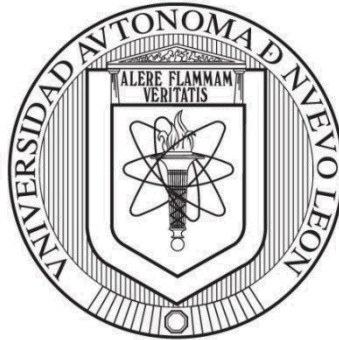


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



**EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD PROTEICA DE
RESIDUOS DE CAFÉ Y EL POTENCIAL DE SUS PÉPTIDOS
BIOACTIVOS PARA EL MANEJO DEL SÍNDROME METABÓLICO**

POR:

L.N. ROSA ISELA PIZÑA CISNEROS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

Febrero 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN



**EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD PROTEICA DE RESIDUOS
DE CAFÉ Y EL POTENCIAL DE SUS PÉPTIDOS BIOACTIVOS
PARA EL MANEJO DEL SÍNDROME METABÓLICO**

ROSA ISELA PIZANA CISNEROS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

DIRECTOR

DR. JESÚS ALBERTO VÁZQUEZ RODRIGUEZ

CO-DIRECTOR

DR. LUIS FERNANDO MÉNDEZ LÓPEZ

Febrero 2023

APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA
EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD PROTEICA DE RESIDUOS
DE CAFÉ Y EL POTENCIAL DE SUS PÉPTIDOS BIOACTIVOS
PARA EL MANEJO DEL SÍNDROME METABÓLICO

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Dr. Luis Fernando Méndez López

Dra. Blanca Edelia González Martínez

Subdirector(a) de Investigación, Innovación y Posgrado

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de evaluación de tesis APROBÓ la tesis titulada “**EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD PROTEICA DE RESIDUOS DE CAFÉ Y EL POTENCIAL DE SUS PÉPTIDOS BIOACTIVOS PARA EL MANEJO DEL SÍNDROME METABÓLICO**” presentada por la LN. Rosa Isela Pizaña Cisneros, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Dr. Luis Fernando Méndez López

Dra. Blanca Edelia González Martínez

DRA. EN C. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ
SUBDIRECTOR(A) DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

PRESENTE. -

Nos permitimos comunicarle que hemos concluido la Dirección y Co-dirección de la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD PROTEICA DE RESIDUOS DE CAFÉ Y EL POTENCIAL DE SUS PÉPTIDOS BIOACTIVOS PARA EL MANEJO DEL SÍNDROME METABÓLICO”** presentado por la LN. Rosa Isela Pizaña Cisneros, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Atentamente

“Alere Flamman Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a ___ de _____ de _____

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Dr. Luis Fernando Méndez López

Agradecimiento

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo que recibí durante mi formación en la Maestría en Ciencias en Nutrición. Al personal académico y administrativo de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, por todo el apoyo y facilidades brindadas.

Gracias al Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez por su asesoría, dirección y paciencia en los momentos necesarios y adecuados para la realización de esta tesis. A las personas que me acompañaron en el Laboratorio de Alimentos en diferentes momentos, en especial a Abad López por su asesoría y enseñanza.

A mis maestros por su formación integral, a mis compañeras y amigas: Karla, Anael y Marce que compartí su amistad, conocimiento y perseverancia.

A mi hermana que me ha apoyado en momentos necesarios y a mis sobrinos que me han ofrecido momentos de relajación y diversión que son también necesarios.

Y en especial a mi madre que me ha apoyado durante toda mi vida y siempre me ha motivado e inspirado a ser una mejor persona.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimiento	5
1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
3. Planteamiento del problema.....	28
4. Justificación	29
5. Hipótesis	30
6. Objetivos	30
7. Metodología	31
7.1 Diseño del estudio	31
7.2 Esquema general de trabajo	31
7.3 Materiales y equipos.....	34
7.4 Procedimiento	35
7.4.1. Obtención de los SCG	35
7.5 Análisis proximal de SCG.....	35
7.5.1 Determinación de humedad (AOAC 14.003)	35
7.5.2 Determinación de Cenizas (AOAC 14.006)	35
7.5.3 Determinación de proteínas (AOAC 968.06)	36
7.5.4 Determinación de lípidos (AOAC 7.056)	36
7.5.5 Determinación de fibra cruda (AOAC 962.09)	36
7.5.6 Determinación de carbohidratos totales.....	36
7.6 Determinación del concentrado proteico	37
7.6.1 Extracción del concentrado proteico	37
7.6.1.1 Extracción de lípidos.....	37

7.6.1.2 Extracción de polifenoles.....	37
7.6.1.3. Extracción de proteínas	37
7.6.2 Cuantificación de proteínas	38
7.6.3 Rendimiento del proceso de extracción de proteína	38
7.7 Digestión <i>in vitro</i>	38
7.7.1 Fase oral.....	39
7.7.2 Fase gástrica.....	39
7.7.3 Fase intestinal.....	39
7.7.4. Determinación del porcentaje de proteína digerida	41
7.7.5 Determinación de la bioaccesibilidad de las proteínas.....	42
7.7.6 Electroforesis SDS-PAGE.....	42
7.8 Inhibición enzimática	43
7.8.1 α -amilasa.....	43
7.8.2 α -glucosidasa	44
7.8.3 Determinación del porcentaje de inhibición	44
7.9 Procedimiento de análisis <i>in silico</i>	45
7.9.1 Obtención de secuencia de proteínas.....	45
7.9.2. Hidrólisis <i>in silico</i>	46
7.9.3 Determinación de afinidad ligando-receptor	47
7.9.4 Determinación de bioactividad predictiva y actividad biológica de los péptidos presentes en SCG.....	47
7.9.5 Determinación de energía de unión y puntos de vinculación ligando – receptor.....	48
7.9.6 Análisis <i>in silico</i> de la absorción, digestión, metabolismo y excreción de péptidos con energía de unión.....	50

7.10 Ética y bioseguridad	52
8. Resultados	53
8.1. Análisis proximal	53
8.2 Rendimiento del proceso de extracción de proteína	53
8.3 Digestión <i>in vitro</i>	54
8.3.1 Determinación de digestibilidad proteica <i>in vitro</i>	54
8.3.2 Bioaccesibilidad de la proteína de las muestras digeridas.....	55
8.3.3 Electroforesis SDS-Page	56
8.4 Inhibición enzimática	58
8.4.1 α -amilasa	58
8.4.2 α -glucosidasa	59
8.5 Análisis <i>in silico</i>	59
8.5.1 Proteólisis <i>in silico</i>	59
8.5.2 Bioactividad predictiva y actividad biológica de los péptidos de residuos de café	63
8.5.3 Afinidad <i>in silico</i>	64
8.5.4 Energía de unión y puntos de vinculación de los péptidos de residuos de café con PPAR γ	65
8.5.5 Características de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los péptidos con capacidad de unión al receptor.....	70
9. Discusión.....	73
9.1 Análisis proximal de los residuos de café	73
9.2 Rendimiento de la extracción proteica de SCG	74
9.3 Digestión <i>in vitro</i>	75
9.3.1 Digestibilidad y bioaccesibilidad proteica <i>in vitro</i>	75

9.3.2. Electroforesis SDS-Page	76
9.4 Inhibición enzimática <i>in vitro</i>	77
9.5 Análisis <i>in silico</i>	78
9.5.1 Digestión <i>in silico</i>	78
9.5.2 Bioactividad predictiva	80
9.5.3. Afinidad ligando-receptor de los péptidos resultantes de la digestión <i>in silico</i>	82
9.5.4. Características de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los péptidos con capacidad de unión al receptor.....	83
10. Conclusiones	87
11. Recomendaciones para investigaciones futuras	88
12. Anexos	89
12.1 Anexo de información personal.....	89
13. Referencias.....	90

Lista de tablas

Tabla		Página
I	Criterios de diagnóstico de síndrome metabólico según diferentes asociaciones.	3
II	Contenido de aminoácidos SCG	26
III	Material, equipo y reactivos utilizados en la elaboración de la presente investigación.	35
IV	Clasificación de las fracciones obtenidas mediante la digestión	42
V	Parámetros ADME y sus rangos aceptables	52
VI	Resultados del análisis proximal en SCG comparado con lo reportado	54
VII	Rendimiento del proceso de extracción de proteína bajo diferentes pH	55
VIII	Rendimiento del proceso de extracción de proteína	55
IX	Porcentaje de digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de SCG tostado medio	56
X	Porcentaje de bioaccesibilidad de residuos de café tostado medio.	57
XI	Peso molecular (kDa) de las proteínas identificadas mediante SDS-Page en la fracción no digerible de SCG.	58
XII	Porcentaje de inhibición de α -amilasa del SCG tostado medio	59
XIII	Porcentaje de inhibición de α -glucosidasa del SCG tostado medio	60
XIV	Péptidos liberados por el proceso de hidrólisis <i>in silico</i> en el programa BIOPEP-UWM-UWM	62
XV	Bioactividad predictiva y actividad biológica de los péptidos de residuos de café	64
XVI	Secuencias de péptidos con afinidad <i>in silico</i> al sitio activo de PPAR γ en HPEPDOCK	65
XVII	Energía de unión y puntos de vinculación de los péptidos al receptor PPAR γ	67
XVIII	Características ADME de los péptidos con capacidad de unión PPAR γ	72

Lista de figuras

Figura		Página
1	Digestión de almidón por la acción de α -amilasa y α -glucosidasa	9
2	Dominios funcionales de los receptores PPARs	12
3	Sistema renina-angiotensina-aldosterona	17
4	Anatomía de la cereza del café	20
5	Subproductos relacionados con la producción de café	22
6	Esquema general de investigación	34
7	Proceso de simulación de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	41
8	Sitio activo del receptor PPAR γ	50
9	Perfil electroforético de las fracciones no digerible de residuos de café.	58
10	Perfil electroforético de las fracciones no digerible control negativo, no bioaccesible y bioaccesible de residuos de café	59
11	Uniones intermoleculares de los ligandos con energía de unión similar al antagonista GW9662	68
12	Superposición de los ligandos con energía de unión al similar al antagonista GW9662	69
13	Uniones intermoleculares de los ligandos con energía de unión similar al antagonista G3335	70
14	Superposición de ligandos con energía de unión similar al antagonista G3335	68
15	BOILED-Egg de los péptidos con capacidad de unión a PPAR γ	73

NOMENCLATURA

ADMET	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción/Eliminación y Toxicidad
ADT	Autodock tool
BA	Bioaccesible
C. arabica	<i>Coffea arabica</i>
HBA	Número de aceptores de enlaces de H
HBD	Número de donadores de enlaces de H
iLOGP	Coefficiente de reparto octanol / agua
logP	Lipofilia del compuesto
MR	Reactividad molar
MW	Peso molecular
NBA	No bioaccesible
ND	No digerible
PDB	Protein data bank
PPAR	Receptor proliferador de peroxisomas
PPAR α	Receptor proliferador de peroxisomas alfa
PPAR β/δ	Receptor proliferador de peroxisomas beta/sigma
PPAR γ	Receptor proliferador de peroxisomas gamma
RB	Enlaces rotativos
RXR	Receptor de ácido retinoico
SCG	Residuo de café
TPSA	Área de superficie polar topológica

1. Resumen

Cerca del 90% del grano de café no se utiliza y termina como residuo de café (SCG) los cuales, tienen una cantidad importante de nutrientes que pueden ser utilizados en la industria alimentaria, como lo son las proteínas de los SCG (alrededor del 10%). Dentro de la composición de las proteínas de SCG, el 42% de pertenecen a aminoácidos esenciales de los cuales, predominan los aminoácidos apolares. Péptidos con este tipo de aminoácidos se han evaluado para su utilización como antagonistas de diversas proteínas involucradas en el síndrome metabólico como α -amilasa, α -glucosidasa, la enzima convertidora de angiotensina y PPAR γ . El objetivo del presente estudio es determinar la digestibilidad de proteínas de SCG y su capacidad de inhibición de proteínas involucradas en el síndrome metabólico

Se realizó el análisis proximal para determinar el perfil nutricional de los SCG mediante los protocolos de la AOAC, se estimó un contenido de humedad de 26%, cenizas 1%, lípidos 7%, fibra 29%, proteína 10% y carbohidratos de 26%. Se aisló la fracción proteica de SCG mediante precipitación de punto isoelectrico. El rendimiento del proceso de extracción de la fracción de proteína fue de 1.3%, sin embargo, solo el 21% corresponde a proteína. Los SCG se sometieron a digestión gastrointestinal por el protocolo INFOGEST (Brodkorb et al., 2019) utilizando saliva humana para la fase oral, pepsina para la fase gástrica, bilis y pancreatina para la fase intestinal. Se utilizó membrana de diálisis de 14 kDa para la obtención de la fracción bioaccesible, se obtuvieron 3 fracciones, la no digerible, no bioaccesible y bioaccesible a las cuales, se determinaron los pesos moleculares de las proteínas mediante electroforesis SDS-page por el método Laemmli (1970). Con la fracción bioaccesible de SCG se realizó inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa, la concentración de 0.5 mg/mL presenta inhibición de α -amilasa, mientras que una concentración de 1.25 mg/mL presenta inhibición de α -glucosidasa. Para el análisis *in silico* se simuló una hidrólisis de la fracción proteica de los SCG en el programa BIOPEP-UWM, utilizando pepsina, tripsina y quimiotripsina, se identificó la globulina 11S de SCG mostró un grado de hidrólisis

del 37% con un total de 45% de péptidos de 2 a 5 aminoácidos que fueron analizados en HPEPDOCK para identificar su afinidad a PPAR γ . El 53% de los péptidos con afinidad al receptor muestra una puntuación >0.5 de bioactividad con una actividad inhibitoria de ECA (87%) péptidos con valores de vinculación menores de -160 kcal/mol se analizaron en Autodock tools para determinar su energía de unión a las regiones activas del receptor PPAR γ , 10 péptidos mostraron una fuerte energía de unión al receptor (<-4.8 kcal/mol) de los cuales, DVVAH y YQH y los péptidos PQPR, AIF y APH muestran energía de unión similar a los antagonistas GW9662 y G3335 respectivamente, con puntos de vinculación principalmente a los residuos en CYS285, LEU330, MET364 e ILE341 del receptor. Se evaluó la Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción / Eliminación y Toxicidad mediante el programa Swiss ADME. Los péptidos AIF, IF, IPIL y VAF muestran mejores características para su absorción. Por lo anterior, se propone una posible interacción de los péptidos resultantes de la digestión de residuos de café, sobre la actividad de priteínas relacionadas con el síndrome metabólico.

2. Antecedentes

2.1. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de factores de riesgo metabólico, caracterizados por obesidad abdominal, dislipidemia, bajos niveles de cHDL (lipoproteínas de alta densidad), hipertensión arterial y resistencia a la insulina, la acumulación de estos trastornos está asociado con el doble de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e incrementa 5 veces el riesgo de padecer diabetes tipo 2 (Swarup et al., 2022; Wang et al., 2020). Existen diversos criterios para el diagnóstico de SM que se muestran en la tabla I.

Tabla I. Criterios de diagnóstico de síndrome metabólico según diferentes asociaciones.

Criterio diagnóstico	IDF (2005)	ATP (2005)	ALAD (2009)	Criterios armonizados
Obesidad abdominal (cm)	≥ 90 H ≥ 80 M	> 102 H > 88 M	≥ 94 H ≥ 88 M	≥ 94 H ≥ 88 M
Triglicéridos (mg/mL)	≥ 150	≥ 150	≥ 150 o tratamiento para triglicéridos	≥ 150 o tratamiento para triglicéridos
C-HDL (mg/dL)	< 40 H < 50 M Tratamiento	< 40 H < 50 M Tratamiento	< 40 H < 50 M Tratamiento	< 40 H < 50 M Tratamiento
Presión arterial (mmHg)	≥ 130/85 o tratamiento antihipertensivo	≥ 130/85 o tratamiento antihipertensivo	≥ 130/85 o tratamiento antihipertensivo	≥ 130/85 o tratamiento antihipertensivo
Glucosa (mg/mL)	≥ 100 o diagnóstico de DM2	Glucosa en ayuno ≥ 110 inicial o diagnóstico de DM2	GAA, ITG, DM	≥ 100, diagnóstico o tratamiento de DM.
Diagnóstico	Obesidad abdominal ± ≥ 2 componentes	≥ 3 componentes	Obesidad abdominal + ≥ 2 componentes	≥ 3 componentes

H: hombres, M: mujeres, GAA: glucosa en ayuno alterada, ITC: Intolerancia a la glucosa, IDF:

International Diabetes Federation, ATP III: Adult Treatment Panel III, ALAD: Asociación

Latinoamericana de Diabetes, DM: Diabetes Mellitus, C-HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

Tabla adaptada de González-Chávez et al, (2018).

2.1.2. Prevalencia de síndrome metabólico

La prevalencia de SM en la población adulta de diferentes países está estimada entre el 20 a 40%. En el estudio de Rojas-Martínez et al, (2021) se realizó un análisis comparativo entre la población mexicana adulta que padecía SM según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2006 al 2018 utilizando los criterios armonizados del National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III), American Heart Association; National Heart Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI) e International Diabetes Federation (IDF). Los datos demuestran que la prevalencia de SM fue de 40.2, 57.3, 59.6 y 56.3% en 2006, 2012, 2016 y 2018 respectivamente. Con un aumento de casi 20% de prevalencia de SM, que fue mayor en mujeres con 22.2% en comparación con el 18% en hombres (Shaman-Levy et al., 2020)

La hipertensión arterial (HTA) se considera un factor de riesgo de infarto al miocardio, ictus isquémico, insuficiencia cardiaca, enfermedad renal crónica, deterioro cognitivo y muerte prematura ya que se ha relacionado que una elevación de la PAS de 2 mmHg puede incrementar hasta 7% el riesgo de mortalidad por cardiopatía isquémica y hasta en 10% el riesgo por accidente cerebrovascular. En México, la prevalencia de hipertensión arterial fue de 28.2%, siendo más prevalente en la población mayor de 50 años, donde puede llegar a estar presente en el 52% en hombres de 80 o más años. Estos valores han incrementado hasta un 29.9% desde el 2015. (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2021a; Shaman-Levy et al., 2022).

