



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”
Multidisciplinario
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

“El café (*Coffea arábica* L.) usado inhibe la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano mediada por estrés oxidativo y apoptosis”

Nataly García-Gutiérrez^{1*}, María Elena Maldonado Celis², Mauricio Rojas-López³, Ma. Guadalupe Flavia Loarca-Piña¹, Sandra O. Mendoza-Díaz¹, Rocio Campos-Vega^{1**}

¹Programa en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro, 76010, México. ²Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ³Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Universidad de Antioquia, Colombia.

*nat_gagu5487@hotmail.com: Maestro en Ciencias, **chio_cve@yahoo.com.mx: Doctor en Ciencias, autor correspondencia.



Título.

“El café (*Coffea arabica* L.) usado inhibe la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano mediada por estrés oxidativo y apoptosis”

Resumen. El café usado (CU), residuo sólido recuperado posterior a la preparación de la bebida, contiene compuestos importantes incluyendo polifenoles y fibra dietética antioxidante. Ésta última, al ser fermentada por las bacterias del colon, promueve la formación de metabolitos que podrían inducir la inhibición de células de cáncer de colon. El objetivo fue evaluar el efecto de los productos de la fermentación colónica *in vitro* 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, variedad arábica, 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 ácidos fenólicos: ácido ascórbico, ácido clorogénico y ácido gálico durante su digestión gastrointestinal *in vitro*. La concentración letal media sobre las células SW480 fue del 19%. La actividad de la caspasa 3 (indicador de apoptosis), en las células tratadas, se incrementó en forma dosis-dependiente. Además, el tratamiento indujo estrés oxidativo (relación del glutatión reducido con el oxidado). Los resultados de citometría de flujo, para análisis del ciclo celular, indicaron que el tratamiento 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. Estos últimos son bioaccesibles y ejercen capacidad antioxidante a lo largo del tracto gastrointestinal. Y, al ser digeridos y posteriormente fermentados por la microbiota colónica, inhiben la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano *in vitro*, mediada por estrés oxidativo y apoptosis, sugiriendo su potencial como ingrediente funcional. Estudios adicionales son necesarios para ampliar y confirmar su potencial benéfico.

Palabras clave: café usado, digestión gastrointestinal, fermentación colónica, cáncer de colon humano, estr, apoptosis.



ABSTRACT: The spent coffee (SC), solid residue recovered after the preparation of the beverage, contains important antioxidant compounds including polyphenols and dietary fiber. When dietary fiber is fermented by colonic bacteria, promotes the formation of metabolites that may induce inhibition of colon cancer cells. The objective of this work was to evaluate the effect of the products of colonic fermentation *in vitro* of the indigestible fraction of SC on human colon cancer cells, as well as chemical and nutraceutical composition. The supernatant obtained after *in vitro* gastrointestinal digestion (mouth-colon) was used as a treatment on SW480 transformed cells. SC displayed higher content of proteins, lipids, potassium, calcium, copper, total fiber, insoluble fiber and resistant starch compared with grain. Phenolic acids from SC displayed high bioaccessibility: ascorbic acid, chlorogenic acid and gallic acid during *in vitro* gastrointestinal digestion. The fifty lethal concentration (LC₅₀) on SW480 cells was 19%. Activity of caspase 3 (indicator of apoptosis) in the treated cells was increased dose-dependently. Furthermore, treatment induced oxidative stress, determined by the decrease in the ratio of reduced to oxidized glutathione. Flow cytometry results, for cell cycle analysis, indicated that during the 24 h treatment, the percentage of cells in sub-G1 phase increase, corresponding to apoptotic cells. Additionally, DiOC6 assay suggested mitochondrial damage with membrane intact, suggesting early apoptosis, confirmed by annexinV. SC is a source of nutritious and nutraceuticals compounds. Some phenolic compounds are bioaccessible and exert antioxidant capacity along the gastrointestinal tract. And, subsequently, their transformation by colonic microbiota, inhibits cancer human cell survival *in vitro*, mediated by oxidative stress and apoptosis, suggesting their potential as a functional ingredient. Additional studies are needed to expand and confirm its potential benefits. **Keywords:** spent coffee, gastrointestinal digestion, colonic fermentation, human colon cancer, apoptosis, oxidative stress.

