxantina, teobromina y teofilina. La cafeína, se puede encontrar en valores que varían entre 0.8 y 1.4% (p/p) (Belitz *et al.*, 2009); mientras que, la trigonelina se encuentra en una cantidad de 0.6 a 1.3%. Los contenidos de paraxantina, teobromina y teofilina varían de 3 a 344 mg/kg (Illy y Viani, 2005). También se han identifican más de 800 sustancias volátiles, (Belitz *et al.*, 2004) clasificadas dentro de los ácidos, aldehídos, alcanos, alquenos, ésteres, furanos, cetonas, lactonas, oxazoles, fenoles, piridinas, pirazinas, pirroles y compuestos azufrados (Ryan *et al.*, 2004; Rojas, 2005; Agresti *et al.*, 2008). Las características químicas y el aroma de los constituyentes volátiles del café han sido motivo de importantes estudios (Rojas, 2005); hoy en día se conocen cientos de aromas, que según los expertos, superan las del vino.

El contenido de agua del grano influye en todos los procesos del café, en particular en la germinación, crecimiento, fermentación, secado, almacenamiento, transporte, trilla y tostado. El café debe secarse hasta un contenido de humedad entre 10 y 12%, con el fin de mantener su estabilidad química y microbiológica durante el almacenamiento, evitar daños al grano en la trilla y también para obtener buenas características sensoriales en su tostado (Puerta, 2006; Puerta, 2008).

Durante el tostado de los granos se llevan a cabo varias reacciones, entre ellas se encuentra la reacción de Maillard, que tiene un papel clave en la formación del aroma; esta ocurre entre los compuestos amino (aminoácidos, péptidos y proteínas) y los azúcares reductores (Czerny y Grosh, 2000; Flament, 2002; Sacchetti *et al.*, 2009). La composición de los granos de café se altera de forma dramática por el proceso de tostado, perdiendo gran cantidad de agua (posee apenas 1 a 5%), proteínas, ácidos clorogénicos, carbohidratos (Ky *et al.*, 2001; Farah *et al.*, 2006), trigonelina y grasa; sólo la cafeína se ha observado es termoestable, es decir, no se destruye por el tostado excesivo (Ginz *et al.*, 2000; Lima, 2003; Trugo, 2003; Rawel y Kulling, 2007).

II.1.2. Procesamiento del café y subproductos generados

Existe una amplia gama de alternativas para la preparación de bebidas de café, así mismo, la gama de instrumentos es abundante. El procedimiento general, en la preparación de la bebida, consiste en hacer pasar agua caliente a través de un filtro que contiene el café molido, o bien, la aplicación de agua caliente en un recipiente que contiene al mismo, con la consiguiente recuperación del residuo sólido en el filtro (Ramírez, 2011).

Estos residuos sólidos, a los cuales se le conocen como café usado o borra son un subproducto de desecho que a menudo no es tratado adecuadamente, generando volúmenes altos, pero de bajo valor, lo que se traduce en una reducción de interés de la economía mundial, así como una preocupación de problema ambiental (Nabais *et al.*, 2008; Esquivel *et al.*, 2010).

II.2. Café usado

El café usado posee un tamaño de partícula fino (Figura 1), alta humedad (80 a 85%), carga orgánica y acidez, obtenidas durante el tratamiento de polvo de café crudo con agua caliente o vapor para la preparación de café instantáneo. Casi el 50% de la producción mundial de café se procesa para la preparación de café soluble (Ramalakshmi *et al.*, 2009). Por lo tanto, el café usado se genera en grandes cantidades, alrededor de 6 millones de toneladas (Tokimoto *et al.*, 2005).

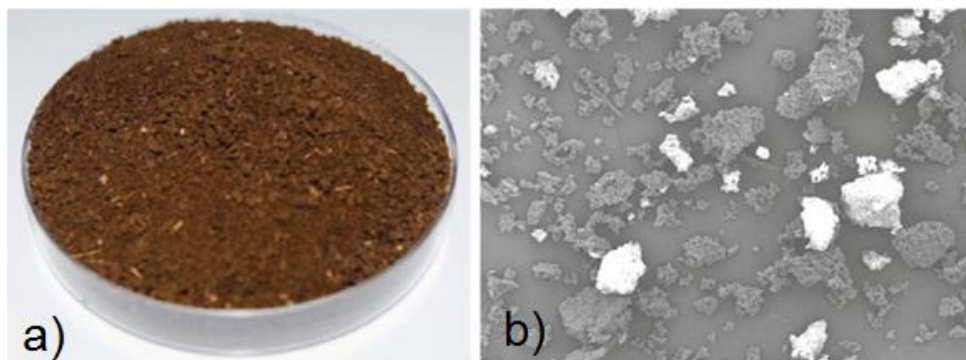


Figura 1. Café usado. a) Muestra de residuo de café seco. b) Microscopía electrónica de barrido de partículas del residuo de café con una ampliación de 50 veces (Mussatto *et al.*, 2011a).

Debido a la presencia de material orgánico, el café usado es altamente contaminante. Además, la cafeína, taninos y polifenoles presentes en este material confieren una naturaleza tóxica (Mussatto *et al.*, 2011b). Por lo tanto, el café usado, proveniente principalmente de la industria del café, representa un peligro de contaminación si se descargan en el medio ambiente. A pesar de esta característica negativa y las grandes cantidades que se generan, son pocos los estudios que se centran en su reutilización para añadir valor a este material. De acuerdo a sus datos de composición química, estos residuos pueden ser utilizados como materia prima, como ha sido reportado por otros autores (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aplicaciones del café usado en la industria.

Aplicaciones	Referencias
Alimento animal	Claude (1979); Givens y Barber (1986)
Etanol	Machado (2009); Sampaio (2010)
Aceite	Burton <i>et al.</i> , (2010)
Adsorbente	Franca <i>et al.</i> , (2009)
Carbón activado	Namane <i>et al.</i> , (2005); Nakamura <i>et al.</i> , (2009)
Materiales carbónicos	Hirata <i>et al.</i> , (2002)
Antioxidantes	Ramalakshmi <i>et al.</i> , (2009)
Combustible, biodisel y bioetanol	Silva <i>et al.</i> , (1998); Sendzikiene <i>et al.</i> , (2004); Kondamudi <i>et al.</i> , (2008)

Adaptado de Murthy y Naidu, 2012a.

Otras alternativas para el empleo del café usado están siendo evaluadas. En un estudio desarrollado por Kondamudi *et al.*, (2008), se demostró que se puede utilizar como una fuente potencial para producir biodiesel y briquetas combustibles, entre otros productos de valor añadido, tales como H₂ y etanol, debido a que su contenido de aceite es de aproximadamente 15%. Los residuos sólidos restantes

se pueden utilizar para producir etanol (Sendzikiene *et al.*, 2004) y pastillas de combustible (Kondamudi *et al.*, 2008). En este sentido, la viabilidad de utilizar procesos de extracción de fluido supercrítico para obtener la fracción de lípidos también se está evaluando (Couto *et al.*, 2009).

II.2.1. Composición química del café usado

El café usado es una fuente importante de compuestos con propiedades funcionales (Esquivel *et al.*, 2010), entre los cuales se encuentra una concentración significativa de compuestos polifenólicos (Naranjo, 2011), como son los ácidos clorogénico y feruloilquínico (Puertas *et al.*, 2005), proteína, fibra, lípidos y minerales, entre otros (Cuadro 3).

Cuadro 3. Composición química del café usado.

Componente	%
Celulosa	8.6 ± 1.8
Hemicelulosa	36.7 ± 5.0
Proteína	13.6 ± 3.8
Grasa	ND
Fibra total	ND
Polifenoles totales	1.5 ± 1.0
Azúcares totales	8.5 ± 1.2
Sustancias pépticas	0.01 ± 0.005
Lignina	0.05 ± 0.05
Taninos	0.02 ± 0.1

Ácido clorogénico	2.3 ± 1.0
Cafeína	0.02 ± 0.1

ND: no determinado (Mussatto *et al.*, 2011b).

La composición química del café usado varía respecto a la del grano, debido principalmente a que varios de los compuestos migran a la bebida (Cuadro 4). Por ejemplo, el contenido de sólidos totales disminuye aproximadamente en un 75%, mientras que los ácidos clorogénicos y los polifenoles totales disminuyen en un 50%, aproximadamente (Ramalakshmi *et al.*, 2009). Sin embargo, continúa siendo una fuente importante de compuestos funcionales (Esquivel *et al.*, 2010). Además, durante el procesamiento del café, el tostado afecta marcadamente su composición, lo que puede reducir la capacidad antioxidante, debido a la degradación del ácido clorogénico y otros compuestos fenólicos. A pesar de esto, se ha encontrado que la capacidad antioxidante del café tostado se puede mantener debido a la formación de los productos de la reacción de Maillard (Budryn *et al.*, 2009) ya que, durante la última etapa de la reacción de Maillard, se forman compuestos poliméricos de color café llamados melanoidinas. Éstas influyen en el color, sabor y textura de los alimentos sometidos a temperaturas altas. Entre algunas actividades biológicas importantes de las melanoidinas se encuentran la capacidad antioxidante y la quelante (Tagliacruzchi *et al.*, 2010a).

Cuadro 4. Comparación de la composición de química del grano y café usado de la variedad arábica.

Tipo de café	Sólidos totales solubles (%)	Ácido clorogénico (%)	Cafeína (%)	Total de polifenoles (%)
Grano café <i>arábica</i>	23.8	2.7	1.6	3.5
Café usado variedad <i>arábica</i>	10.3	1.4	0.5	1.3

(Ramalakshmi *et al.*, 2009).

II.2.2. Compuestos nutraceuticos en el café usado

El término “nutracéutico” se refiere a un alimento, o parte de un alimento, que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades no transmisibles (SOE, 2008).

Los nutraceuticos han evolucionado la ciencia de los alimentos y la nutrición. Los alimentos ya no solo son evaluados en términos de macro y micro nutrientes, si no que se analizan de acuerdo a su contenido de otros componentes bioactivos y su papel en la prevención y tratamiento de enfermedades (DeFelice, 1992). A este respecto, los nutraceuticos se han asociado con la prevención y tratamiento de al menos cuatro de las enfermedades que contribuyen con una alta tasa de mortalidad en los países desarrollados (cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares e hipertensión arterial) (Serna, 2004).

II.2.2.1. Fibra dietaria

El café usado es fuente de fibra dietaria. Esta incluye la fibra dietética total, soluble e insoluble, cuyo contenido en el café usado (una mezcla de variedades arábica y robusta) se han reportado de 60.46, 9.68 y 50.78%, respectivamente, de acuerdo con Ballesteros *et al.*, (2014), mientras que Murthy y Naidu, (2012b), reportan valores de 43, 8 y 35%, respectivamente. La fibra dietética soluble e insoluble del café usado está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina cuyas cantidades son de 12.4, 39.1 y 23.9%, respectivamente.

En el 2001, la American Association of Cereal Chemists definió a la fibra dietética como la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso. Esta se divide en dos grupos: la fibra soluble, que presenta un cierto grado de hidratación en el medio gástrico en condiciones fisiológicas, y la fibra insoluble, que representa un mínimo grado de hidratación (Nelson, 2001).

La fracción soluble tiene la capacidad de unirse con el agua, formar un gel a nivel gástrico y llevar a cabo la retención de macromoléculas. Al llegar al colon es fermentada por las bacterias colónicas, promoviendo así la producción de ácidos

grasos de cadena corta, como el acético, propiónico y butírico (Laurentin, 2005). La fibra insoluble, por su parte, tiene una estructura porosa, la cual es capaz de captar macromoléculas, aportando volumen al bolo alimenticio y posteriormente a las heces (Slavin, 2003).

La fibra dietética y los antioxidantes son dos componentes de los alimentos e ingredientes funcionales que, tanto en investigación como en la industria, se suelen estudiar por separado. Sin embargo, una parte de los compuestos bioactivos presentes en las muestras vegetales, ya sean antioxidantes o no, están asociados a los componentes de la fibra dietética, como consecuencia de la habilidad de algunos de ellos para formar complejos con proteínas y polisacáridos (Saura-Calixto *et al.*, 2007; Vitaglione *et al.*, 2008; Goñi *et al.*, 2009).

Concretamente, en el caso de los polifenoles, una parte considerable de ellos puede estar asociada a la fracción de fibra insoluble, principalmente los compuestos de mayor grado de polimerización como taninos condensados (proantocianidinas) y taninos hidrolizables. Mientras que asociados a la fracción de fibra soluble, se suelen encontrarse polifenoles de menor peso molecular, tales como algunos flavonoides, ácidos fenólicos, dímeros y trímeros de proantocianidinas (Saura-Calixto *et al.*, 2007; Goñi *et al.*, 2009).

Desde un punto de vista nutricional, es importante tener en cuenta esta asociación entre polifenoles y componentes de la fibra, ya que los compuestos asociados a la fibra pueden ser responsables de algunos de los beneficios que tradicionalmente se han atribuido a la fibra dietética (Sáyago-Ayerdi y Goñi, 2010).

En base a estudios previos realizados con materias primas ricas en fibras y compuestos polifenólicos asociados (Larrauri *et al.*, 1996; Larrauri *et al.*, 1997; Jiménez-Escrig *et al.*, 2001; Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007; Sánchez-Alonso *et al.*, 2008), se definió el concepto de “fibra antioxidante” como aquella materia prima, con un elevado porcentaje de fibra dietética y cantidades apreciables de antioxidantes naturales, asociados a la matriz del conjunto de compuestos no digestibles (Saura-Calixto, 1998).

Muy pocos vegetales son materias primas que cumplen con los requerimientos para ser calificadas como fibra antioxidante. Los requerimientos son los siguientes: a) el contenido en fibra debe ser superior al 50% de su materia seca,

b) un gramo de fibra deberá tener capacidad para inhibir la oxidación lipídica equivalente, al menos, a 200 mg de vitamina E, c) la capacidad antioxidante debe ser intrínseca, derivada de los constituyentes naturales del material vegetal correspondiente y no de posibles antioxidantes adicionados (Sáyago-Ayerdi y Goñi, 2010).

Tanto las características funcionales derivadas del contenido en fibra, como las derivadas de la capacidad antioxidante del café usado, justifican su utilización como ingrediente en alimentos funcionales. Como concentrado en fibra, su adición en la formulación de un alimento, tiene la ventaja obvia para la salud del consumidor de incrementar la ingesta de fibra que suele ser deficiente en la población. Como antioxidante, ofrece la posibilidad de disminuir el estrés oxidativo del individuo, factor de riesgo de múltiples patologías (Sáyago-Ayerdi y Goñi, 2010).

II.2.2.2. Compuestos fenólicos

La definición general de un compuesto fenólico es cualquier compuesto que contenga un anillo de benceno con uno o más grupos hidroxilo (Naczki and Shahidi, 2004). Estos, son componentes ubicuos de plantas superiores que se encuentran en una amplia variedad de alimentos vegetales de consumo habitual, como frutas, verduras, cereales, legumbres y en las bebidas de origen vegetal, como el vino, el té y el café (Manach *et al.*, 2004; Cheynier, 2005).

Estos compuestos han recibido considerable atención debido a sus efectos benéficos sobre la salud humana, como una medida de protección contra las enfermedades crónicas degenerativas como cáncer, diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares, entre otras (Scalbert *et al.*, 2005); efectos benéficos que se han atribuido a su capacidad antioxidante (Harborne y Williams, 2000). Los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos condensados son algunos ejemplos.

II.2.2.2.1. Fenoles

Los ácidos fenólicos son derivados de los ácidos benzoicos y cinámicos. Hay dos clases de ácidos fenólicos: ácidos hydroxybenzoicos y ácidos

hydroxycinámicos. Los ácidos hydroxybenzoicos incluyen al ácido gálico, ácido p-hydroxybenzoico, vainillina, siringico y ácido protocatechuico. Los ácidos hydroxycinamicos tienen una estructura C₆-C₃ e incluyen a los ácidos cumárico, caféico, ferúlico y sinápico (Rao *et al.*, 2002; Mattila *et al.*, 2005).

Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Kähkönen *et al.*, 2001; Robbins, 2003). La capacidad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento (Velioglu *et al.*, 1998; Proestos *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de plantas superiores que desempeñan un papel defensa y representan los fitoquímicos más estudiados debido a su bioactividad. El contenido de compuestos fenólicos totales presentes en el café usado reportado por Murthy y Naidu *et al.*, (2012a), fue de 1.02%, determinado en una mezcla de variedad arábica y robusta. Bravo *et al.*, (2013b), reportaron para el café usado variedad arábica, un contenido de compuestos fenólicos en el intervalo de 2.65-24.6 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra; Panusa *et al.*, (2013), reportaron de 6.33-35.52 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra, dependiendo del método de extracción y de la variedad de café usada. La composición del extracto depende, por lo tanto, del disolvente utilizado, de la calidad y el origen del material vegetal, su composición, las condiciones de almacenamiento, y el pretratamiento (Ramalakshmi *et al.*, 2009).

II.2.2.2.2. Flavonoides

Los flavonoides son componentes con un esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆ que consiste en dos anillos aromáticos unidos por tres eslabones de carbono; ellos incluyen antocianinas, flavanoles, flavones, flavanones y flavonoles. Se han identificado más de 5,000 flavonoides en la naturaleza (Yao *et al.*, 2004).

Se ha reportado que los flavonoides son antioxidantes, anticancerígenos, antialérgicos, antiinflamatorios, anticarcinogénicos y con propiedades gastroprotectoras (Harborne y Williams, 2000; Yao *et al.*, 2004).

El contenido de flavonoides en el café usado varía de 2.11 a 8.03 mg equivalentes de quercetina/g de muestra, dependiendo del método de extracción y de la variedad de café usada (Panusa *et al.*, 2013). Por otro lado, Páscoa *et al.*, (2013), reportaron para café usado una media de 7 mg equivalentes de catequina/g de muestra, dependiente de la procedencia de la muestra.

II.2.2.2.3. Taninos

Los taninos condensados son llamados proantocianidinas o procianidinas que consisten en uniones de flavanoles polimerizadas y ellas contribuyen a la astringencia de los alimentos (Dykes y Rooney, 2006). Los taninos se han considerado componentes derivados de las plantas, y por lo tanto presentes en algunos alimentos, que promueven la salud. Por ejemplo, se ha demostrado que los taninos tienen potencial anticancerígeno y antimutagénico, así como propiedades antimicrobianas (Katiyar y Mukhtar, 1996; Chung *et al.*, 1998; Amarowicz *et al.*, 2000a). Varios estudios también han informado de su capacidad antioxidante y antirradical (Muir, 1995; Amarowicz *et al.*, 2000b, 2000c; Amarowicz y Troszy, 2003).

El café usado tiene un contenido de taninos condensados de 14.5 ± 0.04 mg/g de peso seco reportado por Wong y Wang, (1991). Es importante mencionar la limitada información en cuanto al contenido de taninos condensados presentes en el café usado.

II.2.2.3. Cafeína

El café usado, de acuerdo a lo reportado por Ramalakshmi *et al.*, (2009), tiene un contenido de cafeína aproximadamente del 0.5%; Bravo *et al.*, (2013a), reportaron un intervalo de 3.59- 5.20 mg /g de muestra de la variedad arábica y de 5.76-7.53 mg/g de muestra de la variedad robusta; Ramalakshmi *et al.*, (2009),

reportaron valores de 0.5-2.5% de cafeína en la variedad arábica y de 0.2-1.0% en la variedad robusta, dependiente del origen de la muestra. La cafeína es un alcaloide de estructura purínica (1,3,7-metilxantina) que se encuentra naturalmente en los granos del café. Independiente del proceso de preparación del café para su consumo (hervido o filtrado), en promedio una taza de café (150cc) aporta entre 90 y 200 mg de cafeína, dependiendo del origen, de la modalidad de preparación, e incluso del lugar (local) donde se prepara (McCusker *et al.*, 2003). Curiosamente, un estudio demostró que el café expendido por un mismo local en seis días seguidos, varió en su contenido de cafeína de 132 mg a 282 mg (Higdon y Frei, 2006).

Diversos estudios han propuesto que este compuesto presenta capacidad antioxidante y, por lo tanto, protege a los humanos contra los trastornos de salud asociados con el sistema oxidativo. Por ejemplo, Rosso *et al.*, (2008) y Prasanthi *et al.*, (2010) han sugerido que las propiedades antioxidantes de la cafeína tienen efectos protectores sobre el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Por su parte Varma y Hedge, (2010) encontraron que es eficaz en la protección de la lente del ojo contra el daño fotoquímicamente inducida por especies reactivas de oxígeno. Inkielewicz-Stepniak y Czarnowski, (2010) encontraron que la cafeína administrada por vía intragástrica es eficaz como antioxidante y alivia el efecto adverso del fluoruro; además, Vignoli *et al.*, (2011) informaron que la capacidad antioxidante es dependiente de la concentración, es decir, entre mayor es el contenido de cafeína, mayor es la capacidad antioxidante.

II.2.2.4. Ácido clorogénico

El ácido clorogénico es el mayor componente fenólico del café, pues cada taza contiene de 15 a 325 mg, con un promedio de 200 mg por taza para el café americano (Richelle *et al.*, 2001), mientras que su residuo contiene, aproximadamente, $2.3 \pm 1.0\%$ (Mussatto *et al.*, 2011b). El contenido de ácido clorogénico en el café usado reportado por Murthy y Naidu, (2012b), es de 2.3%. También Ramalakshmi *et al.*, (2009), reportaron un contenido de 1.4-5.62% en la variedad arábica y de 1.2-4.87% en la variedad robusta.

Extractos acuosos adicionados con dimetil sulfóxido producidos a partir del café usado exhiben actividades antitumorales y antialérgicas, relacionadas con la presencia de compuestos fenólicos tales como el ácido clorogénico (Ramalakshmi *et al.*, 2009). Se ha informado que el ácido clorogénico, presente en el café usado, tiene un número importante de propiedades benéficas para la salud relacionados con su potente capacidad antioxidante, así como hepatoprotector, hipoglucémico, antibacteriana, antiviral, antiinflamatorio y actividades anticancerígenas (Farah y Donangelo, 2006; Ramalakshmi *et al.*, 2009; Shan *et al.*, 2009; Murthy y Naidu, 2010).

II.2.2.5. Melanoidinas

El contenido de melanoidinas en el café usado de acuerdo a lo reportado por Bravo *et al.*, (2013a), es de 0.102-0.165% en la variedad arábica y de 0.118-0.145 en la variedad robusta, dependiente del origen de la muestra.

Las melanoidinas se conocen como productos de la reacción de Maillard, que se forman a partir de la condensación entre un compuesto carbonilado y una amina. A dicha condensación le siguen una serie de reacciones de isomerización, ciclización y polimerización, que conducen a la formación de compuestos coloreados y volátiles aromáticos. La estructura de las melanoidinas todavía no ha sido establecida completamente, pero se supone que no tienen una estructura definida y que, en gran medida, depende de la naturaleza y concentración molar de los reactantes de los que se forman y las condiciones de reacción como pH, temperatura, y tiempo de calentamiento (Fayle y Gerrard, 2005).

Las melanoidinas están ampliamente distribuidas en el hogar y los productos alimenticios industriales procesados. Estas pueden tener varias funciones *in vitro*, por ejemplo, como antioxidante (Xu *et al.*, 2007) y antihipertensivo (Rufian-Henares y Morales, 2007). De particular interés es la capacidad antioxidante de las melanoidinas, ya que estos productos se forman de manera natural durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, que pueden influir en la oxidación y la vida útil del producto, incluido el café (Nicoli *et al.*, 1997). En respuesta a su capacidad antioxidante, se han reportado algunos efectos fisiológicos, incluida la protección de las células

contra el daño oxidativo inducido (Valls-Belles *et al.*, 2004; Goya *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2009).

II.2.3. Aplicación potencial del café usado

El uso del café usado como una fuente potencial de compuestos bioactivos, especialmente los polifenoles, es otro enfoque prometedor, pero hasta ahora poco explorado, al menos desde un punto de vista tecnológico (Esquivel y Jiménez, 2011). Como queda de manifiesto en una reciente revisión por Dai y Mumper (2010), los polifenoles de las plantas están recibiendo cada vez más atención por parte de las comunidades científica y médica, debido no sólo a sus potentes propiedades antioxidantes, sino también a su capacidad para intervenir en muchas etapas del desarrollo del cáncer (Farah y Donangelo, 2006).

El residuo de café contiene grandes cantidades de ácido clorogénico y sus derivados, tales como ácidos, ácidos cafeoylquinico feruloylquinico, ácidos p-coumaroylquinico y diésteres mixtos de ácidos caféico y ferúlico con ácido quínico. Estos compuestos, que se conocen colectivamente como los ácidos clorogénicos, son poderosos antioxidantes *in vitro* (Yen *et al.*, 2005; Brezová *et al.*, 2009) y se cree que proporcionan muchos beneficios para la salud (Rawel y Kulling, 2007). Los estudios farmacocinéticos han demostrado que cerca de un tercio de los ácidos clorogénicos ingeridos son absorbidos en el estómago y el duodeno proximal, mientras que el restante se escinde por la microflora intestinal en caféico y ácido quínico (Rechner *et al.*, 2002; Stalmach *et al.*, 2010). Curiosamente, se ha demostrado que estos últimos compuestos poseen propiedades neurotróficos y neuroprotectores (Kim, 2007; Sul *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2011), dando más apoyo a la producción de alimentos funcionales que contienen compuestos fenólicos de café y recibiendo considerable atención como posibles factores de protección contra las enfermedades crónico degenerativas (Scalbert *et al.*, 2005).

II.3. Enfermedades crónico-degenerativas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere que las enfermedades crónicas son de larga duración y por lo general de progresión lenta (OMS, 2009). Entre estas enfermedades están las cardiovasculares (Lawes *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2007), el cáncer (Kanavos, 2006), la diabetes mellitus (Van Dieren *et al.*, 2010) y las enfermedades respiratorias crónicas (Pauwels y Rabe, 2004; Mathers y Loncar, 2006); las cuales están directamente relacionadas al estilo de vida, tabaquismo y una dieta desequilibrada.

II.3.1. Cáncer

El cáncer es uno de los padecimientos responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud señala que en 2012, fallecieron 8.2 millones de personas por este padecimiento (OMS, 2014). El cáncer, afecta a los hombres principalmente en la próstata, pulmón, colon, recto y estómago; y a las mujeres en la mama, pulmón, colon, recto, cérvix y útero (OPS, 2013). En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer, este padecimiento es la tercera causa de muerte, estimándose que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (SSA y SPPS, 2013).

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento desmesurado (proliferación) y diseminación (metástasis) de células anormales (INC, 2004). Esta patología se desarrolla a través de un proceso complejo que involucra un gran número de cambios, graduales y pequeños, en el comportamiento de las células normales. Por ejemplo, el ADN de las células normales puede dañarse al ser expuesto a la luz solar, el humo del tabaco o los químicos industriales. Algunos factores endógenos como las hormonas y un ADN hereditario dañado (llamado mutaciones genéticas) también contribuyen al desarrollo del cáncer (Dean, 2007). Cerca del 30 al 40% de los casos de cáncer alrededor del mundo pueden ser atribuidos a dietas no saludables y a un estilo de vida sedentario (Anonymous, 2001).

II.3.1.1. Proceso de carcinogénesis

El desarrollo del cáncer es un proceso de múltiples pasos, denominado carcinogénesis; fue propuesto por primera vez por Berenblum y Shubik en 1947. Hoy en día el proceso de carcinogénesis está organizado en tres fases principales: iniciación, promoción y progresión, como se muestra en la Figura 2 (INC, 2004).

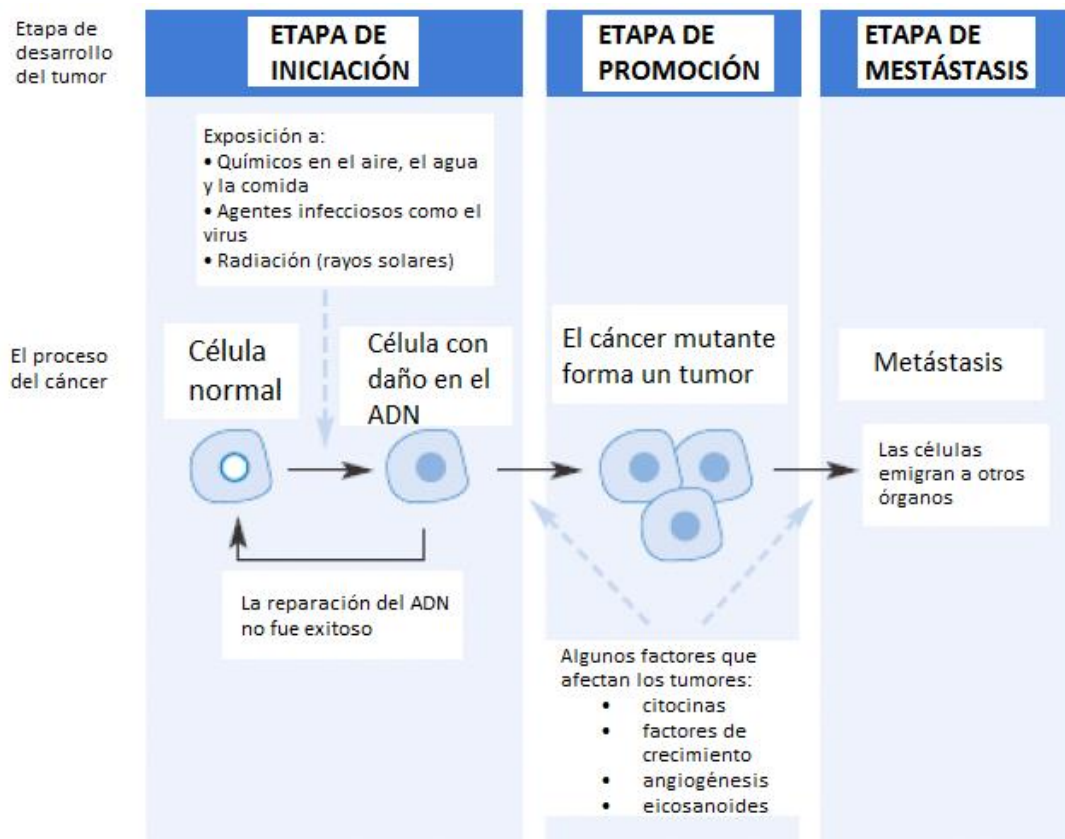


Figura 2. Etapas del proceso del cáncer. ADN, material genético que se encuentra dentro del núcleo de la célula. Adaptado de Brandan *et al.*, (2006).

- **Iniciación.** Son esencialmente cambios irreversibles en las células somáticas diana apropiadas. En términos más simples, la iniciación involucra uno o más cambios celulares estables que surgen de forma espontánea o inducida por la exposición a un carcinógeno. Este se considera que es el primer paso en la carcinogénesis, donde el genoma celular sufre mutaciones, creando el potencial para el desarrollo neoplásico, lo que predispone a la célula afectada y su progenie a la transformación neoplásica posterior (Alberts *et al.*, 2004).