La prevalencia de diabetes también ha aumentado con los años, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020), en 2014, un 8.5% de los mayores de 18 años padecían diabetes y en 2019 esta afección causó 1.5 millones de defunciones. Según la ENSANUT, la diabetes en la población mexicana pasó de 6.9% en 2006 a 10.6% en 2018 (Rojas-Martínez et al., 2021).

Mientras que, para 2021 la prevalencia de dislipidemias en la población mexicana va de 24% personas con colesterol elevado (> 200 mg/dL), 47.2% con

triglicéridos elevados (>150 mg/dL), 30.8% con HDL bajo (<40 mg/dL) y 20.2% con LDL elevado (>130 mg/dL), siendo los hombres los que se ven más afectados con un 37.8% de valores alterados, a comparación de las mujeres con 24.6%. (Shaman-Levy et al., 2022).

Un factor determinante en el desarrollo del SM es la obesidad. La prevalencia de sobrepeso y obesidad en México en 2021 muestra que el 75% de las mujeres y el 69.9% de los hombres cuentan con sobrepeso y obesidad (IMC > 25 kg/m²) teniendo un aumento en los últimos 11 años de 0.2% en hombres y 2.7% en mujeres, sin embargo, tomando en cuenta que el aumento solamente de obesidad fue de 26.8% en hombres y 9.6% en mujeres, podemos determinar que un gran número de la población que antes padecía sobrepeso ha pasado a padecer obesidad (Shaman-Levy et al., 2022).

2.1.3. Fisiopatología del síndrome metabólico

La obesidad es el principal factor de desarrollo de SM, se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Existen distintos grados de obesidad en todos los grupos de edad; en individuos con exceso de grasa corporal en la cavidad intraabdominal se incrementa significativamente el riesgo de desarrollarla (OMS, 2021b).

La obesidad es una patología producida por la acumulación de tejido adiposo subcutáneo, principalmente debido a un aumento en la hipertrofia (aumento en el tamaño de los adipocitos), sin que lleguen a estimularse para hiperplasia (aumento en el número de adipocitos de una célula precursora). El principal factor para desarrollar sobrepeso y obesidad es un desequilibrio energético positivo, sin embargo, existen diversos factores genéticos y ambientales que pueden desarrollar trastornos metabólicos que desencadenan una excesiva acumulación de tejido adiposo (Torres & Rojas, 2018). Debido a su desarrollo multifactorial, Pasca y Montero (2015), han propuesto la definición de la obesidad como una enfermedad sistémica, multiorgánica, metabólica e inflamatoria crónica, multideterminada por la interrelación entre lo genómico y lo ambiental,

fenotípicamente expresada por un exceso de grasa corporal (en relación con la suficiencia del organismo para alojarla), que conlleva un mayor riesgo de morbimortalidad.

El desequilibrio energético contribuye a la disfunción adiposa y al desarrollo de obesidad y complicaciones relevantes. La disfunción adipocitaria se manifiesta por un aumento excesivo del número y tamaño de los adipocitos (hiperplasia e hipertrofia). La adipogénesis está regulada por el receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ) (codificado por *PPARG*) y CCAAT/proteína de unión potenciadora $\alpha/\beta/\delta$ (C/EBP $\alpha/\beta/\delta$); La actividad de PPAR γ promueve la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros (Zhang et al., 2017).

El SM se desencadena por una disfunción del tejido adiposo, que conduce a la resistencia a la insulina. El tejido adiposo incrementado presente en un estado de obesidad altera la secreción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral, la resistina, la leptina, la adiponectina y el inhibidor del activador de plasminógeno. Durante el aumento de la ganancia de peso y la acumulación lipídica, se genera un mecanismo homeostático, como la activación del catabolismo y la resistencia de señales anabólicas, esto como una manera del cuerpo de limitar la ganancia de peso, como consecuencia de una lipólisis crónica, existe una liberación continua de ácidos grasos libres que son transferidos directamente mediante la vena porta al hígado, el aumento de ácidos grasos libres en conjunto con la inflamación crónica generan una disminución de la sensibilidad a la insulina en los tejidos dependientes de insulina, causada por la inhibición de la señalización de los receptores (Aballay et al., 2013)

Mientras que, el vínculo fisiopatológico entre la adiposidad visceral y las complicaciones cardiometabólicas se centra en la sensibilidad a la insulina, el sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), el cual está desregulado en pacientes con obesidad. El tejido adiposo tiene un sistema local completo de renina-angiotensina que está activo a nivel local y sistémico. La biología y el metabolismo de los adipocitos están influenciados por

el sistema renina-angiotensina local, y la angiotensina II actúa como un "factor de crecimiento" para los adipocitos. Una mayor actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona tienen un papel central en la obesidad y sus complicaciones mortales (Sarzani et al., 2008).

El objetivo del tratamiento del SM es el control de las enfermedades subyacentes. Dentro del tratamiento de las diversas patologías se encuentran los agentes que actúan sobre diversas proteínas involucradas en la regulación SM, algunos de ellos son los inhibidores de la α -glucosidasa que inhibe la absorción de carbohidratos por el intestino y los inhibidores de la α -amilasa que regula los niveles plasmáticos de glucosa postprandial, los inhibidores del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ) que disminuyen la acumulación de tejido adiposo y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) que ayudan a regular el SRAA, disminuyendo la presión arterial (Kaur et al., 2014).

2.1.4 Proteínas diana para el tratamiento de síndrome metabólico

2.1.4.1 α -amilasa y α -glucosidasa

La α -amilasa pertenece a un grupo de enzimas amilolíticas las cuales son capaces de degradar el almidón. Es sintetizada en la saliva humana y en el páncreas, se encarga de romper los enlaces glucosídicos α -1-4 de las cadenas de amilosa o amilopectina, rompiendo los carbohidratos de cadena larga (Figura 3). El producto de α -amilasa son oligosacáridos de longitud variable con configuración α -y dextrinas límites α que dan como resultado maltotriosa o maltosa de la amilosa o maltosa y glucosa y dextrinas límite de amilopectina (Tiwari et al. 2015).

La actividad de α -amilasa en el metabolismo de almidón es importante para la obtención de moléculas de glucosa durante la digestión que puedan atravesar la barrera intestinal; esta actividad está ligada al aumento de los niveles de glucosa posprandial. La acarbosa es un agente que suprime la actividad de α -amilasa, de

esta manera, se disminuyen los niveles de glucosa postprandial, favoreciendo el estado metabólico de personas con diabetes mellitus (Kaur et al., 2014).

Por otra parte, Las α -glucosidasas es un grupo de enzimas digestivas unidas a la membrana del epitelio de la mucosa del intestino delgado, también conocidas como maltasa-glucoamilasa (MGAM) y sacarasa-isomaltasa (SI), tienen dos dominios funcionales en los extremos C y N-terminal (Ct y Nt, respectivamente), que difieren por su especificidad en el sustrato. Ct y Nt de MGAM tienen una mayor especificidad por los oligómeros de glucosa y la maltosa, respectivamente, mientras que los dominios Ct y Nt de SI tienen actividades de sacarasa e isomaltasa, respectivamente. La α -glucosidasa hidroliza los residuos de glucosa unidos a α (1-4) terminales no reductores para liberar glucosa libre (Figura 1). Una inhibición moderada de la α -amilasa con una inhibición alta de la α -glucosidasa se ha sugerido como una estrategia eficaz para disminuir la disponibilidad de carbohidratos en la dieta para la liberación de glucosa en el intestino (Stefano, Olivero y Udenigwe, 2018).

Una inhibición moderada de la α -amilasa con una inhibición alta de la α -glucosidasa se ha sugerido como una estrategia eficaz para disminuir la disponibilidad de sustratos de polisacáridos para la liberación de glucosa en el intestino, por lo que se recomiendan dentro del tratamiento antihiper glucémico (Stefano, Oliveiro y Udenigwe, 2018; González-Montor et al., 2018).

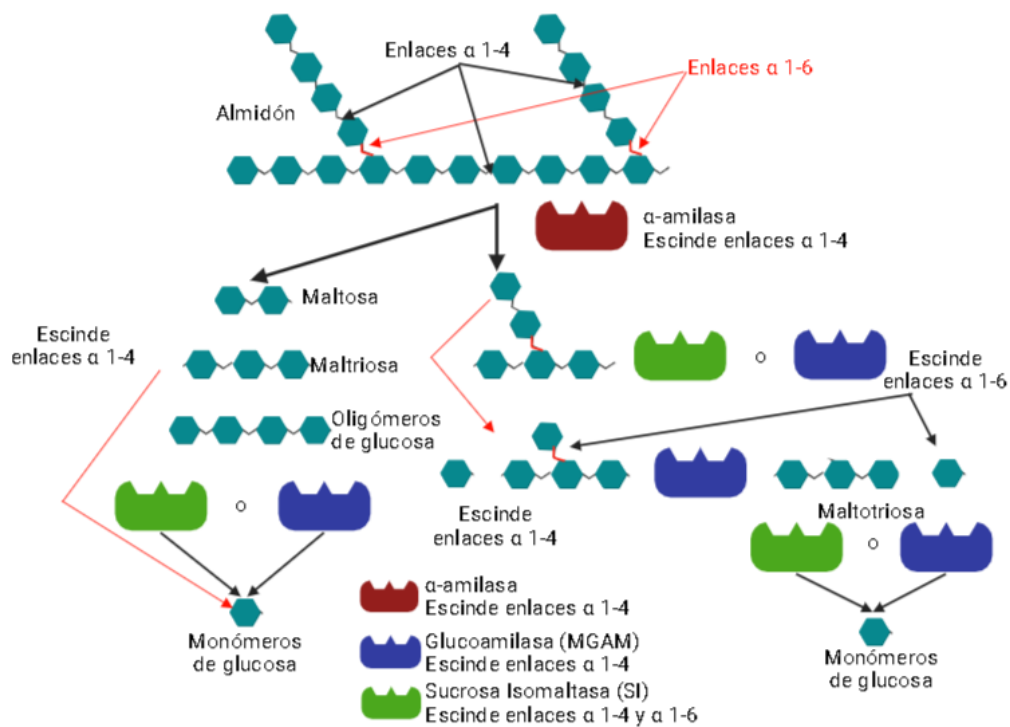


Figura 1. Digestión de almidón por la acción de α -amilasa y α -glucosidasas.

(Jiang, Ghosh y Burley, 2019).

2.1.4.1.1 Moléculas con capacidad de unión a α -amilasa y α -glucosidasas

El tratamiento principal para inhibir α -amilasa es la acarbosa, un antidiabético ampliamente utilizado para regular la producción de glucosa a partir de carbohidratos complejos, sin embargo, este tratamiento presenta diversos efectos secundarios como flatulencias o diarrea. Por esta razón se buscan terapias alternativas provenientes de plantas con efectos hipoglucemiantes, que puedan disminuir o evitar estos efectos secundarios (Kaur et al., 2014)

Los péptidos provenientes de fuentes vegetales son compuestos estudiados para el tratamiento de inhibición de α -amilasa, el mecanismo de acción propuesto para la capacidad inhibidora de la α -amilasa de un péptido está relacionado con su capacidad para formar una barrera al establecer un enlace de hidrógeno con los residuos de la región activa de la enzima (Siow y Gan, 2016). La enzima contiene residuos aromáticos que se encuentran en el sitio activo del receptor y pueden interactuar directamente con el sustrato, se ha visto que tiene mejor interacción

con péptidos que presentan un residuo aromático (fenilalanina, triptófano y tirosina) (Siow, Liam y Gan, 2107).

En el estudio de Admassu et al, (2018) se evaluó la capacidad de inhibición *in vitro* de péptidos sintetizados de *Porphyra spp* a una concentración de enzima/sustrato de 1:100, demostrando que ejercen una acción inhibitoria de α -amilasa. Se propuso que los aminoácidos hidrofóbicos presentes en los péptidos analizados (VECYGPNRPEFIY, FIY y LW), afectan la conformación en la enzima, disminuyendo su actividad. Por otro lado, péptidos de las resultantes de la hidrólisis de las fracciones de albúmina, globulina y prolamina de salvado de arroz han mostrado actividad inhibitoria de α -amilasa de 66.8 % a una concentración de 7.5 mg/mL (Uraipong y Zhao, 2015).

Péptidos de bajo peso molecular resultantes de la hidrólisis de proteína de chícharo y de leguminosas, han demostrado una fuerte capacidad de inhibición de α -amilasa de hasta 50% (Gong et al., 2020).

En el caso de α -glucosidasa, se ha sugerido que el mecanismo de inhibición de los péptidos es mediante interacciones hidrofóbicas en el sitio activo de la enzima, aquellos péptidos con aminoácidos hidrofóbicos o aminoácidos como serina, treonina, tirosina, lisina o arginina en el N terminal o residuo de prolina cercano a C terminal ejercen mayores efectos inhibitorios de α -glucosidasa. Esto se ha reafirmado en estudios como el de Di Stéfano et al. (2018), donde el péptido LQAFEPLR obtenido de avena demostró una fuerte capacidad inhibitoria de α -glucosidasa a concentraciones de 35.36 μ g/ml.

Vilcacundo, Martínez-Villaluenga y Hernández-Ledezma, (2017) estudiaron péptidos resultantes de la digestión de proteínas de quínoa, las principales proteínas de la quínoa son la globulina 11S y la globulina 7S, se identificó la fracción hidrolizada de péptidos con una longitud <5 kDa con capacidad de inhibición de α -amilasa, y con un IC₅₀ de 1.81 mg/mL; se realizó cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) para caracterizar los péptidos responsables de la inhibición y se identificó al péptido

GEHSDGNV como el principal inhibidor de α -amilasa, en el caso de α -glucosidasa, se encontró que los péptidos IQAEGGLT, DKDYPK y GEHSDGNV presentan capacidad de inhibición de la enzima.

También se han identificado péptidos con capacidad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa a partir de proteína de soja germinada sometida a digestión gastrointestinal, demostrando tener capacidad inhibitoria de ambas enzimas, sin embargo, fue menor a la mostrada por la acarbosa en el mismo experimento (Montoya et al., 2018).

Otros péptidos bioactivos que muestran capacidad de inhibición de α -amilasa han sido obtenidos del comino (*Cuminum cyminum*) son CSP1 (FFRSKLLSDGAAAAGKALLPQYW), CSP2 (RCMAFLLSDGAAAQQLLPQYW), y CSP3 (DPAQPNYPWTAVLVFRH) (Siow & Gan, 2016) y péptidos <3 kDa PPHMLP, PPMHLP, PLPWGAGF, GNAACCGLP LLP, PLPPHNLL, PNPFPSPHTP de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris*) (Ngho & Gan, 2016).

Se han determinado compuesto de residuos de café (SCG) que han mostrado capacidad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa; en el estudio de Vázquez-Sánchez et al, (2018) se comparó la capacidad inhibitoria de α -glucosidasa de SCG y fibra aislada de SCG sometidos a digestión, se demostró que se incrementa la inhibición de la enzima con la fracción bioaccesible tanto de SCG como de la fibra con un IC50 de 7.3 y 7.5 mg/mL respectivamente, mientras que en la fracción indigerible el IC50 de SCG mostró valores de 53.4 y 44.8 mg/mL respectivamente.

Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad inhibitoria de extractos de café sobre enzimas digestivas de almidón, Duangajai et al., (2021) evaluó extracto de café con diferentes niveles de tostados a una concentración de 5 mg/mL, se demostró una actividad inhibitoria de α -amilasa de 31% con un nivel de tostado oscuro, y de α -glucosidasa de 16.67%, en este caso con extracto de café tostado ligero. Por otro lado, Li et al., (2021) demostró una correlación entre la

concentración de extracto de café sobre inhibición de α -amilasa, se sugiere que ocurre un cambio conformacional en la estructura secundaria de la enzima, debido a que un análisis cinético demostró que los compuestos en el extracto de café disminuyen la afinidad de unión al sustrato de la enzima y su recambio catalítico.

2.1.4.2 Receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPARs).

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son factores de transcripción activados por ligandos que pertenecen a la familia de receptores nucleares (Rojo-Villaescusa, 2017); están implicados en varias vías metabólicas tales como la homeostasis glucídica y de lípidos y entre otras en el control de la proliferación y diferenciación celular, a la fecha existen 3 subtipos caracterizados alfa (α), beta/sigma (β/δ) y gamma (γ), los tres se caracterizan por la presencia estructural común de cuatro dominios funcionales (figura 2) y se diferencian particularmente en su patrón de expresión tisular y temporal (Martin, 2010).

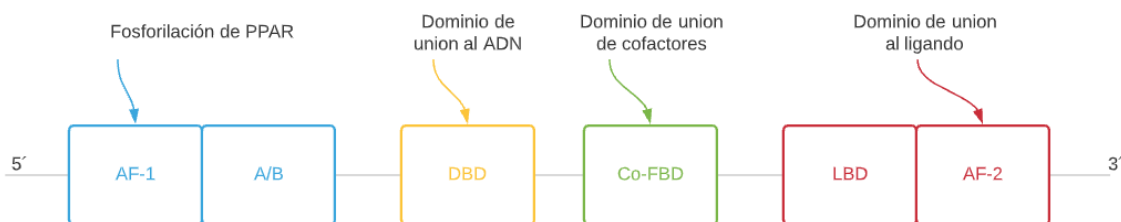


Figura 2. Dominios funcionales de los receptores PPARs
(Rojo-Villaescusa, 2017)

Los dominios de los PPARs se clasifican en el dominio A/B, es el N-terminal, contiene una función de activación independiente de ligando (AF-1), responsable de la fosforilación de PPAR. El dominio C, dominio de unión al ADN (DBD), permite la unión al elemento de respuesta a PPAR. El dominio D o co-FBD, es el dominio de unión de los cofactores. Por último, el dominio E/F o dominio de unión

de ligandos (LBD), es el responsable de la unión de ligandos y la activación de PPAR (Rojo-Villaescusa, 2017).