I. Introducción. El café usado (CU), residuo sólido recuperado posterior a la preparación de la bebida, se genera en grandes cantidades y es vertido al ambiente generando contaminación (Campos-Vega *et al.*, 2015a). Este, sin embargo, contiene compuestos bioactivos como la fibra dietética antioxidante (Campos-Vega *et al.*, 2015a), que al ser fermentada por la flora colónica promueven la formación de metabolitos, como los ácidos grasos de cadena corta (López-Barrera, 2014), los cuales se ha observado en trabajos con otros alimentos, inhiben la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano (Campos-Vega *et al.*, 2010). En este trabajo se simuló la digestión gastrointestinal del CU y se evaluó el potencial funcional de los productos de su



fermentación colónica *in vitro* (FgE-CU) sobre células de cáncer de colon humano SW480, determinando su mecanismo de acción. Lo anterior con la finalidad de demostrar el efecto funcional del consumo del CU como ingrediente dentro de la dieta de la población.

II. Metodología. Gravimetría. Cuantificación de fibra total, soluble, insoluble (Shiga *et al.*, 2003) y almidón resistente (Saura-Calixto *et al.*, 1993). Cuantificación de humedad, cenizas, proteínas, lípidos, y carbohidratos (AOAC 2002). Espectrofotometría. Actividad antioxidante por las técnicas: DPPH (Fukumoto y Mazza, 2000), ABTS (Nenadis *et al.*, 2004) y FRAP (Russo *et al.*, 2012). Cuantificación de minerales por espectrofotometría atómica (Mussatto *et al.*, 2011). HPLC-DAD. Cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC con detector de diodos. (Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014). Digestión y fermentación, *in vitro*. Simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* del CU (boca-intestino delgado) y fermentación colónica *in vitro* (Campos-Vega *et al.*, 2015b, 2009). Ensayo celular. Elaboración de la curva dosis-respuesta en células SW480, de los productos de la fermentación colónica del CU (FgE-CU), con azul de tripano bajo 5 concentraciones, controles: negativo, células sin tratamiento y control positivo células tratadas con peróxido de hidrógeno al 20%. El tratamiento con FgE-CU aplicado en células fue de 24 horas (Campos-Vega *et al.*, 2010). Espectrofotometría. Actividad de la caspasa 3 en células SW480 con FgE-CU usando el kit ApoTox-Glo. Contenido de glutatión total y oxidado en células SW480 con FgE-CU (kit GSH/GSSG-Glo). Citometría de flujo. Distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular (kit MitoProbe, Invitrogen). Daño en la membrana por DIOC6 (kit MitoProbe, Invitrogen). Apoptosis por anexina V (kit Annexin-V-Fluos). Todos los experimentos representan el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm ES. Análisis estadístico. Se usaron las pruebas de Tukey y Dunnet, y los programas JMP y Flow Jo.

III. Resultados. El contenido de humedad, cenizas, proteínas, lípidos y carbohidratos, presentado en la Tabla 1, se mostró estadísticamente diferente entre el grano de café (GC) y café usado (CU). El contenido de humedad, proteínas y lípidos que permaneció en el CU fue de 5.4, 16.2, 18.1%, respectivamente. El CU retiene hasta un 40% de los minerales del GC (Tabla 2), siendo los componentes mayoritarios en ambas muestras potasio, magnesio y calcio. Mientras que, el porcentaje de fibra total, insoluble y almidón resistente se vio concentrado en el CU (53.9, 52.8 y 6.1%, respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 1. 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.

Tabla 2. 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.

Tabla 3. 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.

El contenido de todos los compuestos fenólicos fue estadísticamente mayor en el GC en comparación al CU (Tabla 4), predominando el ácido ascórbico seguido del clorogénico, en ambas muestras. Los compuestos fenólicos: ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, (+)-catequina y quercetina, no se detectaron en las muestras de GC y CU. La presencia de estos compuestos se vio reflejada en la capacidad antioxidante del CU, que muestra hasta un 50% de esta, al compararla con la del GC (Tabla 5). La tendencia observada de actividad antioxidante fue la siguiente: FRAP>DPPH>ABTS.

Tabla 4. 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 ± ES.

Tabla 5. Contenido de actividad antioxidante del grano de café y café usado.

Muestra	Capacidad antioxidante ^a		
	DPPH	ABTS	FRAP
Grano de café	302.2 ± 17.0 ^a	249.4 ± 12.4 ^a	4266.7 ± 0.2 ^a
Café usado	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 actividad antioxidante de DPPH y ABTS es expresada como µmoles eq de trolox y FRAP es expresada como µmoles eq de Fe²⁺. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado ± ES.