- Promoción. La célula transformada (iniciada) puede permanecer inofensiva, a menos que sea estimulada a una mayor proliferación, alterando el equilibrio celular. Los cambios posteriores de una célula iniciada, que conducen a la transformación neoplásica, pueden implicar más de un paso y requieren repetidas y prolongadas exposiciones al estímulo (Upton, 1986). La promoción representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor, en la que participan los factores de crecimiento y los receptores de los factores de crecimiento, así como la angiogénesis y degradación de las matrices extracelulares (Maciag, 1990; Toi *et al.*, 1996).
- Progresión. Es el proceso a través del cual los cambios sucesivos en la neoplasia dan lugar a subgrupos de poblaciones de mayor malignidad. Los mecanismos moleculares de la progresión del tumor no se entienden completamente, pero se cree que participan las mutaciones y aberraciones cromosómicas. El proceso puede ser acelerado por la exposición repetida a los estímulos cancerígenos o por presiones de selección a favor de los derivados clonales autónomos. Las células iniciadas proliferan causando un rápido aumento en el tamaño del tumor. A medida que el tumor crece en tamaño, las células pueden someterse a otras mutaciones, lo que lleva al aumento de la heterogeneidad. De esta manera, adquiere la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna. Esa capacidad está codificada también en los genes de la misma con modificaciones estructurales y funcionales (Cavenee y White, 1995).

II.3.1.2. Cáncer de colon

El cáncer de colon es una enfermedad maligna en la cual ocurren múltiples alteraciones genéticas de oncogenes y genes supresores de tumores durante el desarrollo del tumor (Luo *et al.*, 2006). A nivel mundial el cáncer de colon representa el tercer lugar en la frecuencia de incidencia y cuarto lugar en mortalidad, con un número similar de hombres y mujeres (Globocan, 2008). En México el porcentaje de mortalidad oscila alrededor de 5.3% para hombres y 4.3% para mujeres (Figura 3). Además, es la tercera causa de egreso hospitalario en las mujeres, siendo las

de 65 a 74 y de 75 a 79 años donde se concentran las tasas más altas de morbilidad hospitalaria (28 casos de cada 100 mil mujeres de cada grupo de edad) (INEGI, 2011).

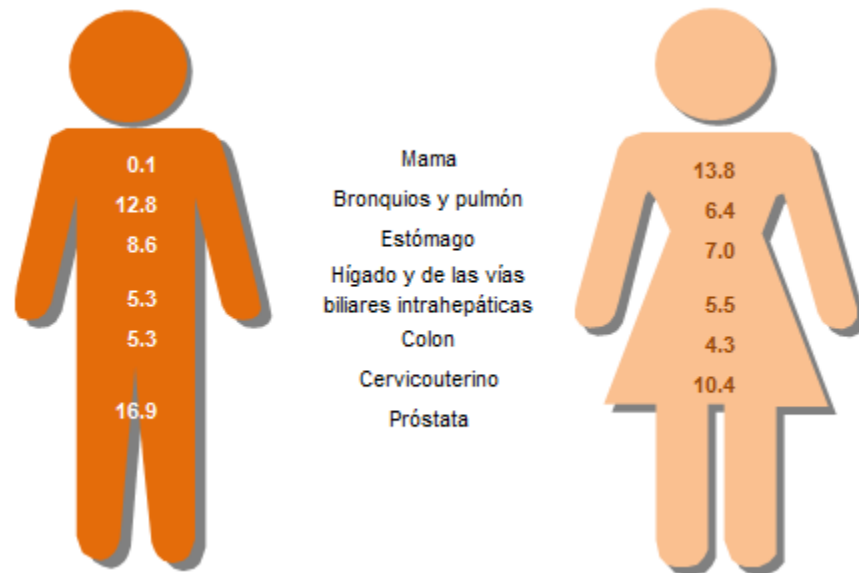


Figura 3. Porcentaje de mortalidad por principales tumores malignos según el género en una población de más de 20 años (INEGI, 2011).

II.3.1.2.1. Genética molecular del cáncer de colon

El cáncer de colon se desarrolla a través de etapas definidas que incluyen lesiones en la cripta del colon a través de adenomas, hasta manifestar el cáncer. Esta secuencia adenoma-carcinoma se caracteriza por la acumulación de múltiples mutaciones en genes supresores de tumor y oncogenes que afectan al balance entre la proliferación celular y la apoptosis. La explicación más moderna de la tumorigénesis se basa en el concepto de que cada uno de estos eventos mutacionales le confiere, a cada una de las células del tumor, una ventaja de crecimiento (Hahn *et al.*, 1999; Mecklin and Peltomaki, 2000). Cada evento que le sigue le confiere a la célula ventajas adicionales de crecimiento, en comparación con el resto de las células del tumor que traen como resultado la expansión clonal en múltiples etapas y al final, la progresión del tumor (Carethers, 1996; Hahn *et al.*, 1999).

Los eventos mutacionales comprenden pequeñas deleciones, inserciones o sustituciones de un solo nucleótido, pero también pueden ocurrir cambios genéticos mayores como amplificación génica o pérdida de cromosomas completos. Estas alteraciones afectan dos clases de genes diferentes: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumor (Luo *et al.*, 2006). La mayoría de las formas hereditarias de cáncer de colon presentan alteraciones en genes supresores de tumor (Hahn *et al.*, 1999) y gracias a la investigación se han encontrado alteraciones moleculares que llevan hacia la carcinogénesis (Figura 4). Ello comprende mutaciones puntuales en el proto-oncogen K-ras (Andreyev *et al.*, 1998) e hipometilación del ADN, y pérdida de ADN (pérdida de alelos) en el lugar de un gen supresor de tumores (el gen de la poliposis adenomatosa del colon): APC, localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21) (Abad *et al.*, 2003). Así como la pérdida de alelos en el lugar del gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 18q (también llamado gen deleciónado del cáncer colorrectal, DCC) (Jen *et al.*, 1994), pérdida de alelos en el cromosoma 17p, que se asocia con mutaciones en el gen supresor de tumores p53, además de otras alteraciones moleculares involucradas en el proceso carcinogénico (Alarcon-Vargas and Ronai, 2002).

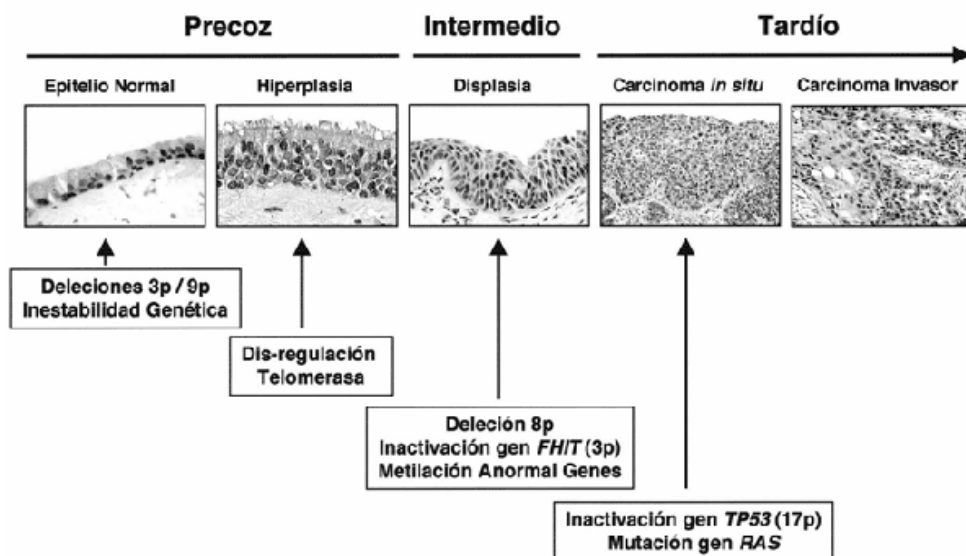


Figura 4. Desarrollo molecular del carcinoma colorrectal (Wistuba, 2001).

Diversos estudios confirman la importancia de la dieta en este padecimiento, destacando alimentos con alto contenido de fibra y compuestos bioactivos. Estos compuestos ejercen su efecto sobre la prevención y/o inhibición del desarrollo de cáncer (Bingham *et al.*, 2005; Lanza *et al.*, 2006), por lo que resulta necesario evaluar el metabolismo de los mismos como potenciales coadyuvantes de la enfermedad.

II.4. Proceso de digestión

La cinética de la digestión depende de las características físicas y químicas de los alimentos y de su interrelación con los eventos fisiológicos que ocurren dentro del tracto gastrointestinal (Hoebler *et al.*, 2000). La digestión de los alimentos y la absorción de nutrientes, son procesos dinámicos que involucran sistemas de complejos enzimáticos y reacciones de transporte (Fassler *et al.*, 2006).

El proceso de digestión se compone de varias fases: la bucal, la gástrica, la de absorción y la colónica o de fermentación. Cada una de estas fases se lleva a cabo bajo condiciones fisiológicas específicas, que tienen además funciones concretas.

La digestión de los alimentos comienza con la masticación en la boca. La etapa oral es rápida y juega un papel muy importante en la digestión (Kong y Singh, 2008). Durante esta fase tiene lugar la masticación que transformará el alimento en partículas más pequeñas, comenzando la digestión enzimática del almidón. La digestión oral es el primer paso en el cual las características fisicoquímicas de la comida sólida (textura, tamaño de partícula, humedad y viscosidad) están sujetas a mayores modificaciones (Hoebler *et al.*, 2000). Posteriormente, continúa la digestión gástrica. Durante este tiempo, el estómago transforma su contenido en una mezcla multifase llamada quimo, que es la combinación de fases separadas en soluciones acuosas, grasas y sólidos (Kong y Singh, 2008). En el estómago principalmente las proteínas y en segundo término los carbohidratos y lípidos, son degradados a través de una serie de reacciones enzimáticas acompañadas de un pH ácido (García-Luna y López-Gallardo, 2007).

Al llegar al duodeno muchas de las macromoléculas ya han sido transformadas a sus unidades más simples y es aquí donde comienza la absorción de todos los monómeros. En el intestino delgado tienen lugar reacciones enzimáticas que terminan la degradación de macromoléculas, principalmente de lípidos, pero en este punto el pH del medio ácido, que prevalecía en la etapa anterior, cambia por un pH cercano a la neutralidad (García-Luna y López-Gallardo, 2007).

Por último, el colon está habitado por una serie de microorganismos denominados microbiota que se encargan de fermentar los sustratos que llegan hasta este punto; se estiman unas 400 especies. Las bacterias predominantes representan el 99% de la población total; están compuestas de *Bacteriodes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Clostridia*. Por su parte las bacterias subdominantes son *E. coli*, *Lactobacilli* (*L. acidophilus*) y *Streptococci* (Sekirov *et al.*, 2010).

Al final de la digestión, cuando ya han sido aprovechados todos los nutrientes posibles, se absorben los últimos minerales y el agua en el segmento final del intestino grueso y el sobrante de la digestión se almacena hasta su evacuación (Guyton y Hall, 2001).

Conocer el proceso de digestión es de vital importancia. Se han usado varios modelos que simulan las condiciones de digestión gastrointestinal, referente a esto y relacionado a los modelos *in vitro*, se han diseñado varios procesos, sin embargo, el proceso de digestión es tan complejo, que sería difícil poder diseñar un proceso que lo imite a la perfección, como lo han declarado Hoeble *et al.*, (2002) y Fassler *et al.*, (2006).

II.5. Modelos *in vitro* para la evaluación de la digestión gastrointestinal

Una manera novedosa de medir la digestibilidad es mediante modelos dinámicos gastrointestinales *in vitro*, estos fueron creados en el campo de la farmacología humana y han permitido evaluar la permanencia y absorción de fármacos dentro del organismo, evitando así la investigación directa con humanos. Además, la combinación de métodos para medir la digestibilidad *in vitro*, junto con

un sistema para medir la absorción (asimilación) de los nutrientes, permite la disponibilidad de sistemas más robustas (Berge *et al.*, 2004). Sin embargo, diversos estudios *in vitro* han abordado las diferentes etapas del proceso de digestión por separado: la fase bucal (Akerberg *et al.*, 1998; Hoebler *et al.*, 1998b; Hoebler *et al.*, 2000), la fase gástrica (Hoebler *et al.*, 2002; Fassler *et al.*, 2006) y la fermentación colónica (Cummings y Macfarlane, 1991; Bjorck *et al.*, 1994; Soergel, 1994; Hoebler *et al.*, 1998a).

Hoebler *et al.*, (1998b), mencionan que la fibra dietética es susceptible de ser modificada en sus propiedades fisicoquímicas durante el proceso de digestión, y que estos cambios posiblemente afectan la velocidad y el grado de su fermentación en el colon; se reporta también que las fibras altamente solubles pueden ser fácilmente degradables por algunas bacterias que se encuentran antes de llegar al colon.

II.6. Modelos *in vitro* para la evaluación de la fermentación colónica

El estudio directo de la fermentación de la fibra en el intestino es muy difícil debido a la inaccesibilidad del colon proximal (Edwards y Rowland, 1992), por lo que se han desarrollado diversos métodos indirectos que estiman la fermentación a través de sus productos en heces, sangre, etc. (Laurentin, 2004a). Los sistemas *in vitro* son los modelos más simples; en ellos, las heces humanas son la fuente de bacterias que llevarán a cabo la fermentación. Bajo condiciones apropiadas (soluciones amortiguadoras, micro- y macronutrientes) estas herramientas pueden imitar las condiciones del colon humano (Laurentin y Edwards 2001, 2003, 2004b).

Autores como Campos-Vega *et al.*, (2010) y Cruz-Bravo *et al.*, (2011), han llevado a cabo la fermentación colónica *in vitro*, empleando heces humanas, de la fracción no digerible del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido. Al finalizar el proceso, se logró identificar y cuantificar compuesto derivados del metabolismo en el colon, como los ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico), relacionados con la inhibición de células transformadas de colon humano.

II.7. Modelos celulares utilizados en estudios *in vitro*

El cultivo celular es un modelo adecuado para el estudio del desarrollo y la diferenciación, por lo que las líneas celulares que conservan esta capacidad *in vitro* son objeto de un intenso estudio (Cohen, 1995). Este es considerado una herramienta útil para validar alimentos funcionales y proporcionar información sobre los mecanismos moleculares de acción, así como la eficacia protectora de sustancias bioactivas (O'Brien *et al.*, 2000; Liu y Finley, 2005).

Las líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal se han empleado en el estudio de genes reguladores de la diferenciación intestinal y su implicación en el desarrollo del cáncer, en gran parte debido a la dificultad de obtener cultivos primarios. En particular, algunas líneas celulares colorrectales tienen conservadas partes del programa de diferenciación epitelial del intestino, al mantener la expresión normal de los genes implicados en estos procesos (por ejemplo, las células absortivas o mucosecretoras); además, mantienen la capacidad de formar monocapas de células polarizadas, una vez que han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro* (Morantes, *et al.*, 2006).

Por otra parte, muchas de estas líneas celulares presentan mutaciones genéticas, así como inestabilidad cromosómica y de microsatélites similares a lo que ocurre en tumores colorrectales, lo cual es muy interesante a la hora de estudiar la conservación o pérdida de mecanismos de diferenciación celular durante la progresión tumoral (Morantes, *et al.*, 2006). En consecuencia, estas líneas celulares son muy útiles como modelos de diferenciación celular, normal y tumoral.

II.7.1. Línea celular SW480

La línea celular SW480 se deriva de la etapa primaria de adenocarcinoma de colon que surgió en un paciente varón de 50 años de edad. Cuando el mismo paciente fue sometido a laparotomía 6 meses más tarde, el cáncer recurrente fue descubierto en hígado y metástasis ganglionares mesentéricas (Hewitt *et al.*, 2000).

La línea de carcinoma colorrectal SW480 es representativa del 75% de los carcinomas colónicos, ha perdido cada uno una copia del cromosoma 17p

(incluyendo el gen p53), y el alelo p53 restante esta mutado (Baker *et al.*, 1989; Nigro *et al.*, 1989).

Entre las características de esta línea celular que le confieren sus cualidades carcinogénicas son su capacidad para mantener activa la expresión de los oncogenes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, myb, sis y fos. Además, contiene dos mutaciones puntuales, arginina a histidina en el codón 273 y la prolina a serina en el codón 309 (Nigro *et al.*, 1989). Las sustituciones en el codón 248 y 273 son típicos de los observados en los tumores humanos, que se producen dentro de dos de las cuatro mutaciones.

II.8. Mecanismo de acción de los productos de la digestión sobre modelos celulares *in vitro*

Los polifenoles y la fibra de la dieta pueden interferir en las distintas etapas de desarrollo de la carcinogénesis, a través de varios mecanismos de acción molecular, ligados al efecto sobre carcinogénesis en estudios *in vitro*.

En un estudio realizado por Cruz-Bravo *et al.*, (2011) se evaluó el efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Negro 8025 sobre la sobrevivencia de células de adenocarcinoma humano HT-29. Los resultados mostraron que tanto la fracción no digerible como la mezcla de los ácidos grasos de cadena corta (a la concentración encontrada en los productos de la fermentación colónica) modularon la expresión de genes implicados en el arresto del ciclo celular, proliferación celular, apoptosis y reparación del ADN. Por lo que se sugiere que los productos de la fermentación de la fracción no digerible del frijol común contienen compuestos con actividad quimioprotectora que modulan los genes en células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 a través de mecanismos antiproliferativos y pro-apoptóticos.

Campos-Vega *et al.*, (2010) utilizaron la línea celular HT 29 como modelo para investigar el mecanismo de algunos compuestos protectores de diferentes variedades de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. De acuerdo a los resultados sugieren que los productos de la fermentación colónica de polisacáridos de frijol

común podrían inhibir el crecimiento de células transformadas en colon mediante la modulación de la expresión de genes involucrados en diferentes procesos celulares, entre ellos arresto al ciclo celular e inducción de apoptosis.

Entre los compuestos que pueden desempeñar un papel quimiopreventivo frente a la carcinogénesis a través de la regulación del ciclo celular y la inducción de la apoptosis se encuentran los polifenoles (Nijveldt *et al.*, 2001) y los AGCC (Campos-Vega *et al.*, 2010), entre otros.

II.8.1. Arresto al ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto de eventos que van desde el nacimiento y el crecimiento hasta la división de una célula cualquiera; es decir, la proliferación celular (López-Casillas, 2002). El ciclo celular se encuentra dividido en cuatro fases, morfológicamente no muy bien diferenciadas, pero molecularmente bien delimitadas, en el siguiente orden secuencial: fase G1, S, G2 y M como se muestra en la Figura 5. Las fases G1 y G2 (gap o intervalo) implican una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. Por su parte, la fase S (síntesis) consiste en la replicación del DNA para heredar a cada célula hija la misma carga genética. Y, la fase M (mitosis) o de división celular, como su nombre lo indica, es la división de todo el material celular para originar dos células hijas (Alberts *et al.*, 1998). Cuando la célula no está en actividad proliferante se dice que ha salido del ciclo celular y se encuentra en estado de quiescencia o G0, un ejemplo clásico de estas células son las neuronas (López-Casillas, 2002).

El tránsito por estas cuatro fases del ciclo celular está dirigido por una red de interacción de proteínas altamente compleja y finamente regulada. De entre estas proteínas se destacan las enzimas de acción fosforilante denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs 1, 2, 4, 6) y sus subunidades activadoras, las ciclinas (A, B, D y E) (Kim y Zhao, 2005). La elucidación de estas redes de interacción nos ha llevado a entender actualmente muchos de los fenómenos en el desarrollo del cáncer.

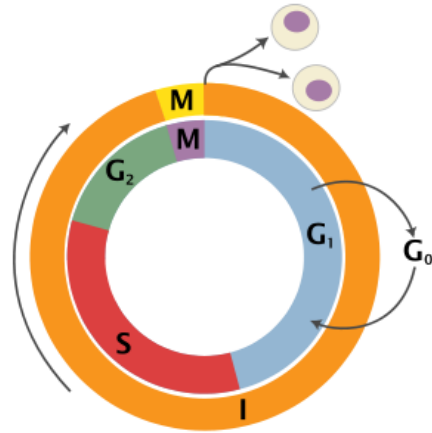


Figura 5. Fases del ciclo celular. M: mitosis, S: síntesis, I: interfase, G₀: fase de reposo, G₁: primera fase de crecimiento, G₂: segunda fase de crecimiento. (EcuRed, 2012).

Las CDKs son proteínas constitutivas cuya actividad está regulada por un gran número de moléculas, no menos importantes, y que también requieren de regulación para que funcione correctamente el ciclo celular (Cuadro 5). Entre estas moléculas que están vinculadas a la actividad de las CDKs se encuentran otras cinasas (CDK7, Well, MytIs), fosfatasa (*cdc25A*, B y C), proteínas inhibidoras (CKIs) y ciclinas (coenzimas) (Verschuren *et al.*, 2004).

Las ciclinas están sujetas a una regulación por retroalimentación negativa, excepto la ciclina D, quien se expresa mientras se mantiene el estímulo mitógeno (factor que actúa en el ciclo celular estimulando la división celular), aunque esto no implica que no tenga que ser degradada. Las ciclinas D y E requieren ser fosforiladas para su degradación por el proteosoma mediada por el complejo ubiquitin ligasa (SCF). La ciclina E es fosforilada por ciclina E/CDK2, mientras que ciclina D es fosforilada por la cinasa glicógeno sintasa 3 β (GSK-3 β) al ser exportada del núcleo de la célula (Verschuren *et al.*, 2004).

La degradación de las ciclinas A y B es mediada por el complejo promotor de la anafase (APC) que ellas mismas activan junto con la cinasa Polo. El complejo ubiquitina ligasa-APC media la degradación por el proteosoma; sus blancos incluyen ciclinas A y B, securina (esencial para la segregación cromosómica), cinasa Polo y Aurora B, estas dos últimas imprescindibles para la correcta ejecución de la citocinesis (Pardo, 2005). Existen además otros actores importantes para el control del ciclo celular que requieren ser regulados. Los inhibidores de CDKs (CKIs), son

proteínas supresoras de tumor que bloquean la actividad de los complejos CDKs/ciclinas y causan arrestos en fases específicas del ciclo celular dependiendo de la ubicación del complejo cinasa inhibido. Algunos CKIs son estimulados por senescencia celular, inhibición por contacto o diferenciación terminal (Burdon *et al.*, 2002).

Dos familias de CKIs han sido descritas, la familia INK4 (inhibidores de cinasa 4), que se compone de las proteínas p15, p16, p18 y p19 (nombradas de acuerdo a su masa molecular), todas ellas interactúan con las CDKs 4 y 6 ocasionándoles un cambio conformacional que impide su unión con la ciclina D (Kim y Zhao, 2005). La familia CIP (CDKs-proteínas inhibidoras), que incluye a las proteínas p21, p27 y p57, estas bloquean a las ciclinas A, B y E y a las CDKs 1 y 2 o a los complejos ya formados por estas (Kim y Zhao, 2005).

Cuadro 5. Expresión, efectos y regulación de complejos CDKs/ciclinas durante el ciclo celular.

Etapas	Estímulo	Ciclina	CDK	Blancos	Efectos	Degradación	Regulación
G0/G1e	FC	D	CDK4/6	Rb	Activación de la ciclina E y cdc25A		Dependiente del FC e INK4
G1I/Se	FC y E2Fs	E	CDK2	Rb, cdc6, p27, ciclina E	Activación de ciclinas A y B y maquinaria de replicación. Inactivación de ciclina E y p27	SCF	
G1/S-Prometa	FC y E2Fs	A	CDK2, CDK1	Cdc6, E2Fs, APC, ciclina B	Activa la replicación y a APC. Bloquea E2Fs. Estabiliza a ciclina B		Regulación Negativa y a través de CIPs
G1/S-Meta/Ana	E2Fs	B	CDK1 (MPF)	APC, láminas, histona H1, ARN pol II, pp60c-src, NO38 y nucleolina	Activa APC y proteínas de formación del huso. Desaparición de la membrana nuclear. Condensación de cromosomas. Inhibición de la transcripción. Reorganización de cito esqueleto. Desensamble de nucléolo.	APC	

FC, factor de crecimiento; e, temprana; I, tardía; Prometa, prometafase; Meta, metafase; Ana, anafase; MPF, factor promotor de la fase M; INK, familia de inhibidores de la cinasa 4; CIP, familia de proteínas inhibidoras de CDKs (Quezada 2007).

Es sabido que c-myc es un represor transcripcional de CKIs, que bloquea la transcripción de p15 al unirse a su promotor y, de p21 al bloquear a los factores de transcripción sp1/sp3 (Gartel y Shchors, 2003). Además, p21 es una proteína cuya expresión esta mediada por otra importante proteína supresora de tumores, p53.

La proteína p53 es un factor de transcripción cuya actividad está involucrada en múltiples procesos celulares (arresto del ciclo celular, apoptosis, diferenciación celular, etc.). Se dice que esta proteína está ubicada en el centro de las vías de respuesta al estrés, activándose (por modificaciones post-traduccionales) cuando existe daño al DNA, hipoxia, activación de oncogenes, entre otras señales, por ello se la ha llegado a nombrar “el guardián del genoma”. Dentro del ciclo celular esta proteína constituye un punto de control en las transiciones G1/S y G2/M. Cuando es activada por daño al DNA que requiera ser reparado antes de entrar a la replicación (fase S), p53 activa la transcripción de p21 y a través de este inhibe la actividad del complejo ciclina E/CDK2. También se ha encontrado que puede unirse al RNAm de CDK4 para impedir su traducción. A través de estos mecanismos arresta el ciclo celular en fase G1 (Ryan *et al.*, 2001; Golias *et al.*, 2004). Si el daño es producido luego de la replicación del DNA, p53 arresta a la célula en G2/M uniéndose al promotor del gen de ciclina B, bloqueando su transcripción (Kim y Zhao, 2005). Cuando el daño al DNA es irreparable (masivo), p53 puede llevar a la muerte celular por apoptosis activando los genes requeridos para ambas vías de muerte: mitocondrial y receptor de muerte (Ryan *et al.*, 2001).

Se mencionó que el cáncer es una proliferación celular descontrolada causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos. Existen decenas de formas en que se presenta la enfermedad, pero su fisiopatología básica comprende aberraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que gobierna el ciclo celular y que por tanto causan las desregulaciones de este (Golias *et al.*, 2004).

En la actualidad se emplean técnicas modernas para el análisis del ciclo celular, una de ellas es la citofluorimetría. Esta técnica permite estudiar las fases del ciclo celular y de manera simultanea cuantificar el proceso apoptótico. Para la determinación se emplea un fluorocromo como el yoduro de propidio (PI) que se intercala de manera estequiométrica en el DNA, por lo que es posible determinar el contenido relativo en cada una de las células y por lo tanto diferenciar la fase del

ciclo celular en que se encuentra cada una de ellas. Así, las células en fase G_0 o G_2 presentan un contenido de DNA = $2N$, cuando entran en división e inician la síntesis de material genético la cantidad es mayor (fase S), mientras que las células en mitosis tienen exactamente el doble de DNA justo antes de separarse en dos células hijas (Fase G_2 y M), siendo entonces su contenido igual a $4N$; las células apoptóticas en las que hay degradación de la cromatina, presentan un contenido menor a $2N$ permitiendo ser cuantificadas por la aparición de un pico en la región $SubG_0$ (Técnica del pico $SubG_0$). Su limitante es que detecta una etapa tardía de la muerte celular, por lo que en sistemas *in vivo* es difícil captar a las células apoptóticas, pues son rápidamente removidas por células fagocíticas. Con esta técnica es posible apreciar simultáneamente la reducción de tamaño que presentan las células en apoptosis (Nicoletti *et al.*, 1991; McCloskey *et al.*, 1994).

II.8.2. Inducción de apoptosis

Desde principios del siglo XX numerosos reportes fueron hechos sobre la existencia de una forma particular de muerte celular en ausencia de inflamación. No fue sino hasta la década de los setenta cuando se reconoció que las células sufren un proceso fisiológico de muerte *in vivo* caracterizado por ausencia de inflamación, contracción celular, irregularidad de la membrana citoplasmática, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear (Kerr *et al.*, 1972). Este proceso fue llamado apoptosis. Estudios posteriores indicaron que las células tumorales presentaban defectos en la inducción de apoptosis. De hecho, la pérdida del recambio celular natural inducido por apoptosis es considerado uno de los elementos centrales en la carcinogénesis (Wyllie *et al.*, 1980). Con la caracterización de este fenómeno, el cáncer pasó de ser una enfermedad con alteraciones de la proliferación, a una con desbalance entre proliferación y apoptosis. En los años siguientes se caracterizaron los componentes de la red que controla el proceso de apoptosis, identificándose las rutas que modulan la muerte celular (Shirin y Moss, 1998; Maeda *et al.*, 2002).

La apoptosis es la forma fisiológica de suicidio celular que interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas. Morfológicamente, la diferencia con la necrosis es

que en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular. Bioquímicamente, la característica diferencial es que se trata de un proceso dependiente de energía y de la síntesis de nuevas proteínas, mientras que en la necrosis falla el aporte de energía y la síntesis de proteínas se interrumpe (Gupta, 2000).

En la actualidad se sabe que alteraciones en este proceso no sólo se presentan en cáncer, sino en una serie de enfermedades que afectan al ser humano (ej. enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes, del desarrollo embrionario, daño isquémico, etc.) (Reed, 2000). En el cáncer los defectos de la apoptosis favorecen la proliferación y crecimiento sin control que le caracteriza.

A fines de los años noventa comenzaron a develarse los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis. Esto motivó a diferentes grupos de investigadores a modular las vías de la apoptosis, como una nueva estrategia terapéutica contra el cáncer mediante la restauración o la estimulación de la misma (Penn, 2001). Una red de señales de traducción celular controla en forma precisa el proceso de apoptosis. Los reguladores de la apoptosis pueden dividirse en forma amplia en tres categorías: inductores, efectores y ejecutores. Dentro de los inductores de apoptosis están el retiro de factores de sobrevivencia, como son las citoquinas o los factores de crecimiento, la exposición a agonistas de los receptores de muerte celular (tales como FAS/CD95L y el factor de necrosis tumoral) o la exposición a agentes genotóxicos tales como radiación, luz ultravioleta y quimioterapia. Los inductores son agentes o condiciones que gatillan los efectores ('dan la orden'). Los efectores son las cascadas intracelulares que transmiten la señal de muerte ('buscan a quien debe cumplir la orden'), y los ejecutores son los eventos intracelulares al final de la vía que causan la apoptosis ('ejecutan la orden') (Gupta, 2000).

La inducción de apoptosis ocurre a través de al menos dos rutas separadas y paralelas (Figura 6). Una de ellas es dependiente de la mitocondria y es modulada por la liberación de proteínas pro-apoptóticas desde ese organelo al citoplasma. Esta ruta es comúnmente referida como la "vía intrínseca", debido a que son moléculas internas las que generalmente la activan (Adams y Cory, 2001; Elmore,

2007). Agentes genotóxicos como quimioterapia y radiación, determinan una respuesta de estrés celular que induce apoptosis a través de esta vía (Decaudin *et al.*, 1998). La otra ruta conocida como la “vía extrínseca”, involucra la activación de la cascada apoptótica a través de receptores en la membrana en respuesta a señales (ligandos) extracelulares (Reed, 2000; Cascales-Angosto, 2003). Inductores de esta vía son los miembros de la familia del factor de necrosis tumoral de receptores de muerte celular (Ashkenazi y Dixit, 1998).