PPAR α se expresa principalmente en el hígado, el tejido adiposo pardo (BAT) y el tejido cardíaco, renal y muscular, y participa principalmente en la β -oxidación y el transporte de ácidos grasos para regular el equilibrio lipídico. PPAR β / δ se expresa en el músculo esquelético, el tejido adiposo, el corazón, el tracto gastrointestinal y participa principalmente en el metabolismo de los ácidos grasos. PPAR γ se expresa principalmente en el tejido adiposo donde constituye un regulador principal de la diferenciación adipocitaria y participa en la homeostasis glucídica, también se expresa en otros tejidos como en el riñón y en los vasos sanguíneos (Hong et al., 2019; Martin, 2010).

PPAR γ está encargada de la regulación de la expresión genética de enzimas involucradas en el almacenamiento de ácidos grasos en tejido adiposo, tales como acil-CoA sintasa, lipoproteína lipasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Wang et al., 2017). PPAR γ se expresa como tres transcritos que codifican dos proteínas diferentes: PPAR γ 1 y PPAR γ 2. PPAR γ 1 se expresa en diversos tejidos incluidos hígado y músculo, mientras que PPAR γ 2 se expresa mayoritariamente en tejido adiposo blanco y marrón en condiciones normales y más específicamente en adipocitos maduros (Ros-Pérez & Medina-Gómez, 2011).

Al unirse los ligandos al dominio de unión de PPAR, se dimeriza con el receptor de ácido retinoico (RXR) y la unión de una serie de coactivadores. Este complejo PPAR-RXR regula la transcripción de una serie de genes que presentan secuencias de ADN específicas conocidas como elemento de respuesta a PPAR (PPRE), controlando así la expresión de un grupo de genes implicados en la adipogénesis, metabolismo de los lípidos, inflamación y mantenimiento de la homeostasis metabólica (Rojo-Villaescusa, 2017).

La activación de PPAR γ solía utilizarse como una opción para regular los niveles de glucosa en sangre mediante el fármaco rosiglitazona, sin embargo, esto genera una mayor acumulación de tejido adiposo que desencadena la secreción

de citocinas y adipocinas, promoviendo un estado proinflamatorio, afectando la respuesta a la insulina; por lo que, se han propuesto ligandos con capacidad de inhibición al receptor que logren disminuir la adipogénesis, previniendo el incremento de tejido adiposo. Los ligandos no activadores de PPAR γ , tales como los antagonistas o los agonistas inversos modulan PPAR γ uniéndose con gran afinidad, pero sin incrementar la expresión de genes regulados por el receptor (Frcik, 2021).

Un antagonista de PPAR γ bien conocido es GW9662, es antagonista irreversible con una alta afinidad de unión al residuo CYS285 del receptor y muestra una potencial actividad inhibitoria hacia PPAR γ . Por otro lado, el dipéptido H-Trp-Glu-OH (G3335) ha demostrado una fuerte actividad antagonista en la inhibición PPAR γ por afinidad al sitio de unión y es competitivo con rosiglitazona. Estos antagonistas muestran efectos antiobesidad y antidiabéticos ya que se mejora la sensibilidad a la insulina, y carece de los efectos adversos causados por los agonistas de PPAR γ (Jin et al., 2016; Ye et al., 2005).

2.1.4.2.1 Moléculas con capacidad de unión a PPAR γ .

Existen diversos ligandos que pueden unirse al PPAR γ que regulan su activación o inhibición e influyen en la diferenciación celular y la adipogénesis *de novo*. Estos antagonistas de PPAR γ pueden reducir el contenido de triglicéridos en el tejido adiposo blanco, el músculo esquelético y el hígado. Además, también podrían mejorar los efectos de la leptina y aumentar el metabolismo de ácidos grasos y la disipación de energía, mejorando así la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina (Ye et al., 2006). Un objetivo potencial para el control de la obesidad es reducir la adipogénesis mediante la inhibición de la actividad de PPAR γ o la reducción de la diferenciación de preadipocitos. En estudios *in silico* se ha visto que los residuos de aminoácidos Phe264, His266, Ile281, Cys285, Arg288, Ser289, Met348 e His449 del receptor pueden unirse a ligandos que ejerce efectos antagonistas en adipogénesis (Aranaz et al., 2019; Ye et al., 2006).

Dentro del tratamiento enfocado a la inhibición de la adipogénesis se encuentran antagonistas sintéticos de PPAR γ como el bisfenol A diglicidil éter (BADGE), GW-9662 y G3335 (Zhang et al., 2017). Sin embargo, se ha apostado por la utilización de compuestos bioactivos de origen vegetal con capacidad inhibitoria de PPAR γ que disminuyan los efectos adversos que se puedan presentar con los compuestos sintéticos o fármacos.

Péptidos de la fracción proteica de glutelina (PIVF, IVPQH, IIQGR, QPY) y prolamina (QSPVF) de arroz y de la fracción proteína legumina (AQTF, AAVSH), convilicina (VIPVN, PQH) y vicilina (PVAIN, PGSSH) de chícharo mostraron actividad antiadipogénica *in silico*. mediante la unión a PPAR γ (Ruíz-López, 2020). En estudios *in vitro* los péptidos de proteína hidrolizada de quinoa (FGVSEDIAEKLQAKQDERGNIVL, AEGGLTEVWDTQDQQF, YIEQGNGISGLMIPG, AVVKQAGEEGFEW, HGSDGNVF) y el péptido RLLPH procedente de proteína hidrolizada de avellana han demostrado inhibición de la línea celular 3T3L1, mediante la interacción con PPAR γ (Shi et al., 2019; J. Wang et al., 2020).

Una característica de los péptidos que se ha identificado puede influir en su capacidad de unión con el receptor es su hidrofobicidad, determinada por la cantidad de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica, esta característica es crucial para su funcionalidad como compuestos bioactivos. Dentro de los aminoácidos hidrófobos se encuentran valina, lisina, isoleucina, alanina, fenilalanina, triptófano, metionina, prolina. En el estudio de Osguera-Toledo et al. (2016) se reporta que los péptidos FFL, LLSL, QQEG y LVL, los cuales presentan aminoácidos hidrófobos en ambas terminaciones (a excepción de QQEG), presentan una inhibición de la acumulación lipídica del 13 – 28% en la línea celular 3T3-L

Diversos compuestos presentes en el café (que también se encuentran en los SCG) han demostrado tener efectos antiadipogénicos gracias a su inhibición de PPAR γ , que ha demostrado una inhibición en la diferenciación de la acumulación de lípidos intracelulares en los adipocitos 3T3-L1, sin ser citotóxico (Kim et al.,

2018). Por otra parte, adipocitos tratados con trigonelina regulan a la baja el PPAR γ inhibiendo la adipogénesis (Ilavenil et al., 2014). Sin embargo, no se han realizado estudios que relacionen los péptidos presentes en café o SCG con inhibición del PPAR γ .

2.1.4.3 Enzima convertidora de angiotensina (ECA).

La enzima convertidora de angiotensina es una dicarboxipeptidasa dependiente de zinc con dos dominios catalíticos, está involucrada en diversos procesos fisiológicos, incluidos el desarrollo renal y la reproducción masculina, sin embargo, su principal función es su papel en la regulación de la presión arterial al convertir la angiotensina I en angiotensina II en el sistema renina angiotensina aldosterona (Wong, 2016)

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es un regulador crítico del volumen sanguíneo y la resistencia vascular sistémica, inicia como respuesta a la disminución de la presión arterial. Las células yuxtaglomerulares del riñón secretan la prorenina de forma constitutiva que se encuentra inactiva, sin embargo, al existir una disminución de la presión arterial se genera una escisión de la prorenina en renina. Una vez en la sangre la renina actúa sobre el angiotensinógeno secretado por el hígado, convirtiéndolo a angiotensina I. La angiotensina I es transformada en angiotensina II gracias a la ECA que se encuentra en el endotelio vascular de los pulmones y riñones. La angiotensina II afecta los riñones, la corteza suprarrenal, las arteriolas y el cerebro al unirse a los receptores de angiotensina tipo I y II, esto genera una vasodilatación gracias a la generación de óxido nítrico. La angiotensina II al actuar sobre la corteza suprarrenal estimula la liberación de aldosterona, esta hormona afecta la reabsorción de sodio y la excreción de potasio en el túbulo distal y el conducto colector de la nefrona, dando como resultado la retención de sal sin la pérdida de potasio (Figura 3) (Fountain y Lappin, 2017).

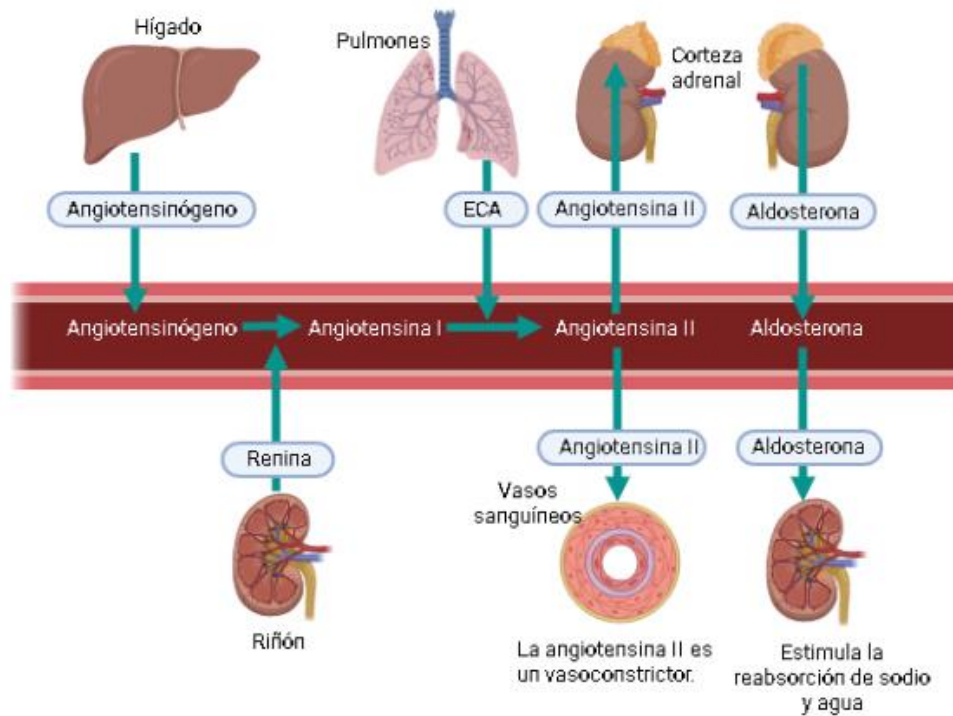


Figura 3. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (Fountain y Lappin, 2017).

2.1.4.3.1 Moléculas con capacidad de unión a ECA

Los inhibidores de la ECA disminuyen la presión arterial en persona con hipertensión, su mecanismo de acción es bloquear la enzima e inhibir la conversión de angiotensina I a angiotensina II; esto aumenta la natriuresis, reduce la presión arterial y evita la remodelación del músculo liso y los miocitos cardíacos. Existen 10 medicamentos orales inhibidores de ECA que han sido aprobados por la FDA (Benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, perindopril., quinapril, ramipril y trandolapril), sin embargo, existe el riesgo de presentar efectos adversos al consumir estos medicamentos, desde dolor de cabeza, debilidad y mareos, hasta efectos secundarios graves como hinchazón, reacción alérgica o ictericia (Herma et al., 2022).

La evidencia sugiere una amplia variedad de péptidos de origen vegetal relacionados a una inhibición de la ECA. Los péptidos inhibidores de la ECA son generalmente péptidos de cadena corta con 2 a 12 aminoácidos, contienen aminoácidos altamente ácidos (Asp y Glu) que pueden causar una carga neta negativa. La interacción de péptidos cargados negativamente con ACE que la átomos de zinc, que son necesarios para la actividad enzimática. Los péptidos inhibidores de la ECA generalmente consisten en residuos de aminoácidos específicos en el extremo C y/o el extremo N (Daskaya-Dikmen, et al., 2017).

Los hidrolizados de proteínas vegetales han demostrado generar péptidos con capacidad inhibitoria de ECA, dipéptidos, tripéptidos y pentapéptidos resultantes de la hidrólisis de chícharo, camote, espinaca, proteína de arroz, soya y canola mostraron valores de IC50 desde 0.03µM hasta 746.4 µM en estudios *in vitro*. La actividad inhibitoria de los diferentes péptidos que se unen a la ECA está influenciada por los residuos presentes en C-terminal, los aminoácidos de cadena ramificada o los hidrófobos muestran mayor afinidad a la enzima (Nishitkumar et al., 2022).

Los péptidos de residuos de café han sido evaluados para comprobar su capacidad de inhibición de ECA. En el estudio de Ramírez et al., (2021) se evaluó la capacidad inhibitoria de ECA de péptidos de SCG en un modelo *in silico*, mediante el programa BIOPEP, se determinó una posible inhibición de los péptidos YGF, RMYRY y GMCC sobre ECA.

En el estudio de Valdés et al., (2020) los péptidos provenientes de la hidrólisis de residuos de café tostado medio (GGSMG, GVMDFQ, LDPIEF, GGGDL, YEAWL, DAHIPPG, DPHFGQPAVE, FGMNSLS, FPCDGP, GPVNIAY, GMAST y LGMAST), mostraron la mayor capacidad inhibitoria de ECA, comparado con el nivel de tostado ligero y oscuro, una concentración de 2.5 mg/mL de proteína de SCG hidrolizada con alcalasa, inhibe en un 88.4% la ECA.

Por otro lado, Ribeiro et al., (2021) realizó una secuenciación de péptidos a partir de proteína hidrolizada de SCG mediante enzimas gastrointestinales (pepsina y

pancreatina), los péptidos secuenciados fueron sometidos a un análisis *in silico* sobre ECA, donde los péptidos PGF, PQPR, AGN, APH, ADAF y PSEAGL mostraron características como inhibidores competitivos de ECA. Posteriormente se realizó una inhibición *in vitro* de ECA, donde la proteína digerida de SCG mostró un IC50 de 0.27 mg/mL, esta inhibición se muestra 9 veces mayor que la realizada con SCG sin digerir, con esto podemos predecir la bioactividad de los péptidos de SCG resultantes de la digestión gastrointestinal.

Durante las últimas décadas, péptidos bioactivos de origen vegetal han sido estudiados por ser potenciales alternativas naturales o complementos de los medicamentos sintéticos. Los péptidos bioactivos pueden ser liberados posterior a la digestión gastrointestinal a partir de proteínas precursoras o pueden ser sintetizados. Una vez liberados, han demostrado tener abundantes actividades biológicas que mejoran la salud humana y reducen el riesgo de enfermedades crónicas. Gracias a su estructura, los péptidos pueden interactuar con los aminoácidos del sitio catalítico de las enzimas involucradas en el desarrollo diversas enfermedades, inhibiendo su acción (Vilcacundo, Villanluenga y Hernández-Ledezma, 2017).

Hasta el momento, los estudios relacionados con péptidos bioactivos de SCG, se han centrado en la capacidad inhibitoria de ECA, mientras que no se han realizado suficientes estudios que evalúen su capacidad de inhibición de en proteínas involucradas en el SM (α -amilasa, α -glucosidasa, ECA y PPAR γ).

2.2. *Coffea arabica* L.

2.2.1 Características biológicas

El café se obtiene a partir de árboles o arbustos que crecen en la capa más baja de los bosques, pertenecientes a la familia botánica *Rubiaceae*, la cual cuenta con 500 géneros y más de 6,000 especies. En la tabla I se enlistan las especies más frecuentes. Las dos especies más importantes de café desde el punto de

vista económico son el *Coffea arabica* (café Arábica) que supone más del 60% de la producción mundial y el *Coffea canephora* (café Robusta).

La planta de *C. arabica* es un arbusto grande con hojas ovaladas de color verde oscuro. Es genéticamente diferente de otras especies de café, ya que tiene cuatro juegos de cromosomas en lugar de dos. Los frutos son ovalados y maduran en 7-9 meses.; Por lo general, contienen dos semillas planas (los granos de café). En comparación con la variedad robusta, los árboles de *C. arabica* son generalmente menos vigorosos, requieren un mayor costo de producción y producen granos que contienen aproximadamente la mitad de la cantidad de cafeína (Batista et al., 2015).