La biodisponibilidad de los compuestos fenólicos medido por HPLC-DAD se vio afectada positivamente, de tal manera que las condiciones de pH, temperatura, reacciones enzimáticas y otros factores, lograron liberar los compuestos que en un inicio se encontraban atrapados y por lo tanto no se detectaron en el CU previo a la digestión (Tabla 6). Los compuestos detectados en todas las etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro*, fueron los ácidos: ascórbico, clorogénico y gálico. Favorablemente, los productos de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* del CU mostraron capacidad antioxidante, siendo mayor en intestino delgado (Tabla 7). El potencial activo de flujo/absorción se obtiene mediante el cálculo de la proporción de la tasa de permeación del lado apical al basolateral ($A \rightarrow B$) y del basolateral al apical ($B \rightarrow A$); la relación $(B \rightarrow A) / (A \rightarrow B)$, 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) lo que corresponde a los compuestos evaluados (Tabla 8). También se observó el transporte de los fenoles por absorción ($A \rightarrow B$) a través de los sacos intestinales de rata de acuerdo al coeficiente de permeabilidad aparente bilateral (Papp). En general, los valores de Papp $< 1 \times 10^{-7}$ y $> 1 \times 10^{-6}$ cm/s ($A \rightarrow B$) se consideran de baja y alta permeabilidad, respectivamente (Artursson *et al.*, 2001). 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 una importante capacidad antioxidante del lado basolateral del intestino (Tabla 9). El efecto inhibitorio del FgE-CU sobre células de adenocarcinoma humano SW480 (Figura 1), fue 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 las concentraciones seleccionadas para posteriores análisis fueron de 3.75, 7.5 y 15% del FgE-CU. La actividad de la Caspasa 3 (Figura 2) por acción del tratamiento, se incrementó de manera dependiente de la concentración, en comparación con el control negativo, sugiriendo que la inhibición de la sobrevivencia esta mediada por Caspasa 3.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Tabla 6. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, determinados por HPLC, en los productos de la digestión gastrointestinal 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)	ND	16799.7 ^a (100)	ND	ND	6084.3 ^a (100)	ND	ND	ND	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)	ND	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)	ND	738.1 ^c	463.8 ^c	ND
30 min	16179.9 ^e (29)	744.2 ^d	5776.8 ^e (34)	200.2 ^c	50.0 ^b	3043.9 ^e (50)	ND	899.6 ^d	559.1 ^d	ND
60 min	17252.4 ^f (31)	479.3 ^e	5314.9 ^f (32)	200.7 ^c	53.2 ^b	1855.9 ^f (31)	ND	2415.5 ^e	455.8 ^c	ND
120 min	17685.8 ^g (32)	ND	5171.6 ^g (31)	200.2 ^c	49.8 ^b	2925.8 ^g (48)	ND	341.3 ^f	443.8 ^c	ND
Fermentación colónica										
6 h	2457.8 ^h (4)	ND	356.3 ^h (2)	ND	ND	489.7 ^h (8)	54.2 ^b	ND	ND	ND
12 h	4923.8 ⁱ (9)	ND	359.5 ^h (2)	ND	ND	810.3 ⁱ (13)	64.0 ^c	518.1 ^g	ND	ND
24 h	6260.9 ^j (11)	ND	392.3 ⁱ (2)	ND	ND	383.7 ^j (6)	98.0 ^d	1306.6 ^h	ND	ND

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. ND= No detectado. La concentración de los compuestos fenólicos son expresados en μg equivalentes de ácido ascórbico, ácido cafeico, 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.

Tabla 7. Actividad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del café usado.

Muestra	Capacidad antioxidante ^a		
	DPPH (%)	ABTS %	FRAP %
Café usado	172.3 ^a (100)	159.0 ^a (100)	2425.5 ^a (100)
Boca	6.1 ^b (4)	5.9 ^b (4)	89.5 ^b (4)
Estómago	13.5 ^c (8)	12.8 ^c (8)	207.5 ^c (9)
Intestino delgado			
15 min	12.3 ^d (7)	16.3 ^d (10)	221.2 ^d (9)
30 min	16.2 ^e (9)	16.2 ^e (10)	239.1 ^e (10)
60 min	14.5 ^f (8)	16.3 ^d (10)	200.1 ^f (8)
120 min	15.3 ^g (9)	16.2 ^e (10)	239.0 ^e (10)
Fermentación colónica			
6 h	8.4 ^h (5)	13.9 ^f (9)	104.9 ^g (4)
12 h	8.4 ^h (5)	13.9 ^g (9)	98.1 ^h (4)
24 h	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 actividad antioxidante de DPPH y ABTS es expresada como $\mu\text{moles eq}$ de trolox y FRAP es expresada como $\mu\text{moles eq}$ de Fe^{2+} . Los valores del intestino delgado a diferentes tiempos corresponden al lado apical. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