Una vez activado el receptor se inicia la fase ejecutora intracelular. Durante esta fase, la señal apoptótica puede ser inhibida y la célula sobrevivir, o ser transmitida pasado un punto llamado ‘sin retorno’ en la cual la célula indefectiblemente muere. Esta fase efectora es regulada a diferentes niveles. La liberación mitocondrial de citocromo C parece estar cerca del punto sin retorno y es estrechamente regulada por moduladores pro- y anti-apoptóticos que incluyen a los miembros de la familia Bcl-2 (Ej. Bcl-xL, BAX y Bid). La ruta de muerte celular que es independiente de la mitocondria también estimularía apoptosis y es regulada por moléculas como FADD (proteína asociada al dominio de muerte del ligando FAS) (Adams y Cory, 2001; Huerta *et al.*, 2007).

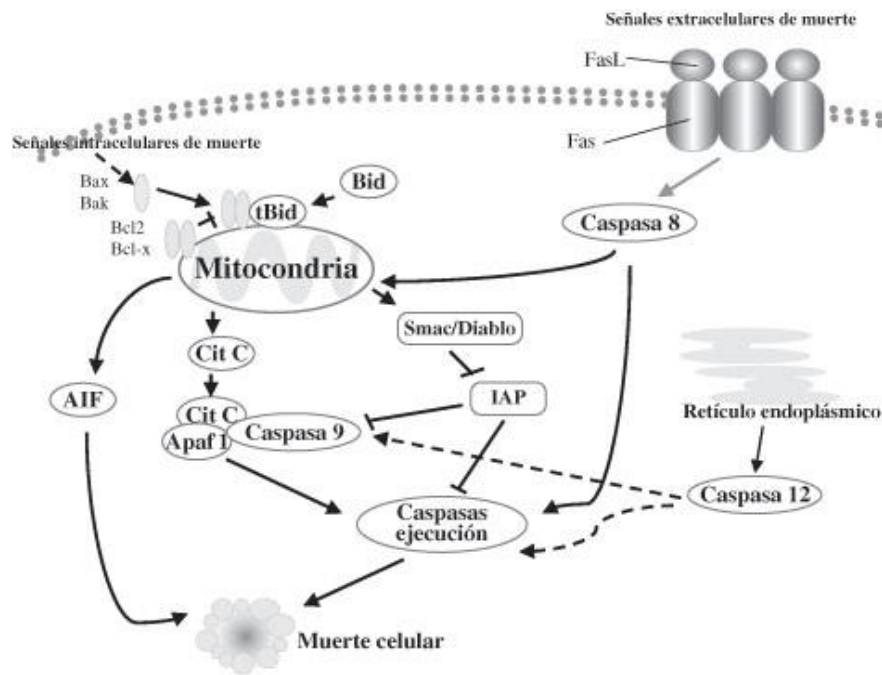


Figura 6. Representación esquemática de las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca (Bernhardi, 2004).

Interesantemente, las señales de sobrevivencia que desencadenan la cascada de quinasas PI3/Akt/PKB, pueden inhibir tanto las vías dependientes como independientes de la mitocondria. Un evento que distingue a las células que sufrirán apoptosis es la activación de al menos una de las caspasas consideradas iniciadoras (caspasas 2, 8 y 9). Esto conlleva la activación de caspasas adicionales (caspasas efectoras 3 y 7) en una cascada auto-perpetua e irreversible, como también de nucleasas que subsecuentemente atacan sustratos celulares críticos llevando a la muerte celular (Gupta, 2001; McDonald, 2005).

Las caspasas (cisteinil-aspartato proteasas específicas) son una familia de moléculas de señalización importantes con diversas tareas dependiendo del subtipo y el órgano en cuestión. La activación de las caspasas también es un marcador para el daño celular en ciertas enfermedades (Lavrik *et al.*, 2005). Aunque el papel exacto en la iniciación y progresión de la apoptosis no es conocido por todas las caspasas, su participación como un indicador de apoptosis hace que estas moléculas sean ampliamente buscadas.

Se ha investigado el uso de la forma activa de la caspasa-3 para la detección de eventos apoptóticos. Esta proteasa se ha implicado como una caspasa "efectora" asociada con el inicio de la "cascada de la muerte" y por lo tanto es un importante marcador de punto de entrada de la célula en la señalización hacia la apoptosis (Nicholson *et al.*, 1995). Además, la activación de la caspasa-3, por las caspasas-8 y -9 río arriba (Jacobson, *et al.*, 1996), sirve como un punto de convergencia de diferentes vías, lo que es muy adecuado como una lectura de salida en un ensayo de apoptosis.

La activación de las caspasas (proteasas de cisteína) durante la apoptosis temprana parece estar regulada principalmente por la familia de las proteínas Bcl-2, cuya función principal es el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial a través de la formación o regulación de poros, en particular el poro de permeabilidad transicional mitocondrial (Sánchez y Arboleda, 2008).

II.8.2.1. Membrana mitocondrial durante la apoptosis

La mitocondria tiene un importante papel dentro del proceso de la muerte celular programada, actuando de reservorio de proteínas apoptóticas como el citocromo C, Smac / Diablo, el factor inductor de apoptosis, endonucleasa G y las procaspasas 2,3,8 y 9 (Hengartner, 2000). La liberación de estas proteínas conduce a una secuencia de cambios morfológicos que van desde la condensación nuclear hasta la exposición de la fosfatidilserina y de moléculas de adhesión en la superficie de las células que han entrado en apoptosis (Amarante-Mendes y Green, 1999). Por tanto, parece que la mitocondria actúa como el escenario integrador de una cadena de estímulos inductores para la apoptosis y desencadena una serie de cascadas de señalización que terminan con la muerte de la célula.

Al igual que las membranas plasmáticas, las mitocondriales poseen una simetría en la distribución de los lípidos no sólo entre las membranas interna y externa, sino también entre las capas interna y externa de la bicapa lipídica. De modo que una alteración en esta distribución tiene consecuencias para la función y supervivencia de las mitocondrias y aún de la célula misma en el proceso de la apoptosis (Geydan *et al.*, 2006; Grimm y Brdiczka, 2007).

En la mitocondria existe un proceso latente de transporte, conocido como “permeabilidad transicional mitocondrial”, cuya activación se presenta bajo ciertas condiciones y se traduce en la permeabilización de la membrana mitocondrial a iones que incluyen el calcio (Verhagen *et al.*, 2000). Se ha propuesto que esta permeabilidad mitocondrial podría ser una de las vías de conducción de moléculas pro-apoptóticas. Se sabe que el poro se abre cuando hay un exceso de calcio y fosfato, lo que despolariza la mitocondria y desacopla la cadena respiratoria. El poro de permeabilidad transicional mitocondrial, favorece la cascada de caspasas y favorece la muerte celular al liberar factores inductores de apoptosis como el citocromo c, factores de fragmentación del núcleo y proteínas como SMAC/ DIABLO que neutralizan los inhibidores endógenos de la apoptosis (Sánchez y Arboleda, 2008).

La proteína de translocación mitocondrial (TSPO), interactúa con los canales aniónicos dependientes de voltaje para desempeñar un papel en la

apoptosis. TSPO participa en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta generación de ROS induce la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis. Las ROS son conocidos por ser capaces de liberar al citocromo c. (Orrenius *et al.*, 2007; Veenman *et al.*, 2008). Además, la caspasa 2 puede estar directamente involucrada en la liberación de citocromo c desde la mitocondria en las células apoptóticas (Orrenius *et al.*, 2007). Esta caspasa se activa tempranamente en respuesta al estrés genotóxico y puede funcionar como modulador del camino apoptótico mitocondrial. La activación de la caspasa 2 ocurre dentro de un complejo multiproteico, con proteínas inducidas por el gen supresor tumoral p53, las proteínas adaptadoras de muerte RAIDD y otras proteínas (Tinel y Tschopp, 2004). La permeabilización de la membrana externa y consiguiente liberación de citocromo c es considerada un paso clave y de no retorno en el inicio del proceso apoptótico. Una vez en el citoplasma, el citocromo c, junto a la molécula adaptadora Apaf-1 participa en la formación del complejo del apoptosoma, lo que resulta en el reclutamiento y procesamiento de la procaspasa 9 hacia su forma activa (caspasa 9), en presencia de ATP. Subsecuentemente la caspasa 9 activa a las procaspasas 3 y 7 (caspasas efectoras) que son las responsables del clivaje de varias proteínas que llevan a las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis (Amarante-Mendes y Green, 1999; Gogvadze y Orrenius, 2006).

La capacidad de permeabilización de la membrana mitocondrial ha sido tema de investigación. Se ha demostrado que los colorantes de cianina catiónicos se acumulan en las células en respuesta a los cambios del potencial de membrana en asociación con la apoptosis (Howard *et al.*, 1979; Cossarizza *et al.*, 1994; Darzynkiewicz *et al.*, 2001). El compuesto 3,3'-diethyloxacarbocyanine yoduro (DIOC6) penetra en el citosol de las células eucariotas. A concentraciones inferiores a 100 nm, el colorante se acumula principalmente en las mitocondrias con los potenciales de membrana activos, la intensidad del colorante disminuye cuando las células se tratan con reactivos que alteran potencial de membrana mitocondrial. Una combinación del reactivo DIOC6 con PI discrimina entre células vivas que se tiñen solamente con DIOC6, de células en apoptosis temprana que han perdido la capacidad de acumular el reactivo DIOC6 (se encuentran acumulando DIOC6 a baja concentración) y de células que han muerto por apoptosis tardía o por necrosis cuya

integridad de la membrana plasmática se ve comprometida y se colorean únicamente con PI (Darzynkiewicz *et al.*, 1982; Darzynkiewicz *et al.*, 1994).

Como se ha estudiado, el proceso de apoptosis genera una serie de cambios celulares, incluyendo pérdida de la asimetría de fosfolípidos de la membrana, lo que resulta en la exposición de fosfatidilserina (FS) en la superficie de la célula (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

II.8.2.2. Reconocimiento de apoptosis por Anexina V

En las primeras etapas de la apoptosis, se producen cambios en la superficie celular (Andree *et al.*, 1990; Creutz, 1992; Fadok *et al.*, 1992). Una de estas alteraciones de la membrana plasmática es la traslocación de la FS de la parte interna de la membrana a la capa exterior, por el cual la FS queda expuesta en la superficie externa de la célula (Vermes *et al.*, 1995). La expresión de la FS en la superficie celular desempeña un papel importante en el reconocimiento y eliminación de células apoptóticas por los macrófagos. Fadok *et al.*, (1992), demostraron que los macrófagos reconocen específicamente la FS expuesta en la superficie de los linfocitos durante el desarrollo de la apoptosis. El reconocimiento y la fagocitosis de células y cuerpos apoptóticos protegen a los organismos de la exposición a los compuestos celulares que conducen a inflamación, que acompaña a la necrosis.

El análisis de FS en la capa exterior de las membranas celulares apoptóticas se lleva a cabo mediante el uso de Anexina-V-fluoresceína y PI para la diferenciación a partir de células necróticas, etiquetando con un marcador de superficie celular para la caracterización de células. Bajo ciertas concentraciones de calcio, la molécula de Anexina V, tiene afinidad específica por este fosfolípido, por lo que se utiliza acoplada a un fluorocromo como el FITC, y a la par se usa el PI como colorante supravital. Esto permite diferenciar entre las células apoptóticas, que fijan la Anexina V y excluyen al PI, y las células necróticas que captan tanto la Anexina V como el PI. Las células vivas son negativas para ambos fluorocromos (Vermes *et al.*, 1995).

Se mencionó anteriormente, que algunas proteínas presentes en la mitocondrial como la TSPO participan en la generación de ROS, cuya función es inducir la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis (Orrenius *et al.*, 2007; Veenman *et al.*, 2008). La constante producción de ROS y la capacidad del sistema biológico de reparar el daño celular, generan estrés oxidativo.

II.8.2.3. Estrés oxidativo en la apoptosis

El estrés oxidativo se produce cuando los compuestos pro-oxidantes sobrepasan los mecanismos de defensa antioxidante (Kroemer *et al.*, 1997). El estrés oxidativo puede ocurrir cuando la producción de radicales de oxígeno es mayor que la capacidad de desintoxicación celular (Halliwell y Gutteridge, 1989; Kowaltowski y Vercesi, 1999), es decir, cuando se altera la homeostasis redox dentro de la célula. Se ha sugerido que el cierre global de la función mitocondrial en condiciones del estrés oxidativo, podría contribuir a la apoptosis debido a la dramática disminución en el suministro de energía celular (Sies, 1985; 1986; Horton y Fairhurst, 1987; Jaeschke, 1995; Reed, 1995). Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud del cambio, y si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original. Sin embargo, el estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún la oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis (Lennon *et al.*, 1991; Zamzami *et al.*, 1995; 1996).

En muchos modelos apoptóticos, las alteraciones en el estado redox de la célula a un entorno más oxidante se produce antes de la activación de la fase final de la activación de caspasa (Green y Reed, 1988; Richter, 1993; Fernández *et al.*, 1995; Zamzami *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1998; Morel y Barouki, 1999). Este argumento se ve apoyado por la capacidad de diversos antioxidantes, tales como, N-acetilcisteína para bloquear la apoptosis de una manera similar que hacen los inhibidores de caspasas (McGowan *et al.*, 1996). Las propiedades antioxidantes de Bcl-2, un potente inhibidor de la apoptosis, apoya aún más este punto de vista (Hockenbery *et al.*, 1993; Hockenberry, 1995; Korsmeyer *et al.*, 1995; Voehringer, 1999). En condiciones normales, las células aeróbicas están dotadas de

mecanismos amplios de defensa antioxidante para contrarrestar los efectos dañinos de las ROS (Buttke y Sandstrom, 1994; Fernández *et al.*, 1995; Morel y Barouki, 1999)

Existe evidencia experimental que reconoce la disfunción mitocondrial como uno de los mediadores importantes de la apoptosis (Richter, 1993; Castedo *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1995; Zamzami *et al.*, 1995; Marchetti *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1996; Kroemer *et al.*, 1997; Scarlett y Murphy, 1997; Zamzami *et al.*, 1997; Green y Reed, 1988; Marzo *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1998; Yang y Cortopassi, 1998; Morel y Barouki, 1999). La mitocondria es sensible a cambios en el estado redox de la célula. Varios estudios han demostrado que el cierre global de la función mitocondrial en condiciones de estrés oxidativo puede contribuir a la apoptosis (Zamzami *et al.*, 1995; Zamzami *et al.*, 1996; Green y Reed, 1988; Susin *et al.*, 1998; Morel y Barouki, 1999).

El mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial es un proceso dinámico. Bajo estrés oxidativo severo se produce lo que se mencionó anteriormente como transición de la permeabilidad mitocondrial (PT). Este proceso implica un aumento repentino de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los solutos mayor que 1500 Da (protones, calcio, glutatión reducido, etc.). En la actualidad se cree que la PT funciona como un sensor de equilibrio de oxidación-reducción, en consecuencia, la apertura de poros, de PT defectuoso, a moléculas más grandes provoca el desacoplamiento de la cadena respiratoria que resulta en la hipergeneración de ROS, el cese de la síntesis de ATP, la salida del calcio, y el agotamiento de glutatión reducido y otros agentes reductores. Este cambio en el potencial de membrana predispone estas células al daño oxidativo por el deterioro de los mecanismos de defensa antioxidantes endógenos (Castedo *et al.*, 1995; Marchetti *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1996; Scarlett y Murphy, 1997; Zamzami *et al.*, 1997; Marzo *et al.*, 1998; Yang y Cortopassi, 1998). Otro paso crucial en los primeros cambios en la mitocondria es la alteración del potencial mitocondrial transmembrana (DCM) (Green y Reed, 1988; Zamzami *et al.*, 1995; Zamzami *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1998; Morel y Barouki, 1999). Una disminución en solo la DCM puede inducir estrés oxidativo y la muerte celular (Susin *et al.*, 1998).

Estos eventos son detectados en las primeras etapas del proceso apoptótico, antes que la mayoría de las células están irreversiblemente comprometidas a la muerte lo que sugiere que las mitocondrias podrían ser un objetivo primario durante la apoptosis.

El estrés oxidativo por lo tanto es un gran aumento (cada vez más negativo) en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión (Schafer y Buettner, 2001).

El glutatión es un péptido de tres aminoácidos (gamma glutamil-cisteinilglicina), y un antioxidante abundante que se encuentra en las células eucariotas (Griffith, 1999; Sies, 1999). La mayor parte del glutatión existe en forma reducida (GSH) en las que el grupo sulfhidrilo de la cisteína no está vinculada en un enlace disulfuro a un segundo glutatión. Un pequeño porcentaje del glutatión se oxida y se presenta como un dímero de dos de los elementos de péptidos unidos por un enlace disulfuro entre las cisteínas presentes en ambas moléculas (Viña *et al.*, 1995).

Dentro de las células, el total de GSH existe libre y unido a las proteínas. Es el antioxidante más abundante en las células aeróbicas, presente en concentraciones micromolares en los fluidos corporales y en milimolar concentraciones en el tejido (Janáky *et al.*, 2007). Puesto que la enzima glutatión reductasa, glutatión libre que se revierte a partir de su forma oxidada (GSSG), es constitutivamente activa e inducible en el estrés oxidativo, el glutatión libre existe casi exclusivamente en su forma reducida. El glutatión oxidado (GSSG) es un indicador de la salud de las células y el estrés oxidativo. Ciertos productos químicos reaccionan con GSH para formar aductos o para aumentar los niveles de GSSG, disminuyendo la relación de la reducción de glutatión oxidado (GSH/GSSG). Las mediciones de GSH y GSSG son útiles en sistemas experimentales porque los cambios en la relación GSH/GSSG están asociados con la enfermedad humana, envejecimiento y eventos de señalización celular (Ghezzi, 2005; Rebrin y Sohal, 2008; Ballatori *et al.*, 2009).

La relación de la reducción de glutatión oxidado dentro de las células se utiliza a menudo como un marcador de toxicidad celular (Carelli *et al.*, 1997; Noctor y Foyer, 1998; Locigno y Castronovo, 2001; Townsend *et al.*, 2003). En condiciones

normales, el glutatión reducido es la forma más frecuente del glutatión, que constituye hasta el 98% de la reserva total de glutatión (Kosower y Kosower, 1978; Silvia *et al.*, 1987). Sin embargo, la relación GSH/GSSG disminuye durante el envejecimiento normal y se agota más en las enfermedades (Sofic *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1993; Lovell *et al.*, 1995; Janáky *et al.*, 2007). El potencial redox celular es crítica para la fisiología celular normal, y la relación GSH/GSSG como se indica, es el mejor indicador de este potencial redox (Butterfield *et al.*, 2002; Kemp *et al.*, 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

El residuo del café, es un desecho producido en la elaboración de la bebida del café, al cual no se le ha dado gran valor y tiene impacto negativo en el ambiente. Este, sin embargo, contiene compuestos bioactivos, que tienen efectos positivos en la salud. Sin embargo, no hay información científica en cuanto a los efectos fisiológicos y más aún de los mecanismos de acción, que los compuestos polifenólicos y fibra dietaria, presentes en el café usado, pueden ejercer sobre el cáncer de colon humano, que, a nivel mundial, es un padecimiento de alta incidencia y mortalidad. En el colon se lleva a cabo la fermentación bacteriana de la fibra, promoviendo la producción de ácidos grasos de cadena corta, como el acético, propiónico y butírico. En estudios *in vitro* se encontró que la mezcla de estos ácidos puede modular la expresión de genes implicados en el arresto del ciclo celular, proliferación celular, apoptosis y reparación del ADN. En este trabajo se simuló la digestión gastrointestinal del CU, y el potencial funcional de los productos de la fermentación colónica *in vitro* (FgE-CU), de la fracción no digerible, del café usado sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon SW480; determinando su mecanismo de acción.

IV. HIPOTESIS

Los productos de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado, por sus componentes bioactivos, son capaces de inhibir la sobrevivencia de células de cáncer de colon *in vitro*, a través de la inducción de apoptosis y arresto al ciclo celular.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de los productos de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café (*Coffea arabica* L.) usado, sobre células transformadas de colon humano y su mecanismo de acción.

V.2. Objetivos específicos

V.2.1. Caracterizar la composición química y nutracéutica del café usado.

V.2.2. Simular el proceso de digestión gastrointestinal y fermentación colónica del café usado, a través de un sistema *in vitro*.

V.2.3. Estudiar el efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* del café usado en células transformadas de colon humano.

V.2.3.1. Evaluar el extracto de la fermentación colónica *in vitro* del café usado, en la sobrevivencia de células transformadas de colon humano.

V.2.3.2. Determinar el mecanismo de acción involucrado en la inhibición de la sobrevivencia de células transformadas de colon humano.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Materiales

VI.1.1. Material biológico

Se trabajó con granos de café (GC) de la variedad *arábica* tostado americano, que consiste en un tostado medio, de la marca Tuytz (ecogurmet). Este fue cultivado en el estado de Chiapas, México y adquirido directamente con el fabricante.

Los residuos sólidos de café se obtuvieron como se describe a continuación: se tomaron 7 g de muestra (grano de café molido y tamizado con malla no. 40) por cada 100 ml de agua y se preparó la bebida de café en una cafetera convencional. Los residuos sólidos retenidos en el filtro de la cafetera fueron considerados café usado (CU). Posteriormente el residuo se secó a 60 °C por 24 horas y se almacenó, protegiéndose de la luz, en refrigeración hasta su uso.

Ratas macho de la cepa Wistar, se adquirieron del bioterio de la UNAM, Campus Juriquilla.

La línea celular de adenocarcinoma humano SW480, fue donada por la Dra. Maria Elena Maldonado Celis de la Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia, Colombia.

VI.1.2. Reactivos

Los solventes y sólidos mencionados a continuación se adquirieron en Sigma-Aldrich o en JT Baker. Acetonitrilo, ácido acético, ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄), amiloglucosidasa, 2-aminoetildifenilborato, antibiótica-antimicótico, 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), bicarbonato de sodio (NaHCO₃), carbonato de sodio (Na₂CO₃), cisteína, cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂·2 H₂O), cloruro de sodio NaCl, cloruro de potasio KCl, cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃·6 H₂O), 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), etanol, éter de petróleo, extracto de levadura, Folin-Ciocalteu, fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄), glucosa, hematina,

hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de sodio (NaOH), hiel de buey, metanol, pancreatina, PBS, pentobarbital, pepsina, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), persulfato de potasio (K₂S₂O₈), proteasa, sales biliares, suero fetal bovino, sulfato de cobre (CuSO₄), sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7 H₂O), sulfato de sodio (Na₂SO₄), tripsina, tween-80, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-5-triazine (TPTZ), vainillina, yoduro de propidio, agua destilada, agua grado HPLC y agua peptonada.

Estándares comerciales de Sigma-Aldrich: ácido ascórbico, ácido caféico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido sinápico, aluminio, calcio, (+)-catequina, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, rafinosa, rutina, sulfato férrico heptahidratado (FeSO₄·7 H₂O), tripsina, quercetina, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (trolox) y zinc. Colorantes comerciales de Sigma-Aldrich: rojo de metilo, verde de bromocresol y azul de tripano.

Kits: glucosa (Sigma-Aldrich), GSH/GSSG-Glo (PROMEGA), ApoTox-Glo (PROMEGA), Anexina-V-FLUOS (Roche) y MitoProbe (Invitrogen).

VI.1.3. Equipos

Los equipos pertenecen a la casa comercial Thermo Scientific. Baño maría, cámara de bioseguridad, centrifuga, espectrofotómetro ELISA varioskan flash, espectrofotómetro de absorción atómica, espectrofotómetro de emisión atómica, incubadora y mufla. Por otro lado, el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson), espectrofotómetro ELISA Gliomax (PROMEGA), microondas (LG), microscopio invertido eclipse Ti (Nikon), cromatografía de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD, Agilent).

VI.2. Métodos

VI.2.1. Composición química

La composición química (proteínas, lípidos, cenizas, humedad y minerales) en el GC y CU se realizó de acuerdo a las metodologías descritas para cada

determinación en la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2002. El contenido de carbohidratos (%) se obtuvo por diferencia de los componentes.

VI.2.1.1. Determinación de humedad

La humedad se determinó por el método 925.23 descrito en la AOAC (2002). Brevemente, en una cápsula de porcelana a peso constante, se pesaron 3 g de muestra. Posteriormente se introdujo a la estufa a 100 °C durante 30 minutos. Finalmente se dejó enfriar en desecador y se registró su peso.

$$\% \text{ humedad y materia volátil} = [(W1 + W2) - W3] * 100 / W2$$

donde:

W1 = peso inicial de la cápsula (g).

W2 = peso de la muestra (g).

W3 = peso final de la cápsula + muestra seca (g).

VI.2.1.2. Determinación de cenizas

El contenido de cenizas se determinó por el método 945.46 descrito en la AOAC (2002). Brevemente, en un crisol a peso constante se pesaron 4 g de muestra. Posteriormente se sometió a calcinación en una mufla a 550 – 600 °C durante 4 horas. Por último, se dejó enfriar en desecador y se registró su peso.

$$\% \text{ cenizas} = (W3 - W1) * 100 / W2$$

donde:

W1 = peso constante del crisol (g).

W2 = peso muestra (g).

W3 = peso crisol + cenizas (g).

VI.2.1.3. Determinación de lípidos

Los lípidos totales se determinaron por el método 920.39 descrito en la AOAC (2002). Brevemente, en un cartucho de celulosa se colocaron 3 g de muestra

y se cubrió con algodón para colocarse en el compartimento de extracción de Soxhlet donde el matraz, a peso constante, contuvo 2/3 partes de su volumen de éter de petróleo. Se mantuvo la extracción a un flujo de 10 reflujos/hora durante 4 horas. Posteriormente, el matraz se secó en estufa a 100 °C con la finalidad de retirar la humedad y residuos de solvente. Finalmente, el matraz se atemperó en desecador y se registró su peso.

$$\% \text{ lípidos} = (W3 - W1) * 100 / W2$$

donde:

W1 = peso inicial del matraz (g).

W2 = peso de la muestra (g).

W3 = peso final del matraz + lípidos (g).

VI.2.1.4. Determinación de proteína

La proteína se determinó empleando el método 920.15 descrito en la AOAC (2002). Brevemente, en un tubo de digestión tipo Kjeldhal se colocó 1 g de muestra, 3.5 g de Na₂SO₄, 0.4 g de CuSO₄ y 15 ml de H₂SO₄ concentrado. El tubo se colocó en el digestor por una hora. Pasado el tiempo se dejó atemperar y se prosiguió a destilar. Se adicionó 100 ml de agua HPLC y 50 ml de NaOH 40%. Se recibió el destilado en un matraz con 15 ml de H₂SO₄ 0.2 N. Se emplearon como indicadores rojo de metilo y verde de bromocresol. Se tituló con NaOH 0.2 N valorado previamente. Finalmente, se determinó el nitrógeno total multiplicado por 6.25, factor de conversión equivalente al porcentaje de proteína presente en el alimento.

$$\% \text{ nitrógeno} = [(A * B) - (C * D)] * 1.4 / E$$

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ Nitrógeno} * 6.25$$

donde:

A = Normalidad del ácido de la solución recibidora.

B = Volumen usado de la solución recibidora (ml).

C = Normalidad del hidróxido de sodio.

D = Volumen usado de hidróxido de sodio en la titulación de la muestra (ml).

E = peso de la muestra (g).

VI.2.1.5. Determinación de minerales

La cuantificación de aluminio, calcio, cobre, hierro, magnesio manganeso, potasio y zinc se realizó siguiendo la metodología descrita por Mussatto *et al.*, (2011a). Se utilizó un equipo de espectrofotometría de emisión atómica para determinar la concentración de potasio en las muestras y espectrofotometría de absorción atómica para los demás minerales. La concentración de minerales se expresó en mg/kg de muestra.

VI.2.2. Composición nutracéutica

La composición nutracéutica incluye la cuantificación de compuestos fenólicos: flavonoides totales, taninos condensados, fenoles totales y específicos (HPLC), capacidad antioxidante por los métodos de ABTS, DPPH y poder reductor férrico (FRAP); además de la fibra dietaria total, insoluble, soluble y almidón resistente. El análisis de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se realizó en el GC y CU y en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica del CU.

VI.2.2.1. Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico se llevó acabo de acuerdo a la metodología de Pavlovic *et al.*, (2013) con ligeras modificaciones. 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. Compuestos fenólicos

VI.2.2.2.1. Cuantificación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se cuantificaron siguiendo la metodología de Oomah *et al.*, (2005) con una adaptación a microplaca, donde a 50 µl de muestra se le adicionaron 180 µl de metanol y 20 µl de solución 2-aminoetildifenilborato al 1%. Se preparó un blanco con 50 µl del solvente usado en la muestra. La microplaca se leyó a una longitud de onda de 404 nm. Para la realización de la curva de calibración se utilizó el estándar de rutina en un intervalo de concentración de 0–400 µg/ml, la cual se preparó en metanol. La concentración de flavonoides se expresó como mg equivalentes de rutina /g de muestra.

VI.2.2.2.2. Cuantificación de taninos condensados

Los taninos condensados se cuantificaron de acuerdo a la metodología de Feregrino-Pérez *et al.*, (2008). Se adicionaron 200 µl del reactivo de vainillina 1% - HCl 4% (en proporción 1:1) de manera dosificada (50 µl) a 50 µl de muestra; posteriormente la microplaca se leyó a una longitud de onda de 540 nm. Se preparó un blanco con 50 µl del solvente usado en la muestra. La curva de calibración se realizó con el estándar de (+)-catequina en un intervalo de concentración de 0–0.8 mg/ml, la cual se preparó en metanol. La concentración de taninos condensados se expresó como mg equivalentes de (+)-catequina /g muestra.

VI.2.2.2.3. Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo por la técnica propuesta por Singleton y Rossi, (1965). Brevemente, a 50 µl de muestra, se le adicionó 250 µl de agua grado HPLC y después 125 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10). Se preparó un blanco con 50 µl del solvente usado en la muestra. La reacción fue neutralizada con 625 µl de Na₂CO₃ (70 g/l); posteriormente se incubó por 2 horas en oscuridad. La reacción se leyó a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados fueron comparados con una curva de calibración usando el ácido clorogénico (0-

500 µg/ml) como estándar. El contenido de fenoles totales se expresó como mg equivalentes de ácido clorogénico /g de muestra.