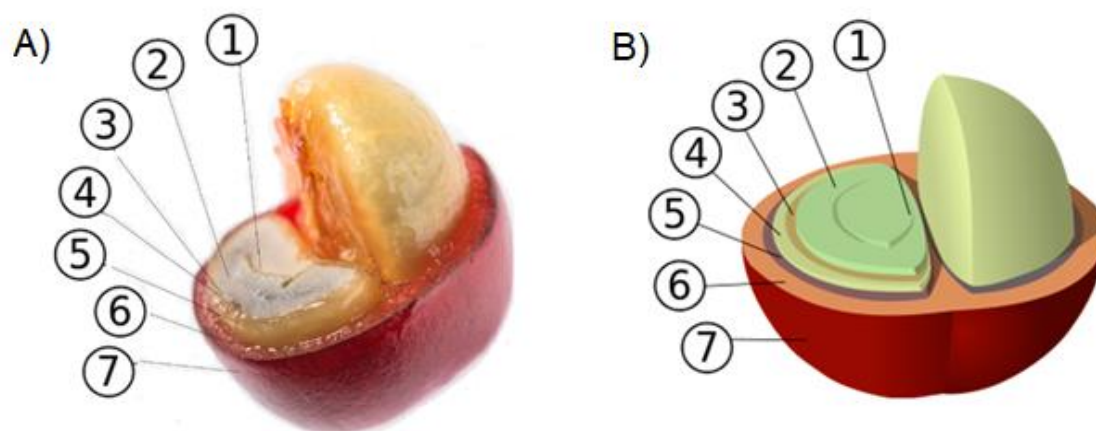


Figura 4. Anatomía de la cereza del café. A) Imagen real, B) Imagen gráfica. 1: Corte central, 2: Grano de café (endospermo), 3: Piel plateada (tegumento), 4: Pergamino (endocarpio), 5: capa de pectina, 6: pulpa (mesocarpio) 7. Piel exterior (pericarpio). (Klingel, et al., 2010)

En la figura 4 se presenta la estructura de la cereza de café, la piel de la cereza de café se llama pericarpio y es verde hasta que madura y se vuelve de color rojo, amarillo, naranja o incluso rosa brillante, según la variedad; debajo de la piel de cada cereza hay una capa delgada que se denomina mesocarpio, también conocida como pulpa; el mucílago es la capa interna de la pulpa; también hay una capa de pectina debajo del mucílago, posteriormente se encuentra el

endospermo, conocido como granos. Por lo general, hay dos granos en una cereza de café, cada uno de ellos está cubierto por una capa fina de epidermis conocida como piel plateada y una cascarilla similar al papel, denominado pergamino (endocarpio) (Klingel et al., 2020).

2.2.2 Producción y consumo del café

El café crece idealmente a una temperatura de entre 18 a 22°C a una altitud de entre 950 a 2000 m, siendo la altitud más favorable entre 1300 y 1600 m. (López-García et al., 2016; Patay et al., 2017). El cultivo y el tratamiento del café implican los siguientes pasos: reducción de árboles; preparación del suelo; plantación; tratamiento (corrección de suelos, fertilización, control de plagas y limpieza del terreno manualmente o con herbicidas); recolección de frutas (la fruta madura suele ser roja y, por lo tanto, se llama baya); tamizado para eliminar impurezas; transporte; lavado para quitar pulpa y membranas; secado al sol, granos rotatorios con rastrillo o secado mecánico mediante chorro de aire caliente; separación manual de granos; y almacenar en sacos (Batista et al., 2015).

Actualmente, aproximadamente 70 países producen café y más del 50% proviene de Brasil, Colombia y Vietnam; la producción de café se extiende por América Central y del Sur, África y Asia, lo que da lugar a un total de aproximadamente 11 millones de hectáreas de plantaciones y un rendimiento anual de aproximadamente 6 millones de toneladas de café verde. *C. arabica L* se cultiva a menudo en plantaciones a gran escala y también en pequeñas explotaciones agrícolas (Patay et al., 2017)

México es el onceavo productor mundial de café, el café *Coffea arabica L.* se cultiva en regiones que poseen el clima adecuado para su crecimiento y la mayoría de su producción se realiza por productores locales en pequeñas parcelas y escaso capital (López-García et al., 2016; Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural [SADER], 2018). En México, el principal periodo de cosecha de café es de enero a marzo y su principal producción se realiza en el estado de Chiapas con un 41% de la producción total, seguido por Veracruz (24%) y Puebla

(15.3%), donde se producen principalmente las variedades de *Coffea arabica* L. Typica, Garnica, Bourbon y Caturra (López-García et al., 2016; Melquiades Hernández-Solabac et al., 2011; SADER, 2018).

En México se consumen aproximadamente 80,300 toneladas de café, tomando en cuenta el café vendido al público general para consumo personal o en el hogar, a negocios y a instituciones formales. El café soluble representa el 54.2% de consumo, seguido del café molido con un 40.5% y por último el café en grano con un 5.3% (AMECAFE, 2017).

2.2.3 Subproductos del café

La producción de café en México y su consumo generan una importante cantidad de subproductos que son desechados en vertederos. Dentro de su producción agrícola los subproductos de café representan el 80% del volumen total. La industria del café genera alrededor de 2 mil millones de toneladas de desechos agrícolas, que representan un alto peligro de contaminación ambiental. Pulpa de café, cascarilla, piel plateada, cáscara, y los residuos de café son los subproductos comunes del café (Figura 5) (Klingel et al., 2020).

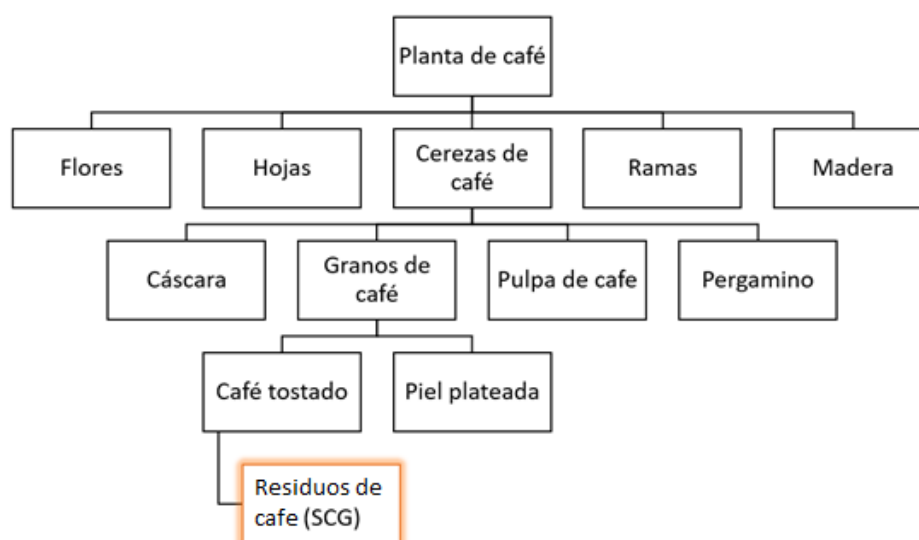


Figura 5. Subproductos relacionados con la producción de café (Klingel et al., 2020).

Se estima que, del total de café preparado, alrededor del 90% no se utiliza y termina como residuo, denominado “residuos de café” (SCG por sus siglas en inglés) (Kourmentza et al., 2018). Los SCG se forman durante la extracción de café en polvo con agua caliente para producir una bebida de café y durante la producción de preparaciones de café instantáneo, en este caso, por cada kg de café instantáneo, se producen 2 kg de SCG (Klingel et al., 2020).

Las prácticas habituales para el tratamiento de los desechos alimentarios incluían su uso como pienso, la producción de composta y su disposición en vertederos, sin embargo, este último representa un impacto ambiental significativo, por lo que la industria alimentaria debe de buscar alternativas para estos residuos (Kourmentza et al., 2018; Kovalcik et al., 2018). Actualmente, los SCG se utilizan para la elaboración de diversos productos como *bio-syngas*, electricidad, composta, biodiesel, y precursor en la producción de carbón activado y productos para la alimentación de animales (Kourmentza et al., 2018; Valdés et al., 2020). Sin embargo, se ha propuesto su revalorización dentro de la industria alimentaria, debido a sus características nutricionales.

2.2.3.1 Uso de los SCG en productos alimentarios

Actualmente existen propuestas para la utilización de este compuesto dentro de la industria alimentaria, por ejemplo, después de secar los SCG, la posterior extracción del aceite de café con CO₂ supercrítico y la esterilización, se produce una “harina de café”, que es altamente fibrosa, rica en proteínas y libre de gluten. Está diseñado para usarse como un ingrediente alimentario novedoso en recetas dulces y saladas, productos de panadería, confitería y bocadillos (Klingel et al., 2020; Martínez-Saez et al., 2017).

Martínez-Saez et al. (2017), propone que los SCG se pueden utilizar directamente como ingrediente alimentario en alimentos sólidos sin afectar la preparación convencional de los alimentos y la calidad final del producto. Para esto elaboró diversas galletas con diversas concentraciones de fibra dietética insoluble antioxidante extraída de los SCG. Estas formulaciones alimentarias

pueden estar destinadas a personas con una ingesta energética reducida y necesidades particulares.

Por otro lado, Aguilar-Raymundo et al. (2019) analizó la capacidad antioxidante y la aceptación sensorial de galletas a las que se les añadió de entre 17% a 25% de harina de SCG, demostrando un aumento de capacidad antioxidante y tenía buena aceptación por el público. Esto permite obtener un producto que podría considerarse fuente de fibra dietética y aceptable que representa una alternativa para valorar los subproductos del café y reducir su impacto ambiental.

Por lo tanto, la composición nutricional de los SCG podría aprovecharse para adicionar a diversos alimentos, utilizarlo como base para la elaboración de alternativas saludables de otros productos (ej. harinas) o extraer sus compuestos bioactivos que se pueden añadir a alimentos para mejorar su composición nutricional y potencialmente tener un efecto preventivo o paliativo contra alguna enfermedad.

2.2.3.2 Composición nutricional de los SCG

Los SCG son ricos en polisacáridos y fibra, lípidos, así como en proteínas. Respecto a carbohidratos, las melanoidinas pueden ser los compuestos tipo carbohidratos predominantes, mientras que la glucosa y el almidón resistente, son componentes menores. Los SCG contienen cerca del 45% de azúcares polimerizados en estructuras de celulosa y hemicelulosa, de los cuales el 47% le corresponde a manosa, 30% a galactosa, 19% a glucosa y 4% a arabinosa (Campos-Vega et al., 2015).

Los SCG contienen fracción lipídica en una proporción de 10 - 15%, donde los principales lípidos presentes son el ácido linoleico, el ácido palmítico, el ácido oleico y el ácido esteárico (Ali et al., 2018).

Durante el proceso de tostado del café, se genera una fragmentación y polimerización de las proteínas con azúcares y alcaloides, generando melanoidinas, a mayor nivel de tostado, es mayor el contenido de melanoidinas

en los residuos de café. A su vez, presenta compuestos antioxidantes como compuestos fenólicos y otros compuestos nitrogenados no proteicos como la cafeína (Valdés et al., 2020). Los principales compuestos fenólicos en los residuos de SCG son similares a los que se obtienen en las infusiones de café, siendo los ácidos clorogénicos como los ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínico, ácidos feruloilquínicos, lactonas de ácido cafeoilquínico, lactonas de ácido feruloilquínico y ácidos p-cumaroilquínicos, los más abundantes, sin embargo, la concentración de estos compuestos, depende del proceso de preparación y tostado; algunos elementos se incorporan a melanoidinas, las cuales se forman durante el proceso de tostado de café (Campos-Vega et al., 2015; Valdés et al., 2020).

Respecto al contenido de proteína en los SCG, este varía entre 10% a un 17%; aunque este contenido puede estar sobreestimado debido a la presencia de otras sustancias nitrogenadas. Al comparar el contenido de proteína de SCG con otras fuentes vegetales ricas en proteína como la soya, se tiene que los SCG tienen niveles similares o más altos de los aminoácidos leucina, valina, fenilalanina e isoleucina (Campos-Vega et al., 2015).

En la tabla II, se encuentra el perfil de aminoácidos presente en los SCG, donde se puede ver que presentan un aporte importante de aminoácidos esenciales, los aminoácidos de mayor presencia son valina, ácido aspártico, la isoleucina y la histidina (Martínez-Saez et al., 2017).

Tabla II. Contenido de aminoácidos en SCG

Aminoácidos	Presencia en proteína de café (%)
Aminoácidos esenciales	42
Alanina (Ala)	2.3
Ácido aspártico (Asp)	5.1
Ácido glutámico (Glu)	4.1
Glicina (Gly)	2.7
Leucina (Leu)	2.5
Threonina (Thr)	4.7
Valina (Val)	6.0
Isoleucina (Ile)	5.3
Histidina (His)	5.3
Prolina (Pro)	2.7

(Martinez-Saez et al., 2017).

Se debe tomar en cuenta que el contenido de proteína y péptidos presentes en los SCG puede variar dependiendo del nivel de tostado de café. Esto es importante al momento de determinar el café utilizado para la obtención de proteínas, ya que, a mayor nivel de tostado, será mayor la cantidad de melanoidinas presentes en el mismo a las cuales se les puede unir las proteínas de café disminuyendo así su biodisponibilidad (Valdés et al., 2020).

El efecto fisiológico de las proteínas se puede predecir al analizar su perfil de aminoácidos, por ejemplo, existe una presencia alta de la relación lisina/arginina en los SCG, lo cual es un determinante de los efectos colesterolemiantes y aterogénicos. Además, la proteína presente en SCG también es una excelente fuente de arginina, glutamina e histidina, los tres aminoácidos conocidos por tener fuertes efectos sobre las funciones inmunes del cuerpo. El alto contenido de cisteína y metionina de algunas proteínas SCG puede aumentar los niveles de antioxidantes del cuerpo, estabilizando potencialmente el ADN durante la división celular y reduciendo el riesgo de ciertas formas de cáncer de colon. El contenido de aminoácidos hidrofóbicos de los SCG (leucina, valina, isoleucina, prolina y alanina) puede relacionarse con inactivación de receptores como PPAR γ (Campos-Vega et al., 2015; Oseguera et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, los péptidos de SCG han sido poco estudiados, los principales estudios *in silico* e *in vitro* exhiben potenciales actividades asociadas a aminorar factores involucrados en SM; como inhibición de la ECA (Enzima convertidora de angiotensina) y de la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV). Algunos de los péptidos encontrados con esta posible bioactividad, se obtuvieron de la globulina de almacenamiento 11S presente en los SCG.

3. Planteamiento del problema

El síndrome metabólico es un conjunto de factores de riesgo metabólico, caracterizados por obesidad abdominal, dislipidemia, bajos niveles de cHDL, hipertensión y resistencia a la insulina; es un problema prevalente en México, ya que en el año 2018 el 56% de la población adulta mexicana presentaba SM. Existen diversas proteínas que han sido utilizados como dianas farmacológicas para tratar las afecciones del SM entre ellas las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, relacionadas con los niveles de glucosa postprandial, el receptor PPAR γ involucrado en la adipogénesis y por consecuente, el aumento de tejido adiposo; y la enzima convertidora de angiotensina involucrada en la regulación de la presión arterial. Se han estudiado compuestos bioactivos y péptidos de fuentes vegetales con una posible interacción sobre las proteínas involucradas en el SM.

Una fuente vegetal propuesta de compuestos bioactivos son los residuos de café. El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo, al año se consumen 6 millones de toneladas de café, donde México representa el 7mo productor mundial de café, sin embargo, 90% del grano de café no se utiliza y termina como residuo SCG, lo que implica un impacto medioambiental importante y un desecho de compuestos potencialmente bioactivos presentes en los SCG, por lo que se plantea la revalorización del subproducto. Las proteínas representan una fracción del 10 al 17% que no ha sido suficientemente investigada.

Compuestos bioactivos de residuos de café han demostrado interacción con las proteínas involucradas en el SM. Los estudios sobre péptidos de proteína de SCG hidrolizada han demostrado una interacción sobre la ECA, tanto en estudios *in silico* como *in vitro*, sin embargo, no han sido estudiados con otras enzimas o receptores.

Por lo anterior se propone el estudio de la fracción hidrolizada mediante digestión *in silico* e *in vitro*, sobre las proteínas relacionadas con el SM α -amilasa, α -glucosidasa, PPAR γ y ECA.

4. Justificación

Debido a que existe una fuerte prevalencia en México de síndrome metabólico se buscan alternativas presentes en compuestos vegetales que ayuden a disminuir las afecciones relacionadas y que no ocasionen efectos secundarios. Péptidos bioactivos de fuentes vegetales han sido estudiados y se han relacionado con una posible inhibición del proceso de adipogénesis, mediante la unión al receptor PPAR γ en tejido adiposo, actúan como reguladores de los niveles de glucosa postprandial, mediante la inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa y regulan el sistema renina angiotensina aldosterona mediante la inhibición de la ECA, disminuyendo la presión arterial. Estos efectos han sido estudiados mediante métodos *in silico* como *in vitro*.

Los residuos de café (SCG) son un subproducto de la industria alimentaria con un importante perfil nutricional. Se han caracterizado péptidos de la fracción proteína de SCG resultantes de diversos procesos de hidrólisis que han mostrado bioactividad *in silico* como *in vitro* sobre la enzima convertidora de angiotensina. Esta bioactividad se atribuye a su perfil de aminoácidos, donde aquellos péptidos con residuos hidrofóbicos se relacionan con una mayor bioactividad, esta característica está presente en los péptidos de fuentes vegetales que muestran interacción con α -amilasa, α -glucosidasa y PPAR γ , por lo que se propone que los péptidos hidrofóbicos presentes en SCG hidrolizado con enzimas gastrointestinales, inhiben la actividad de proteínas relacionadas con síndrome metabólico.

5. Hipótesis

Los péptidos de residuos de café tienen actividad inhibitoria de proteínas relacionadas con el síndrome metabólico.

6. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la digestibilidad proteica de residuos de café y el potencial de sus péptidos bioactivos para el manejo del síndrome metabólico

Objetivos específicos

1. Analizar la digestibilidad y bioaccesibilidad *in vitro* de la proteína residuos de café
2. Determinar la actividad inhibitoria *in vitro* de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa de los péptidos de residuos de café.
3. Analizar *in silico* la bioactividad predictiva de los péptidos de residuos de café, así como su actividad ligando-receptor con PPAR γ .

7. Metodología

7.1 Diseño del estudio

El estudio es de tipo descriptivo, analítico y transversal.