Tabla 8. 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 \rightarrow A) / (A \rightarrow B)
		A \rightarrow B $\times 10^{-3}$	B \rightarrow A $\times 10^{-3}$	
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 \rightarrow B= Transporte de compuestos del lado apical al basolateral. Papp B \rightarrow A= Transporte de compuestos del lado basolateral al apical. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

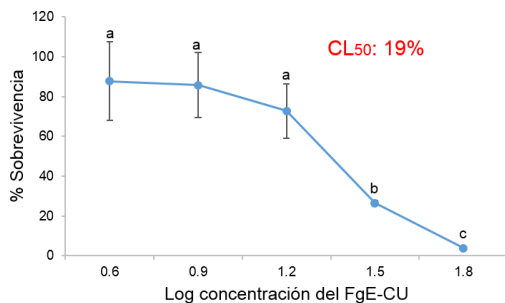
Tabla 9. Actividad antioxidante de los compuestos del café usado que fueron permeables/absorbidos *in vitro* usando un modelo de saco intestinal invertido.

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

Multidisciplinario, 21 y 22 de abril de 2016. México

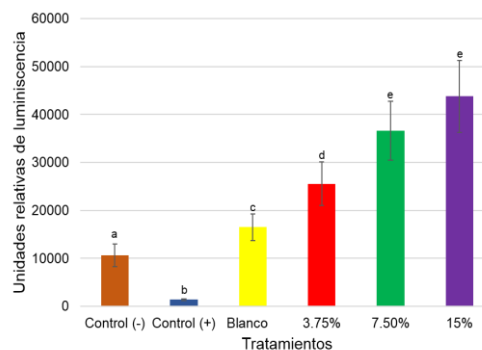
Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey. La actividad antioxidante de DPPH y ABTS es expresada como $\mu\text{moles eq}$ de trolox por gramo de muestra y FRAP es expresada como $\mu\text{moles eq}$ de Fe^{2+} por gramo de muestra. Los valores de actividad antioxidante del saco intestinal invertido a diferentes tiempos corresponden al lado basolateral. Los resultados representan la media de 3 experimentos por triplicado \pm ES.

Figura 1. Curva dosis-respuesta del FgE-CU en células de adenocarcinoma humano SW480.



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 sobrevivencia 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).

Figura 2. Actividad de la Caspasa 3 en células de adenocarcinoma humano SW480, sometidas a 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.

La relación del glutatión reducido con el glutatión oxidado (Tabla 10) se redujo de manera dependiente de la concentración del tratamiento, lo que indica un incremento del estrés oxidativo. De manera complementaria, el análisis de las fases del ciclo celular de las células SW480 sometidas al tratamiento (Tabla 11), indica que las células se detienen en la fase S del ciclo celular que resulta en la posterior acumulación de células con DNA fragmentado (fase subG0), característico de células apoptóticas.

Tabla 10. 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.

Tabla 11. Efecto del FgE-CU sobre las fases del ciclo celular de las células SW480.

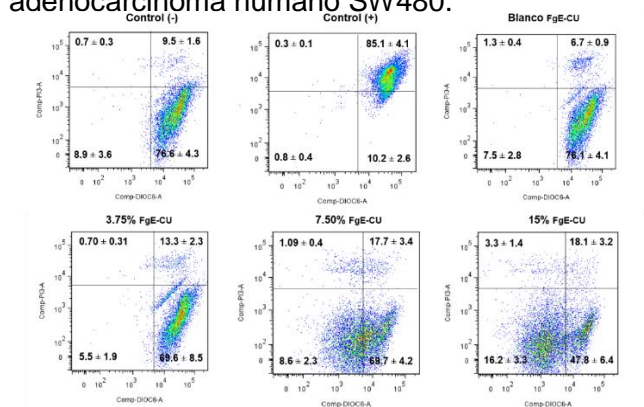
Grupo	G0	G1	S	G2
Control (-)	7.5 \pm 1.4 ^a	29.9 \pm 4.6 ^a	1.5 \pm 2.9 ^a	26.3 \pm 5.5 ^a
Control (+)	5.5 \pm 1.2 ^a	59.8 \pm 1.3 ^b	-2.4 \pm 3.9 ^a	34.4 \pm 5.8 ^a
Blanco FgE-CU	7.2 \pm 1.2 ^a	27.7 \pm 4.1 ^a	1.2 \pm 1.5 ^a	28.9 \pm 3.7 ^a
3.75% FgE-CU	17.5 \pm 2.1 ^b	19.6 \pm 1.2 ^c	0.7 \pm 1.9 ^a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