VI.2.2.2.4. Cuantificación de compuestos fenólicos específicos por HPLC

La cuantificación de compuestos fenólicos específicos se realizó siguiendo la metodología propuesta por Cardador-Martínez *et al.*, (2002) y Ramírez-Jiménez *et al.*, (2014). Brevemente, las muestras se filtraron e inyectaron en el equipo de HPLC-DAD bajo las siguientes condiciones. Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, 4. 6 x 150 mm, 5.0 micras). La columna fue controlada por termostato a una temperatura de 35 °C ± 0.6 y la tasa de flujo se ajustó a 1 ml/min. La fase móvil consistió de dos disolventes: el disolvente A fue agua ajustada con ácido acético al 1% y el disolvente B fue acetonitrilo grado HPLC. Un gradiente lineal se utilizó como se describe a continuación: se mantuvo una relación de la concentración del disolvente A con el disolvente B 80:20% respectivamente durante 7 min, 83:17% por 5 min, 60:40% por 1 min, 50:50% por 2 min y finalmente 85:15% durante 2 min. La detección se realizó a una longitud de onda de 280 nm con una velocidad de adquisición de 1 s e inyectándose un volumen de 40 µl. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método de estándar externo con los estándares comerciales: ácido ascórbico, ácido caféico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido sinápico, (+)-catequina, rutina, quercetina (0-1 mg/ml). El contenido de compuestos fenólicos específicos se expresó como µg equivalentes del estándar /g de muestra.

VI.2.2.3. Capacidad antioxidante

VI.2.2.3.1. Cuantificación de capacidad antioxidante por ABTS

Se determinó la capacidad antioxidante por el método de ABTS en microplaca descrita por Nenadis *et al.*, (2004). Se preparó una solución acuosa 7 mM de ABTS y una solución de K₂S₂O₈ 140 mM, de los cuales se mezclaron 5 ml y 88 µl, respectivamente. La mezcla anterior se incubó por 12 horas en oscuridad para propiciar la generación del radical. Pasado el tiempo, se tomaron 500 µl de la mezcla

y se le agregó 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. A una microplaca de 96 pozos, se adicionaron 20 μ l de muestra y un control con 20 μ l del solvente usado en la muestra. Posteriormente se adicionaron 230 μ l de ABTS a cada pozo. Los valores fueron comparados contra una curva de calibración usando trolox (0-600 μ M/ml) como estándar. Los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como μ mol equivalentes de trolox /g de muestra.

VI.2.2.3.2. Cuantificación de capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante por el método DPPH se determinó por la técnica propuesta por Fukumoto y Mazza, (2000), con adaptación a microplaca. Se añadieron 20 μ l de muestra y 200 μ l de solución DPPH en una microplaca de 96 pozos; además se preparó un control con 20 μ l del solvente usado en la muestra y 200 μ l de DPPH. Las muestras se leyeron cada 10 min durante 90 min a una longitud de onda de 520 nm. Los valores fueron comparados contra una curva de calibración con trolox (0-800 μ M/ml) como estándar. Los resultados fueron expresados como μ mol equivalentes de trolox /g de muestra.

VI.2.2.3.3. Cuantificación de capacidad antioxidante por FRAP

La capacidad antioxidante por el método de FRAP se determinó por la técnica propuesta por Russo *et al.*, (2012). Se añadieron 25 μ l de muestra y 175 μ l del reactivo de FRAP; además se usó un blanco con 200 μ l del solvente usado en la muestra. El reactivo de FRAP se preparó con las siguientes soluciones: solución acuosa de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 20 mM y solución ácida de TPTZ (XX) 10 Mm (en ácido clorhídrico 40 Mm). Las muestras se leyeron cada 10 min durante 90 min a una longitud de onda de 595 nm. Los valores fueron comparados contra una curva de calibración usando $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0-2500 μ M/ml) como estándar. Los resultados fueron expresados como μ mol equivalentes de Fe^{2+} /g de muestra.

VI.2.2.4. Fibra dietaria

La fibra dietaria se cuantificó en el GC y CU. La fibra total se determinó por la suma de la fibra insoluble y soluble.

VI.2.2.4.1. Cuantificación de fibra dietaria insoluble

La fibra dietaria insoluble se cuantificó de acuerdo a la metodología establecida por Shiga *et al.*, (2003). A 1 g de muestra desgrasada y tamizada en malla no. 40 se adicionaron 50 ml de solución amortiguadora de fosfato 0.08 mM a pH 6 y 100 µl de α-amilasa. El frasco se protegió de la luz mientras se incubó en baño María a 95 °C por 30 min, después, se agitó cada 5 minutos ajustando el pH a 7.5 con la muestra atemperada. Se adicionaron 100 µl de proteasa (5 mg/ml) y nuevamente se incubó en baño María a 60 °C por 30 min con agitación continua, pasado el tiempo se justó el pH a 4 con la muestra atemperada. Enseguida se adicionaron 300 µl de amiloglucosidasa y se incubó por 30 min a 60 °C con agitación continua. Finalizada la incubación se filtró en papel Whatman no. 4 previamente pesado. Se realizaron 2 lavados con 15 ml agua a 60 °C y 2 lavados con 15 ml de etanol al 80%. El filtro se secó a 60 °C por 24 horas; pasado el tiempo se registró su peso. La fibra insoluble fue lo que permaneció en el filtro.

$$\% \text{ fibra dietaria insoluble} = (W1 - W2) * 100 / W2$$

donde:

W1 = peso del papel con muestra (g).

W2 = peso del papel (g).

W3 = peso de la muestra (g).

VI.2.2.4.2. Cuantificación de fibra soluble

De la prueba anterior, se conservó el residuo del filtrado y se adicionó un volumen igual de etanol al 80%, dejándose en reposo por 12 horas. Se filtró en papel Whatman no. 4, previamente pesado. Se hicieron 2 lavados con 15 ml de etanol al

80% y 2 lavados con 15 ml de acetona. Se dejó secar el papel filtro por 24 horas a 60 °C y se registró su peso.

$$\% \text{ fibra dietaria soluble} = (W1 - W2) * 100 / W2$$

donde:

W1 = peso del papel con muestra (g).

W2 = peso del papel (g).

W3 = peso de la muestra (g).

VI.2.2.4.3. Cuantificación de almidón resistente

La cuantificación de almidón resistente se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Saura-Calixto *et al.*, (1993) y Shiga *et al.*, (2003). Se utilizó la fracción insoluble de los pasos anteriores. Se raspó el filtro hasta obtener 100 mg de muestra a la cual se le adicionó 6 ml de KOH 2 M. Se incubó a 25 °C por 30 min en agitación continua. Se adicionaron 3 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0.4 M, pH 4.73) a la muestra atemperada. Se ajustó el pH a 4.75 y se adicionaron 60 µl de amiloglucosidasa. Nuevamente se incubó a 60 °C por 30 min en agitación continua. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. La pastilla fue lavada dos veces con agua grado HPLC y el agua de lavado junto con el sobrenadante se aforó a 100 ml. El almidón resistente se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación a partir de una curva de calibración usando glucosa (0-140 µg/ml) como estándar.

$$\% \text{ almidón resistente} = \frac{\text{glucosa } (\mu\text{g/mL}) \times \text{volumen de aforo} \times 100 \times 0.9}{1000 \times \text{peso de la muestra (mg)}}$$

VI.2.3. Digestión gastrointestinal *in vitro*

En esta parte se simuló todo el proceso digestivo (desde la boca hasta su fermentación en el colón) del CU. A continuación, se describe la metodología adaptada por Campos-Vega *et al.*, (2015), por partes (boca, estómago, intestino y

fermentación en el colón). Cabe destacar que esta simulación se llevó a cabo de manera *in vitro* empleando diferentes enzimas (α -amilasa salival obtenida de la boca de personas sanas, la pepsina y pancreatina de origen porcino y las sales biliares) y *ex vivo* usando el yeyuno intestinal de rata.

VI.2.3.1. Simulación de las condiciones de la boca

Se reunieron a 4 voluntarios sanos: dos hombres y dos mujeres, los cuales consumieron su último alimento al menos 90 minutos antes del inicio del ensayo. Se enjuagaron la boca con agua justo antes de masticar la muestra.

Los 4 voluntarios masticaron 1 gramo de CU 15 veces, durante 15 segundos, descargando el contenido en un vaso de precipitados conteniendo 5 ml de agua grado HPLC. Inmediatamente después, cada sujeto se enjuagó la boca por 60 segundos con otros 5 ml de agua grado HPLC, 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 el cual consistió únicamente en agua grado HPLC en lugar de muestra y se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

VI.2.3.2. Simulación de las condiciones del estomago

A 10 ml de la suspensión anterior se le ajustó el pH a 2 con HCl 2N; posteriormente se le adicionó 0.055 g de pepsina disuelta en 0.94 ml de HCl 20mM. Esta mezcla, conocida como extracto estomacal, se incubó en agitación durante 2 horas a 37 °C.

VI.2.3.3. Simulación de las condiciones del intestino delgado

Un extracto intestinal fue preparado por dilución de 3 mg de hiel de buey más 2.6 mg de pancreatina disueltos en 5 ml de solución amortiguadora 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 (preparado 30 min antes de utilizarse)]. El extracto intestinal se añadió al extracto estomacal y la suspensión

fue transferida a un recipiente que contuvo un saco intestinal invertido.

VI.2.3.3.1. Técnica del saco intestinal invertido

El saco intestinal invertido se preparó adaptando la metodología descrita por Patil *et al.*, (2010), de la siguiente manera.

VI.2.3.3.2. Manejo de los animales

Para llevar a cabo esta técnica se emplearon ratas macho de la cepa Wistar clínicamente sanas, con un peso de 250-300 g y 12 horas de ayuno. Al llegar se verificó el sexo de las ratas, el peso y la constancia de salud.

VI.2.3.3.3. Sacrificio de animales y elaboración del saco intestinal invertido

Para el sacrificio, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (60 mg/kg). El intestino fue expuesto por una incisión abdominal en la línea media, y un segmento de 20-25 cm del yeyuno proximal de cada rata fue escindido y colocado en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer gasificado con CO₂ a 37°C. El segmento de intestino removido se lavó con la misma solución amortiguadora para retirar los residuos. Posteriormente el intestino se volteó suavemente sobre una varilla de vidrio para después cortarse en segmentos de aproximadamente 6 cm, los cuales, se ligaron de un extremo (este procedimiento se realizó con los segmentos de intestino sumergidos en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer para evitar que el tejido perdiera viabilidad). El intestino se llenó con 2 ml de solución amortiguadora de Krebs-Ringer y se ligó el otro extremo del intestino para crear un saco; el cual, fue inmediatamente introducido en la mezcla de extractos anteriormente mencionada. Se incubó en baño maría a 37 °C, atmosfera anaerobia (CO₂) y en agitación continua durante 15, 30, 60 y 120 min. Después del periodo de incubación, los sacos fueron retirados y la parte de las muestras contenida en el recipiente (posterior a retirar el saco intestinal), se denominó fracción no digerible (FND), la cual fue sometida a una fermentación colónica *in vitro*.

VI.2.3.3.4. Ensayo de viabilidad

La viabilidad del saco intestinal invertido se determinó siguiendo la metodología de Li *et al.*, (2011). Brevemente, al intestino invertido y ligado por un extremo se le introdujeron 2 ml de solución amortiguadora de Krebs-Ringer sin glucosa y se ligó por el otro extremo para crear un saco; el cual, fue sumergido en 16 ml de solución amortiguadora de Krebs-Ringer con glucosa. Lo anterior se incubó en un baño a 37 °C, atmósfera anaerobia (CO₂) y en agitación continua durante 15, 30, 60 y 120 min. La concentración de glucosa se cuantificó a una longitud de onda de 540 nm usando un kit tanto en la FND como en la solución dentro del saco intestinal invertido. Los valores fueron comparados contra una curva de calibración usando glucosa (0-140 µg/ml) como estándar. Los resultados fueron expresados como Relación del lado basolateral con el lado apical por tiempo.

VI.2.3.3.5. Determinación del flujo de agua

El flujo de agua, resultado de la absorción y flujo de salida del agua en un sistema de saco intestinal invertido se determinó de acuerdo a lo descrito por Khemiss *et al.*, (2009). El registro del peso generado de la técnica de saco intestinal invertido fue usado en la siguiente ecuación para determinar el flujo de agua. Los resultados fueron expresados como g de agua /g de intestino fresco.

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

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

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

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

VI.2.3.4. Simulación de fermentación colónica *in vitro* de la FND

El método de fermentación colónica *in vitro* se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Campos-Vega *et al.*, (2009). Se empleó la rafinosa (100 mg) como control positivo de carbohidrato fermentable; mientras que, como control negativo se consideró el blanco del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mencionado

anteriormente, sin carbohidrato disponible para ser fermentado. El inóculo fecal humano, empleado como fuente de flora bacteriana representativa del colon, se obtuvo de dos individuos voluntarios sanos, hombre y mujer, en su primera evacuación del día. Los individuos, con peso normal, debieron presentar ausencia de enfermedades gastrointestinales, sin haber consumido antibiótico en los 3 meses previos a la toma de muestra. Se prepararon tubos estériles con 9 ml de medio de cultivo basal, el cual se compuso de lo siguiente (g/l): agua peptonada 2.0, extracto de levadura 2.0, NaCl 0.1, K₂HPO₄ 0.04, KH₂PO₄ 0.04, MgSO₄ 7 H₂O 0.01, CaCl₂ 2H₂O 0.01, Na₂CO₃ 2.0, cisteína, HCl 0.5, sales biliares 0.5, Tween-80 2 ml y hematina 0.2 g (previamente diluida en 5 ml de NaOH). Los tubos se sellaron y se mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia usando una mezcla de gases (H₂-CO₂-N₂: 10:10:80, volumen) durante 30 min. El inóculo fecal (3 g de materia fresca) se homogeneizó con 27 ml de solución de fosfato de sodio 1 M a pH 7.0. Los tubos con el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 ml de homogeneizado fecal; además se le adicionó FND proveniente de muestra (0.5 g del precipitado sólido y 0.5 ml del sobrenadante líquido), del blanco (1ml) o rafinosa (100 mg). Se agitaron los tubos en vortex durante 30 s y se incubaron en baño maría a 37 °C bajo un flujo de mezcla de gases durante 6, 12 y 24 h. Se midió el pH a las 0, 6, 12 y 24 h. Los productos de la fermentación colónica se almacenaron a -70 °C en ultracongelador.

VI.2.4. Cultivo celular

Las células SW480 se manejaron en una cámara de bioseguridad donde se cultivaron en medio base DMEM (Gibco) adicionado con suero fetal bovino (10% Gibco), antibióticos- y antimicóticos (1% Gibco). El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada 48 horas hasta alcanzar la confluencia. Las células se mantuvieron bajo una atmósfera humificada con CO₂ al 5% a 37 °C en una incubadora con cámara de gasificación automática.

VI.2.4.1. Elaboración de la curva dosis-respuesta

Las células se sembraron en cajas de 24 pozos (15×10^3 células/pozo) en medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino al 10%. A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por el extracto de la fermentación del CU (FgE-CU), filtrado con membrana de 0.22 micras, a las siguientes concentraciones 3.75, 7.5, 15, 30 y 60%, disueltos en medio con suero fetal bovino al 5%. Se incluyeron controles negativo y positivo (ausencia de tratamiento y con peróxido de hidrógeno al 20%, respectivamente). Después de 24 h de tratamiento el medio de cultivo se aspiró y las células se cosecharon con tripsina (tripsina 1X, Sigma-Aldrich) por 7 minutos para contabilizarse en un hemocitómetro. Se utilizó azul de tripano al 0.4% en una proporción 1:1 del medio con células. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia para obtener la concentración letal cincuenta (CL_{50}), que se refiere a la concentración necesaria del FgE-CU para inhibir la sobrevivencia del 50% de la población celular sometida al tratamiento (Campos-Vega *et al.*, 2009). El porcentaje de sobrevivencia se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% \text{ sobrevivencia} = (\# \text{ células viables}) * 100 / \# \text{ células no viables}$$

VI.2.4.2. Cuantificación de la actividad de la caspasa 3

La actividad de la caspasa 3 se determinó siguiendo la metodología del kit de ApoTox-Glo (PROMEGA). Brevemente, las células se sembraron en microplaca estéril de 96 pozos (5×10^3 células/pozo) en medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino al 10%. A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por el FgE-CU, filtrado, a tres concentraciones: 3.75, 7.5 y 15% en medio con suero fetal bovino al 5%, incluyéndose controles negativo y positivo, anteriormente mencionados. Después de 24 h de tratamiento se adicionaron 20 μ l del reactivo de viabilidad/citotoxicidad y se incubó por 30 min a 37 °C. Pasado el tiempo se añadieron 100 μ l del reactivo de caspasa-glo 3/7 y se volvió a incubar por 30 min a temperatura ambiente. La actividad de la caspasa 3 se cuantificó por medición de

la luminiscencia. Los resultados fueron expresados como unidades relativas de luminiscencia (URL).

VI.2.4.3. Cuantificación del contenido de glutatión

La actividad del glutatión se determinó siguiendo la metodología descrita en el kit de GSH/GSSG-Glo (PROMEGA). Brevemente, las células se sembraron en microplaca estéril de 96 pozos (5×10^3 células/pozo) en medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino al 10%. A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por el FgE-CU, filtrado, a tres concentraciones: 3.75, 7.5 y 15% en medio con suero fetal bovino al 5%, incluyéndose controles negativo y positivo, anteriormente mencionados. Después de 24 h de tratamiento el medio se removió y se adicionó a la microplaca 50 μ l del reactivo de glutatión total u oxidado. Después de 5 minutos se añadieron 50 μ l del reactivo generador de luciferina y se incubó por 30 min. Por último, se añadieron 100 μ l del reactivo detector de luciferina y se volvió a incubar por 15 min. El contenido de glutatión se cuantificó por medición de la luminiscencia. Los resultados fueron expresados como unidades relativas de luminiscencia (URL). El cálculo de la relación del glutatión reducido (GSH) con el oxidado (GSSG) se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{Relación GSH/GSSG} = \frac{\text{URL de glutatión total} - \text{URL de glutatión GSSG}}{(\text{URL de glutatión GSSG} / 2)}$$

VI.2.4.4. Ensayos de citometría de flujo

VI.2.4.4.1. Cuantificación del DNA en las fases del ciclo celular

El contenido de DNA en las fases del ciclo celular se cuantificó siguiendo la metodología del kit MitoProbe (Invitrogen). Brevemente las células se sembraron en caja de 6 pozos (1×10^6 células/pozo) en medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino al 10%. A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por el FgE-CU, filtrado, a tres concentraciones: 3.75, 7.5 y 15% en medio con suero fetal bovino al 5%, incluyéndose controles negativo y positivo, anteriormente mencionados. Después de 24 h de tratamiento el medio se recuperó y la caja se lavó con 1 ml de

PBS 1X el cual fue recuperado también. Las células adheridas a la caja se cosecharon con tripsina 1X por 7 minutos. Las células tripsinizadas más los mililitros recuperados se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min a 30 °C. El sobrenadante se removió y la pastilla se lavó 2 veces con 2ml de PBS 1X. Se centrifugó nuevamente removiéndose el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de PBS: metanol (en una relación 1:9 en volumen). Se incubó por 2 horas a -20 °C. Pasado el tiempo se centrifugó a 1800 rpm durante 5 min a -4 °C. La pastilla se lavó 2 veces con PBS 1X y se resuspendió en 0.3 ml de PBS 1X, al cual, se le adicionó 5 µg/ml de yoduro de propidio, incubándose por última vez durante 15 min. La lectura en el citómetro fue de 10,000 células. Los resultados fueron expresados en porcentaje de DNA/100% de células en las cuatro fases del ciclo celular (G0, G1, S, G2).

VI.2.4.4.2. Cuantificación del daño en la membrana mitocondrial por DIOC-6

La detección del daño en la membrana fue medida por cuantificación del 3,3'-dietiloxacarbocianina yoduro (DIOC-6) siguiendo la metodología descrita en el kit de MitoProbe. Brevemente las células se sembraron en caja de 6 pozos (1 x 10⁶ células/pozo) en medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino al 10%. A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por el FgE-CU, filtrado, a tres concentraciones: 3.75, 7.5 y 15% en medio con suero fetal bovino al 5%, incluyéndose controles negativo y positivo, anteriormente mencionados. Después de 24 h de tratamiento el medio se recuperó y la caja se lavó con 1 ml de PBS 1X el cual fue recuperado también. Las células adheridas a la caja se cosecharon con tripsina 1X por 7 minutos. Las células tripsinizadas más los mililitros recuperados se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min a 30 °C. El sobrenadante se removió y la pastilla se lavó con 2ml de PBS 1X. Se centrifugó nuevamente removiéndose el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 0.5 ml de PBS 1X, al cual se le adicionó 200-300 nM de DIOC-6 y 5 µg/ml de yoduro de propidio. La lectura en el citómetro fue de 10,000 células. Los resultados fueron expresados en porcentaje de células/100%.

1	2
3	4

Los cuadrantes 1 y 2 representan las células muertas por necrosis.

El cuadrante 3 representa las células en apoptosis (aparente).

El cuadrante 4 representa las células viables.

VI.2.4.4.3. Cuantificación de apoptosis por anexina V

La detección de apoptosis fue medida por cuantificación de anexina-V-fluoresceína siguiendo la metodología descrita en el kit de anexina-V-FLUOS. Brevemente las células se sembraron en caja de 6 pozos (1×10^6 células/pozo) en medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino al 10%. A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por el FgE-CU, filtrado, a tres concentraciones: 3.75, 7.5 y 15% en medio con suero fetal bovino al 5%, incluyéndose controles negativo y positivo, anteriormente mencionados. Después de 24 h de tratamiento el medio se recuperó y la caja se lavó con 1 ml de PBS 1X el cual fue recuperado también. Las células adheridas a la caja se cosecharon con tripsina 1X por 7 minutos. Las células tripsinizadas más los mililitros recuperados se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min a 30 °C. El sobrenadante se removió y la pastilla se lavó con 2ml de PBS 1X. Se volvió a centrifugar removiéndose el sobrenadante y la pastilla se resuspendiendo en 1 ml de solución amortiguadora 1X. Se sometió a incubación por 15 min a 30 °C. Pasado el tiempo se centrifugó, removiéndose el sobrenadante y la pastilla se lavó con 2 ml de PBS 1X, se volvió a centrifugar resuspendiendo la pastilla en 0.5 ml de PBS 1X, al cual, se le adicionó 5 µg/ml de yoduro de propidio. La lectura en el citómetro fue de 10,000 células. Los resultados fueron expresados en porcentaje de células/100%.

1	2
3	4

El cuadrante 1 las células muertas por necrosis.

El cuadrante 3 representa las células viables.

Los cuadrantes 2 y 4 representan las células en apoptosis.

VI.3. Análisis estadístico

Para determinar el efecto del extracto de la fermentación sobre las líneas celulares se usó un diseño al azar. Se realizó un análisis de regresión lineal de los datos para el cálculo de la concentración letal cincuenta. Las citometrías de flujo se analizaron con el programa Flow Jo 7.6.2. Finalmente, para el análisis de los datos en general se realizó una comparación de medias \pm el error estándar, seguido de la prueba de Tukey y de Dunnet cuando se compare el tratamiento con respecto al control, empleando el programa estadístico JMP 8.0.1.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

El contenido de humedad, cenizas, proteínas, lípidos y carbohidratos del GC y CU se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Composición química del grano de café y café usado.

Parámetro	Grano de café	Café usado
Humedad	3.6 ± 0.0 ^a	5.4 ± 0.0 ^b
Cenizas	6.9 ± 0.1 ^a	2.7 ± 0.1 ^b
Proteínas	14.5 ± 0.3 ^a	16.2 ± 0.2 ^b
Lípidos	14.9 ± 0.1 ^a	18.1 ± 0.1 ^b
Carbohidratos	60.4 ± 0.3 ^a	57.4 ± 0.3 ^b

Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado ± ES, expresados como porcentaje en base seca/gramo de muestra. Letras diferentes por renglón expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

El contenido de humedad del CU fue estadísticamente mayor en comparación con el GC, los cuales fueron del 5.4 y 3.6%, respectivamente, esto podría deberse a que el agua con el que se prepara la bebida de café no es eliminada por completo del CU, a pesar del secado previo al que es sometido antes del análisis.

El porcentaje de proteínas fue estadísticamente mayor en el CU con valor de 16.2% en comparación con el GC el cual fue de 14.5%. Ballesteros *et al.*, (2014), reportaron un contenido de proteína en CU del 17.44%; Vardon *et al.*, (2013), también reportaron un contenido de proteína en el CU del 15.4%; mientras que Mussatto *et al.*, (2011a), y Ravindranath *et al.*, (1972), para el mismo residuo fue de alrededor del 13.6-14%. Estas diferencias pueden ser atribuidas a las variedades de los granos utilizados, su cosecha, su proceso de tostado y a las diferentes maneras de obtener el CU. En el caso del GC el resultado fue ligeramente mayor a lo reportado por Belitz *et al.*, (2009), con un porcentaje del 8.5-12%.

En cuanto al contenido de lípidos, el resultado de CU se observó estadísticamente mayor en comparación con el GC, cuyos valores fueron del 18.1 y 14.9%, respectivamente. Ballesteros *et al.*, (2014), reportaron para CU un contenido lipídico de 2.29%, cuyo valor se encontró por debajo de lo reportado en

este estudio; al igual que lo reportado por Vardon *et al.*, (2013), cuyo valor fue de 16.2%. Los resultados del GC se encontraron ligeramente por debajo de lo reportado por Belitz *et al.*, (2009), que fue del 15-18%. Nuevamente las diferencias entre autores pueden atribuirse a las variedades de los granos utilizados, su cosecha, su proceso de tostado y a las diferentes maneras de obtener el CU.

Los carbohidratos son el componente más abundante del GC y CU (60.4 y 57.4%, respectivamente). Es importante mencionar que no se encontraron reportes del contenido de carbohidratos totales en el CU. En ambas muestras, los azúcares se polimerizan en celulosa y estructuras de hemicelulosa. Los polisacáridos más abundantes del café son los arabinogalactanos, galactomananos, y celulosa (Arya y Rao, 2007).

El contenido de azúcares presentes en el CU reportado por Ballesteros *et al.*, (2014), fueron de 12.4 g de celulosa o glucosa, 39.1 g de hemicelulosa, 19.07 g de manosa, 16.43 g de galactosa y 3.6 g de arabinose / 100g en peso seco; Mussatto *et al.*, (2011a), reportaron para CU un contenido de 8.6 g de celulosa, 36.7 g de hemicelulosa, 1.7 g de arabinosa, 13.8 g de galactosa y 21.2 g de manosa. Los valores difieren entre autores debido al proceso de extracción y variedad de granos de café utilizados, por ejemplo, Belitz *et al.*, (2009), reportaron un contenido de carbohidratos en el GC del 9-12.5%, estos valores se encontraron por debajo de lo encontrado en este trabajo.

El contenido de cenizas del CU (2.7%) se observó en mayor porcentaje en comparación con el GC (6.9%). Los resultados de CU se encontraron por encima de lo reportado por Ballesteros *et al.*, (2014), cuyo resultado fue de 1.3%; Mussatto *et al.*, (2011a), reportaron para CU un contenido de cenizas de 1.6 g. Belitz *et al.*, (2009), reportaron para GC un porcentaje de cenizas del 3-5.4%, este rango de valor fue menor a lo encontrado en este estudio.

Las cenizas son la medida total de componentes inorgánicos presentes en la muestra. Estos compuestos inorgánicos, mejor conocidos como minerales, son considerados micronutrientes esenciales para la salud humana debido a que participan en procesos biológicos del cuerpo humano. Una variedad de elementos minerales incluyendo potasio, calcio, hierro, manganeso, cobre, zinc, magnesio,

aluminio del GC y CU se observa en el Cuadro 7, y son parte de la composición química de las cenizas.

Cuadro 7. Contenido de minerales en el grano de café y café usado.

Parámetro	Grano de café	Café usado
Potasio	15210.0 ± 320.0 ^a	3640.0 ± 60.0 ^b
Calcio	1720.0 ± 20.0 ^a	1840.0 ± 10.0 ^b
Hierro	35.8 ± 2.6 ^a	38.5 ± 1.6 ^a
Manganeso	24.3 ± 2.3 ^a	21.7 ± 0.1 ^b
Cobre	11.5 ± 0.3 ^a	12.7 ± 0.0 ^b
Zinc	4.4 ± 0.1 ^a	4.2 ± 0.0 ^b
Magnesio	2240.0 ± 40.0 ^a	1560.0 ± 10.0 ^b
Aluminio	17.0 ± 0.3 ^a	11.6 ± 0.0 ^b

Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado ± ES, expresados como mg/kg de muestra. Letras diferentes por renglón expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Los minerales mayoritarios, en ambas muestras, fueron potasio, magnesio y calcio, del 15210, 2240 y 1720 mg/kg de peso seco respectivamente en GC, mientras que para CU fueron de 3640, 1560 y 1840 mg/kg de peso seco, respectivamente. El contenido de calcio y cobre se encontraron en mayor porcentaje en el CU, en comparación con el GC; mientras que el contenido de hierro en ambas muestras fue estadísticamente igual. Comparando los resultados obtenidos con los valores en la literatura se encuentra discrepancia entre ellos, algunos se presentan en mayor concentración que otros.

Mussatto *et al.*, (2011a) reportaron los siguientes porcentajes de minerales presentes en el CU: potasio de 3549.0 mg, magnesio de 1293.3 mg, calcio de 777.4 mg, aluminio de 279.3 mg, hierro de 118.7 mg, manganeso de 40.1 mg, cobre de 32.3 mg y zinc de 15.1 mg. También, Ballesteros *et al.*, (2014), reportaron la siguiente composición de minerales en el CU: potasio 11700 mg, magnesio 1900 mg, calcio 1200 mg, cobre 18.66 mg, hierro 52 mg, manganeso 28.80 mg, zinc 8.4 mg, aluminio 22.3 mg/kg de peso seco; además cuantificaron los minerales: azufre, fósforo, estroncio, bario, sodio, boro, cobalto, yodo, níquel, cromo, molibdeno, vanadio, selenio, galio, estaño y cadmio. Además, Vardon *et al.*, (2013), reportaron los siguientes porcentajes de minerales en el CU: potasio del 0.81%, calcio 0.20%, magnesio 0.20%, manganeso 42 ppm, cobre 23 ppm. En la literatura el contenido de minerales totales del GC reportado por Belitz *et al.*, (2009), fue de 3-5.7%.

Los minerales regulan múltiples funciones metabólicas y fisiológicas del cuerpo humano incluyendo las actividades hormonales y enzimáticas, el equilibrio de electrolitos y el crecimiento normal (Kuan *et al.*, 2011). Estos minerales también apoyan los procesos vitales como la respiración, la digestión y la circulación. Por lo tanto, los micronutrientes que se encuentran en el CU podrían ser añadidos a los alimentos o para la producción de nuevos productos ricos en nutrientes.

Se ha mostrado que el CU tiene alto contenido de polisacáridos, proteínas y minerales, mostrando su valor biotecnológico para ser utilizado, por ejemplo, como sustratos o soportes sólidos en procesos fermentativos para la extracción y producción de compuestos con importantes aplicaciones en la comida e industrias farmacéuticas (Mussatto *et al.*, 2011a).