7.2 Esquema general de trabajo

En la figura 5, se presenta el esquema general de la investigación. La metodología del proceso digestivo *in vitro* utilizada en esta investigación está basada en el estudio López-Ibarra (2018), mientras que, el procedimiento *in silico* está basado en el estudio de Ruiz-López (2020). Se partió de café molido (*Coffea arabica L.*), de tostado medio, mediante filtración con agua a 92°C en proporción 1:20. Para posteriormente recuperar los SCG. Se realizó un análisis proximal de los compuestos presentes en los mismos. Los SCG fueron desgrasados y se le extrajeron los compuestos fenólicos, a la harina resultante se le realizó una digestión gastrointestinal *in vitro* basada en el protocolo estandarizado INFOGEST (Brodkorb et al., 2019) que simula las fases oral, gástrica e intestinal con enzimas pepsina, pancreatina y bilis; se simula la permeación del epitelio intestinal con una membrana de celulosa. Esta digestión *in vitro* dio como resultado las fracciones No digerible (ND), No bioaccesible (NBA) y Bioaccesible (BA) de SCG, estas fracciones fueron evaluadas para medir la digestibilidad, bioaccesibilidad y se les realizó electroforesis (SDS-Page) para identificar el peso molecular de las proteínas digeridas de SCG. Se evaluó su capacidad para inhibir α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro* de la fracción bioaccesible resultante de la digestión de SCG. Por último, se realizó el análisis *in silico* donde se determinó la secuencia de aminoácidos de las proteínas y péptidos presentes en SCG mediante bases de datos de proteínas (RSCB PDB y UniProt), se realizó un proceso proteolítico en BIOPEP-UWM con enzimas gastrointestinales (pepsina, tripsina y quimotripsina) (Minkiewicz, Iwaniak y Darewicz, 2019). Se utilizaron los péptidos hidrolizados con una longitud de 2 a 5 aminoácidos para la medición de afinidad con el receptor PPAR γ . Posteriormente, los péptidos con un valor de afinidad menor -160 puntos de vinculación se consideraron como moléculas con alta afinidad, por lo que, se utilizaron para el análisis de ligando-receptor PPAR γ

en autodock tool (ADT 4.0). Finalmente, se evaluó la Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción / Eliminación y Toxicidad de los péptidos seleccionados mediante el programa SwissADME, los resultados se compararon con el fármaco Risoglitazona para comparar la capacidad del péptido de llegar al sitio activo del receptor.

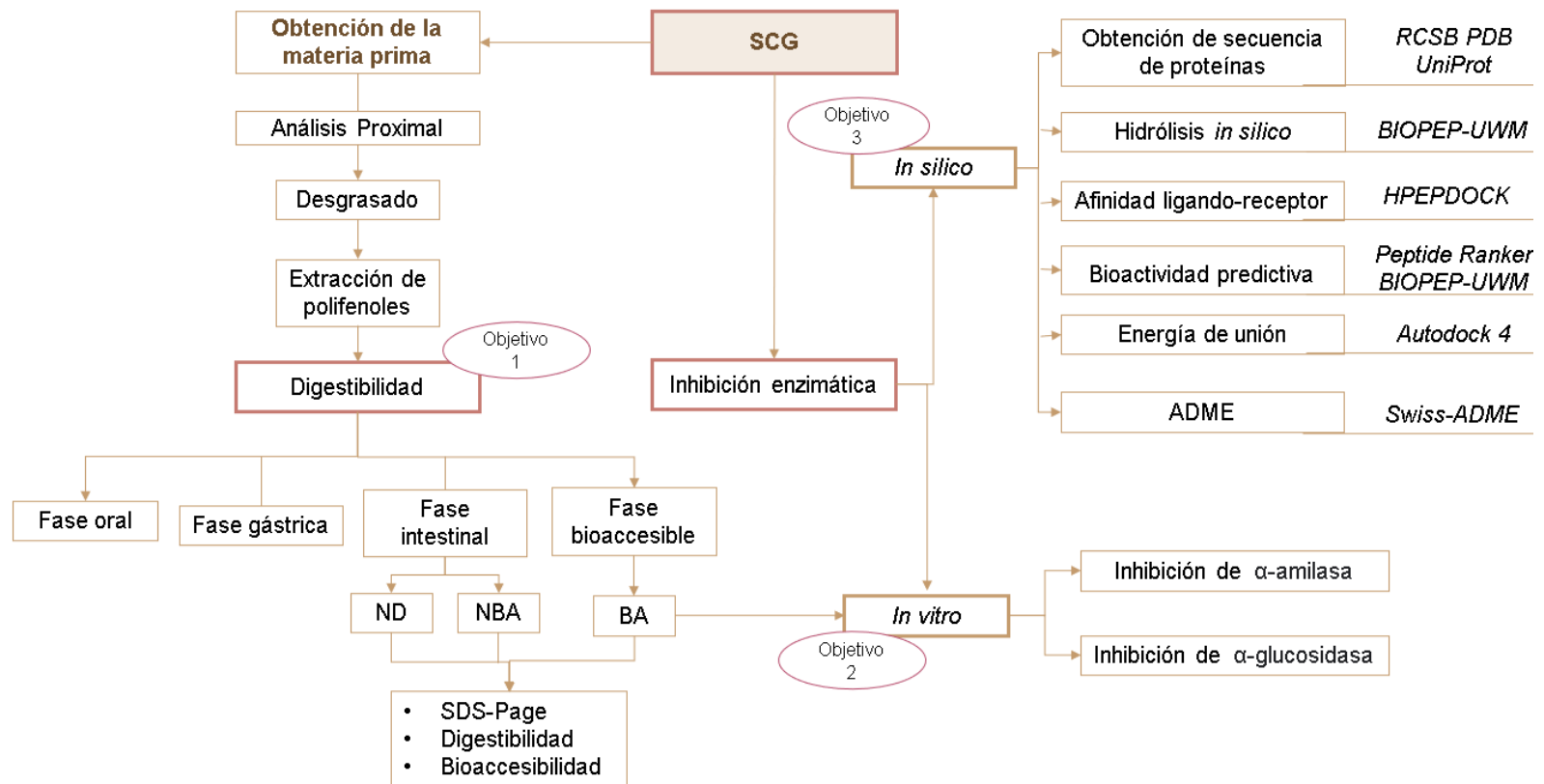


Figura 6. Esquema general de investigación. SCG: Residuos de café (Spend Coffee Grounds) ND: Fracción no digerible. NBA: Fracción no bioaccesible, BA: Fracción Bioaccesible. ADME: Absorción Digestión, Metabolismo y Excreció

7.3 Materiales y equipos

En la tabla III se describen los materiales y equipos utilizados en las diferentes técnicas y procedimientos que se llevaron a cabo para lograr los objetivos planteados en la metodología

Tabla III. Material, equipo y reactivos utilizados en la elaboración de la presente investigación.

Materiales	
<ul style="list-style-type: none"> • Vasos de precipitado • Matraces Erlenmeyer • Probetas 10, 50, 100 y 1000 mL • Tubos de plástico con tapa 15 y 50 mL • Puntas de micropipeta • Tubos de ensayo • Frascos de vidrio con tapa 	<ul style="list-style-type: none"> • Espátulas metálicas • Agitadores magnéticos • Crisoles de porcelana • Desecador de vidrio • Embudo • Charolas de aluminio • Placa de 96 pocillos
Equipo	
<ul style="list-style-type: none"> • Molino manual (IKA A11 basics) • Horno Felisa FE-292D • Extractor-Goldfish LABCONCO • Agitador Vortex VX-200-LABNET • Placas de calentamiento Thermo Scientific Cimarec 588850100 • Cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Bio-Rad • Incubadora con agitador orbital (1575 Sheldon Manufacturing • Campana de flujo laminar nivel 2 (AirClean® Systems) 	<ul style="list-style-type: none"> • Liofilizadora FreeZone 775002 • Refrigerador (-80°C, -20°C, 4°C) • Baño de agua caliente • Potenciómetro HANNA • Mufla FE-363 • LECO FP-528 • Espectrofotómetro Cytation 5 imaging reades BioTek • Centrifuga (Hermle Labortechnik Z 216 MK) • Espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c
Reactivos	
<ul style="list-style-type: none"> • α-amilasa (EC3.2.1.1) • α-glucosidasa (EC 3.2.1.20) • β-mercaptoetanol reactivo de pureza de electroforesis • Acarbosa • Ácido acético glacial • Ácido clorhídrico • Ácido dinitrosalicílico • Acrilamida 99.9% reactivo de pureza de electroforesis • Alcohol metílico • Almidón • Azul de bromofenol reactivo de pureza de electroforesis • Benchmark™ Protein Ladder. • Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) • Bis (N, N' – Methylene – bis – acrylamide) • Cloruro de calcio (CaCl₂) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cloruro de magnesio hexahidratado ((MgCl₂(H₂O)₆) • Cloruro de potasio (KCl) • Cloruro de sodio (NaCl) • Duodecilsulfato de sodio (SDS) reactivo de pureza de electroforesis. • Extracto de bilis de origen porcino • Glicerol grado de biología molecular • Hidróxido de sodio (NaOH). • p-nitrofenil-α-D-glucopiranosido • Pancreatina de origen porcino • Pepsina de mucosa gástrica en polvo. • Persulfato de amonio grado de biología • Polvo de tinción de proteína Comassie Brilliant Blue G-250 • Tartrato de sodio-potasio. • Tetrametilendiamina (TEMED) reactivo de pureza de electroforesis. • Tris Base, grado de biología molecular.

7.4 Procedimiento

7.4.1. Obtención de los SCG

Se utilizó café (*Coffea arabica L.*) molienda fina, tostado medio, el cual se preparó en cafetera convencional a una concentración de 50g de café por 1000 mL de agua, por 5 minutos a 92°C (Jiménez-Zamora et al., 2015). Los SCG generados se secaron en un horno a 103 ± 2 ° hasta peso constante, (Valdés et al., 2020), posteriormente se molieron y tamizaron a 500 µm.

7.5 Análisis proximal de SCG

El análisis proximal de las muestras se realizó de acuerdo con los métodos oficiales de la Association Official Analytical Chemist (AOAC). El contenido de carbohidratos (extracto libre de nitrógeno) se obtuvo por diferencia.

7.5.1 Determinación de humedad (AOAC 14.003)

El contenido de humedad se determinó utilizando el método gravimétrico basado en el secado de la muestra en un horno marca Felisa (FE-292D) a 100°C y la diferencia de peso entre el material seco y húmedo (AOAC, 1980b).

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = ((A - B) / (A - C)) \times 100$$

Donde: *A* es la masa de la cápsula con muestra antes del secado, en gramos; *B* es la masa de la cápsula con la muestra desecada, en gramos; *C* es la masa de la cápsula vacía, en gramos.

7.5.2 Determinación de Cenizas (AOAC 14.006)

Se utilizó el método de calcinación empleando una mufla marca Felisa (FE-363) a 500 °C, de acuerdo con la siguiente ecuación se calculó el porcentaje de cenizas (AOAC, 1990a):

$$\% \text{ cenizas} = (CC - C) / w \times 100$$

Donde: *CC* es el peso inicial del crisol con muestra; *C* es el peso del crisol con la muestra calcinada; *w* es el peso de la muestra.

7.5.3 Determinación de proteínas (AOAC 968.06)

La determinación del contenido de proteína se realizó bajo el mismo proceso que el paso 7.6.2 mencionado en el presente documento, se realizó mediante el método de Dumas utilizando el equipo LECO (FP-528), partiendo de una muestra de SCG.

7.5.4 Determinación de lípidos (AOAC 7.056)

El contenido de lípidos se determinó con el método de Goldfish. Se utilizó éter etílico como disolvente y el extractor Goldfish de la marca LABCONCO modelo 35001, la muestra se mantuvo en reflujo constante durante 4 horas, posteriormente el disolvente y el extracto se separó por destilación. Los vasos con extracto se secaron en estufa a 100 °C, y 24 horas después se pesaron para determinar la cantidad de lípidos contenida en la muestra (AOAC, 1980a).

7.5.5 Determinación de fibra cruda (AOAC 962.09)

La fibra cruda contenida en las muestras se calculó mediante la pérdida de masa después de la incineración del residuo orgánico que queda al finalizar la etapa de digestión, en la cual se utilizaron soluciones de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 0.255 N) e hidróxido de sodio (NaOH, 0.313 N) (AOAC, 1990b).

7.5.6 Determinación de carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos (extracto libre de nitrógeno) se obtuvo por diferencia, tal como se muestra en la siguiente ecuación (FAO, 1993):

$$\text{Extracto libre de nitrógeno (\%)} = 100 - (A+B+C+D+E)$$

Donde: *A* es el contenido de humedad (%); *B* es el contenido de proteína cruda (%); *C* es el contenido de lípidos crudos (%); *D* es el contenido de fibra cruda (%); *E* es el contenido de cenizas (%)

7.6 Determinación del concentrado proteico

7.6.1 Extracción del concentrado proteico

Se realizó previamente la eliminación de otros componentes que podrían intervenir en la recuperación de un mayor concentrado proteico, como los lípidos, polifenoles y carbohidratos, mediante los métodos descritos a continuación

7.6.1.1 Extracción de lípidos

Se partió de SCG molido el cual se secó a 100°C hasta peso constante, se mezcló con hexano en proporción 1-10. Posteriormente se mantuvo en agitación constante a 20°C por 16 h, se filtró la muestra utilizando una bomba de vacío, se descartó el hexano y se recuperó el SCG ya desgrasado (Ramírez et al., 2021).

7.6.1.2 Extracción de polifenoles

A la muestra previamente desgrasada se le agregó metanol al 80% (v:v) en proporción 1-10 (p/v). Se colocó bajo ultrasonido por 20 minutos a 40% amplitud, se filtró al vacío con bomba de extracción para recuperar la harina de SCG sin polifenoles (Okur, 2019). Los SCG resultantes de este proceso se secaron en horno para eliminar la humedad a 100°C por 2 horas, los SCG resultantes están desgrasados y sin polifenoles.

7.6.1.3. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas se utilizó sulfito de sodio (Na_2SO_3) al 0.25% en una proporción 1-10 (p/v) con la harina desgrasada y sin polifenoles y se ajustó el pH a 8 con NaOH al 6M, en esta fase se solubilizaron las proteínas en un medio alcalino, se colocó en agitación por 24 horas a 250 rpm. Posteriormente, se centrifugaron a 13520g por 20 minutos a 22°C, se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 4.25 (punto isoelectrico de las proteínas de SCG) con HCl 3M para promover la precipitación de las proteínas en el medio ácido. Se centrifugó a 13520 g, 4°C por 20 minutos y se recuperó el sedimento (Samsalee, 2021; Ayala-Rodríguez et al., 2022).

7.6.2 Cuantificación de proteínas

Se realizó mediante el método de Dumas utilizando el equipo LECO (FP-528). A partir de la combustión de la muestra en presencia de oxígeno (O₂) a 950 °C, la muestra se descompuso en gases y cenizas. Los gases resultantes de la combustión fueron arrastrados por el flujo de oxígeno y desplazados posteriormente por Helio (He) para eliminar los gases interferentes (Oxígeno libre, dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O)). Luego de eliminar los gases interferentes, el gas llegó a la celda de medición de Nitrógeno (N₂) que determinó el contenido de N₂ y se multiplicó por el factor de conversión de proteína 7.9 identificado en los SCG (AOAC, 2005; Massaya; 2021)..

7.6.3 Rendimiento del proceso de extracción de proteína

El rendimiento de extracción de proteína de los SCG se realizó por diferencia empleando la siguiente ecuación:

$$R = \frac{H}{E} \times 100$$

Dónde: *R* es el rendimiento de extracción de proteína (%); *H* son los gramos de SCG; *E* son los gramos de proteína extraída.

7.7 Digestión *in vitro*

La digestión *in vitro* estática (Figura 7) se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del consenso internacional estandarizado INFOGEST (Brodkorb et al., 2019) con ligeras modificaciones. Este protocolo utiliza proporciones constantes de comida a líquidos digestivos y un pH constante para cada paso de la digestión. Se prepararon las soluciones para simular la concentración de electrolitos en los fluidos fisiológicos de la digestión humana, fluido salival simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS). La digestión *in vitro* se llevó a cabo por triplicado, con un blanco de enzimas digestivas (C+) y un control sin enzimas igual a la muestra a tratar: SCG tostado medio sin polifenoles. El

proceso de incubación se llevó a cabo en una incubadora a 37°C a 200 rpm (fase gástrica) y 100 rpm (fase intestinal).

7.7.1 Fase oral

Para la obtención de α -amilasa se recolectó saliva humana de un voluntario sano que no estuviera tomando antibióticos, con un ayuno de 5 horas, quien se lavó los dientes y se enjuagó la boca con agua purificada por 30 segundos, la saliva recolectada fue diluida en FSS en proporción 1:2 (Shu et al., 2018).

Se pesó 5 gramos de SCG tostado medio sin polifenoles (Sección 7.5.1.2) en tubos de 50 mL, se agregó suficiente saliva para llegar a una consistencia de pastosa similar a la pasta de tomate, se utilizaron 8 ml de saliva. Se colocó en baño de agua a 37°C durante 5 minutos.

7.7.2 Fase gástrica

Una vez finalizada la incubación de 5 minutos, se agregaron 13 ml FGS (1:1 v/v), se ajustó pH a 3 con 500 μ l de HCL 3M, se agregó 16 mg/mL de pepsina (≥ 400 unidades / mg pt.) y se colocó en agitación a 200 rpm durante 2 horas a 37°C.

7.7.3 Fase intestinal.

Al contenido de la fase gástrica se ajustó el pH a 7 con NaOH 3M, se agregó 2 mg/mL (4 \times USP) de pancreatina y 200 mg de bilis, fue colocado en una membrana tubular para diálisis de celulosa de 14 kDa (D9652, Sigma-Aldrich), basado en el método descrito por Cianciosi et al, (2020) para simular un modelo simplificado de la barrera epitelial. La membrana de diálisis con el bolo resultante de la fase gástrica fue suspendida en FIS en proporción 1:2 (v/v), se colocó en agitación durante 2 h a 37°C a 100 rpm.

El FIS resultante de la fase intestinal fue considerado como la fase bioaccesible, donde estarán suspendidas aquellas moléculas capaces de atravesar la membrana de manera pasiva con un peso <14 kDa. El bolo interior en la membrana de celulosa fue centrifugado a 10,000 rpm, durante 20 min, el líquido

decantado se recolectó como la fase no bioaccesible y la fracción sólida se recolectó como la fase no digerible, las 3 fases fueron almacenadas a -20°C.