La muerte por apoptosis se encontró principalmente en etapa temprana ya que, al aumentar la concentración del tratamiento con el FgE-CU, parte de la población celular se desplaza desde la zona de células en óptimas condiciones (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 tanto en la mitocondria y en la membrana (MM) (cuadrante derecho superior), cuando son comparados contra los controles negativo y positivo (Figura 3). Eventos que fueron confirmados con el ensayo de Anexina V (Figura 4). Los resultados

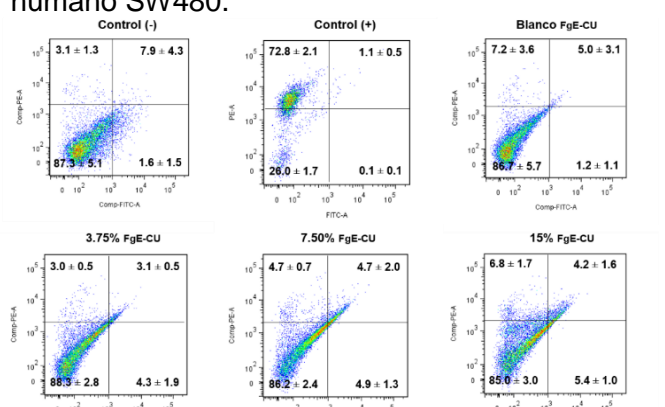
muestran que, al aumentar la concentración del tratamiento con el FgE-CU, parte de la población celular se desplaza desde la zona de células en óptimas condiciones (cuadrante izquierdo inferior) a la zona con células muertas por apoptosis (cuadrantes derecho superior e inferior) y otro porcentaje a la zona con células muertas por necrosis (cuadrante izquierdo superior), cuando son comparados contra los controles negativo y positivo.

Figura 3. Efecto de FgE-CU sobre la membrana mitocondrial (ensayo DIOC6) de células de adenocarcinoma humano SW480.



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 celular / 100% células.

Figura 4. Efecto apoptótico (ensayo anexina V) del FgE-CU sobre células de adenocarcinoma humano SW480.



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 celular / 100% células.

III. Conclusiones.

Los resultados sugieren que el café usado es fuente importante de compuestos nutritivos y nutracéuticos, los cuales son bioaccesibles durante la digestión gastrointestinal ejerciendo, algunos de ellos, capacidad antioxidante. Y, al ser fermentados por la microbiota colónica inhiben la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano *in vitro*, mediada por incremento del estrés oxidativo, incremento de la actividad de Caspasa 3 y la subsecuente apoptosis. Lo anterior respalda el potencial beneficio a la salud que puede brindar el consumo de CU como ingrediente en la elaboración de productos funcionales. Estudios adicionales son necesarios para confirmar y ampliar estos resultados.

Agradecimientos: Los autores agradecen el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; fondo No. 242282); al programa PRODEP y a la estrategia de Sostenibilidad 2014-2015 de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.



IV. Bibliografía.

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. **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 cancer cells (HT-29). *Food Res. Int.* 47:1057-1064. **Campos-Vega**, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H. A., Oomah, D. 2015a. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends Food Sci. Technol.* 45(1):24–36. **Campos-Vega**, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., and Oomah, B. D. 2015b. Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Res. Int.* 77:156-161. **Fukumoto**, L. R., and Mazza, G. 2000. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compound. *J. Agric. Food Chem.* 48:3597-3604. **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. **López-Barrera**, 2014. Composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (*Coffea Arabica* L) utilizado y la actividad de los productos de su digestión gastrointestinal sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon. Tesis Maestría. **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. **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. **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. **Russo**, D., Bonomo, M.G., Salzano, G., Martelli, G., and Milella, L. 2012. Nutraceutical properties of Citrus clementina juices. *Pharmacol. SPL.* 1:84–93. **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. **Shiga**, M., Lajolo, M., and Filisetti, M. 2003. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cienc. Technol. Aliment. Caminas.* 23:141-148.