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

La fibra dietética incluyendo celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, gomas y mucílagos, se conocen como la parte comestible de plantas que es resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso (Betancur-Ancona *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos del contenido de fibra total, insoluble, soluble y almidón resistente del GC y CU muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Contenido de fibra total, fibra soluble, fibra insoluble y almidón resistente en el grano de café y café usado.

Parámetro	Grano de café	Café usado
Fibra Total	48.6 ± 0.1 ^a	53.9 ± 0.1 ^b
Fibra Soluble	2.4 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^b
Fibra Insoluble	46.2 ± 0.1 ^a	52.8 ± 0.0 ^b
Almidón resistente	6.0 ± 0.0 ^a	6.1 ± 0.0 ^b

Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado ± ES, expresados como porcentaje en base seca/gramo de muestra. Letras diferentes por renglón expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

En cuanto al contenido total de fibra se encontró significativamente mayor en el CU en comparación con el GC (53.9 y 48.6%, respectivamente). El porcentaje del CU fue ligeramente menor a lo reportado por Ferreira *et al.*, (2012), el cual fue

de 64.19%, Ballesteros *et al.*, (2014), también reportaron fibra total en el CU de 60.46% y Murthy y Naidu, (2012b), en el mismo residuo de 43%.

El contenido de fibra soluble en el CU, de 1.1%, fue estadísticamente menor comparado con el GC, del 2.4%; caso contrario pasó en el contenido de fibra insoluble, siendo del 52.8% para CU y del 46.2% para GC. Los valores de fibra soluble e insoluble del CU se muestran diferentes lo reportado por Ferreira *et al.*, (2012), los cuales fueron de 0.58 y 63.61% de fibra dietaria soluble e insoluble, respectivamente. Estas diferencias se pueden deber a que ellos aplicaron al CU un tratamiento previo usando H₂O₂ para modificar sus propiedades de hidratación, ya que las investigaciones han demostrado que la acción del peróxido de hidrógeno provoca la remoción de lignina por solubilización y al mismo tiempo, interviene en la destrucción de la estructura cristalina de la celulosa promoviendo un aumento del grado de hidratación de la misma (Gould, 1985). De igual manera Ballesteros *et al.*, (2014), reportaron cantidades más altas de fibra soluble e insoluble en el CU del 9.68 y 50.78%, respectivamente. Murthy y Naidu, (2012b), también reportaron un contenido en el CU de fibra soluble e insoluble del 8 y 35%, respectivamente.

El contenido de fibra soluble e insoluble en las muestras es justificable debido a la celulosa, hemicelulosa y lignina que contienen (Borrelli *et al.*, 2004). Es importante mencionar que cada tipo de fibra (insoluble y soluble) tiene propiedades específicas. La fibra soluble posee alta capacidad de retención de agua, promueve la creación de la flora bacteriana, y disminuye la absorción de grasas y azúcares, por lo tanto, esta fibra podría ser utilizada directamente en productos alimenticios que contribuyen a la estabilización de la estructura de los alimentos. Por otra parte, la fibra insoluble tiene baja retención de agua, acelera el movimiento de alimentos a través del sistema digestivo, y promueve la regularidad heces.

En cuanto al contenido de almidón resistente se observó ligeramente mayor contenido en el CU en comparación con el GC (6.1 y 6.0%, respectivamente). No se encontraron en la literatura valores de almidón resistente.

En este estudio se observó que el CU es un material con abundante fibra soluble e insoluble y, por lo tanto, tienen un gran potencial para ser utilizado como materia prima en el desarrollo de alimentos funcionales.

VII.3. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del grano de café y café usado

En el Cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados y la capacidad antioxidante medida por DPPH, ABTS y FRAP en el GC y CU.

Cuadro 9. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del grano de café y café usado.

Muestra	Concentración ^a			Capacidad antioxidante ^b		
	Fenoles	Flavonoides	Taninos Condensados	DPPH	ABTS	FRAP
Grano de café	56.4 ± 0.0 ^a	31.6 ± 0.0 ^a	179.7 ± 0.0 ^a	302.2 ± 17.0 ^a	249.4 ± 12.4 ^a	4266.7 ± 0.2 ^a
Café usado	26.2 ± 0.0 ^b	13.0 ± 0.0 ^b	107.1 ± 0.0 ^b	172.3 ± 3.5 ^b	159.0 ± 8.2 ^b	2425.5 ± 0.0 ^b

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. ^aLa concentración de los compuestos fenólicos son expresados en mg equivalentes de ácido clorogénico, rutina, (+)-catequina por gramo de muestra para fenoles, flavonoides y taninos condensados, respectivamente. ^bLa capacidad antioxidante de DPPH y ABTS es expresada como $\mu\text{moles eq de trolox}$ y FRAP es expresada como $\mu\text{moles eq Fe}^{2+}$. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

El mayor contenido de fenoles totales se presentó en el GC en comparación con el CU (56.4 y 26.2 mg, respectivamente). Esta tendencia se repitió en el contenido de flavonoides (31.6 mg en GC, 13.0 mg en CU) y taninos condensados (179.7 mg en GC y 107.1 mg en CU). Estos resultados eran de esperarse ya que los compuestos fenólicos tienen alta solubilidad en el agua caliente y son transportados a la bebida de café.

Los resultados de fenoles totales para CU se encontraron por encima de lo reportado por los siguientes autores: Campos-Vega *et al.*, (2015), con valores de 10.3 mg; Murthy y Naidu, (2012b), los cuales reportan un contenido de 1.02%; Páscoa *et al.*, (2013), cuyo valor reportan de 12.1 mg; Bravo *et al.*, (2013b), que reportaron valores de 10.2-17.44 mg. En lo que respecta al GC, los resultados se encontraron por encima de lo reportado por Oliveira *et al.*, (2011), el cual fue de 29.96 mg y de Belitz *et al.*, (2009), cuyo valor reportaron del 6.7-9.2%. Campos-Vega *et al.*, (2015), informan valores para GC de 26.7 mg.

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas, estos juegan un papel importante de defensa y

representan los fitoquímicos más estudiados por su bioactividad. Aparte de los compuestos fenólicos presentes de manera natural, estos también se pueden originar a partir de reacciones de Maillard durante el proceso de tostado del café, como las melanoidinas. Estos compuestos podrían contribuir a la diferencia en contenido de compuesto fenólico totales (Pérez-Martínez *et al.*, 2010).

En cuanto al contenido de flavonoides totales los resultados obtenidos se encontraron dentro de lo reportado para CU por Páscoa *et al.*, (2013), el cual fue del 2.2-19.5 mg. Panusa *et al.*, (2013), reportaron valores de 2.11-8.03 mg en el CU y Páscoa *et al.*, (2013), reportaron valores de 7 mg. Campos-Vega *et al.*, (2015), también reportan valores de CU y GC del 11.5 y 53.4 mg, respectivamente.

Los resultados del contenido de taninos condensados para CU se encuentran muy por encima de lo reportado por Wong y Wang, (1991), que fue de 14.5 mg. Campos-Vega *et al.*, (2015), también reportan valores de CU y GC del 18.2 y 38.3 mg, respectivamente; estos valores se encuentran por debajo de los reportado en este estudio.

La capacidad antioxidante del GC, medida por los tres métodos, fue estadísticamente mayor en comparación con el CU. Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante determinada por el método de DPPH en el GC y CU fueron de 302.2 y 172.3 μ moles, respectivamente. El resultado de CU se encontró por encima de lo reportado por Bravo *et al.*, (2013a), y Campos-Vega *et al.*, (2015), los cuales informan valores de 112.06 y 107.4 μ moles, respectivamente. También, Bravo *et al.*, (2013b), reportaron valores de 38.65-82.4 μ moles; además, Ballesteros *et al.*, (2014), reportaron en el mismo residuo un valor de 20.04 μ moles. En cuanto al GC, éste se encontró por debajo de lo reportado por Pérez-Hernández *et al.*, (2012), y Campos-Vega *et al.*, (2015), cuyos valores fueron de 938.58 y 436.1 μ moles, respectivamente.

En cuanto a los resultados de capacidad antioxidante medida por el método de ABTS, los valores de GC y CU fueron de 249.4 y 159 μ moles, respectivamente. El resultado de CU se encontró dentro de lo reportado por Páscoa *et al.*, (2013), y Campos-Vega *et al.*, (2015), cuyos valores fueron de 176-85 y 243.7 μ moles, respectivamente. Bravo *et al.*, (2013a), y Bravo *et al.*, (2013b), reportaron también una capacidad antioxidante en CU de 215.12 y 92.98-140.3 μ moles,

respectivamente. En cuanto al GC, este se encontró por debajo de lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2015), los cuales reportan el valor de 416.9 μ moles.

Los resultados de capacidad antioxidante medida por la técnica de FRAP en el GC y CU fueron de 4266.7 y 2425.5 μ moles, respectivamente. Ballesteros *et al.*, (2014), reportan un contenido menor de capacidad antioxidante en el CU del 0.102 mmoles.

De acuerdo con la literatura actual, diferentes métodos pueden ser utilizados para evaluar la capacidad antioxidante en sistemas biológicos y alimentos. Sin embargo, como cada método es basado en una reacción diferente, es muy aconsejable determinar el potencial antioxidante de una muestra por diferentes métodos para interpretar mejor los resultados. En general, la capacidad antioxidante del GC fue mayor significativamente de acuerdo a la tendencia FRAP>DPPH>ABTS que la capacidad antioxidante del CU. Además, existe una relación del contenido de compuestos fenólicos totales presentes en mayor concentración en el GC en comparación del CU.

Los antioxidantes se cree que interceptan la cadena de oxidación de radicales libres mediante la donación de hidrógeno a partir de los grupos hidroxilo fenólicos, formando de ese modo un producto final estable, lo que no lo hace iniciar o propagar la oxidación de los lípidos (Chung *et al.*, 1998). El ácido clorogénico tiene capacidad antioxidante en base a sus propiedades de quelación de cationes (Robertson y Eastwood, 1981). Sin embargo, otros compuestos fenólicos también podrían contribuir a la capacidad antioxidante marginalmente. Los compuestos antioxidantes tienen numerosas aplicaciones en alimentos, cosméticos y áreas farmacéuticas, pues se sabe que protegen contra el desarrollo de enfermedades no transmisibles como el cáncer y la diabetes mellitus, además de disminuir los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, entre otros (Ao *et al.*, 2011). Se ha informado que el CU cuenta con capacidad antioxidante para capta radicales libres de oxígeno, ejercer efectos antitumorales y antialérgica (Ramírez-Coronel *et al.*, 2004). La presencia de compuestos fenólicos, ácido clorogénico y pigmentos marrones, presentes en el CU, hace de este residuo un subproducto con antioxidantes naturales. Además de la capacidad antioxidante, su conjugación con

la fibra dietética, antes mencionada, podría indicar que la matriz del CU puede ser una fuente rica en fibra dietética antioxidante (Esposito *et al.*, 2005), por lo cual podría ser utilizado como suplemento dietético. Los resultados encontrados en este trabajo sugieren la posibilidad de reutilizar el CU para obtener dichos compuestos en beneficio a la salud.

En el cuadro 10 se muestra el contenido de ácido ascórbico, ácido clorogénico, ácido gálico y rutina, presentes en el GC y CU (la (+)-catequina, quercetina y los ácidos caféico, cumárico, ferúlico y sináptico, no se detectaron en las muestras).

Cuadro 10. Contenido de compuestos fenólicos, determinados por HPLC, en el grano de café y café usado.

Muestra	Concentración			
	Ác. Ascórbico	Ác. Clorogénico	Ác. Gálico	Rutina
Grano de café	70990.2 ± 8.1 ^a	47659.0 ± 50.1 ^a	10746.2 ± 6.4 ^a	15920.5 ± 5.3 ^a
Café usado	55039.5 ± 15.5 ^b	16799.7 ± 49.4 ^b	6084.3 ± 1.3 ^b	9712.8 ± 2.0 ^b

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. ND= No detectado. Los resultados son expresados en μg equivalentes de ácido ascórbico, ácido clorogénico, ácido gálico y rutina por gramo de muestra, respectivamente. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

El contenido de todos los fenoles fue estadísticamente mayor en el GC en comparación con el CU, esta tendencia se mantuvo igual que en el contenido de compuestos fenólicos totales. Los compuestos fenólicos: ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sináptico, (+)-catequina y quercetina, no se detectaron en las muestras de GC y CU.

Los resultados de ácido clorogénico en el GC y CU fueron de 47659 y 16799.7 mg, respectivamente. Murthy y Naidu, (2012b), reportaron un contenido de ácido clorogénico en el CU del 2.3%; mientras que Ramalakshmi *et al.*, (2009), reportaron del 4.87–5.62% en el mismo residuo. Dupas *et al.*, (2006), informaron una concentración de ácido clorogénico en el GC del 8.75-14.21 mg, cuyo valor es inferior a lo encontrado en el presente estudio. Sin embargo, ellos identificaron además ácido caféico, ácido ferúlico y ácido cumárico, lo que en este estudio no se encontró.

Las diferencias entre el presente estudio y lo reportado en la literatura dependen del tipo de disolvente utilizado, de la calidad de la muestra, del origen del grano, su composición, las condiciones de composiciones de almacenamiento y el pretratamiento (Ramalakshmi *et al.*, 2009).

VII.4. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del café usado

En el Cuadro 11 se muestra la bioaccesibilidad de fenoles totales, flavonoides totales, taninos condensados y capacidad antioxidante determinada por las técnicas de DPPH, ABTS y FRAP de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del CU.

Cuadro 11. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del café usado.

Muestra	Bioaccesibilidad ^a			Capacidad antioxidante ^b		
	Fenoles %	Flavonoides %	Taninos Condensados %	DPPH %	ABTS %	FRAP %
Café usado	26.2 ^a (100)	13.0 ^a (100)	107.1 ^a (100)	172.3 ^a (100)	159.0 ^a (100)	2425.5 ^a (100)
Boca	7.2 ^b (27)	2.8 ^b (22)	5.3 ^b (5)	6.1 ^b (4)	5.9 ^b (4)	89.5 ^b (4)
Estómago	12.7 ^c (48)	2.3 ^c (18)	18.6 ^c (17)	13.5 ^c (8)	12.8 ^c (8)	207.5 ^c (9)
Intestino delgado						
15 min	11.8 ^d (45)	5.6 ^d (43)	32.0 ^d (30)	12.3 ^d (7)	16.3 ^d (10)	221.2 ^d (9)
30 min	10.2 ^e (39)	5.5 ^e (42)	20.0 ^e (19)	16.2 ^e (9)	16.2 ^e (10)	239.1 ^e (10)
60 min	9.7 ^f (37)	5.3 ^f (41)	34.2 ^f (32)	14.5 ^f (8)	16.3 ^d (10)	200.1 ^f (8)
120 min	8.9 ^g (34)	5.5 ^e (42)	46.9 ^g (44)	15.3 ^g (9)	16.2 ^e (10)	239.0 ^e (10)
Fermentación colónica						
6 h	1.2 ^h (5)	0.2 ^g (2)	24.7 ^h (23)	8.4 ^h (5)	13.9 ^f (9)	104.9 ^g (4)
12 h	1.2 ^h (5)	0.4 ^h (3)	33.7 ⁱ (31)	8.4 ^h (5)	13.9 ^g (9)	98.1 ^h (4)
24 h	2.6 ⁱ (10)	0.6 ⁱ (5)	38.8 ^j (36)	8.7 ⁱ (5)	13.8 ^h (9)	102.6 ⁱ (4)

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. ^aLa concentración de los compuestos fenólicos son expresados en mg equivalentes de ácido clorogénico, rutina, (+)-catequina por gramo de muestra para fenoles, flavonoides y taninos condensados, respectivamente. ^bLa capacidad antioxidante de DPPH y ABTS es expresada como μ moles eq de trolox y FRAP es expresada como μ moles eq Fe²⁺. Los valores del intestino delgado a diferentes tiempos corresponden al lado apical. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

El contenido de CU tuvo la mayor concentración en todos los parámetros. Durante la digestión gastrointestinal del CU se vió afectada la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos totales.

La digestión salival afectó la biodisponibilidad de los fenoles totales y flavonoides reduciendo hasta el 27 y 22%, respectivamente, mientras que para taninos condensados la reducción fue drásticamente hasta el 5%. Campos-Vega *et al.*, (2015), reportaron valores diferentes de CU, también sometido a digestión salival, a lo presentado en este estudio, sin embargo, es de resaltar que sus porcentajes, obtenidos de acuerdo al 100% de su muestra, para los parámetros de fenoles totales, flavonoides y taninos condensados fueron de 37, 65 y 319%, respectivamente.

Durante la digestión gástrica los fenoles totales, flavonoides y taninos condensados, se observaron nuevamente reducidos en un 48, 18 y 17%, respectivamente. Es importante mencionar que los fenoles totales y flavonoides se incrementaron después de la adición de la pepsina, esto podría deberse al efecto que causan las condiciones de pH, temperatura y reacciones enzimáticas que hacen más bioaccesibles los metabolitos (Vallejo *et al.*, 2004). Los taninos condensados como (+)-catequina son susceptibles a las condiciones de bajo pH gástrico, degradándose en (-)-epigallocatequina monomérica después de 1.5 h. (Zhu *et al.*, 2002). También los flavonoides son susceptibles a la hidrólisis ácida. Campos-Vega *et al.*, (2015), reportaron porcentajes superiores de flavonoides y taninos condensados a lo reportado por este estudio, los valores fueron de 34 y 44%, respectivamente; adicionalmente el contenido de fenoles totales reportado por los mismos autores, fue de 42%, siendo menor al encontrado en este estudio.

El contenido de los fenoles totales durante la digestión en el intestino delgado disminuyó dependiente del tiempo de incubación de un 45 a 34%. El porcentaje de flavonoides se mantuvo alrededor del 40%. Por su parte, en el porcentaje de taninos condensados se observó incrementado del 30 al 46% durante la incubación. Todos los parámetros se vieron fuertemente afectados por el proceso de digestión intestinal; al finalizar la incubación de 2 horas se obtuvo una media del 40% en fenoles totales, flavonoides y taninos condensados, mientras que la capacidad antioxidante en las tres técnicas fue de aproximadamente 9%. Campos-Vega *et al.*, (2015), reportaron incremento de fenoles totales dependiente del tiempo de incubación del 63 al 73%, en el porcentaje de flavonoides sus valores se

encontraron alrededor del 50-60% y para taninos sus porcentajes se incrementaron más del 100%.

La pérdida de flavonoides tras el proceso de digestión después de 2 horas fue mayor que lo reportado en café por Campos-Vega *et al.*, (2015), del 77% y en catequina de uva del 44% como resultado de interacciones fenólicas con proteínas pancreáticas (Xia, *et al.*, 2010), probablemente los flavonoides son hidrolizados a agliconas menos polares antes de la absorción gastrointestinal. El porcentaje de fenoles totales que llegaron a la etapa final del intestino delgado se observó diferente en comparación con lo reportado por los siguientes autores: Campos-Vega *et al.*, (2015), reportaron un valor fue de 73%, Renouf *et al.*, (2014), del 76% de ácido caffeoylquinic después del consumo de café, Crozier *et al.*, (2012), de 25% del ácido clorogénico del café. Esta extracción dependiente del tiempo de los compuestos fenólicos del café usado es similar a la bioaccesibilidad de polifenoles a partir de uvas (Tagliazucchi *et al.*, 2010b), y los flavonoides del cacao en el medio intestinal artificial (Zhu *et al.*, 2002).

Los compuestos fenólicos totales se observaron ligeramente incrementados durante la fermentación. Después de 24 horas de incubación se obtuvieron porcentajes de fenoles totales, flavonoides y taninos condensados del 10, 5 y 36%, respectivamente. Los porcentajes de fenoles totales después de 24 horas de fermentación se encontraron por debajo de lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2015), cuyo valor reportan del 33%. En cuanto al porcentaje de flavonoides después de 24 horas de fermentación, los mismos autores, reportaron valores de 68%, muy por encima de lo encontrado en este estudio. Aura *et al.*, (2005), reportaron valores similares a Campos-Vega *et al.*, (2015), en flavonoides puros después de una fermentación *in vitro*. Como se había mencionado anteriormente, el café usado es fuente de fibra dietética antioxidante (aproximadamente el 60%), la cual no es totalmente digerida, alcanza el colon y puede ser metabolizada por la microbiota colónica generando metabolitos que pueden ser absorbidos posteriormente y distribuido a los tejidos con beneficios potenciales para la salud (Ferruzzi, 2010).

Durante la digestión gastrointestinal la capacidad antioxidante medida por las técnicas de DPPH, ABTS y FRAP, se redujo a un 5%. Campos-Vega, *et al.*,

(2015), reportaron un porcentaje del 171% usando la técnica de DPPH y de 47% a través de la técnica de ABTS.

En la digestión gástrica la capacidad antioxidante también se redujo a un 8, 8 y 9% usando las técnicas de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Campos-Vega *et al.*, (2015), reportaron porcentajes superiores de capacidad antioxidante por DPPH y ABTS a lo reportado por este estudio, los valores fueron de 224 y 113% respectivamente.

En cuanto a la digestión en el intestino delgado, la capacidad antioxidante usando el método de DPPH, se observó aumentada ligeramente de 7 a 9% durante la incubación, en el ensayo de ABTS se encontró estable a 10% y en la técnica de FRAP se mantuvo alrededor del 9.5% aproximadamente. De igual manera, Campos-Vega *et al.*, (2015), reportaron el incremento de la capacidad antioxidante medida por DPPH y ABTS de 127-685 y 154-223%, respectivamente e independiente del tiempo de incubación.

La capacidad antioxidante se mantuvo estable durante la fermentación, medida por DPPH, ABTS y FRAP el porcentaje de capacidad antioxidante fue de 5, 9 y 4%. Campos-Vega *et al.*, (2015), reportaron porcentajes superiores al 100%. Después de 24 horas de fermentación sus valores reportados alcanzaron porcentajes de 866 y 158% utilizando las técnicas de DPPH y ABTS, respectivamente.

En resumen, la capacidad antioxidante medida por la técnica de DPPH durante la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* aumentó en el siguiente orden: boca<fermentación colónica<estómago<intestino delgado; el orden para el ensayo ABTS fue: boca<estómago<fermentación colónica<intestino delgado. Por último, el orden para el ensayo FRAP fue: boca<fermentación colónica<estómago<intestino delgado. Esto refleja el orden de la contribución antioxidante fenólico en el ensayo DPPH donde los monómeros fenólicos (caféico, ferúlico y ácidos isoferúlicos) metabolizados y absorbidos rápidamente en el tracto gastrointestinal y aparecerá rápidamente en el plasma (entre 0.5 y 2 h) (Renouf *et al.*, 2014). Entonces, la microflora colónica metabolizará ampliamente los taninos poliméricos gastrointestinalmente estables a los principales metabolitos en el plasma humano (dihydroferulic y ácidos dihydrocaffeic) que son reabsorbidos en el

colon (Renouf *et al.*, 2014). La capacidad antioxidante en el intestino delgado probablemente sugiere la presencia de ácidos clorogénicos libres fácilmente metabolizables. Nuestros resultados muestran que los polifenoles del café usado son liberados durante la digestión gastrointestinal simulada para eliminar los radicales libres. Además, los polifenoles antioxidantes aumentaron durante la transición de ácido a medio alcalino, posiblemente por desprotonar las fracciones hidroxilo presentes en sus anillos aromáticos. Por lo tanto, una prueba realizada a bajo pH (~ 3) podría ser más apropiada para evaluar la capacidad antioxidante en el compartimento gástrico; un ensayo por donación de electrones debe considerarse, como se sugirió anteriormente (Bouayed *et al.*, 2011). 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 del cuerpo. Se requiere más investigación para confirmar los efectos antioxidantes del café usado en la salud, ya que se ha informado que los compuestos fenólicos incrementan la capacidad antioxidante en el plasma y la actividad enzimática antioxidante en adultos humanos sanos (Oliveras-López *et al.*, 2014).

En el Cuadro 12 se muestra la bioaccesibilidad de compuesto fenólicos determinados por HPLC en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del CU.

Cuadro 12. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, determinados por HPLC, en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del café usado.

Muestra	Bioaccesibilidad									
	Ác. Ascórbico %	Ác. Caféico	Ác. Clorogénico %	Ác. Cumárico	Ác. Ferúlico	Ác. Gálico %	Ác. Sinápico	Catequina	Quercetina	Rutina %
Café usado	55039.5 ^a (100)	DLD	16799.7 ^a (100)	DLD	DLD	6084.3 ^a (100)	DLD	DLD	DLD	9712.8 ^a (100)
Boca	2140.6 ^b (4)	725.6 ^a	4185.6 ^b (25)	75.5 ^a	34.8 ^a	18.7 ^b (0)	DLD	292.3 ^a	154.7 ^a	124.8 ^b (1.3)
Estómago	7037.5 ^c (13)	217.6 ^b	11848.5 ^c (71)	163.8 ^b	37.1 ^a	784.8 ^c (13)	39.0 ^a	2517.8 ^b	410.1 ^b	343.3 ^c (3.5)
Intestino delgado										
15 min	12922.2 ^d (23)	828.7 ^c	6050.4 ^d (36)	198.5 ^c	52.9 ^b	3182.5 ^d (52)	DLD	738.1 ^c	463.8 ^c	DLD
30 min	16179.9 ^e (29)	744.2 ^d	5776.8 ^e (34)	200.2 ^c	50.0 ^b	3043.9 ^e (50)	DLD	899.6 ^d	559.1 ^d	DLD
60 min	17252.4 ^f (31)	479.3 ^e	5314.9 ^f (32)	200.7 ^c	53.2 ^b	1855.9 ^f (31)	DLD	2415.5 ^e	455.8 ^c	DLD
120 min	17685.8 ^g (32)	DLD	5171.6 ^g (31)	200.2 ^c	49.8 ^b	2925.8 ^g (48)	DLD	341.3 ^f	443.8 ^c	DLD
Fermentación colónica										
6 h	2457.8 ^h (4)	DLD	356.3 ^h (2)	DLD	DLD	489.7 ^h (8)	54.2 ^b	DLD	DLD	DLD
12 h	4923.8 ⁱ (9)	DLD	359.5 ^h (2)	DLD	DLD	810.3 ⁱ (13)	64.0 ^c	518.1 ^g	DLD	DLD
24 h	6260.9 ⁱ (11)	DLD	392.3 ⁱ (2)	DLD	DLD	383.7 ⁱ (6)	98.0 ^d	1306.6 ^h	DLD	DLD

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. DLD= Debajo del límite de detección. La concentración de los compuestos fenólicos es expresada en μg equivalentes de ácido ascórbico, ácido caféico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido sinápico, (+)-catequina, quercetina y rutina por gramo de muestra, respectivamente. Los valores del intestino delgado a diferentes tiempos corresponden al lado apical. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

El contenido de CU tuvo la mayor concentración en los parámetros, a excepción del ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, catequina, quercetina, los cuales no fueron detectados en esta muestra, por lo que no se logró hacer el análisis de comparación contra el 100% de muestra inicial.

Durante la digestión gastrointestinal del CU se vio afectada positivamente la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, de tal manera que las condiciones de pH, temperatura, reacciones enzimáticas y demás, lograron liberar los compuestos que en un inicio se encontraban enlazados a proteína y/o carbohidratos y por lo tanto no se detectaron. Los compuestos determinados en todas las etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro*, fueron los ácidos ascórbicos, clorogénico y gálico. Estos, son algunos de los principales ácidos fenólicos del café, su contenido varía entre especies, lugar de origen, condiciones de cultivo, etc. (Naranjo *et al.*, 2011).

En general, la digestión salival afectó la bioaccesibilidad de los compuestos, reduciendo su contenido por debajo del 25% dependiendo del compuesto. Los compuestos que se liberaron después del proceso de masticación y por efecto de la enzima salival fueron ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, (+)-catequina y quercetina.

Durante la digestión gástrica los compuestos detectados se observaron nuevamente reducidos; sin embargo, su contenido en esta etapa de la digestión se encontró mayor que en boca, incluso aquellos compuestos que no se detectaron en boca se mostraron presentes, este es el caso del ácido sinápico. El incremento de fenoles después de la adición de la pepsina, podría deberse al efecto que causan las condiciones de pH, temperatura y reacciones enzimáticas que hacen más bioaccesibles los metabolitos (Vallejo *et al.*, 2004).

La digestión en el intestino delgado de los compuestos fenólicos se observó heterogénea dependiendo del compuesto en cuestión. Durante la incubación el ácido ascórbico aumentó en un 23 a 32%, el ácido caféico disminuyó de 828.7 a 479.3 μg , no detectándose su presencia en el tiempo de 120 min. El ácido clorogénico disminuyó ligeramente en un 36 a 31%, el contenido de los ácidos cumárico y ferúlico se mantuvo alrededor de 200 y 50 μg . El ácido gálico se observó ligeramente disminuido en un 52 a 48%. Por último, el contenido de (+)-catequina y quercetina disminuyó dependiente del tiempo de incubación. El ácido sinápico y la rutina no se detectaron.

Los resultados de compuestos fenólicos durante la fermentación se observaron nuevamente heterogéneos. El ácido ascórbico aumentó de 4 a 11%, el

ácido clorogénico se mantuvo en 2%, el ácido gálico aumentó de 8 a 13% a las 12 h y disminuyó a las 24 h hasta el 6%. El ácido sinápico aumentó de 54.2 a 98 µg. Por último, a las 6 h el contenido de (+)-catequina no se detectó, fue hasta las 12 h que se mostró presente y aumentó más del doble de su contenido a las 24h.

VII.5. Coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del café usado digerido *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido

Se evaluó la permeabilidad intestinal de polifenoles (fenoles totales, flavonoides y taninos condensados) del café usado por el método de saco intestinal invertido. El coeficiente de permeabilidad aparente y la relación del flujo de los compuestos fenólicos del CU sometido a digestión gástrica *in vitro* y usando un modelo de saco intestinal invertido se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 13. Coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos fenólicos del café usado digerido *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido.

Parámetro	Tiempo (min)	Papp		Relación de flujo (B → A) / (A → B)
		A → B x 10 ⁻²	B → A x 10 ⁻²	
Fenoles	15	2.94 ^a	4.62 ^a	1.57 ^a
	30	2.35 ^b	7.99 ^b	3.40 ^b
	60	3.60 ^c	15.20 ^c	4.22 ^c
	120	10.97 ^d	27.89 ^d	2.54 ^d
Flavonoides	15	6.06 ^a	12.11 ^a	2.00 ^a
	30	2.60 ^b	23.79 ^b	9.17 ^b
	60	4.33 ^c	45.86 ^c	10.60 ^c
	120	39.80 ^d	95.18 ^d	2.39 ^d
Taninos condensados	15	4.07 ^a	8.56 ^a	2.11 ^a
	30	6.47 ^b	10.70 ^b	1.65 ^b
	60	21.18 ^c	36.59 ^c	1.73 ^c
	120	32.10 ^d	100.36 ^d	3.13 ^d

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

La relación del flujo de transporte de los lados apical y basolateral varía dependiendo de los compuestos transportados, fenoles, flavonoides o taninos condensados, y del tiempo de incubación.