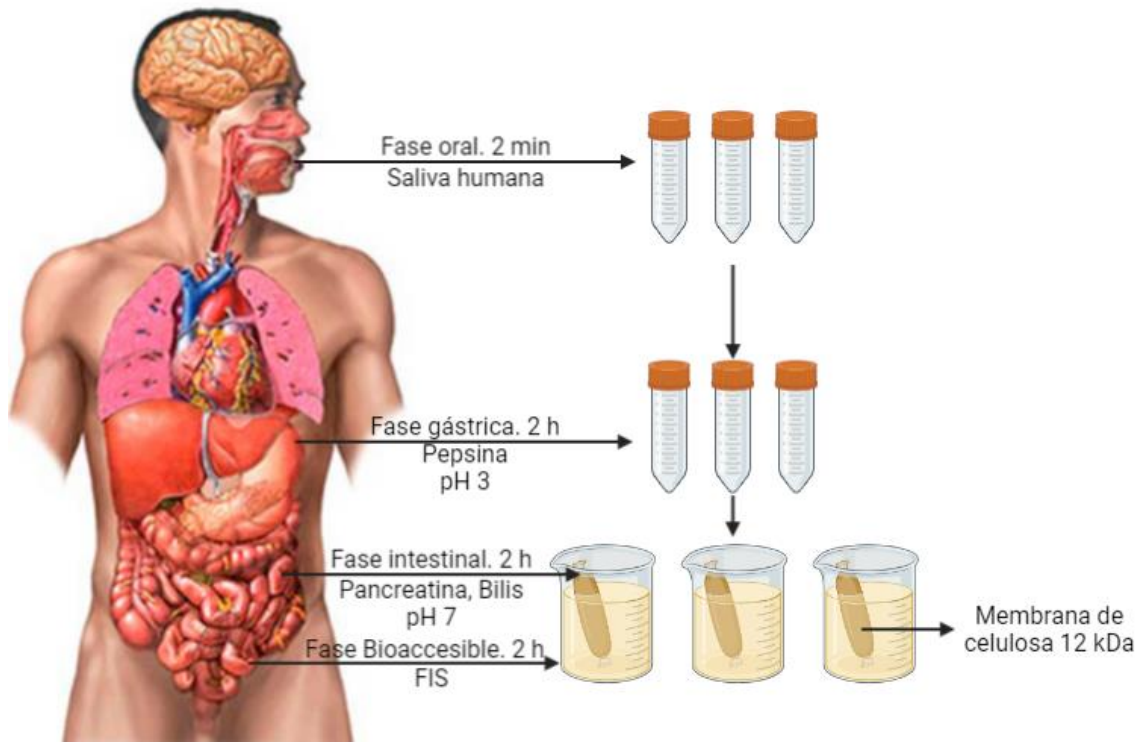


Figura 7. Proceso de simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* basado en el protocolo estandarizado INFOGEST. Se realizó la fase oral por triplicado partiendo con 5 g de SCG tostado medio, se agregó saliva humana diluida 1:2 (v/v) en FSS, se colocó a 37°C por 5 minutos, para la fase gástrica se agregó 1:1 (v/v) FGS y pepsina (16 mg/mL). Se ajustó pH a 3, se colocó a 37°C por 2 h, para la fase intestinal se colocó el bolo en una membrana de diálisis de celulosa de 14 kDa, con pancreatina y bilis a pH 7, se suspendió en FIS por 2h a 37°C.

En la tabla IV se clasifica la nomenclatura de cada fracción obtenida durante el proceso de digestión, los controles negativos, que son aquellas fracciones que fueron sometidas a digestión, pero sin la adición de enzimas gastrointestinales, se abrevian de la misma manera con la adición de C- (ND C-, NBA C-, BA C-).

Tabla IV. Clasificación de las fracciones obtenidas mediante la digestión

Fracción	Abreviación	Obtención
No digerible	ND	Fase solida al interior de la membrana de celulosa que fue recuperada después de la centrifugación. Contiene compuestos que no fueron afectados por las enzimas digestivas o aquellos compuestos insolubles.
No bioaccesible	NBA	Fase líquida solida al interior de la membrana de celulosa que fue recuperada después de la centrifugación. Contiene compuestos que sufrieron digestión por las enzimas gastrointestinales o son solubles, pero con un peso molecular mayor a 14 kDa.
Bioaccesible	BA	Fase exterior a la membrana de celulosa. Contiene aquellos compuestos que sufrieron digestión por las enzimas gastrointestinales y son solubles, con un peso moléculas ≤ 14 kDa.

Fracciones obtenidas de la digestión *in vitro* con enzimas gastrointestinales.

Es importante aclarar la utilización de conceptos como digestibilidad y bioaccesibilidad, en este caso, tomamos la definición de digestibilidad de Lawrence, et al, (2020) que representa la diferencia entre la cantidad de alimento ingerido y la cantidad de heces producidas. En este caso la fracción ND representa las heces o el desecho, ya que no ha sufrido suficiente degradación enzimática, entonces se tomó como digestibilidad a la fracción NBA y BA en conjunto. Por otro lado, la bioaccesibilidad se define como la fracción de un biocomponente ingerido que se vuelve accesible para la absorción a través del epitelio del tracto gastrointestinal (Dima et al., 2020). La fracción BA representa aquellos compuestos con un peso ≤ 14 kDa, que son capaces de atravesar el epitelio gastrointestinal de manera pasiva, por lo que se toman como compuestos accesibles para la absorción.

7.7.4. Determinación del porcentaje de proteína digerida

La determinación del contenido de proteína se realizó mediante cuantificación a 205 nm con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), a la muestra inicial sin digestión en una dilución similar a la dilución final después de la digestión (5g/51mL), al contenido de la fracción NBA (líquido recolectado posterior a la centrifugación del bolo interno de la membrana de diálisis). El

contenido de proteína de la fracción ND (la fracción sólida resultante de la centrifugación del bolo interno a la membrana) se determinó mediante diferencia. El porcentaje de proteína digerida se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$PD (\%) = 100x \frac{pt0 \times pt1}{pt0}$$

Donde:

PD es la proteína digerida; *Pt1* es el contenido proteico de la muestra después de la fase intestinal; *Pt0* es el contenido proteico de la muestra en el tiempo 0.

7.7.5 Determinación de la bioaccesibilidad de las proteínas

La cuantificación del contenido de proteína (mg/mL) se realizó a la muestra líquida al exterior de la membrana de diálisis, mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), se considera al contenido de este líquido como aquella fracción que tiene la capacidad de atravesar la barrera intestinal de manera pasiva, por lo cual se denomina “fracción bioaccesible (BA)”. El porcentaje de la BA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$FB (\%) = 100 \times \frac{Ptd \text{ (mg/mL)}}{Pti \text{ (mg/mL)}}$$

Donde: *FB (%)* es la fracción bioaccesible en porcentaje; *Ptd* es la proteína dializada; *Pti* es el contenido proteico de la muestra en el tiempo 0.

7.7.6 Electroforesis SDS-PAGE

El perfil de proteínas de las fracciones resultantes de la digestión de SCG, ND, NBA y BA se analizó mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Siguiendo el método propuesto por Laemmli (1970) con algunas modificaciones de Camacho-Espinoza et al., (2010) y Ribeiro et al., (2021). Los reactivos y soluciones se prepararon según el manual Bio-Rad Laboratories (2014). El gel utilizado, fue elaborado a un espesor de 0.75 mm, con una concentración de 4% para el gel de apilamiento y 15 % para el gel de resolución. La muestra se diluyó a 2% p/v en buffer de muestra (5.24% agua

desionizada, 1.25% Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS 10%, 2% glicerol, 0.5% β -mercaptoetanol, 0.001% azul de comassie) que fue calentada a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se cargaron 10 μ L en el gel. Como marcador de peso molecular se emplearon 10 μ L de BenchMark Protein Ladder. Las proteínas se separarán en una cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN (Bio-rad®) a 60 V hasta pasar el gel de apilamiento y posteriormente a 120 V hasta el término del gel. El gel fue teñido en solución de tinción (azul de Coomassie R-250 (0.1%), metanol 40%, ácido acético glacial 10%) durante toda la noche y agitación suave. Para la revelación de las bandas fue sumergido en solución decolorante (45% agua destilada, 5% ácido acético glacial, 50% metanol) con agitación suave hasta que desapareció la tinción. Las imágenes del gel fueron documentadas utilizando el software GelAnalyzer 19.1

7.8 Inhibición enzimática

7.8.1 α -amilasa

La inhibición enzimática de α -amilasa (EC 3.2.1.1) se realizó basada en el protocolo de Kwon et al, (2008), con ligeras modificaciones. La muestra utilizada fue la fracción BA resultante del proceso de digestión de SCG, a 250 μ L de muestra a una concentración 0.1, 0.25 y 0.5 mg/mL diluida en buffer de sodio fosfato (fosfato de sodio 20 mM con cloruro de sodio 6,7 mM, pH 6.9), se agregaron 250 μ L de α -amilasa (3U/mL) en buffer de sodio fosfato pH 6.9 y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se agregaron 250 μ L de almidón al 1% en buffer de sodio fosfato y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, se añadió 500 μ L de solución DNS (50% ácido 3-5 dinitrosalicílico 96 mM y 20% tartrato de sodio-potasio 5.3 M preparado en NaOH 2M), se llevó por 5 minutos a agua hirviendo para inhibir la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se llevó a dilución 1:1 para un volumen final de 2.5 mL. Se tomaron 200 μ L de la reacción anterior y se colocaron en una placa de 96 pocillos por triplicado, se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. Se realizó curva de acarbose bajo el mismo procedimiento, se sustituyó la muestra con acarbose a 0.1, 0.25 y 0.5 mM 0.1 mM como control

positivo, además se realizó el control negativo sustituyendo la muestra con buffer fosfato. Se agregaron 200 µL de buffer directamente a la placa como blanco.

7.8.2 α-glucosidasa

Se utilizó la misma muestra que en α-amilasa, la fracción BA resultante del proceso de digestión de SCG. A una placa de 96 pocillos se agregaron 50 µL de muestra a una concentración 0.1, 0.25 y 0.5 mg/mL en 0.1 M buffer fosfato pH 6.9 y 100 µL de α-glucosidasa (EC 3.2.1.20 a 1U/mL en 0.1 m buffer pH 6.9), se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, se agregan 50 µL de 5 mM p-nitrofenil-α-D-glucopiranosido (en buffer fosfato 0.1 M, pH 6.9), se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 405 nm, en un espectrofotómetro de microplaca PowerWave BioTek. Se realizó curva de acarbosa bajo el mismo procedimiento sustituyendo la muestra con acarbosa a 0.1, 0.25 y 0.5 mM y 0.1 mM como control positivo, además se realizó el control negativo sustituyendo la muestra con búfer fosfato. Se agregaron 200 µL de buffer fosfato 0.1M directamente a la placa como blanco.

7.8.3 Determinación del porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición tanto de α-amilasa como de α-glucosidasa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{\text{Abs control negativo} - \text{Abs de la muestra}}{\text{Abs control negativo}} \right) \times 100$$

Para determinar el porcentaje relativo de acarbosa se utiliza la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & \% \text{ relativo de acarbosa} \\ & = \% \text{ de inhibición de la muestra} \left(\frac{100\%}{\% \text{ inhibición control positivo}} \right) \end{aligned}$$

7.9 Procedimiento de análisis *in silico*

El análisis *in silico* ha sido desarrollado en este trabajo para determinar los péptidos bioactivos presentes en la proteína de café y evaluar su capacidad de unión de al receptor PPAR γ , este protocolo está basado en la información reportada por Peredo-Lovillo et al., 2022, Selvaraj et al., 2014 y Gupta et al., 2017

7.9.1 Obtención de secuencia de proteínas.

RSCB PDB Y UniProt

El Protein Data Bank (PDB) es el principal archivo global de estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas (proteínas, ADN, ARN) determinadas experimentalmente a nivel atómico con diversos centros de datos regionales en el mundo (EE.UU., Japón y Europa) que recopilan, anotan, validan y difunden datos de PDB estandarizados al público sin limitaciones de uso. El banco de datos de proteínas RCSB PDB se basa en datos de PDB para permitir la investigación en la estructura y funcionalidad de las proteínas (Rose et al., 2016).

La base de datos de UniProt consta de dos partes: una sección que contiene registros anotados de forma totalmente manual resultantes de la extracción de información bibliográfica y el análisis computacional evaluado por el curador, y una sección con registros analizados computacionalmente en espera de una anotación manual completa. En aras de la continuidad y el reconocimiento del nombre, las dos secciones se denominan 'Swiss-Prot' y 'TrEMBL'. Los datos presentes en cada proteína de UniProt son los siguientes: funciones, información específica de la enzima, dominios y sitios biológicamente relevantes, modificaciones postraduccionales, peso molecular, ubicación, expresión específica de tejido y desarrollo de la proteína, estructura secundaria, estructura cuaternaria, interacciones, productos de proteína madura, polimorfismos, similitudes con otras proteínas, uso de la proteína en un proceso biotecnológico,

enfermedades asociadas, uso de la proteína como fármaco, conflictos de secuencia, etc. (Apweiler et al., 2004).

Se identificaron las fracciones proteicas de los SCG en diversos artículos científicos y se determinó su secuencia de aminoácidos en formato FASTA mediante RCSB PDB para coffetidos (Fan et al., 2020) con el código 6JI7 <https://www.rcsb.org/structure/6JI7> y UniProt para la globulina de almacenamiento 11S (Bau et al., 2001; Ramírez et al., 2021; Ribeiro et al., 2021) con el código Q9ZNY2 <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9ZNY2>.

7.9.2. Hidrólisis *in silico*

BIOPEP-UWM

BIOPEP-UWM es una base de datos utilizada en la búsqueda de péptidos, especialmente aquellos derivados de alimentos y constituyentes dietéticos. La base de datos se utiliza para la realización de proteólisis enzimática de proteínas *in silico*. Además, brinda la información sobre la potencial bioactividad de los péptidos para el tratamiento y prevención de enfermedades (Minkiewicz et al., 2019).

Se obtuvo la secuencia FASTA de la fracción proteica presente en los SCG (Sección 7.9.1) y se sometió a hidrólisis *in silico* en el programa BIOPEP-UWM, tomando en cuenta la acción de las enzimas pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) y quimiotripsina (EC 3.4.21.1).

Posterior a la hidrólisis, se determinarán los péptidos con una longitud de 2 a 5 aminoácidos y se evaluará su afinidad con el receptor PPAR γ mediante el programa HPEPDOCK.

7.9.3 Determinación de afinidad ligando-receptor

HPEPDOCK SERVER

Debido a que alrededor del 40% de las interacciones proteicas son mediados por péptidos cortos, el conocimiento sobre la energía de unión que presentan oligopéptidos hacia diferentes receptores es importante para el entendimiento de procesos fisiológicos de interés (Petsalaki & Russell, 2008). HPEPDOCK es una herramienta bioinformática ampliamente utilizada el cual mide de una manera confiable la afinidad que presentan péptidos pequeños con proteínas, tomando en consideración factores fisicoquímicos que podrían interferir con la interacción péptido-proteína (Zhou et al., 2018).

HPEPDOCK server se utilizó en el presente proyecto con el propósito de medir el grado de energía de afinidad que presentan los péptidos seleccionados en regiones del receptor nuclear PPAR γ que se ha visto involucrada en la modulación y/o antagonismo del proceso adipogénico.

Péptidos con valores de vinculación por debajo de -160 kcal/mol se convirtieron a formatos SMILES (Simplified molecular-input line-entry system, por sus siglas en inglés) y se modelaron utilizando los programas Dendrimer Builder y Avogrado, respectivamente.

7.9.4 Determinación de bioactividad predictiva y actividad biológica de los péptidos presentes en SCG

Peptide Ranker

PeptideRanker predice la probabilidad (entre 0 y 1) de que un péptido sea bioactivo. Cuanto más cerca esté la probabilidad predicha de 1, más seguro se está de que el péptido es bioactivo. Se entrenó en un umbral de 0,5, es decir, cualquier péptido predicho por encima de un umbral de 0,5 se etiquetó como bioactivo (Mooney et al., 2012).

BIOPEP-UWM

BIOPEP-UWM brinda la información sobre la potencial bioactividad de los péptidos. Actualmente en BIOPEP-UWM se han recopilado datos de 659 proteínas y 1968 péptidos con 37 tipos de bioactividades. BIOPEP-UWM fue utilizado para determinar los potenciales péptidos bioactivos. Se realizó mediante los siguientes criterios: el perfil de actividad biológica potencial de la proteína definida como el tipo y ubicación del fragmento bioactivo en una cadena proteica; la frecuencia de aparición del fragmento bioactivo en una cadena proteica; y la actividad biológica potencial de la proteína (Minkiewicz et al., 2019)

7.9.5 Determinación de energía de unión y puntos de vinculación ligando – receptor

PyRx

PyRx es un software de detección virtual para el descubrimiento de fármacos y compuestos que se pueden utilizar frente a posibles dianas farmacológicas, un asistente de acoplamiento con una interfaz fácil de usar. PyRx incluye una gran cantidad de software de código abierto, para el caso de este proyecto se utilizó el software Autodock 4 que viene incluido en PyRx (Dallakyan y Olson, 2015).

Autodock 4 es un programa informático que se utiliza para conocer la interacción ligando-receptor y para el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Este programa se basa en las diferentes conformaciones que puede tomar el ligando, los sitios y la energía de unión que este presenta en el receptor (Forli et al., 2016).