Se observó el transporte de los fenoles totales por absorción (A→B) a través de los sacos intestinales de rata de acuerdo con los valores del coeficiente de permeabilidad aparente bilateral (Papp). En general, los valores de Papp $<1 \times 10^{-7}$ y $>1 \times 10^{-6}$ cm/s (A→B) se consideran de baja y alta permeabilidad, respectivamente (Artursson *et al.*, 2001). Los valores de Papp en ambas direcciones aumentaron significativamente dependiente del tiempo, alcanzando el valor más alto a los 120 min; además, todos los valores se mostraron $>1 \times 10^{-6}$ cm/s (alta permeabilidad). El potencial activo de flujo/absorción se obtiene mediante el cálculo de la proporción de la tasa de permeación del lado apical al basolateral (A→B) y del basolateral al apical (B→A); la relación (B→A) / (A→B), menor a 0.5 y mayor a 2 indican flujo de salida o flujo de entrada, respectivamente, de lo contrario el mecanismo de absorción es simplemente por difusión pasiva (Hubatsch *et al.*, 2007).

Este estudio mostró un mayor transporte a lo largo del intestino delgado en sentido B →A, lo que sugiere que los polifenoles de CU pueden actuar como sustrato para los transportadores de flujo de salida (como P-glicoproteínas). Las relaciones B→A/A→B (<2 y >0.5) sugieren que no hay participación de un flujo de salida mediada por P-glicoproteínas o mecanismos de flujo de entrada. Lo que sugiere que algunos fenoles y taninos condensados, son capaces de permear rápidamente a través del intestino delgado por difusión pasiva, similar a lo reportado para el ácido dihidroxicinámico después del consumo de café (Farrell *et al.*, 2012).

El coeficiente de permeabilidad aparente y la relación del flujo de los compuestos fenólicos, determinado por HPLC, del CU previamente sometido a digestión gástrica *in vitro* y usando un modelo de saco intestinal invertido, se muestran en el Cuadro 15.

Cuadro 14. Coeficiente de permeabilidad aparente de compuestos fenólicos, determinados por HPLC, del café usado digerido *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido.

Parámetro	Tiempo (min)	Papp		Relación de flujo (B → A) / (A → B)
		A → B x 10 ⁻³	B → A x 10 ⁻³	
Ác. Ascórbico	15	57.6 ^a	91.4 ^a	1.58 ^a
	30	167.5 ^b	228.8 ^b	1.37 ^b
	60	322.5 ^c	487.9 ^c	1.51 ^a
	120	670.0 ^d	1000.2 ^d	1.49 ^c
Ác. Clorogénico	15	7.2 ^a	25.4 ^a	3.54 ^a
	30	19.0 ^b	48.5 ^b	2.55 ^b
	60	45.8 ^c	89.3 ^c	1.95 ^c
	120	108.3 ^d	173.7 ^d	1.60 ^d
Ác. Gálico	15	172.5 ^a	201.7 ^a	1.17 ^a
	30	189.4 ^b	385.9 ^b	2.04 ^b
	60	561.9 ^c	470.6 ^c	0.84 ^c
	120	1285.3 ^d	1483.7 ^d	1.15 ^a
Ác. Cumárico	15	60.2 ^a	60.3 ^a	1.00 ^a
	30	119.5 ^b	121.6 ^b	1.02 ^a
	60	240.1 ^c	243.8 ^c	1.02 ^a
	120	476.5 ^d	486.6 ^d	1.02 ^a

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

Se evaluó la biodisponibilidad intestinal de ácido fenólicos: ascórbico, clorogénico, gálico y cumárico, del café usado por el método de saco intestinal invertido. Es importante mencionar que el contenido de ácido sinápico y rutina no se detectó en ambos lados de la pared intestinal (Cuadro 12); mientras que el contenido del ácido caféico, ácido ferúlico, (+)-catequina y quercetina no se detectó en el lado basolateral del intestino (datos no presentados).

La relación del flujo de transporte de los lados apical y basolateral varía dependiendo del compuesto transportado y del tiempo de incubación. Se observó el transporte de los compuestos fenólicos en sentido de absorción (A→B) a través de los sacos intestinales de rata, de acuerdo con los valores del coeficiente de permeabilidad aparente bilateral (Papp). Los valores de Papp en ambas direcciones aumentaron significativamente dependiente del tiempo, alcanzando el valor más alto a los 120 min; además, todos los valores se mostraron $>1 \times 10^{-6}$ cm/s (alta permeabilidad).

Al igual que para la determinación de fenoles totales por métodos colorimétricos, el flujo mayor de los compuestos determinados por HPLC fue B →A.

Por lo tanto, la mayoría de nuestros resultados corresponden a difusión pasiva, rápida permeación, dependiente del tiempo de captación y absorción

De manera interesante, los compuestos absorbidos ejercieron/mantuvieron capacidad antioxidante del lado basolateral del intestino. La tendencia de los valores de capacidad antioxidante medida por los tres métodos fue: FRAP>ABTS>DPPH (Cuadro 15). La capacidad antioxidante del CU en el lado basolateral (a partir de compuestos permeados) medida por la técnica de DPPH, no mostró diferencia significativa durante los primeros 60 min, disminuyendo después de este tiempo. En ABTS, no se encontró diferencias significativas durante el tiempo de incubación. En cambio, en FRAP, la capacidad antioxidante aumento hasta los 30 min de 78.5 a 164.9 μ moles, a los 60 min disminuyo a 124.2 μ moles, finalmente aumentó a 269.3 μ moles. La capacidad antioxidante puede ser debido a la biotransformación de los polifenoles del CU, entre ellos los ácidos: ascórbico, clorogénico, gálico y cumárico, además de la presencia de otros compuestos antioxidantes, o la asociación significativa de antioxidantes con otros nutrientes (Fogliano *et al.*, 2011). Los resultados de los compuestos absorbidos sugieren que la capacidad antioxidante del CU fue modificada por la acción secuencial de las enzimas digestivas, incluyendo aquellos secretada por el intestino delgado y su potencial de biotransformación a través de la membrana intestinal. La relevancia clínica de estos resultados debe ser confirmada por estudios de biodisponibilidad *in vivo*.

Cuadro 15. Capacidad antioxidante de los compuestos del café usado que fueron permeables/absorbidos *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido.

Muestra	Capacidad antioxidante		
	DPPH	ABTS	FRAP
Saco intestinal invertido			
15 min	14.8 \pm 8.3 ^a	15.3 \pm 6.4 ^a	78.5 \pm 0.0 ^a
30 min	12.8 \pm 7.4 ^a	16.0 \pm 4.4 ^a	164.9 \pm 0.4 ^b
60 min	10.3 \pm 13.9 ^a	16.2 \pm 3.0 ^a	124.2 \pm 0.2 ^c
120 min	15.9 \pm 3.2 ^a	15.9 \pm 3.3 ^a	269.3 \pm 0.0 ^d

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. La capacidad antioxidante de DPPH y ABTS es expresada como μ moles eq de trolox por gramo de muestra y FRAP es expresada como μ moles eq Fe²⁺ por gramo de muestra. Los valores de capacidad antioxidante del saco intestinal invertido a diferentes tiempos corresponden al lado basolateral. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

VII.6. Flujo de agua y viabilidad del saco intestinal invertido durante el ensayo de permeabilidad *in vitro* del café usado

El efecto del flujo de agua en un sistema de saco intestinal invertido se muestra en el Cuadro 16. La absorción ocurrió durante todos los experimentos a través de la transferencia de moléculas de agua desde el lado apical al basolateral.

Las muestras de CU y la muestra blanco o control siguieron la tendencia de aumentar su peso desde la obtención del intestino antes de ligarse, el saco antes de la incubación y el saco después de la incubación. El peso del saco en ambas muestras aumentó después de someterse a incubación, este efecto se debió al poder de absorción del saco. En cuanto al peso de ambas muestras a lo largo de la incubación se muestra incrementado en forma dependiente del tiempo. El flujo de agua del saco con muestra de CU se incrementó significativamente con el tiempo (de 0.24 a 0.76 g), mientras que en el blanco no hubo incremento estadísticamente significativo. El aumento de la absorción de agua lleva a una mayor humectabilidad.

Cuadro 16. Flujo de agua durante el ensayo de permeabilidad *in vitro* (saco intestinal invertido) del café usado.

Muestra	Flujo de agua			
	I1	I2	I3	FA
Café usado				
15 min	1.13 ± 0.05 ^{a+}	2.37 ± 0.04 ^{b+}	2.64 ± 0.06 ^{c+}	0.24 ± 0.03 ⁺
30 min	1.14 ± 0.08 ^{a+}	2.10 ± 0.12 ^{b-}	2.49 ± 0.14 ^{c+}	0.37 ± 0.07 ⁻
60 min	1.23 ± 0.14 ^{a+}	2.08 ± 0.09 ^{b-}	2.65 ± 0.08 ^{c+}	0.46 ± 0.03 ⁻
120 min	1.06 ± 0.00 ^{a-}	2.11 ± 0.14 ^{b-}	2.92 ± 0.23 ^{c-}	0.76 ± 0.07 [*]
Blanco				
15 min	1.04 ± 0.07 ^{a+}	2.21 ± 0.12 ^{b+}	2.63 ± 0.13 ^{c+}	0.42 ± 0.05 ⁺
30 min	0.98 ± 0.08 ^{a+}	2.17 ± 0.12 ^{b+}	2.58 ± 0.15 ^{c+}	0.42 ± 0.05 ⁺
60 min	1.12 ± 0.02 ^{a-}	2.28 ± 0.06 ^{b+}	2.77 ± 0.10 ^{c+}	0.43 ± 0.03 ⁺
120 min	1.23 ± 0.05 ^{a+}	2.39 ± 0.12 ^{b+}	2.95 ± 0.15 ^{c-}	0.45 ± 0.06 ⁺

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

Una vez extraído el intestino, se sabe, tiene un tiempo de vida en el cual debe realizarse el experimento antes de que pierda su viabilidad por completo. Una

manera de verificar la viabilidad e integridad intestinal es a través de la cuantificación de la glucosa debido a que el sitio principal de absorción de glucosa es en las células epiteliales del intestino delgado; además, este compuesto atraviesa los poros del intestino de manera pasiva sin requerir energía. Los resultados del contenido de glucosa medido en un sistema de saco intestinal invertido se muestran en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Transporte de glucosa en un modelo de saco intestinal invertido.

Tiempo (min)	Lado apical	Lado basolateral	Relación Basolateral/Apical
15	149.6 ± 0.1 ^a	167.0 ± 0.2 ^b	1.12
30	169.6 ± 0.0 ^b	145.3 ± 0.1 ^a	0.86
60	128.0 ± 0.1 ^c	120.2 ± 0.1 ^c	0.94
120	110.0 ± 0.1 ^d	104.5 ± 0.1 ^d	0.95

Los resultados de los lados apical y basolateral son expresados como µg de glucosa/ µl. Basolateral/Apical representa la relación del lado basolateral con el apical. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado ± ES. Los Letras diferentes por renglón expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Se observó el transporte de glucosa por absorción a través de los sacos intestinales de rata debido a la presencia de glucosa en el lado basolateral; en un inicio únicamente se colocó solución amortiguadora sin glucosa en el lado basolateral, mientras que en el lado apical la solución amortiguadora si contenía glucosa. Por otro lado, en el lado apical la concentración de glucosa aumentó durante el tiempo de 15 a 30 min de incubación y posteriormente disminuyó hasta concluir la incubación. El contenido de glucosa en el lado basolateral disminuyó de forma dependiente del tiempo de incubación. El intestino delgado es un sistema complejo y sensible a las condiciones externas al que es sometido, cuando se extrae, las bombas que transportan ciertos compuestos entre ellos la glucosa, van perdiendo su función. Debido a que la glucosa es activamente transportada por el intestino delgado, en sacos saludables, que son metabólicamente activos sin fugas, harán que la glucosa se concentre en el lado basolateral y se mantendrá este gradiente (Ballent *et al.*, 2006).

La relación de concentración de glucosa entre el lado basolateral y apical se observó disminuida durante el tiempo de 15 a 30 min de 1.12 a 0.86, posteriormente aumentó hasta los 120 min a 0.95. Si bien los intestinos al ser extraídos de sus óptimas condiciones, necesitan un tiempo de adaptación, lo que

podría ser la causa de la disminución inicial de glucosa. El posterior aumento de la glucosa es indicativo de que, durante el experimento, el tejido del saco intestinal fue viable y con buen funcionamiento (Li *et al.*, 2011).

VII.7. Efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado sobre el pH del medio de incubación

La medición del pH en el medio de incubación es un indicador indirecto de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por la fermentación colónica de sustratos fermentables (Hu *et al.*, 2002).

El efecto de acidificación del medio de fermentación se muestra en el Cuadro 18. El inóculo bacteriano afectó el pH durante la fermentación *in vitro* de la FND del CU. El pH disminuyó a las 6 horas de fermentación de la fracción no digerible del café usado, posteriormente aumento a las 12 y 24 horas sin alcanzar su concentración inicial. De forma similar al tratamiento el pH del control negativo alcanza su mayor acidificación a las 6 horas de fermentación, después de 24 horas el pH aumenta por encima de su concentración inicial por efecto de la flora intestinal humana. La disminución del pH puede reflejar el aumento de la concentración total de los tres AGCC acético, propiónico y butírico. El pH del lumen del intestino grueso va a variar de forma inversa a la producción de AGCC. McBain y Marlane, (1998) reportaron que la hidrólisis de los carbohidratos por las bacterias colónicas genera un ambiente ácido, mejorando las condiciones para el crecimiento de poblaciones acidófilas que generan AGCC, predominantemente el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico.

Cuadro 18. Efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado sobre el pH del medio de incubación.

Muestra	pH			
	0 h	6 h	12 h	24 h
Café Usado	6.32 ± 0.00 ^{Aa}	6.14 ± 0.04 ^{Ab}	6.29 ± 0.02 ^{Aa}	6.30 ± 0.00 ^{Aa}
Control (+)	6.38 ± 0.00 ^{Ba}	4.56 ± 0.06 ^{Bb}	4.29 ± 0.01 ^{Bc}	4.14 ± 0.00 ^{Bd}
Control (-)	6.36 ± 0.00 ^{Ca}	6.16 ± 0.05 ^{Ab}	6.35 ± 0.03 ^{Aa}	6.43 ± 0.00 ^{Cc}

Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado ± ES. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre grupos bajo las mismas horas ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. Letras minúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fermentación de cada grupo ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey.

La excreción de AGCC va a estar afectada por el nivel y la naturaleza de la fibra y/o azúcares de la dieta (McKay y Eastwood, 1983). El pH del colon proximal varía considerablemente (4-7) (Bown *et al.*, 1974), cayendo drásticamente cuando los carbohidratos no son absorbidos por el intestino delgado. Por lo tanto, los cambios en el pH pueden tener una influencia importante en la salud de los enterocitos del colon y su eficiencia para salvar los carbohidratos no absorbidos por una rápida conversión en ácidos grasos volátiles para ser absorbidos y usados (Campos-Vega *et al.*, 2013).

La rafinosa, usada como control de sustrato fermentable, disminuyó el pH de forma dosis-dependiente hasta las 24 horas de fermentación. Guillon y Champ, (2002), atribuyen el marcado decremento en el pH del medio con rafinosa a su rápida fermentación y a su mayor biodisponibilidad para ser degradada por la carga bacteriana del inóculo, en comparación con la complejidad de los carbohidratos presentes en la FND del CU evaluado.

Al observarse acidificación del medio empleando como fuente fermentable la FND del CU se sugiere que es buen sustrato de fuente fermentable en el colon, debido a su compleja matriz incluyendo polifenoles y a la producción de AGCC, que favorecen la proliferación de bacterias benéficas y por tanto causando potencial bioactivo a la salud.

VII.8. Efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado sobre células de adenocarcinoma humano SW480

VII.8.1. Efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado sobre la sobrevivencia de células de adenocarcinoma humano SW480

El efecto del FgE-CU sobre células de adenocarcinoma humano SW480 se muestra en la Figura 7.

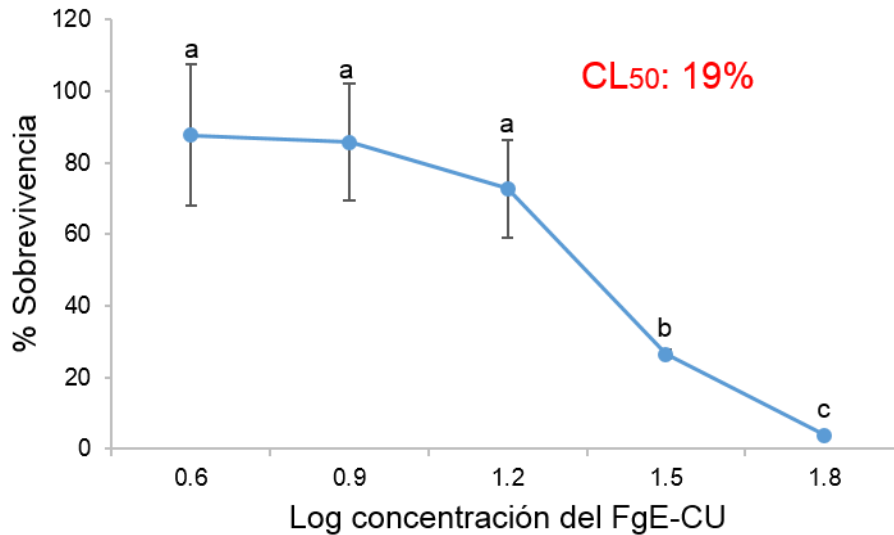


Figura 7. Curva dosis-respuesta del FgE-CU en células de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento. Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado \pm ES. Letras diferentes expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey. El efecto de FgE-CU se normalizó con el control blanco (FgE-CU sin células) y las células con el control negativo (células no tratadas) (0%/ml, 100%). La concentración letal media o CL_{50} se refiere a la concentración necesaria del FgE-CU para inhibir la supervivencia del 50% de la población celular sometida al tratamiento. CL_{50} se calculó a partir del anti-log del valor del eje x en el punto de inflexión de la curva sigmoidea, generado por el tratamiento (JMP 8.0.1).

El FgE-CU inhibió el crecimiento de células SW480 de manera dependiente de la concentración. El valor de la concentración letal media (CL_{50}) después de 24 h de tratamiento fue del 19%. Debido a este hallazgo se decidió seleccionar tres concentraciones por debajo de la concentración letal media, las cuales fueron de 3.75, 7.5 y 15% del FgE-CU para posteriores análisis.

Esta misma tendencia inhibitoria fue reportada por Campos-Vega *et al.*, (2013), en productos de la fermentación de la fracción no digerible del frijol variedad bayo madero sobre células de adenocarcinoma humano HT-29, los cuales encontraron una CL_{50} del 17%. Las propiedades inhibitorias se le pueden atribuir a los nutrientes y compuestos bioactivos presentes en la matriz (World Cancer Research, 1997).

El efecto citotóxico, determinado colorimétricamente, del FgE-CU a las 24 horas de tratamiento, se incrementó de manera dependiente de la concentración,

en comparación con el control negativo (Figura 8). El control positivo, peróxido de hidrógeno, se vio disminuido debido al daño letal, y por lo tanto disminución drástica del número de células, que muestra el compuesto sobre las células SW480. El control negativo presenta una citotoxicidad estadísticamente igual al blanco de fermentación.

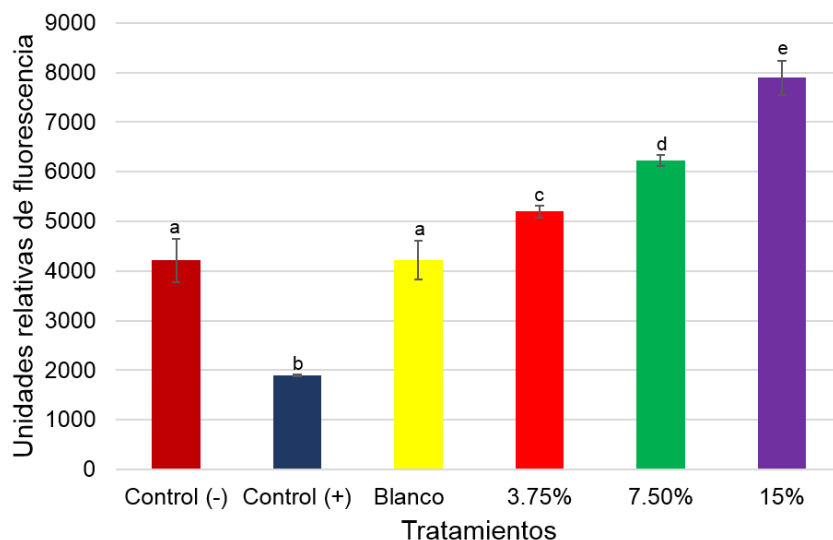


Figura 8. Efecto citotóxico, determinado colorimétricamente, del FgE-CU sobre la línea celular de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento. Control (-): células sin tratamiento. Control (+): células tratadas con peróxido de hidrógeno al 20%. Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado \pm ES. Letras diferentes por barra expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

VII.8.2. Efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado sobre la actividad de la caspasa 3 en células de adenocarcinoma humano SW480

Las caspasas son requeridas para inducir la apoptosis, así como para el procesamiento proteolítico de ciertas citosinas proinflamatorias.

La actividad de la caspasa 3 (indicador de muerte celular programada o apoptosis), en las células tratadas con FgE-CU, incrementó en forma dosis-dependiente, en comparación con el control negativo como se muestra en la Figura 9. El control positivo fue estadísticamente diferente a los demás grupos con la concentración de la actividad de caspasa 3 más baja. Hasta este momento no se

han encontrado reportes del efecto del FgE-CU sobre la activación de la caspasa 3 en células de cáncer de colon humano.

Existen 2 vías de activación de la apoptosis: 1. Cuando los receptores de muerte son reconocidos por su ligando específico, o en su defecto se presenta una supresión de los factores de crecimiento u hormonales y 2. Activación de la vía mitocondrial por daño al citosol o núcleo, en donde la proteína supresora tumoral p53, considerada vigilante de la integridad del genoma, activa la transcripción de varios genes, entre ellos los proapoptóticos de la familia Bcl-2: Bax, Bak, Bid, Bad. Ambas vías convergen en la activación de la señalización de la vía de las caspasas cuya última proteína efectora y la más importante es la caspasa-3, la cual da lugar a la muerte celular programada o apoptosis (Elinos-Báez *et al.*, 2001).

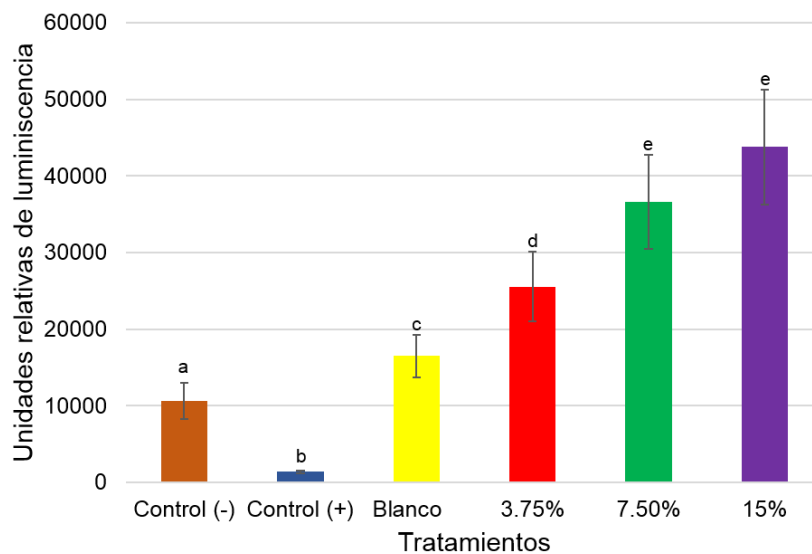


Figura 9. Actividad de la caspasa 3 en células de adenocarcinoma humano SW480, sometidas a 24 h de tratamiento con el FgE-CU. Control (-): células sin tratamiento. Control (+): células tratadas con peróxido de hidrógeno al 20%. Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado \pm ES. Letras diferentes por barra expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

VII.8.3. Efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado sobre el contenido de glutatión en células de adenocarcinoma humano SW480

El glutatión, un péptido de tres aminoácidos (gamma glutamil-cisteinilglicina), es un antioxidante abundante que se encuentra en las células eucariotas (Griffith, 1999; Sies, 1999).

En la Figura 10 se muestra el contenido de glutatión total y oxidado. El glutatión total disminuyó de manera dependiente de la concentración del tratamiento con FgE-CU, mientras que el glutatión oxidado aumentó. La concentración del glutatión oxidado del control positivo fue la más baja en comparación a los demás grupos, seguido del control negativo. En cuanto a la concentración del glutatión total, el control negativo fue estadísticamente más baja en comparación a los demás grupos.

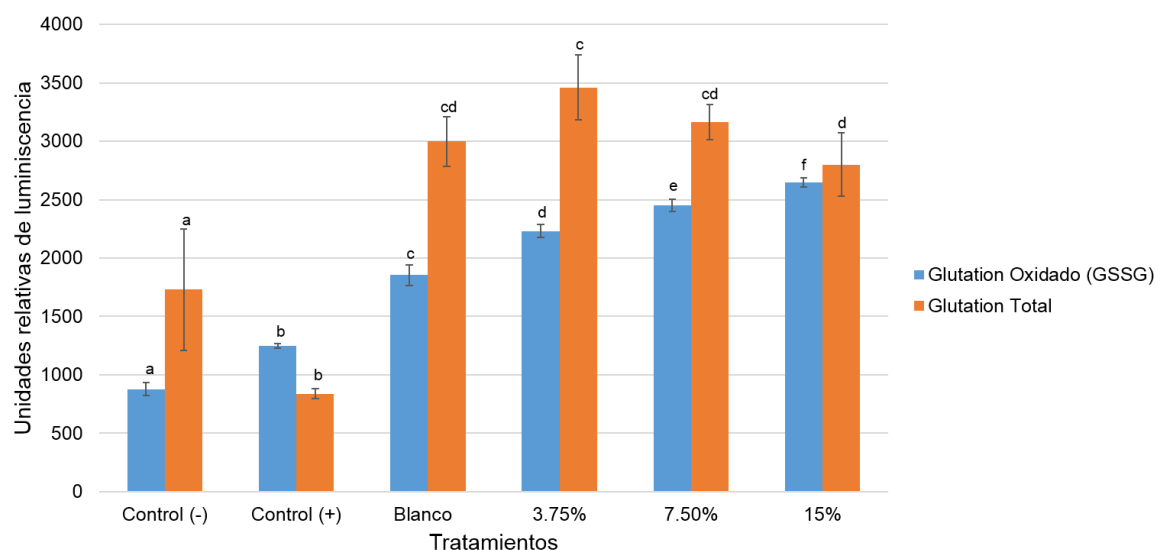


Figura 10. Contenido de glutatión total y glutatión oxidado (GSSG) en la línea celular de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento con el FgE-CU. El Control (-) representa a las células sin tratamiento. Control (-): células sin tratamiento. Control (+): células tratadas con peróxido de hidrógeno al 20%. Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado \pm ES. Letras diferentes por barra, por color, expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Dentro de las células, el total de GSH existe libre y unido a las proteínas. Es el antioxidante más abundante en las células aeróbicas, presente en

concentraciones micromolares en los fluidos corporales y en milimolar en el tejido (Janáky *et al.*, 2007). Puesto que la enzima glutatión reductasa, glutatión libre que se revierte a partir de su forma oxidada (GSSG), es constitutivamente activa e inducible en el estrés oxidativo, el glutatión libre existe casi exclusivamente en su forma reducida. El glutatión oxidado (GSSG) es un indicador de la salud de las células y el estrés oxidativo. Ciertos productos químicos reaccionan con GSH para formar aductos o para aumentar la GSSG niveles, disminuyendo la relación de la reducción de glutatión oxidado (GSH/GSSG). Las mediciones de GSH y GSSG tanto son útiles en sistemas experimentales porque los cambios en la relación GSH/GSSG están asociados con la enfermedad humana, envejecimiento y eventos de señalización celular (Ghezzi, 2005; Rebrin y Sohal, 2008; Ballatori *et al.*, 2009).

La relación de la reducción de glutatión oxidado dentro de las células se utiliza a menudo como un marcador de toxicidad celular (Carelli *et al.*, 1997; Noctor y Foyer, 1998; Locigno y Castronovo, 2001; Townsend *et al.*, 2003). Para determinar el grado de estrés oxidativo por el glutatión es necesario conocer la relación de GSH: GSSG.

La relación del glutatión reducido con el glutatión oxidado se muestra en el Cuadro 19. La relación del glutatión reducido con el oxidado se redujo de manera dependiente de la concentración del tratamiento con el FgE-CU. La tendencia a disminuir la relación del glutatión con el oxidado fue la siguiente: control negativo > Blanco > 3.75% de FgE-CU > 7.5% de FgE-CU > 15% de FgE-CU > Control positivo. Por lo que, el tratamiento indujo estrés oxidativo, determinado por la disminución en la relación del glutatión reducido con el oxidado.

Cuadro 19. Efecto del FgE-CU sobre la relación de glutatión reducido vs glutatión oxidado.

Grupo	GSH/GSSG
Control (-)	1.9
Control (+)	-0.7
Blanco FgE-CU	1.2
3.75% FgE-CU	1.1
7.50% FgE-CU	0.6
15% FgE-CU	0.1

GSH/GSSG representa la relación del glutatión reducido (GSH) con el glutatión oxidado (GSSG). Control (-): células sin tratamiento. Control (+): células tratadas con peróxido de hidrógeno al 20%. Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado.

El cáncer es resultado de una división celular descontrolada causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos. Existen decenas de formas en que se presenta la enfermedad, pero su fisiopatología básica comprende aberraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que gobierna el y que por tanto causan las desregulaciones de este (Golias *et al*, 2004).

VII.8.4. Efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado sobre las fases del ciclo celular, en células de adenocarcinoma humano SW480

En el Cuadro 20 se muestra el efecto del tratamiento con FgE-CU sobre las fases del ciclo celular de las células SW480.

Cuadro 20. Efecto del FgE-CU sobre las fases del ciclo celular de las células SW480.

Grupo	G0	G1	S	G2
Control (-)	7.5 ± 1.4 ^a	29.9 ± 4.6 ^a	1.5 ± 2.9 ^a	26.3 ± 5.5 ^a
Control (+)	5.5 ± 1.2 ^a	59.8 ± 1.3 ^b	-2.4 ± 3.9 ^a	34.4 ± 5.8 ^a
Blanco FgE-CU	7.2 ± 1.2 ^a	27.7 ± 4.1 ^a	1.2 ± 1.5 ^a	28.9 ± 3.7 ^a
3.75% FgE-CU	17.5 ± 2.1 ^b	19.6 ± 1.2 ^c	0.7 ± 1.9 ^a	16.7 ± 1.6 ^b
7.50% FgE-CU	24.2 ± 2.9 ^c	18.5 ± 4.0 ^c	-2.9 ± 0.8 ^a	13.2 ± 1.8 ^c
15% FgE-CU	28.8 ± 3.3 ^c	11.4 ± 2.5 ^d	-2.4 ± 0.3 ^a	7.9 ± 0.2 ^d

Control (-): células sin tratamiento. Control (+): células tratadas con peróxido de hidrógeno al 20%. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por duplicado ± ES, expresados como porcentaje de DNA/ 100% células. G₀: fase de reposo, G₁: primera fase de crecimiento, G₂: segunda fase de crecimiento. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa (P<0.05), prueba de Tukey.