Autodock 4 se utilizó para realizar el acoplamiento molecular de los péptidos resultantes con una afinidad <-160 kcal/mol y el receptor nuclear PPAR γ . El programa PyRx realiza las modificaciones conformacionales necesarias en la molécula al convertirla en formato de Autodock 4, donde se agregan átomos de hidrógeno y cargas de Kollman al receptor PPAR γ , mientras que, al ligando se agregan cargas de Gasteiger. Posterior a las modificaciones fisicoquímicas, se realizó el acoplamiento entre ambas moléculas. Para realizar el acoplamiento en

el sitio activo de la proteína se utilizó un tamaño de caja con una zona de interacción centrada a 8.4325 x 40 x 60 y con dimensiones de X= 60, Y=40 y Z= 60, que cubre los residuos del sitio activo del receptor CYS285, MET364, ILE264, ARG288, SER289, ILE281 y LEU 330 (Figura 8) (Selvarja, Kalimurthi y Thirugnanasambandam, 2014; Aranaz et al., 2019 y Brusotti et al., 2017). Finalmente se observaron los puntos de uniones intermoleculares y sus energías de unión ligando-receptor.

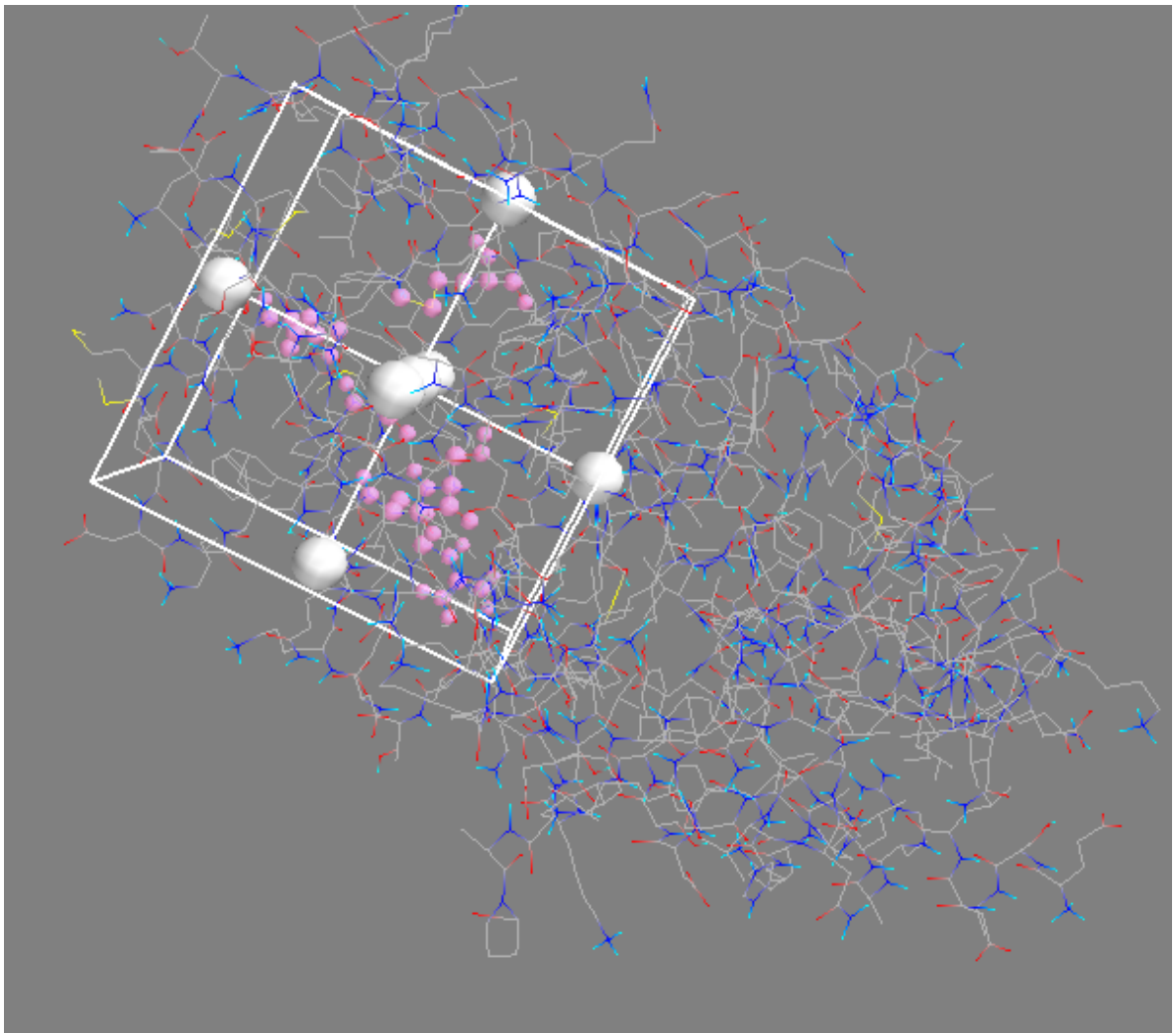


Figura 8. Sitio activo del receptor PPAR γ . PyRx <https://pyrx.sourceforge.io/>

Discovery Studio Visualizer

Discovery Studio es un paquete de software completo para analizar y modelar estructuras moleculares, secuencias y otros datos. El producto incluye funcionalidad para ver y editar datos junto con herramientas para realizar análisis de datos básicos. Está diseñado para ofrecer un entorno interactivo para ver y editar estructuras moleculares, secuencias, datos de reflexión de rayos X, etc. proporciona un amplio conjunto de visores para mostrar representaciones gráficas de datos (Dassault Systèmes BIOVIA, 2020).

Una vez realizado el acoplamiento molecular en PyRx, se guardan las moléculas resultantes (tanto el receptor como los ligandos) en formato PDB, posteriormente se utiliza Discovery Studio para analizar las uniones intermoleculares el ligando y el receptor. Se evalúa los puntos de unión a los residuos del receptor y los enlaces de hidrógeno.

7.9.6 Análisis *in silico* de la absorción, digestión, metabolismo y excreción de péptidos con energía de unión

ADME

El programa SwissADME es un programa diseñado para estimar parámetros o propiedades de la farmacocinética de compuestos similares a fármacos a partir de sus estructuras moleculares llamado ADME que se refiere a Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción / Eliminación y Toxicidad. Este programa sirve para analizar la bioactividad y toxicidad ya sea de fármacos o diversos compuestos.

La utilización de estos parámetros en el presente estudio es de gran importancia para analizar la distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de los péptidos a evaluar y verificar su posible absorción y bioactividad.

Los péptidos con afinidad de unión al receptor fueron evaluados para determinar sus características ADME mediante los parámetros presentes en la tabla V.

A pesar de la posible bioactividad que tengan los péptidos, es necesario demostrar la capacidad de llegar al sitio de unión, mediante los parámetros de absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Tabla V. Parámetros de ADMET y sus rangos aceptables

Nombre de la propiedad	Notación	Rango predeterminado
MW	Peso molecular	50 – 500
WLOGP	Coefficiente de reparto octanol / agua	-2.3 – 6.8
TPSA	Área de superficie polar topológica	20 – 140
HBA	Número de aceptores de enlaces de H	0 – 10
HBD	Número de donadores de enlaces de H	0 – 5
RB	Enlaces rotativos	0 – 5
Átomos pesados	Número de átomos pesados	15 – 50
logP	Lipofilia del compuesto	-0.7 – 5.0
MR	Reactividad molar	40 – 130

Para evaluar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos se utiliza el formato SMILES, se ingresa al programa SwissADME (<http://swissadme.ch/>) (Isyaku et al., 2020)

El análisis de las características del compuesto en el programa SwissADME consta de 7 secciones: Propiedades fisicoquímicas, lipofilia, solubilidad del agua, farmacocinética, semejanza de fármacos, química medicinal, salida gráfica que muestra la absorción gastrointestinal y el acceso al cerebro (BOILED-Egg) (Daina et al., 2017).

El programa cuenta con una gráfica en forma de huevo cocido de donde proviene el nombre de BOILED-Egg, que utiliza dos parámetros predecir simultáneamente dos parámetros clave de ADME, es decir, la absorción gastrointestinal pasiva (HIA) y el acceso al cerebro (BBB). Se basa únicamente en dos descriptores fisicoquímicos (WLOGP y TPSA, para lipofilicidad y polaridad aparente) e incluye la yema (el espacio fisicoquímico para la permeación altamente probable de BBB) y la clara (el espacio fisicoquímico para la absorción altamente probable de HIA), además, se obtiene en el mismo gráfico una evaluación global sobre la absorción pasiva (dentro/fuera de la clara), el acceso pasivo al cerebro (dentro/fuera de la yema) y el eflujo activo desde el SNC o hacia la luz gastrointestinal. (Daina et al., 2017).

7.10 Ética y bioseguridad

El proyecto de investigación se apegó a las condiciones y lineamientos de los laboratorios de la unidad de alimentos funcionales establecidos por el Comité Institucional de Bioseguridad del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) y por el Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud (COBICIS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

8. Resultados

8.1. Análisis proximal

El proceso de determinación de los compuestos de los SCG mediante análisis proximal se realizó bajo los criterios de la AOAC, a partir de SCG molido y cernido a 500 μm , la muestra presenta un contenido de humedad de 26.3%, cenizas 1.1%, lípidos 6.8%, fibra 29, carbohidratos 26% y proteínas 10%.

Tabla VI. Resultados del análisis proximal en SCG (media \pm DS)

Componente	Contenido (%)
Humedad	26.30 \pm 0.28
Cenizas	1.15 \pm 0.01
Lípidos	6.80 \pm 0.45
Fibra	29.17 \pm 0.42
Proteína	10.25 \pm 0.15
Carbohidratos	26.47 \pm 0.34

Resultados en base seca. Humedad, fibra, proteína n=3, cenizas, lípidos y carbohidratos n=2.

8.2 Rendimiento del proceso de extracción de proteína

Durante el proceso de extracción de proteína se realizó la solubilización de las proteínas en un medio alcalino para la posterior precipitación en un medio ácido (apartado 7.7.1). Se utilizaron diferentes pH en la fase ácida para evaluar en cual existía un mayor rendimiento, en donde se compararon los pesos del concentrado proteico recuperado, los resultados se muestran en la tabla VII, en este caso, el pH 4.5 fue el que mejor rendimiento obtuvo por lo que se decidió trabajar con ese pH para el protocolo final.

Tabla VII. Rendimiento del proceso de extracción de proteína bajo diferentes pH.

pH	Rendimiento (%)
4.0	0.86
4.5	1.46
5.0	0.90
5.5	0.68
6.0	0.95
6.5	0.76
7.0	0.95

n=1.

En la tabla VIII podemos ver los resultados de la fórmula para determinar el rendimiento del proceso de extracción de proteína en donde el rendimiento de proteína, es decir, el porcentaje de concentrado proteico recuperado durante el proceso de extracción fue de 1.3%, mientras que la concentración de proteína de la fracción extraída es de 21%.

Tabla VIII. Rendimiento del proceso de extracción de proteína

	(%)
Rendimiento	1.3
Contenido de proteína	21

Contenido de proteína cuantificado con el método Dumas.

8.3 Digestión *in vitro*

8.3.1 Determinación de digestibilidad proteica *in vitro*

En la tabla IX se muestran los resultados de la digestibilidad proteica de los residuos de café mediante el proceso de digestión *in vitro*, en este caso, debido a que las fracciones NBA y BA se cuantificaron por separado, se sumaron los resultados de la cuantificación de cada fracción para obtener la fracción digerible,

es decir, aquella fracción de los residuos de café en la que existió acción de las enzimas proteolíticas capaz de liberar proteínas solubles, mientras que para la fracción ND se determinaron los resultados mediante diferencia. Los resultados se compararon con la muestra ND (C-). Los porcentajes de digestibilidad de SCG están ajustados con el blanco de enzimas (2.94 mg/mL de proteína). Se muestra que la digestibilidad proteica de los residuos de café es de 17.09%, mientras que, en el caso del control negativo, existió un porcentaje de digestión de 4.19%.

Tabla IX. Porcentaje de digestibilidad proteica *in vitro* de SCG tostado medio (Media \pm DE).

Muestra	Proteína cuantificada* (mg/mL)			Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> (%)
	Inicial sin digestión	Fracción ND	Fracción NBA + BA	
SCG (C-)	10.035 \pm 0.14	9.606 \pm 0.09	0.429 \pm 0.09	4.19
SCG		8.28 \pm 0.24	1.75 \pm 0.24	17.09

SCG (C-): residuo de café sometido a digestión *in vitro* sin enzimas. SCG: residuo de café sometido a digestión *in vitro* con saliva humana, pepsina, pancreatina y bilis. ND: no digerible, NBA: no bioaccesible, BA: bioaccesible. *Cuantificación de proteínas realizado mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a absorbancia de 205 nm. n=3

8.3.2 Bioaccesibilidad de la proteína de las muestras digeridas.

En la tabla X se muestra el porcentaje de bioaccesibilidad de los péptidos de residuo de café después de ser sometido a digestión gastrointestinal *in vitro* y dializado mediante membrana de celulosa (< 14 kDa). Se utilizó la muestra de residuo de café de tostado medio control negativo para comparar. Los porcentajes de digestibilidad de SCG están ajustados con el blanco de enzimas (0.4680 mg/mL de proteína). En este caso, el porcentaje de digestibilidad de la muestra analizada demostró un porcentaje de 5.48%, mientras que en la muestra de control negativo se presentó un porcentaje de digestibilidad de 2.81%.

Tabla X. Porcentaje de bioaccesibilidad de residuos de café tostado medio.
(Media \pm DE).

Muestra	Proteína cuantificada* (mg/mL)		Bioaccesibilidad proteica <i>in vitro</i> (%)
	Inicial sin digestión	Fracción BA	
SCG (C-)	10.035 \pm 0.14	0.282 \pm 0.02	2.81
SCG		0.550 \pm 0.06	5.48

SCG (C-): residuo de café sometido a digestión *in vitro* sin enzimas. SCG: residuo de café sometido a digestión *in vitro* con saliva humana, pepsina, pancreatina y bilis. BA: Fracción bioaccesible. *Cuantificación de proteínas realizado mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a absorbancia de 205 nm. n=3

8.3.3 Electroforesis SDS-Page

Se realizó electroforesis SDS-page utilizando el marcador molecular BenchMarck con pesos moleculares de 10 a 220 kDa. En la figura 8 y 9 se muestra el perfil electroforético por peso molecular de cada fracción digerida de SCG. Se utilizó fracción ND C- para determinar la acción digestiva de las enzimas. Esta muestra no contiene enzimas gastrointestinales, por lo que no debe existir digestión. También se evaluó la fracción NBA y BA. Solamente la fracción ND mostró dos bandas, con un peso molecular de 160 kDa y otra tenue de 10 kDa identificada con el programa GelAnalyzer (Tabla XI, Imagen 9), esto demuestra que en la fracción ND existe un grado de digestión en comparación con la fracción ND C-. La banda identificada corresponde a la fracción de proteína que fue liberada por las enzimas proteolíticas, mientras que en la fracción NBA y BA no se distinguen bandas (Imagen 10).

Tabla XI. Peso molecular (kDa) de las proteínas identificadas mediante SDS-Page en la fracción ND de SCG.

SCG ND		
Banda	Rf ^a	Peso molecular (kDa)
1	0.053	160
2	0.979	10

^a Se define como la distancia (mm) de migración de la proteína a través del gel dividida por la distancia de migración del frente del colorante. La distancia debe medirse desde la parte superior del gel de resolución hasta la banda de interés

ND: No digerible

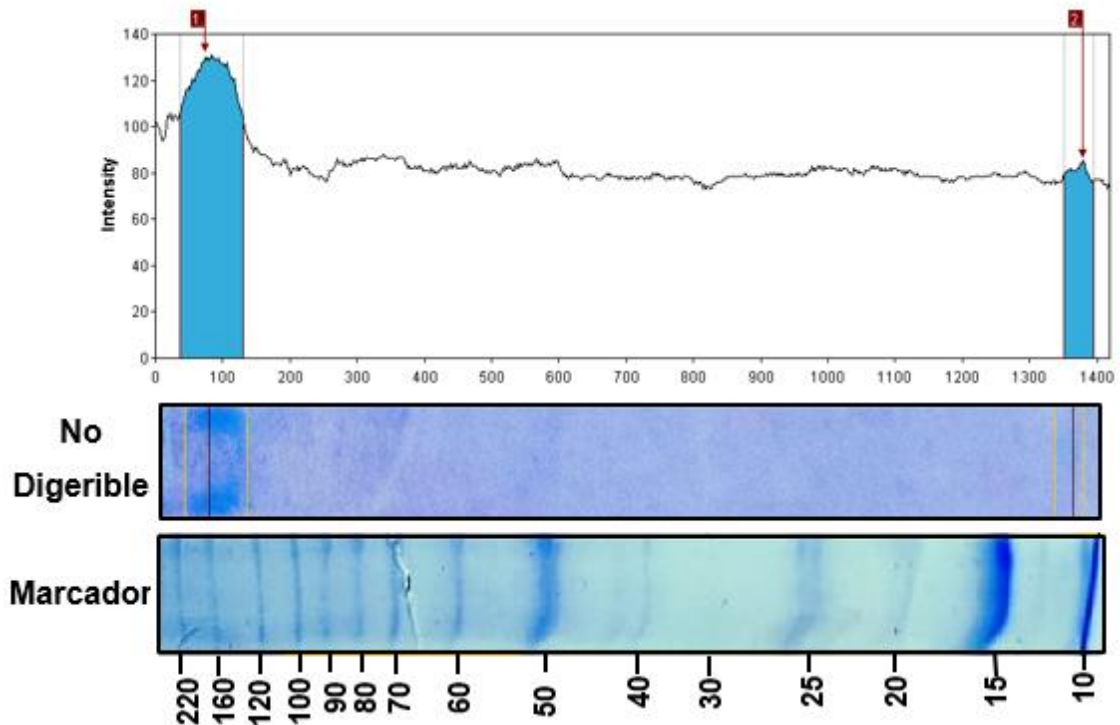


Figura 9. Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 19.1 en el perfil electroforético de la fracción ND de SCG.