En comparación con el control negativo, en el control positivo se observa acumulación de DNA en la fase G1 disminuyendo el contenido en la fase S. La distribución de DNA en las fases del ciclo celular de las células SW480 sometidas al blanco de la fermentación fue estadísticamente igual al control negativo.

Después de 24 h de tratamiento con FgE-CU, las células se detienen en la fase S del ciclo celular que resulta en la posterior acumulación de células con DNA fragmentado (fase subG0) que corresponde a células apoptóticas, como más tarde

se confirmó por el ensayo de anexina V. Este estudio demuestra que el FgE-CU causa arresto al ciclo celular en la fase sub G0.

VII.8.5. Efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado sobre la membrana mitocondrial en células de adenocarcinoma humano SW480

El daño en la membrana mitocondrial en las células SW480 por efecto del tratamiento con FgE-CU se puede muestra en la Figura 11.

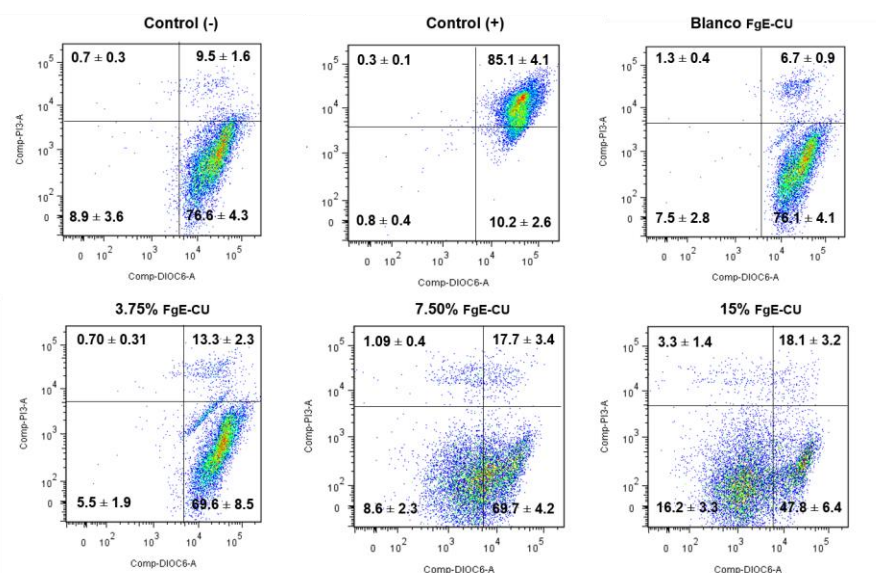


Figura 11. Efecto de FgE-CU sobre la membrana mitocondrial (ensayo DIOC6) de células de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento. Control (-): células sin tratamiento. Control (+): células tratadas con peróxido de hidrógeno al 20%. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por duplicado \pm ES, expresados como porcentaje celular / 100% células.

En la Figura 11 se observa que al aumentar la concentración del tratamiento con el FgE-CU, parte de la población celular se desplaza desde la zona de células viables (cuadrante derecho inferior) a la zona con células muertas por daño en la mitocondria con membrana intacta (MMI) (cuadrantes izquierdo inferior y superior) y otro porcentaje a la zona con células muertas por daño en la mitocondria y en la membrana (MM) (cuadrante derecho superior), cuando son comparados contra los controles negativo y positivo. Es importante mencionar que

el control negativo, lo conforman células viables con un porcentaje del 76.6%, células con MMI del 9.6% y el 9.5% son células con MM. El control positivo está conformado por una población del 85.1% de células con MM, 1.1% de células con MMI y 10.2% de células viables.

El porcentaje de células viables durante el tratamiento con FgE-CU se observó disminuido al aumentar la concentración del extracto, desde un 69 a 48%. Esto debido a que la población celular viable se va desplazando a las demás zonas. La población de células muertas por MMI aumentó en forma dependiente de la concentración del extracto de un 6.2 a 19.5%. En cuanto a la población de células muertas por MM, también se observó incrementada en forma dependiente de la concentración del extracto, pasando del 13.3 al 18.1%. La población de células SW480 en tratamiento con el blanco de FgE-CU se concentró en la zona de viabilidad con un 76.1%, 8.8% de células con MMI y el 6.7% en la zona con células MM. Por lo anterior, se demuestra que el tratamiento con FgE-CU daña la mitocondria, pero sin alteración en la integridad de la membrana, sugiriendo un proceso apoptótico en etapa temprana.

VII.8.6. Efecto apoptótico del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado en células de adenocarcinoma humano SW480

En las primeras etapas de la apoptosis, se producen cambios en la superficie celular (Andree *et al.*, 1990; Creutz, 1992; Fadok *et al.*, 1992). Una de estas alteraciones de la membrana plasmática es la traslocación de fosfatidilserina (FS) de la parte interna de la membrana a la capa exterior, por el cual la PS queda expuesta en la superficie externa de la célula (Vermes *et al.*, 1995). Fadok *et al.*, (1992), demostraron que los macrófagos reconocen específicamente la FS expuesta en la superficie de los linfocitos durante el desarrollo de la apoptosis. El reconocimiento y la fagocitosis de células y cuerpos apoptóticos protegen a los organismos de la exposición a los compuestos celulares que conducen a inflamación, que acompaña a la necrosis.

El análisis de FS en la capa exterior de las membranas celulares apoptóticas se lleva a cabo mediante el uso de Anexina-V-fluoresceína y yoduro de

propidio (PI) para la diferenciación a partir de células necróticas, etiquetando con un marcador de superficie celular para la caracterización de células.

En la Figura 12 se muestra el efecto apoptótico del FgE-CU sobre células transformadas de colon humano usando el ensayo de anexina V.

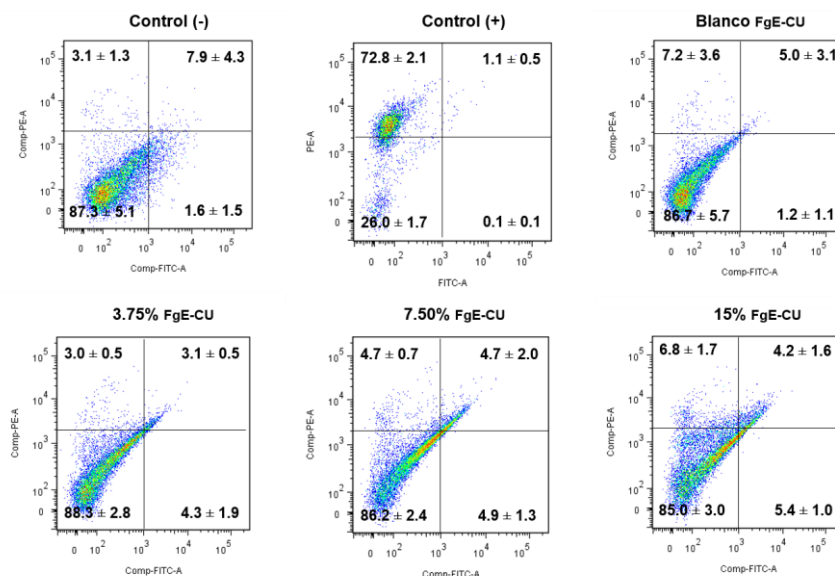


Figura 12. Efecto apoptótico (ensayo anexina V) del FgE-CU sobre células de adenocarcinoma humano SW480, después de 24 h de tratamiento. Control (-): células sin tratamiento. Control (+): células tratadas con peróxido de hidrógeno al 20%. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por duplicado \pm ES, expresados como porcentaje celular / 100% células.

Los resultados muestran que, al aumentar la concentración del tratamiento con el FgE-CU, parte de la población celular se desplaza desde la zona de células viables (cuadrante izquierdo inferior) a la zona con células muertas por apoptosis (cuadrantes derecho superior e inferior) y otro porcentaje a la zona con células muertas por necrosis (cuadrante izquierdo superior), cuando son comparados contra los controles negativo y positivo. Cabe mencionar que el control negativo lo conforman células viables (87.3%), el 9.5% son células que sufrieron procesos apoptóticos y el 3.1% son células necróticas. El control positivo está conformado por una población necrótica de 72.8%, 1.2% con células apoptóticas y 26.0% con células viables.

El porcentaje de células viables durante el tratamiento con FgE-CU se observó ligeramente disminuido al aumentar la concentración del extracto, desde

un 88.3 a 85.0%. Esto debido a que la población celular viable se va desplazando a las demás zonas. La población de células muertas por apoptosis aumentó en forma dependiente de la concentración del extracto de un 7.4 a 9.6%. En cuanto a la población de células muertas por necrosis, también se observó aumentada en forma dependiente de la concentración del extracto de 3.0 a 6.8%. La población de celular SW480 en tratamiento con el blanco de FgE-CU se concentró en la zona de células viables en un 86.7%, el 6.2% en la zona apoptótica y el 7.2% en la zona necrótica.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que el café usado (CU) es fuente rica en compuestos químicos nutritivos en proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales.

El CU presentó buena composición nutracéutica con propiedades funcionales que incluye compuestos fenólicos totales, ácidos fenólicos (clorogénico, ascórbico, gálico y cumárico), flavonoides y taninos condensados, que se sabe, pueden estar conjugados con la fibra dietética que se encuentra presente en el CU, para formar la fibra dietética antioxidante; todo esto contribuye a su la alta capacidad antioxidante.

Los compuestos presentes en el CU son liberados de su matriz durante la digestión gastrointestinal *in vitro*. Además, de atravesar la pared intestinal para ser absorbidos, abriendo la posibilidad de alcanzar el torrente sanguíneo y llegar a los sitios de acción donde podría aplicar su efecto benéfico.

Durante la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del café usado se tuvo la acidificación del medio como respuesta a la disminución del pH, lo que indica posible producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales se le han relacionados con la inhibición de células transformadas de colon humano.

Los productos de la fermentación colónica de la fracción no digerible del CU (FgE-CU) mostraron un efecto inhibitorio, dosis-dependiente, sobre la sobrevivencia de células de adenocarcinoma humano, con una CL₅₀ del 19%.

Estos productos (FgE-CU) tienen la capacidad de generar la activación de la caspasa 3 en células de cáncer de colon humano, la cual es una proteína efectora que desencadena la muerte celular programada o apoptosis.

El tratamiento con los FgE-CU sobre las células de adenocarcinoma humano genera posible estrés oxidativo como resultado de la disminución en la relación del glutatión reducido con el oxidado, siendo este estrés una posible vía de activación del proceso apoptótico por medio de las funciones redox de la mitocondria celular.

En este sentido, los resultados de citometría muestran que los FgE-CU tienen efecto sobre la mitocondria de las células de adenocarcinoma humano, pues

se muestra dañada, sin embargo, se mantiene íntegra su membrana lo cual sugiere un proceso de apoptosis temprano.

El proceso apoptótico que muestran los FgE-CU sobre las células de adenocarcinoma humano se corroboraron con los ensayos de anexina V y el análisis de fases del ciclo celular, en el cual la concentración de DNA en la fase sub-G1 es correspondiente a células apoptóticas.

Por lo tanto, el CU es una matriz rica en compuestos nutritivos y nutracéuticos con alta capacidad antioxidante que al ser sometido a digestión gastrointestinal *in vitro* y posterior fermentación colónica *in vitro*, podría ejercer su potencial efecto benéfico en la salud. De esta manera, el CU podría utilizarse como ingrediente nutracéutico para el desarrollo de nuevos productos e introducirlo en la industria de los alimentos y así darle un valor agregado al residuo que finalmente es desechado.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, A., Martínez-Balibrea, E., Manzano, J. L., y Cirauqui. 2003. Biología molecular del cáncer colorrectal. *Cir. Esp.* 73(1):9-16.
- Adams, J. D., Wang, B., Klaidman, L. K., LeBel, C. P., Odunze, I. N., and Shah, D. 1993. New aspects of brain oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 15:195-202.
- Adams, J. M., and Cory, S. 2001. Life or death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 26:61-66.
- Agresti, P. M., Franca, A. S., Oliveira, L. S., and Augusti, R. 2008. Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile. *J. Agric. Food Chem.* 106(2):787-796.
- Akerberg, A. K. E., Liljeberg, H. G. M., Granfeldt, Y. E., Drews, A. W., and Björck, I. M. E. 1998. An *in vitro* Method, Based on Chewing, to Predict Resistant Starch Content in Foods Allows Parallel Determination of Potentially Available Starch and Dietary Fiber. *J. Nutr.* 128:651-660.
- Alarcon-Vargas, D., and Ronai, Z. 2002. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis.* 23(4):541-7.
- Alberts, B., Johnson L., and Raff, R. W. 1998. *Essential cell biology*, Garland Publishing, Inc. New York and London, USA. 547-562, 582-584.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2004. *Biología molecular de la célula*. 5ta ed.
- Amarante-Mendes, G. P., and Green, D. R. 1999. The regulation of apoptotic cell death. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32:1053-1061.
- Amarowicz, R., Naczek, M., Zadernowski, R., and Shahidi, F. 2000a. Antioxidant activity of condensed tannins of beach pea, canola hulls, evening primrose, and faba beans. *J. Food Lipids.* 7:199-211.

- Amarowicz, R., Naczek, M., and Shahidi, F. 2000b. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77:957–961.
- Amarowicz, R., Bautista, D., and Pegg, R. B. 2000c. Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli* K 12. *Nahrung.* 44:60–62.
- Amarowicz, R., and Troszyńska, A. 2003. Antioxidant activity of extract of pea and its fractions of low molecular phenolics and tannins. *J. Food Nutr. Sci.* 12/53(SI 1):10–15.
- American Association of Cereal Chemists 2001. <http://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/documents/dietaryfiber/dfdef.pdf>
- Andree, H. A., Reutelingsperger C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T., and Willems, G. M. 1990. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 265(9):4923-8.
- Andreyev, H. J., Norman, A. R., Cunningham, D., Oates, J. R., and Clarke, P. A. 1998. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter RASCAL study. *J. Natl. Cancer Inst.* 90:675-84.
- Anonymous. 2001. Nutritional profile of no. 1 Canada western flaxseed and of yellow flaxseed samples. *Canadian.* 1:10,14,16,20.
- Anzueto, F., Baumann, T. W., Graziosi, G., Piccin, C. R., Söndahl, M. R., and Van der Vossen, H.A.M. 2005. The Plant. In: *Espresso Coffee. The Science of Quality.* 2a ed. California, USA: Elsevier Academic Press. 21-86.
- Ao, X., Zhou, T. X., Meng, Q. W., Lee, J. H., Jang, H. D., Cho, J. H., and Kim, I. H. 2011. Effects of a carbohydrase cocktail supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, blood profiles and meat quality in finishing pigs fed palm kernel meal. *Livest. Sci.* 137(1):238-243.
- Artursson, P., Palm, K., and Luthman, K. 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Ad. Drug Deliv.* 46(1–3): 27–43.

- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Sci.* 281:1305-1308.
- Arya, M., and Rao, L. J. M. 2007. An impression of coffee carbohydrates. *Food Nutr. Sci.* 47(1):51–67.
- Aura, A. M., Martin-Lopez, P., O'Leary, K.A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K. M., and Poutanen, K. 2005. *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *J. Nutr.* 44(3):133–142.
- Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C. L. 2009. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol. Chem.* 390:191–214.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., and Lanusse, C. 2006. Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: *in vitro* and *in vivo* assessments. *Drug Metab. Dispos.* 34:457–463.
- Ballesteros, L. F., Teixeira J. A., and Mussatto S. I. 2014. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Technol.* 7:3493–3503.
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R., and Vogelstein, B. 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Sci.* 14;244(4901):217-21.
- Belitz, H. D., Grosch, W., and Schieberle, P. 2004. *Food Chemistry (TR)*. 3a ed. Germany: Springer. 939-951.
- Belitz, H. D., Grosch, W., and Schieberle, P. 2009. Coffee, tea, cocoa. In H.-D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle (Eds.), *Food Chemistry 4th ed.*, Leipzig: Springer. 938–951.
- Berenblum, I., and Shubik, P. 1947. A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *Br. J. Cancer.* 1(4):383–391.

- Berge, G. E., M. Goodman, M., and Espe, E. Lied. 2004. Intestinal absorption of aminoacids in fish: kineics and interacción of the *in vitro* uptake of L-methionine in Atlantic salmon (Salmon salar L.). *Aquacult.* 229:265-273.
- Bernhardi, R. V. M. 2004. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? *Rev. Chil. Neuro-Psiquiat.* 42(4):281-292.
- Betancur-Ancona, D., Peraza-Mercado, G., Moguel-Ordoñez, Y., and Fuertes-Blanco, S. 2004. Physicochemical characterization of lima bean (*Phaseolus lunatus*) and Jack bean (*Canavalia ensiformis*) fibrous residues. *Food Chem.* 84(2):287–295.
- Bingham, S. A., Norat, T., Moskal, A., Ferrari, P., Slimani, N., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjønneland, A., Overvad, K., Martinez, C., Dorronsoro, M., González, C. A., Ardanaz, E., Navarro, C., Quirós, J. R., Key, T. J., Day, N. E., Trichopoulou, A., Naska, A., Krogh, V., Tumino, R., Palli, D., Panico, S., Vineis, P., Bueno-de-Mesquita, H. B., Ocké, M. C., Peeters, P. H. M., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R., and Riboli, E. 2005. Is the association with fiber from foods in colorectal cancer confounded by folate intake?. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(6):1552-1556.
- Bjorck, I., Grandfeldt, Y., Liljeberg, H., Tovar, J., and Asp, N. G. 1994. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *Am. J. Clin. Nutr.* 59:699S-705S.
- Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., and Fogliano, V. 2004. Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. *J. Agr. Food Chem.* 52(5):1338–1343.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., and Bohn, T. 2011. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem.* 128(1):14–21.

- Bown, R. L., Gibson, J. A., Sladen, G. E., Hicks, B., and Dawson, A. M. 1974. Effects of lactulose and other laxatives on ileal and colonic pH measured by a radiotelemetry device. *Gut*. 15:999–1004.
- Brandan, E. C., Retamal, C., Cabello-Verrugio, and Marzolo, M. P. 2006. The low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP, functions as an endocytic receptor for decorin. *J. Biol. Chem.* 281:31562-31571.
- Bravo, J., Juániz, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L. W., Peña, M. P. D., and Cid, C. 2013a. Evaluation of Spent Coffee Obtained from the Most Common Coffeemakers as a Source of Hydrophilic Bioactive Compounds. *Chem. Eng.* 1:1286–1294.
- Bravo, J., Monente, C., Juániz, I., Peña M. P. D., and Cid C. 2013b. Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Res. Inter.* 50:610–616.
- Brezová, V., Slebodová, A., and Stasko, A. 2009. Coffee as a source of antioxidants: an EPR study. *Food Chem.* 114:859-868.
- Budryn, G., Nebesny, E., Podszdek, A., Zyzelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S., and Janda, B. 2009. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *Food Res. Tech.* 228:913–922.
- Burdon, T., Smith, A., and Savatier, P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 12(9):432-438.
- Burton, R., Fan, X., and Austic, G. 2010. Evaluation of two-step reaction and enzyme catalysis approaches for biodiesel production from spent coffee grounds. *Int. J. Green Energy.* 7:530–600.
- Butterfield, D. A., Castegna, A., and Drake, J. 2002. Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. *Nutr. Neurosci.* 5:229–39.

- Buttke, T. M., and Sandstrom, P. A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol.* 15:7–10.
- Campos-Vega R., Reynoso-Camacho R., Pedraza-Aboytes G., Acosta-Gallegos J., Guzmán-Maldonado S., Paredes-López O., Oomah B., and Loarca- Piña G. 2009. Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.* 74(7):T59.
- Campos-Vega, R., Guevara-González, R. G., Guevara-Olvera, L. B., Oomah, D., and Loarca-Piña, G. 2010. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cáncer cells (HT-29). *Food Res.* 47:1057-1064.
- Campos-Vega, R., García-Gasca, T., Guevara-Gonzalez, R., Ramos-Gomez, M., Oomah, B. D., and Loarca-Piña, G. 2013. Human Gut Flora-Fermented Nondigestible Fraction from Cooked Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Modifies Protein Expression Associated with Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Proliferation in Human Adenocarcinoma Colon Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 60:12443–12450.
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., and Oomah, B. D. 2015. Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arábica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Res. Int.*
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña G., and Oomah B. D. 2002. Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50:6975–6980.
- Carelli, S. A. Ceriotti, A. Cabibbo, G. Fassina, M., Ruvo, and Sitia, R. 1997. Cysteine and glutathione secretion in response to protein disulfide bond formation in the ER. *Sci.* 277:1681–1684.
- Carethers, J. M. 1996. The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroent. Clinics North Am.* 25:737-54.
- Cascales-Angosto, M. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* 69.

- Castedo, M., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Marchetti, P., Uriel, J., and Kroemer G. 1995. Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion in vivo. *Eur. J. Immunol.* 25:3277–3284.
- Cavenee, W. K., and White, R. L. 1995. The genetic basis of cancer. *Sci. Am.* 272(3):72-79.
- Cheyrier, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:223S-229S.
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., and Lin, Y. 1998. Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38:421–464.
- Claude B. 1979. Etude bibliographique: utilisation des sous-produits du cafe. *Cafe Cacao The.* 23:146–52.
- Clay, J. 2004. Coffee. In *World Agriculture and the Environment*. Washington, DC: Island Press. 69-91.
- Cohen, J. E. 1995. The Sciences (The New York Academy of Sciences). 35:6. http://web.archive.org/web/http://nature.berkeley.edu/BeahrsELP/2005readingswebsite/w3_pop_poverty_env/how_many_people.pdf.
- Cossarizza, A., Kalashnikova, G., Grassilli, E., Chiappelli, F., Salvioli, S., Capri, M., Barbieri, D., Troiano, L., Monti, D., and Franceschi, C. 1994. Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis; A study at a single cell level. *Exp. Cell Res.* 214:323-330.
- Couto, R. M., Fernandes, J., Gomes da Silva, M. D. R., and Simões, P. C. 2009. Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds. *J. Supercrit. Fluids.* 51:159–166.
- Creutz, C. E. 1992. The annexins and exocytosis. *Sci.* 6;258(5084):924-31.
- Crozier, T. W. M., Stalmach, A., Lean, M. E. J., and Crozier, A. 2012. Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: Potential health implications. *Food Funct.* 3(1):30.

- Cruz-Bravo, R. K., Guevara-González, R., Ramos-Gómez, M., García-Gasca, T., Campos-Vega, R., Oomah, B. D., and Loarca-Piña, G. 2011. Fermented nondigestible fraction from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Negro 8025 modulates HT-29 cell behavior. *J. Food Sci.* 76(2):T41-47.
- Cummings, J. H., and Macfarlane, G. T. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Applied. Bacteriol.* 70:443-459.
- Czerny, M., and Grosch, W. 2000. Potent Odorants of Raw Arabica Coffee. Their Changes during Roasting. *J. Agr. Food Chem.* 48:868-872.
- Dai, J., and Mumper, R. J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Mol.* 15:7313-7352.
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Staiano-Coico, L., Kapuscinski, J., and Melamed, M. R. 1982. Interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.* 42:799–806.
- Darzynkiewicz, Z., Li, X., and Gong, J. 1994. Assays of cell viability. Discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol.* 41:16–39.
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., and Traganos, F. 2001. Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. *Methods Cell Biol.* 63:527–546.
- Dean, J. 2007. Agricore United, Canada. 1:10-14.
- Decaudin, D., Marzo, I. I., Brenner, C., and Kroemer, G. 1998. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: A prospective novel target of cancer therapy (Review). *Int. J. Oncol.* 12:141-152.
- DeFelice, S. L. 1992. The nutraceutical initiative: a recommendation for U.S. Economic and regulatory reforms. *Genet. Eng.* 12:13–15.
- Dupas, C., Baglieri, A. M., Ordonaud, C., Tom, D., and Maillard, M. N. 2006. Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Mol. Nutr. Food Res.* 50:1053–1060.

- Dykes, L., and Rooney, L. W. 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Sci.* 44:236.
- EcuRed. 2012. De: http://www.ecured.cu/index.php/Archivo:Ciclo_celular.png.
- Edwards, C. A., and Rowland, I. R. 1992. Bacterialfermentation in the colon and its measurement. En *Dietary fibre - A component of food*, Schweizer, T. F.; Edwards, C.A., Eds.; Springer-Verlag: London. 119-136.
- Elinos-Báez, C. M., Maldonado, V., y Meléndez-Zajgla, J. 2003. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac. Méd. Méx.* 139:5.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell deth. *Toxicol. Pathol.* 35(4):495-516.
- Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A. M., Napolitano, A., Vitale, D., and Fogliano, V. 2005. Antioxidant activity and dietary fiber in durum wheat bran by-products. *Food Res. Inter.* 38:1167–1173.
- Esquivel, P., Kramer, M., Carle, R., and Jiménez, V. M. 2010. Anthocyanin profiles and caffeine contents of wet-processed coffee (*Coffea arabica*) husks by HPLCAD- MS/MS. In: 28th International Horticultural Congress. Book of abstracts. Amsterdam: Elsevier. 129-30.
- Esquivel, P., and Jiménez, V. M., 2011. Functional properties of coffee and coffee byproducts. *Food Res.* 5:28.
- Etienne, H. 2005. Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In S. M. Jain and P. K. Gupta (Eds.), *Protocol for somatic embryogenesis in woody plant*. Dordrecht: Springer. 167–168.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 1;148(7):2207-16.
- Farah, A., and Donangelo, C. M. 2006. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 18:23–36.

- Farah, A., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S., and Trugo, L. C. 2006. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chem.* 95:373–380.
- Farrell, T. L., Gomez-Juaristi, M., Poquet, L., Redeuil, K., Nagy, K., and Renouf, M. 2012. Absorption of dimethoxycinnamic acid derivatives *in vitro* and pharmacokinetic profile in human plasma following coffee consumption. *Mol. Nutri. Food Res.* 56(9):1413–1423.
- Fassler, C., Arrigoni, E., Venema, K., Hafner, V., Brouns, F., and Amado, R. 2006. Digestibility of resistant starch containing preparations using two *in vitro* models. *Eur. J. Nutr.* 45:445-453.
- Fayle, S., and Gerrard, J. 2005. *La Reacción de Maillard*. Ed. Acribia. España, Federacafé. 1997. *Fábrica de café liofilizado: Composición química de la borra de café*. Chinchiná. 2.
- Feregrino-Pérez A., Berumen L., García-Alcocer G., Guevara-González R., Ramos-González M., Reynoso-Camacho R., Acosta-Gallegos J., and Loarca-Piña G. 2008. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *J. Agric. Food Chem.* 56:8737.
- Fernández, L., Kiefer, J., Fosdick, L., and McConkey, D. 1995. Oxygen radical production and thiol depletion are required for CaX⁺-mediated endogenous endonuclease activation in apoptotic thymocytes. *J. Immunol.* 155:5133-5139.
- Ferreira, L. O., Oliveira, R. M. E., Pimenta, C. J., Torres, L. M., Leal, R. S., and Garcia, T. S. 2012. Characterization of Fiber Modified Spent Coffee Grounds for Treatment with Alkaline Hydrogen Peroxide. THE 24TH International Conference on Coffee Science. November 11-16. San José, Costa Rica.
- Ferruzzi, M. G. 2010. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiol. Behav.* 100(1):33–41.

- Flament, I. 2002. Coffee Flavor Chemistry. West Sussex, England: John Wiley and Sons, Ltd. 410.
- Fogliano, V., Corollaro, M. L., Vitaglione, P., Napolitano, A., Ferracane, R., and Travaglia, F. 2011. *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. Mol. Nutri. Food Res. 55(S1):S44–S55.
- Franca, A. S., Oliveira, L. S., and Ferreira, M. E. 2009. Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds. 249(1);30:267–272
- Fukumoto, L. R., and Mazza, G. 2000. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compound. J. Agric. Food Chem. 48:3597-3604.
- García-Luna, P. P., y López-Gallardo, G. 2007. Nutr. Hosp. 22(2):5-13.
- Gartel, A. I., and Shchors, K. 2003. Mechanism of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. Exp. Cell Res. 283:17-21.
- Geydan, Gil, Giraldo, González, Jaramillo, Maestre, McEwen, Muñetón, Ossa, Parra, Patiño, Ramírez, Rodríguez, Rojas Rugeles, Segura, Spinel, Yildiz, y Vásquez. 2006. Biología de la célula. 1ª Ed. Colombia: Fondo Editorial Biogénesis.
- Ghezzi, P. 2005. Regulation of protein function by glutathionylation. Free Radic. Res. 39:573–580.
- Ginz, M., Balzer, H. H., Bradbury, A. G. W. and Maier, H. 2000. Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. Eur. Food Res. Tech. 211:404–410.
- Givens, D. I., and Barber, W. P. 1986. In vivo evaluation of spent coffee grounds as a ruminant feed. Agr. Waste. 18:69–72.
- Globocan. 2008. Organización Mundial de la Salud. 3. Xu, Q., W. Tao and Z. Ao: Antioxidant activity of vinegar melanoidins. Food Chem. 102:841-849.

- Gogvadze, V., and Orrenius, S. 2006. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem. Biol. Interact.* 163:4-14.
- Golias, C. H., Charalabopoulos, A., and Charalabopoulos, K. 2004. Cell Proliferation and Cell Cycle Control: a mini review. *Int. J. Clin. Pract.* 58(12):1134-1141.
- Goñi, I., Diaz-Rubio, M. E., Pérez-Jiménez, J., and Saura-Calixto, F. 2009. Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber including associated polyphenols in food and beverages. *Food Res. Int.* 42:840-846.
- Gould, J. M. 1985. Enhanced Polysaccharide Recovery from Agricultural Residues and Perennial Grasses Treated with Alkaline Hydrogen Peroxide. *Biotechnol. Bioeng.* XXVII:893-896.
- Goya, L., Delgado-Andrade, C., Rufian-Henares, J., Bravo, L., and Morales, F. 2007. Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Mol. Nutr. Food Res.* 51:536-545.
- Grembecka, M., Malinowska, E., and Szefer, P. 2007. Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. *Sci. Environ.* 383:59–69.
- Green, D. R., and Reed, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Sci.* 281:1309–1312.
- Griffith, O. W. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 27:922-935.
- Grimm, S., and Brdiczka, D. 2007. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis.* 12:841-855.
- Guillon, F., and Champ, M. M. 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br. J. Nutr.* 88(3):S293-306.

- Gupta, S. 2000. Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *J. Clin. Immunol.* 20(4):229-239.
- Gupta, S. 2001. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* 69(25- 26):2957-2964.
- Guyton, A. C., and Hall, J. E. 2001. *Tratado de Fisiología Médica.* Mc Graw-Hill. 10^a edición. España.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. 1999. Creation of human tumourcells with defined genetic elements. *Nat.* 400:464-468.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine,* Ed 2. Clarendon Press, Oxford.
- Harborne, J. B., and Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochem.* 55:481.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nat.* 12(407):770-776.
- Hewitt, R. E., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsoskas M., Stamp, G. W. H., and Stetler-Stevenson, W. G. 2000. Validation of a model of colon cancer progression. *J. Pathol.* 192:446-454.
- Higdon, J. V., and Frei, B. 2006. Coffee and Health: A review of recent Human Research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46:101-23.
- Hirata, M., Kawasaki, N., Nakamura, T., Matsumoto, K., Kayayama, M., and Tamuro, T. 2002. Adsorption of dyes onto carbonaceous materials produced from coffee grounds by microwave treatment. *J. Colloid Interface Sci.* 17–22.
- Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 75(2):22;241–251.
- Hockenberry, D. 1995. Defining apoptosis. *Am. J. Pathol.* 146:16–19.

- Hoebler, C., Guillon, F., Fardet, A., Cherbut, C., and Barry, J. L. 1998a. Gastrointestinal or simulated *in vitro* digestion changes dietary fibre properties and their fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 77:327-333.
- Hoebler, B., Karinthi, A., Devaux, M. F., Guillon, F., Gallant, D. J. G., Bouchet, B., Melegary, C., and Barry, J. L. 1998b. Physical and chemical transformations of cereal food during oral digestion in human subjects. *Bri. J. Nutr.* 80:429-436.
- Hoebler, B., Devaux, M. F. Karinthi, A., Bellevile, C., and Barry, J. L. 2000. Particle size of solid food after human mastication and *in vitro* simulation of oral breakdown. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 51:353-366.
- Hoebler, B., Lecannu, G., Bellevile, C., Devaux, M. F., Popineau, Y., and Barry, J. L. 2002. Development of an *in vitro* system simulating bucco - gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53:389-402.
- Horton, A. A., and Fairhurst, S. 1987. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 18(1):27-79.
- Howard M. S. Natalet, P. J., and kamentsky L. A. 1979. Estimation of membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry (cyanine dyes/ionophores/lectins/ligand-receptor interactions). *Proc. Nati. Acad. Sci.* 76(11):5728-5730.
- Hu, Y., Martin, J., Le, R., and Young, G. P. 2002. The colonic response to genotoxic carcinogens in the rat: regulation by dietary fibre. *Carcinogenesis.* 23(7):1131-1137.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., and Artursson, P. 2007. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat. Protoc.* 2(9):2111–2119.
- Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yépez, S., and Livingston, E. 2007. Screening and detection of apoptosis. *J. Surg. Res.* 139:143-156.

- ICO. 2007. International Coffee Organization. Trade Statistics. Available: http://www.ico.org/coffee_prices.asp.
- Illy, A., and Viani, R. 2005. Espresso coffee: the science of quality, Elsevier, Amsterdam. 398.
- Inkielewicz-Stepniak, I., and Czarnowski, W. 2010. Food Chem. Toxicol. 48:1607.
- Instituto Nacional de Cancerología (INC). 2004. El cáncer, Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. Ministerio de Protección Social. República de Colombia.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2011. Instituto Nacional de Estadísticas, Geografía e Informática. Información sobre Tumores Malignos. México.
- Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. 1996. Role of Ced-3/ICE family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. J. Cell Biol. 133:1041-1051.
- Jaeschke, H. 1995. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 209(2):104-11.
- Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P., and Oja, S. S. 2007. Modulation of [3H] dopamine release by glutathione in mouse striatal slices. Neurochem. Res. 32:1357–1364.
- Jen, J., Kim, H., Piantadosi, S., Liu, Z. F., Levitt, R. C., and Sistonen, P. 1994. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 331:213-21.
- Jeong, C. H., Jeong, H. R., Choi, G. N., Kim, D. O., Lee, U., and Heo, H. J. 2011. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. Chin. Med. 24:6-25.
- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., and Saura-Calixto, F. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. J. Agric. Food Chem. 49:5489–5493.

- Kähkönen, Marja, Copia, A. I., and Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49:4076–4082.
- Kanavos, P. 2006. The rising burden of cancer in the developing world. *Ann. Oncol.* 17(8):viii15-viii23.
- Katiyar, S. K., and Mukhtar, H. 1996. Tea in chemoprevention of cancer: epidemiological and experimental studies. *Int. J. Oncol.* 8:221–238.
- Kemp, M., Go, Y. M., and Jones, D. P. 2008. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic. Biol. Med.* 44:921–937.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26:239-257.
- Khemiss, F. 2009. Effect of *in vitro* exposure to *Vibrio vulnificus* on hydro-electrolytic transport and structural changes of sea bream (*Sparus aurata* L.) intestine. *Fish Physiol. Biochem.* 35:541–549.
- Kim, Y. T., and Zhao, M. 2005. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med. J.* 46(5):597-613.
- Kim, S. Y. 2007. Neuroprotective and neurotrophic agents. In: Suk, K. (Ed.), *Research Focus on Natural Products and the Body's Immune and Inflammatory Systems*. Nova Science Publishers, New York. 23-39.
- Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., and Misra, M. 2008. Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *J. Agric. Food Chem.* 56:11757–11760.
- Kong, F., and Singh, R. P. 2008. Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *J. Food Sci.* 73(5):R67-R80.
- Korsmeyer, S. J., Yin, X. M., Oltvai, Z. N., Veis-Novack, D. J., and Linette, G. P. 1995. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim. Biophys.* 1271;1:63-66.

- Kosower, N. S., and Kosower, E. M. 1978. The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54:109–160.
- Kowaltowski, A. J., and Vercesi, A. E. 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26(3-4):463-71.
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S. A. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol.* 18:44-51.
- Kuan, C. Y., Yuen, K. H., Bhat, R., and Liong, M. T. 2011. Physicochemical characterization of alkali treated fractions from corncob and wheat straw and the production of nanofibres. *Food Res. Int.* 44(9):2822–2829.
- Ky, C. L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., and Noirot, M. 2001. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem.* 75:223–230.
- Lanza, E., Hartman, T. J., Albert, P. S., Shields, R., Slattery, M., Caan, B., Paskett, E., Iber, F., Kikendall, J. W., Lance, P., Daston, C., and Schatzkin, A. 2006. High dry bean intake and reduced risk of advanced colorectal adenoma recurrence among participants in the polyp prevention trial. *J. Nutr.* 136:1896-1903.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., Boroto, B., and Saura-Calixto, F. 1996. Mango peles as New Tropical Fiber: Preparation and Characterization. *LWT.* 29:729-733.
- Larrauri, J. A., Boroto B., and Crespo A. 1997. Water Recycling in Proccesing Orange Peel to a High Dietary Fibre Powder. *Int. J. Food Sci. Tech.* 32:73-76.
- Laurentin, A., and Edwards, C. A. 2001. *In vitro* fermentation of pyrodextrinized lentil and cocoyam starches. *Proc. Nutr. Soc.* 60:192A.
- Laurentin, A., and Edwards, C. A. 2003. A microtitremodification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assayfor glucose-based carbohydrates. *Anal. Biochem.* 315:143-145.

- Laurentin, A. 2004a. Starch pyrodextrins: *In vitro* fermentation and physiological effects. Thesis (PhD); University of Glasgow: Glasgow (Scotland).
- Laurentin, A., and Edwards, C. A. 2004b. Differential fermentation of glucose-based carbohydrates *in vitro* by human faecal bacteria—a study of pyrodextrinised starches from different sources. *Eur. J. Nutr.* 43(3):183-189.
- Laurentin, A. 2005. Pirodextrinas de almidón. Producción, digestibilidad y fermentación colónica *in vitro*. Memorias del Instituto de Biología Experimental. Ediciones IBE. 4:221-224.
- Lavrik, I. N., Golks, A., and Krammer, P. H. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115:2665-2672.
- Lawes, C. M., Vander Hoorn, S., and Rodgers, A. 2004. Global burden of blood-pressure-related disease (2001), *Int. Soc. Hypert.* 3;371(9623):1513-8.
- Lennon, S., Martin, S., and Cotter, T. 1991. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24(2):203–14.
- Leon, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 Ed. Aum. y Rev. San José, CR, IICA. 350-364.
- Li, M., Si, L., Pana, H., Rabbaa, A. K., Yana, F., Qiu, J., and Li, G. 2011. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion. *Int. J. Pharm.* 403:37–45.
- Lim, S. S., Gaziano, T. A., Gakidou, E., Reddy, K. S., Farzadfar, F., Lozano, R., and Rodgers, A. 2007. Prevention of cardiovascular disease in high-risk individuals in low-income and middle-income countries: health effects and costs. *Lancet.* 15;370(9604):2054-62.
- Lima, D. R. 2003. Café e Saúde: Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia. Rio de Janeiro: Medsi Editora.
- Liu, R., and Finley, J. 2005. Potential cell culture models for antioxidant research. *J. Agric. Food Chem.* 53:4311.

- Locigno, R., and Castronovo, V. 2001. Reduced glutathione system: Role in cancer development, prevention and treatment. *Int. J. Oncol.* 19:221–236
- López-Casillas, F. 2002. El ciclo celular bien vale un galardón. *Ciencia* enero-marzo. 74-77.
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M., and Markesbery, W. R. 1995. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurol.* 45:1594-1601.
- Luo, L., Shen, G. Q., Stiffler, K. A., Wang, Q. K., Pretlow, T. G., and Pretlow, T. P. 2006. Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer. *Carcinogenesis.* 27(6):1153–1159.
- Machado, E. S. M. 2009. Reaproveitamento de resíduos da indústria do café como matériaprima para a produção de etanol. MSc thesis. Braga, Portugal: Department of Biological Engineering, University of Minho.
- Maciag, T. 1990. Mecanismos moleculares y celulares de la angiogénesis. En: De Vita V, ed. *Avances en Oncología*. España: Espaxs Publicaciones Médicas. 109-127.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8:731–737.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jimenez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:727-747.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeflner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., and Kroemer, G. 1996. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J. Exp. Med.* 184:1155-1160.

- Martin, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Rufian-Henares, J. A., Morales, F. J., Bravo, L., and Goya, L. 2009. Biscuit melanoidins of different molecular masses protect human HepG2 cells against oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* 57:7250-7258.
- Mathers, C. D., and Loncar, D. 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS. Med.* 3(11):442.
- Mattila, P., Pihlava, J. M., and Hellstrom, J. 2005. Contents of phenolic acids, alkyl and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J. Agric. Food Chem.* 53:8290.
- Marzo, V., Bisogno, T., Melck, D., Ross, R., Brockie, H., Stevenson, L., Pertwee, R., and Petrocellis, L. 1998. Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett.* 436:449–454.
- McBain, A. J., and Macfarlane, G. T. 2001. Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in *in vitro* human gut bacterial ecosystems. *J. Med. Microbiol.* 50:833-842.
- McCloskey, T. W., Oyaizu, N., Coronese, M., and Pahwa, S. 1994. Use a flow cytometric assay to quantitate apoptosis in human lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71:114-118.
- McCusker, R. R., Goldenberg, B. A., and Cone, E. J. 2003. Caffeine content of specialty coffees. *J. Anal. Toxicol.* 27:520-22.
- McDonald, E. R., and el-Deiry, W. S. 2005. Mammalian cell death pathways. In: el-Deiry WS, ed. *Death receptors in cancer therapy*. Volume 1. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 1-42.
- McGowan, A. J., Fernandes, R. S., Samali, A., and Cotter, T. G. 1996. Anti-oxidants and apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 24:229-233.
- McKay, L. F., and Eastwood, M. A. 1983. The influence of dietary fibre on caecal metabolism in the rat. *Br. J. Nutr.* 50(3):679-84.
- Mecklin, J. P., and Peltomaki, P. 2000. Genetic changes associated with colon tumor development. *Ann. Chir. Gynaecol.* 89:211-5.

- Morantes, S. J., Páez, A., Cordero, C. P., Rincón, J., y Aristizábal, F. A. 2006. Análisis fitoquímico y de actividad citotóxica de fracciones aisladas del extracto etanólico total de *Acnistus arborescens*. *Acta Farm. Bonaerense*. 25(4):491-6.
- Morel, Y., and Barouki, R. 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* 15;342:481-96.
- Muir, A. D. 1995. Antioxidative activity of condensed tannins. In *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications* (F. Shahidi, ed.). AOCS Press, Champaign, IL. 204–212.
- Murthy, P. S., and Naidu, M. M. 2010. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food Bioprocess Tech.* s11947-010-0363-z.
- Murthy, P. S., and Naidu, M. M. 2012a. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition. *Resources, Conservation and Recycling*. 66:45–58.
- Murthy, P. S., and Naidu, M. M. 2012b. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food Bioprocess Technol.* 5:897–903.
- Mussatto, S. I. Ercília, E. M. S. Martins, S., and José, A. T. 2011a. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol.* 4:661–672.
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C., and Teixeira, J. A. 2011b. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*. 83:368–374.
- Nabais, J. M. V., Nunes, P., Carrott, P. J. M., Carrott, M. R., García, A. M., and Díez, M. A. D. 2008. Production of activated carbons from coffee endocarp by CO₂ and steam activation. *Process. Technol.* 89:262–268.

- Naczek, M., and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr.* 1054:95.
- Nakamura, T., Hirata, M., Kawasaki, N., Tanada, S., Tamuro, T., and Nakahori, Y. 2009. Decolorization of indigo carmine by charcoal from extracted residue of coffee beans. *J. Environ. Sci. Health.* 3:555–620.
- Namane, Mekarzia, A., Benrachedi, K., Belhaneche-Bensemra, N., and Hellal, A. 2005. Determination of the adsorption capacity of activated carbon made from coffee grounds by chemical activation with ZnCl₂ and H₃PO₄. *J. Hazard. Mater.* 119(1–3):189–94.
- Naranjo, M., Vélez, L. T., and Rojano, B. A. 2011. Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Rev. Cubana Plant Med.* 16(2):164-73.
- Nelson, A. L. 2001. High-fiber Ingredients. Eagan Press Handbook Serie. Eagan Press, St. Paul, Minnesota.
- Nenadis, N., Wang, L., Tsimidou, M., and Zhang, H. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS+ assay. *J. Agric. Food Chem.* 52(15):4669-4674.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J.P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., and Lazebnik, Y. A. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nat.* 6;376(6535):37-43.
- Nicoli, M., Anese, M., Parpinel, M., Franceschi S., and Lericci, C. 1997. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer lett.* 114:71-74.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 139:271-279.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hosteller, R., Cleary, K., Signer, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F. S.,

- Weslon, A., Modali, R., Harris, C. C., and Vogelstein, B. 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nat.* 342:705-708.
- Nijveldt, R.J., Van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., and Van Leeuwen, P. A. 2001. Flavonoids: review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74(4):418-25.
- Noctor, G., and Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:249–279.
- O’Brien, N., Woods, J., Aherne, S., and O’Callaghan, Y. 2000. Citotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell cultura models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem. Soc. Trans.* 28:22.
- Oliveira, L. F., Correa, J. L. G., Tosato, P. G., Borges, S. V., Alves, J. G. L. F., and Fonseca, B. E. 2011. Sugarcane bagasse drying in a cyclone: Influence of device geometry and operational parameters. *Drying Technol.* Singapore. 29:946-952.
- Oliveras-López, M. J., Berná, G., Jurado-Ruiz, E., de la Serrana, H. L. G., and Martín, F. 2014. Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *J. Funct. Foods.* 10:475–484.
- Oomah B., Cardador-Martínez A., and Loarca-Piña G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.* 85:935.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2009. HTA arterial. Recuperado el (2010) de enero de 20, de HTA arterial: <http://who.int/es/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2014. Cáncer. Nota descriptiva N° 297 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2013. El cáncer en las Américas. Recuperado el 9 de enero de (2014), de:

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292%3Acancer&catid=1866%3Ahsd0201a-cancer-ome&Itemid=3855&lang=es

- Orrenius, S., Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:143-83.
- Panusa, A., Zuorro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., and Petrucci, R. 2013. Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds. *J. Agric. Food Chem.* 61:4162–4168.
- Pardo, M. 2005. Citoquinesis en células eucariotas. *Inv. Cienc.* 40-49.
- Páscoa, R. N. M. J., Magalhães, L. M., and Lopes, J. A. 2013. FT-NIR spectroscopy as a tool for valorization of spent coffee grounds: Application to assessment of antioxidant properties. *Food Res. Int.* 51:579–586.
- Patil, A. N. A. N. D., Raheja, V. A. R. U. N., and Damre, A. N. A. G. H. A. 2010. Simultaneous analysis of intestinal permeability markers, caffeine, paracetamol and sulfasalazine by reverse phase liquid chromatography: a tool for the standardization of rat everted gut sac model. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 3:204-207.
- Pauwels, R. A., and Rabe, K. F. 2004. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet.* 14-20;364(9434):613-20.
- Pavlovic, M., Buntic, A, Šiler-Marinkovic, S., and Dimitrijevic-Brankovic, S. 2013. Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. *Sep. Purif. Technol.* 118:503–510.
- Penn, L. Z. 2001. Apoptosis modulators as cancer therapeutics. *Curr. Opin. Invest. Drugs.* 2:684-692.
- Pérez-Hernández, L. M., Chávez-Quiroz, K., Medina-Juárez, L. A., y Meza, N. G. 2012. Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de cafe verde y procesado de las especies *Coffea arábica* y *Coffea canephora*. *Rev. Cienc. Biol.* 15(1):51-56.

- Pérez-Martínez, M., Caemmerer, B., de Peña, M. P., Cid, C., and Kroh, L. W. 2010. Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. *J. Agr. Food Chem.* 58:2958–2965.
- Petit, P. X., Susin, S. A., Zamzami, N., Mignotte, B., and Kroemer, G. 1996. *FEBS Lett.* 396:7-13.
- Prasanthi, J. R. P., Dasari, B., Marwarha, G., Larson, T., Chen, X., Geiger, J. D., and Ghribi, O. 2010. *Free Radic. Biol. Med.* 49:1212.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E., and Komaitis, M. 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53:1190-1195.
- Puerta, Q. G. I. 2006. La humedad controlada del grano preserva la calidad del café. Chinchiná: Cenicafé. 8.
- Puerta, Q. G. I. 2008. Riesgos para la calidad y la inocuidad del café en el secado. Chinchiná: Cenicafé. 371:8.
- Puertas, M. A., Mesa, A. M., and Sáez, J. Á. 2005. *In vitro* radical scavenging activity of twocolumbian magnoliaceae. *Naturwissenschaften.* 92(8):381-4.
- Quezada, M. A. 2007. El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *Contactos.* 65:5–12.
- Ramalakshmi, K., Rao, L.J.M., Takano-Ishikawa, Y., and Goto, M. 2009. Bioactivities of lowgrade green coffee and spent coffee in different *in vitro* model systems. *Food Chem.* 115:79–85.
- Ramírez, B. 2011. El café en el consumo humano. Disponible: <http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/116.pdf>.
- Ramirez-Coronel, M. A., Nathalie Marnet, V. S., Kolli, K., Roussos, S., Guyot, S., and Augur, C. 2004. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arábica*) by thiolysis–high-performance liquid chromatography. *J. Agr. Food Chem.* 52(5):1344–1349.

- Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, G., and Loarca-Piña, G. 2014. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food Chem.* 15:161:254-60.
- Rao, D. R., R. Singh, V. Premalatha, B. K. Kariappa, M., Rekha, and Jayaswal, K. P. 2002. Manifestation of hybrid vigour and combining ability in polyvoltine x bivoltine hybrids of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Int. J. Ind. Entomol.* 4:23-30.
- Ravindranath, R., Khan, Y. A., Reddy, T. O., Rao, S. D. T., and Reddy, B. R. 1972. Composition and characteristics of Indian coffee bean, spent grounds and oil. *J. Sci. Food Agr.* 23:307-310.
- Rawel, H. M., and Kulling, S. E. 2007. Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. *J. Prot. Food.* 2:399–406.
- Rebrin, I., and Sohal, R. S. 2008. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60(13-14):1545-52.
- Rechner, A. R., Kuhnel, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., and Rice-Evans, C. A. 2002. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 33:220-235.
- Reed, J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73(5):1516-1528
- Reed, J. C. 2000. Apoptosis and cancer: Strategies for Integrating Programmed Cell Death. *Sem. Hematol.* 37:9-16.
- Renouf, M., Marmet, C., Giuffrida, F., Lepage, M., Barron, D., and Beaumont, M. 2014. Dose–response plasma appearance of coffee chlorogenic and phenolic acids in adults. *Mol. Nutr. Food Res.* 58(2):301–309.
- Richelle, M., Tavazzi, I., and Offord, E. 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* 49(7):3438-42.

- Richter, C. 1993. Pro-oxidants and mitochondrial Ca^{2+} : their relationship to apoptosis and oncogenesis. *FEBS Lett.* 325:104–107.
- Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51:2866-2887.
- Robertson, J. A., and Eastwood, M. A. 1981. A method to measure the water-holding properties of dietary fiber using suction pressure. *Brit. J. Nutr.* 46:247–255.
- Rojas, M. G. M. E. 2005. Caracterización del aroma del café molido de Puerto Rico mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad de Puerto Rico. 143.
- Rosso, A., Mossey, J., Lippa, C. F., and Am. J. 2008. Alzheimer's Dis. Other Dementias. 23:417.
- Rufian-Henares, J. A., and Morales, F. J. 2007. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 55:1480-1485.
- Russo, D., Bonomo, M.G., Salzano, G., Martelli, G., and Milella, L. 2012. Nutraceutical properties of Citrus clementina juices. *Pharmacol. SPL.* 1:84–93.
- Ryan, K. M., Phillips, A. C., and Vousden, K. H. 2001. Regulation and Function of the p53 tumor suppressor protein. *Cell Biol.* 13:332-337.
- Ryan, D., Shellie, R., Tranchita, P., Casilli, A., Mondillo, L., and Marrito, P. 2004. Analysis of roasted coffee bean volatiles by using comprehensive two dimensional gas chromatography time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1054:57-65.
- Sacchetti, G., Di Mattia, C., Pittia, P., and Mastrocola, D. 2009. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J. Food Eng.* 90:74–80.

- Sampaio, A. R. M. 2010. Desenvolvimento de tecnologias para produção de etanol a partir do hidrolisado da borra de café. MSc thesis. Braga, Portugal: Department of Biological Engineering, University of Minho.
- Sánchez, R., and Arboleda, G. H. 2008. Mitochondría y muerte celular. *Nova*. 6(10):190-200.
- Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto F., and Borderías A. J. 2008. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT-Food Sci. Tech.* 41:42-50.
- Sánchez-Torres, L. E., and Vargas, F. D. 2003. Apoptosis: the phenomenon and its determination. *Téc. Pecu. Méx.* 41:49-62.
- Santos, E. J., and Oliveira, E. 2001. Determination of mineral nutrients and toxic elements in Brazilian soluble coffee by ICP-AES. *J. Food Compos. Anal.* 14:523–531.
- Saura-Calixto, F., Goñi, I., Bravo L., and Mañas, E. 1993. Resistant Starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *J. Food Sci.* 58(3):642-643.
- Saura-Calixto, F. 1998. Antioxidant Dietary Fiber: A New Concept and a Potential Food Ingredient. *J. Agric. Food Chem.* 46:4303-4306.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., and Goñi, I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 101:492-501.
- Sáyago-Ayerdi, S.G., Arranz, S., Serrano, J., and Goñi, I. 2007. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *J. Agr. Food Chem.* 55(19):7886-7890.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., and Goñi I. 2010. *Hibiscus sabdariffa* L: Fuente de fibra antioxidante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.* 60:1.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., and Saltmarsh, M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:215S–217S.

- Scarlett, J. L., and Murphy, M. P. 1997. Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 418:282–286.
- Schafer, F., and Buettner, G. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **30**(11):1191–212.
- Secretaría de Salud (SSA), Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS). 2013. Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. Recuperado el 10 de enero de (2014), de: <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., and Finlay, B. B. 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 90:859–904.
- Sendzikiene, E., Makareviciene, V., Janulis, P., and Kitrys, S. 2004. Kinetics of free fatty acids esterification with methanol in the production of biodiesel fuel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106:31–836.
- Serna, S. 2004. Alimentos nutraceuticos: el futuro de nuestra alimentación. 6to. Congreso de QFB. Departamento de tecnología de alimentos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sies, H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H., editor. *Oxidative Stress*. Academic Press; London. 1–8.
- Sies, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition.* 25(12):1058–1071.
- Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27(9-10):916-921.
- Silva, M. A., Nebra, S. A., Machado, Silva, M. J., and Sánchez, C. G. 1998. The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. *Biomass. Bioenergy.* 14:457–67.

- Silvia, R. C., Piercey, M. F., Hoffmann, W. E., Chase, R. L., Tang, A. H., and Braughler, J. M. 1987. U-74006F, an inhibitor of lipid peroxidation, protects against lesion development following stroke in the cat: histological and metabolic analysis. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13:1499.
- Singleton, V. L., and Rossi, J. A. Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-58.
- Shan, J., Fu, J., Zhao, Z., Kong, X., Huang, H., Luo, L., and Yin, Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation, *Int. Immunopharmacol.* 9:1042–1048.
- Shiga, M., Lajolo, M., and Filisetti, M. 2003. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cienc. Tenol. Aliment. Caminas.* 23:141-148.
- Shirin, H., and Moss S. F. 1998. Helicobacter pylori induced apoptosis. *Gut.* 43:592-594.
- Slavin, J. 2003. Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases. *J. Food Compos Anal.* 16(3):287-291.
- Sobésa Café. 2008. Available at: <http://www.sobesa.com.br>. Accessed 05 March (2010).
- Sociedad Española de nutracéutica médica (SOE). 2008. Disponible en: <http://www.nutraceuticamedica.org/definicion.htm>
- Soergel, K. H. 1994. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin. Investig.* (72):742-748.
- Sofic, E., Lange, K. W., Jellinger, K., and Riederer, P. 1992. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.* 142:128-130.

- Stalmach, A., Steiling, H., Williamson, G., and Crozier, A. 2010. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Arch. Biochem. Biophys.* 501:98-105.
- Sul, D. G., Kim, H. S., Lee, D. H., Joo, S. S., Hwang, K. W., and Park, S. Y. 2009. Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Sci.* 84:257-262.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184:1331–1341.
- Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. 1998. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366:151-165.
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., and Conte, A. 2010a. Effect of Dietary Melanoidins on Lipid Peroxidation during Simulated Gastric Digestion: Their Possible Role in the Prevention of Oxidative Damage. *J. Agr. Food Chem.* 58:2513–2519.
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., and Conte, A. 2010b. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem.* 120(2):599–606.
- Tinel, A., and Tschopp, J. 2007. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Sci.* 304:843-846.
- Toi, M., Kondo, S., Suzuki, H., Yamamoto, Y., Inada, K., and Imazawa, T. 1996. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer.* 77(6):1101-1106.
- Tokimoto, T., Kawasaki, N., Nakamura, T., Akutagawa, J., and Tanada, S. 2005. Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. *J. Colloid Interface Sci.* 281:56–61.
- Townsend, D. M., Tew, K. D., and Tapiero, H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharma.* 57:145–55.

- Trugo, L. 2003. Coffee. In B. Caballero, L. Trugo, and P. Finglas (Eds.), Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition 2nd ed. London: Academic.
- Upton, A. C. 1986. Historical perspectives on radiation carcinogenesis. In Upton, A. C., Albert, R. E., Burns, F. J. and Shore, R.E. (eds) Radiation Carcinogenesis. Elsevier, New York. 1–10.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán F. A., and Ferreres, F. 2004. Characterization of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography-UV diodearray detection-electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. 1054:181-193.
- Valls-Belles, V., Torres, M. C., Muniz, P., Boix, L., Gonzalez-Sanjose, M. L., and Codoner-Franch, P. 2004. The protective effects in adriamycin-induced of melanoidins oxidative stress in isolated rat hepatocytes. J. Sci. Food Agric. 84:1701-1707.
- Van Dieren, S., Beulens, J. W., van der Schouw, Y. T., Grobbee, D. E., and Neal, B. 2010. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. Eur. J. Cardiol. Prev. 17(1):S3-S8.
- Vardon, D. R., Moser, B. R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R. L., Strathmann, T. J., Rajagopalan, K., and Sharma, B. K. 2013. Complete Utilization of Spent Coffee Grounds To Produce Biodiesel, Bio-Oil, and Biochar. Chem. Eng. 1:1286–1294.
- Varma, S. D., and Hegde, K. R. 2010. Mol. Cell. Biochem. 340:49.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B. D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. J. Agric. Food Chem. 46:4113-4117.
- Veenman, L., Shandalov, Y., and Gavish, M. 2008. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. J. Bioenerg. Biomembr. 40:199-205.

- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 102:43-53.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*. 17;184(1):39-51.
- Verschuren, E. W., Jones, N., and Evan, G. 2004. The cell cycle and how it is steered by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin. *J. Virol*. 85:1347-1361.
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., and Benassi, M. T. 2011. *Food Chem*. 124:863.
- Viña, J., Sastre, J., Asensi, M., and Packer, L. 1995. Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise. *Meth. Enzymol*. 251:237-43.
- Vitaglione, P., Napolitano, A., and Fogliano, V. 2008. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends Food Sci. Technol*. 19:451-463.
- Voehringer, D. W. 1999. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic. Biol. Med*. 27:945-950.
- Wistuba, I. I. O. 2001. Molecular pathology: Applications of molecular biological techniques in pathology. *Rev. Méd*. 129;7.
- Wong, Y. S., and Wang, X. 1991. Degradation of tannins in spent coffee grounds by *Pleurotus sajor-caju*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 7:576-574.
- World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*; American Institute for Cancer Research: Washington, DC. 1997.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol*. 68:251-306.

- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., and Li, H. B. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 11(2):622–646.
- Xu, F., Uszkoreit, H., and Li, H. 2007. A seed-driven bottom-up machine-learning framework for extracting relations of various complexity. *Proceedings of the 45th Annual Meeting of the Association of Computational Linguistics.* 584–591.
- Yang, J. C., and Cortopassi, G. A. 1998. Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c. *Free Rad. Biol. Med.* 24:624–631.
- Yao, L., Jian, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., and Chen, S. S. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum. Nutr.* 59:113.
- Yen, W. J., Wang, B. S., Chang, L. W., and Duh, P. D. 2005. Antioxidant properties of roasted coffee residue. *J. Agric. Food Chem.* 53:2658-2663.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssière, J. L., Petit, P. X., and Kroemer, G. 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* 1;181(5):1661-72.
- Zamzami, N., Susin, S., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1533-1544.
- Zamzami, N., Hirsch, T., Dallaporta, B., Petit, P. X., and Kroemer, G. 1997. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29:185-193.
- Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Ensunsa, J. L., Hammerstone, J. F., and Schmitz, H. H. 2002. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agr. Food Chem.* 50(6):1700–1705.