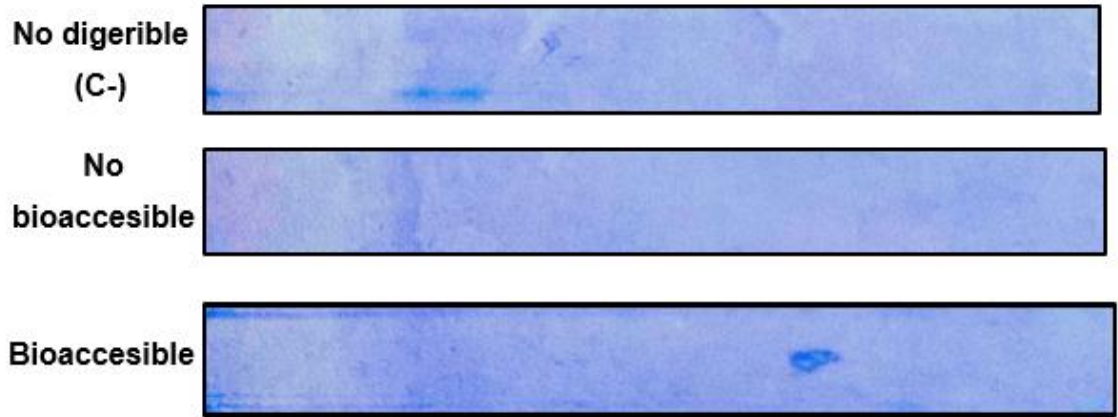


Figura 10. Perfil electroforético de las fracciones ND C-, NBA y BA de SCG.

8.4 Inhibición enzimática

8.4.1 α -amilasa

Se realizó la inhibición de la enzima α -amilasa utilizando la muestra de la fracción bioaccesible resultante de la digestión de SCG, a concentraciones de 0.1, 0.25 y 0.5 mg/mL. La capacidad de inhibición de la muestra se comparó con el de la acarbosa, un oligosacárido capaz de inhibir la α -amilasa (McIver et al., 2022). Los resultados del porcentaje de inhibición se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. Porcentaje de inhibición de α -amilasa del SCG tostado medio (Media \pm DE)

Muestra	Concentración (mg/mL)	% inhibición	%RACB
Fracción BA.	0.1	-	-
	0.25	-	-
	0.5	52.59 \pm 1.20	77.76 \pm 1.78
Acarbosa (mM)	100	67.6 \pm 0.31	-

BA: fracción bioaccesible, RACB: porcentaje relativo de acarbosa. n=3

8.4.2 α -glucosidasa

La inhibición de la enzima α -glucosidasa se realizó utilizando la fracción bioaccesible de SCG, a una concentración inicial de 5 mg/mL que, una vez realizada la dilución de la reacción pasa a 1.25 mg/mL. Los resultados del porcentaje de inhibición se muestran en la tabla XI, en el caso de α -glucosidasa, se puede ver que la fracción BA de residuos de café presenta un porcentaje de inhibición 58% con un porcentaje relativo de acarbosa de 91%, esto da indicios de la capacidad inhibitoria de la fracción BA de SCG sobre α -glucosidasa.

Tabla XIII. Porcentaje de inhibición de α -glucosidasa del SCG tostado medio.

Muestra	Concentración (mg/mL)	% inhibición	%RACB
Fracción BA	1.25	57.56 \pm 5.9	91.19 \pm 9.4
Acarbosa (mM)	100	93.12	-

RACB: porcentaje relativo de acarbosa. n=1

8.5 Análisis *in silico*

8.5.1 Proteólisis *in silico*

Se identificaron diferentes fracciones proteicas en los SCG, la globulina de almacenamiento 11S (Ramírez et al., 2021; Ribeiro et al., 2021) y cofétidos (Fan et al., 2020), mientras que en el estudio de Valdés et al, (2020) se analizaron diferentes péptidos libres, de los cuales, se seleccionaron para este estudio aquellos que tuvieran una longitud de 2 a 5 aminoácidos. La secuencia FASTA de la fracción proteica G11S se obtuvo del programa UniProt con el código QZNY2-1.

Se realizó la proteólisis *in silico* en el programa BIOPEP-UWM utilizando la secuencia FASTA de las fracciones proteicas identificadas, se seleccionaron las enzimas pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) y quimiotripsina (EC 3.4.21.1). Se identificó la proteína de mayor similitud a las reportadas en el café y se encontró la G11S de avena, la cual se sometió a proteólisis *in silico* con las

mismas enzimas para identificar la similitud entre las digestiones de ambas fracciones proteicas, los resultados se muestran en la tabla XIV. La G11S de los SCG mostró una hidrólisis de 37%, valor similar a la G11S de avena, con al menos 16 péptidos similares entre ambas fuentes. Los péptidos identificados en el estudio de Valdes et al., (2020) no se sometieron a hidrólisis *in silico* ya que, en el estudio se obtuvieron mediante una hidrólisis *in vitro* de la proteína de café..

Tabla XIV. Péptidos liberados por el proceso de hidrólisis *in silico* en el programa BIOPEP-UWM

Fracción proteica	Fracción hidrolizada	Péptidos de 2 a 5 aminoácidos	% de hidrólisis
G11S	M – AH – SH – M – ISL – SL – Y – VL – L – F – L – GCL – AQL – GR – PQPR – L – R – GK – TQCIDIQK – L – N – AQEPSF – R – F – PSEAGL – TEF – W – DSN – N – PEF – GCAGVEF – ER – N – TVQPK – GL – R – L – PH – Y – SN – VPK – F – VY – VVEGTGVQGTVIPGCAETF – ESQGESF – W – GGQECPGK – GQEGQEQGSK – GGQEGR – R – QR – F – PDR – H – QK – L – R – R – F – QK – GDVL – IL – L – PGF – TQW – TY – N – DGDVPL – VTVAL – L – DVAN – EAN – QL – DL – QSR – K – F – F – L – AGN – PQQGGGK – EGH – QGQQQQH – R – N – IF – SGF – DDQL – L – ADAF – N – VDL – K – IIQK – L – K – GPK – DQR – GSTVR – AEK – L – QL – F – L – PEY – SEQVQQPQQQEQQQH – GVGR – GW – R – SN – GL – EETL – CTVK – L – SEN – IGL – PQEADV – N – PR – AGR – ITTVN – SQK – IPIL – SSL – QL – SAER – GF – L – Y – SN – AIF – APH – W – N – IN – AH – N – AL – Y – VIR – GN – AR – IQVVDH – K – GN – K – VF – DDEVK – QGQL – IIVPQY – F – AVIK – K – AGN – QGF – EY – VAF – K – TN – DN – AM – IN – PL – VGR – L – SAF – R – AIPEEVL – R – SSF – QISSEAEEL – K – Y – GR – QER – L – L – L – SEQSQQGK – K – R – SCL – S	AH – SH – ISL – SL – VL – GCL – AQL – GR – PQPR – GK – TEF – DSN – PEF – ER – GL – PH – SN – VPK – VY – QR – PDR – QK – GDVL – IL – PGF – TQW – TY – VTVAL – DVAN – EAN – QL – DL – QSR – AGN – EGH – IF – SGF – DDQL – ADAF – VDL – IIQK – GPK – DQR – GSTVR – AEK – PEY – GVGR – GW – EETL – CTVK – SEN – IGL – PR – AGR – ITTVN – SQK – IPIL – SSL – SAER – GF – AIF – APH – IN – AL – VIR – GN – AR – VF – DDEVK – QGQL – AVIK – QGF – EY – VAF – TN – DN – AM – PL – VGR – SAF – QER – SCL	37
Coffetidos	EGECSPL – GEPCAGN – PW – GCCPGCICIW – QL – TDR – CVGN – C	PW – TDR – CVGN	20
Péptidos libres	DPGDK – K – N – SSSDPAQ – CASDPAQ – AWAH – GW – AEGR – RLNQ – VTY – DY – Y – QN – R – N – SGL – L – N – Q – EAN – L – DVVAH – E – AATY – DY – Y – N – Q – CSDAVGVK – R – CPQGGTH – Y – G – N – F – DAVGVQ – CASAPH – W – WLPFP – W – L – PF – P – YWRYDCQ – YGP – QT – RMYRY – GMCC – YSR – YQH	DPGDK – AWAH – AEGR – RLNQ – VTY – DY – QN – SGL – DVVAH – AATY – PF – YGP – QT – RMYRY – GMCC – YSR – YQH	-

Tabla XIV. Continuación

<p>G11S avena</p>	<p>M – ATTSF – PSM – L – F – Y – F – CIF – L – L – F – H – GSM – AQL – F – GQSSTPW – QSSR – QGGL – R – GCR – F – DR – L – QAF – EPL – R – QVR – SQAGITEY – F – DEQN – EQF – R – CTGVSVIR – R – VIEPQGL – VL – PQY – H – N – APAL – VY – IL – QGR – GF – TGL – TF – PGCPATF – QQQF – QPF – DQSQF – AQGQR – QSQTIK – DEH – QR – VQR – F – K – QGDVVAL – PAGIVH – W – CY – N – DGDPIVAIY – VF – DVN – N – N – AN – QL – EPR – QK – EF – L – L – AGN – N – K – R – EQQSGN – N – IF – SGL – SVQL – L – SEAL – GISQQAQR – IQSQN – DQR – GEIIR – VSQGL – QF – L – K – PIVSQQVPGEQQVY – QPIQTQEGQATQY – QVGGSTQY – QVGK – STPY – QGGQSSQY – QAGQSW – DQSF – N – GL – EEN – F – CSL – EAR – K – N – IEN – PQH – ADTY – N – PR – AGR – ITR – L – N – SK – N – F – PIL – N – IVQM – SATR – VN – L – Y – QN – AIL – SPF – W – N – IN – AH – SVIY – M – IQGH – AR – VQVVN – N – N – GQTVF – N – DIL – R – R – GQL – L – IVPQH – F – VVL – K – K – AER – EGCQY – ISF – K – TN – PN – SM – VSH – IAGK – SSIL – R – AL – PIDVL – AN – AY – R – ISR – QEAR – N – L – K – N – N – R – GEEF – GAF – TPK – L – TQK – GF – QSY – QDIEEGSSSPVR – ASE</p>	<p>ATTSF – PSM – GSM – AQL – QSSR – QGGL – GCR – DR – QAF – EPL – QVR – DEQN – EQF – VL – PQY – APAL – VY – IL – QGR – GF – TGL – TF – QQQF – QPF – DQSQF – AQGQR – DEH – QR – VQR – CY – VF – DVN – AN – QL – EPR – QK – EF AGN – IF – SGL – SVQL – SEAL – IQSQN – DQR – GEIIR – VSQGL – QF – QVGK – STPY – DQSF – GL – EEN – CSL – EAR – IEN – PQH – ADTY – PR – AGR – ITR – SK – PIL – IVQM – SATR – VN – QN – AIL – SPF – IN – AH – SVIY – IQGH – AR – VQVVN – GQTVF – DIL – GQL – IVPQH – VVL – AER – EGCQY – ISF – TN – PN – SM – VSH – IAGK – SSIL – AL – PIDVL – AN – AY – ISR – QEAR – GEEF – GAF – TPK – TQK – GF – QSY – ASE</p>	<p>35</p>
-----------------------	--	---	-----------

Péptidos resultantes de la proteólisis *in silico* en el programa BIOPEP-UWM <https://biochemia.uwm.edu.pl/BIOPEP-UWM-uwm/> (Minkiewicz et al., 2019).

G11S: globulina de almacenamiento 11S.

G11S avena código BIOPEP-UWM: 1464

8.5.2 Bioactividad predictiva y actividad biológica de los péptidos de residuos de café

Péptidos con afinidad de unión al receptor fueron evaluados en PeptideRanker para determinar su bioactividad predictiva, la cual se mide de 0 a 1 donde, entre más cercano a 1 es mayor su posible bioactividad (Mooney et al., 2012), en los péptidos con afinidad al receptor, el 53% presentan una bioactividad predictiva >0.5 donde el péptido IF, presenta un valor más alto con 0.94. En las bases de datos del programa BIOPEP-UWM-UWM se encuentran los péptidos con actividades biológicas reportadas, los péptidos con afinidad de unión se analizaron en el programa BIOPEP-UWM-UWM para determinar su actividad biológica, donde presentan actividad inhibitoria de ECA (87%), dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) (80%), dipeptidil peptidasa III (DPPIII) (13%) y actividad antioxidante (20%) (Tabla XV). Estos datos nos dan indicios de la capacidad de estos péptidos de unirse a diversos receptores y presentar actividad biológica, con lo que, además de ser inhibidores de PPAR γ , tienen múltiples actividades biológicas.

Tabla XV. Bioactividad predictiva y actividad biológica de los péptidos de SCG

Fracción proteica	Péptido	Bioactividad predictiva	Actividad biológica
G11S	AIF	0.833341	Inhibidor ECA
	APH	0.478155	Inhibidor ECA y DPPIV
	CTVK	0.100588	Inhibidor ECA y DPPIV
	IF	0.949173	Inhibidor ECA
	IPIL	0.616422	Inhibidor ECA y DPPIV
	ITTVN	0.039878	Inhibidor ECA y DPPIV
	PQPR	0.696461	Inhibidor ECA, DPPIV y DPPIII
	TQW	0.559611	Inhibidor ECA y DPPIV
	VAF	0.559611	Inhibidor ECA
	VTVAL	0.064768	Inhibidor DPPIV
Péptidos libres	AWAH	0.687287	Inhibidor ECA y DPPIV
	DVVAH	0.075941	Inhibidor ECA y DPPIV, Antioxidante
	AATY	0.177341	Inhibidor ECA y DPPIV, Antioxidante
	RMYRY	0.603995	Inhibidor ECA y DPPIV, Antioxidante
	YQH	0.208106	Inhibidor DPPIV

Bioactividad medida de 0 a 1 siendo 1 la mayor bioactividad, medido en Peptide Ranker http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/help/peptideranker/help.php (Mooney et al., 2012).

8.5.3 Afinidad *in silico*

Se identificó el PPAR γ en el programa RCSB PDB con el código 3v9v al cual se le eliminó el ligando y se modeló en CHIMERA. Una vez modelada la proteína, se evaluó la energía de unión de los péptidos de 2 a 5 aminoácidos con los residuos CYS285, MET364, PHE264, ARG288, SER289 e ILE281 de PPAR γ , en el programa HPEPDOCK. En la tabla XVI se muestran los péptidos con una alta afinidad al receptor (< -160 kcal/mol), el 13% de los péptidos de la G11S y el 29% de los péptidos libres muestran alta afinidad con el receptor, por otro lado, no se demostró afinidad con los péptidos de cofetidos, por lo que quedaron descartados para el resto de los análisis. Utilizaron como controles, antagonistas de PPAR γ , GW9662 (Sargent et al., 2004) y G3335 (Ye et al., 2006) que fueron analizados bajo las mismas condiciones, mostrando una afinidad de -155.28 y -188.84 kcal/mol respectivamente, estos datos reafirman que valores de afinidad de los péptidos de SCG cercanos a los de los antagonistas pueden ser indicadores de la posible capacidad de unión al receptor.

Tabla XVI. Secuencias de péptidos con afinidad *in silico* al sitio activo de PPAR γ en HPEPDOCK

Fracción proteica	Péptidos con afinidad de unión a PPAR γ (Kcal/mol)	Frecuencia de péptidos con afinidad de unión a PPAR γ
G11S	PQPR (-178.24) – TQW (-164.76) – VTVAL (-166.18) – IF (-160.74) – CTVK (-168.01) – ITTVN (-186.09) – IPIL (-177.8) – VAF (-160.73) – AIF (-182.18) – PEY (-166.98).	13%
Cofetidos	-	0%
Péptidos libres	AWAH (-205.00) – DVVAH (-173.09) – AATY (-165.26) – RMYRY (-194.77) – YQH (-166.95)	29%
Controles	GW9662 (-155.28) G3335 (-188.84)	-

Péptidos con afinidad < -160 kcal/mol a los residuos CYS285, MET364, PHE264, ARG288, SER289 e ILE281 del sitio activo del receptor PPAR γ en HPEPDOCK <http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/> (Zhou et al., 2018).

8.5.4 Energía de unión y puntos de vinculación de los péptidos de residuos de café con PPAR γ

Se realizó la medición de la energía de unión de los péptidos a los residuos activos del receptor mediante Autodock wizard en el programa PyRx, se utilizó un tamaño de caja que pudiera cubrir el sitio activo del receptor con una zona de interacción centrada a $8.4325 \times 40 \times 60$ y con dimensiones de $X=60$, $Y=40$ y $Z=60$. En la tabla XVII se presentan los péptidos con una energía de unión < -4.8 kcal/mol y la energía de unión entre el receptor y los antagonistas. En total, 10 péptidos muestran una energía de unión menor a -4.8 kcal/mol (tabla XV), donde DVVAH y YQH muestran la menor energía de unión con -7.8 y -7.9 kcal/mol respectivamente. Los residuos de aminoácidos con formación de puentes de hidrógeno a los péptidos son CYS285, MET364, ILE281, ILE341 y LEU330.

Tabla XVII. Energía de unión y puntos de vinculación de los péptidos al receptor PPAR γ

Fracción proteica	Péptido	Energía de unión	Puntos de vinculación
G11S	AIF	-5.26	ALA: CYS285, PHE 236, PHE 363. ILE: CYS285, LEU330, MET364, LYS367 PHE: ILE341, LEU340, CYS285, ARG288.
	APH	-5.26	ALA: ARG288, PRO: ILE281, ILE341, MET348, HIS: MET364, LYS367,
	IF	-5.37	ILE: HIS323, HIS449, TYR473, LEU469, PHE282, PHE363. PHE: CYS285, SER289, MET364, LEU330, LYS367.
	IPIL	-6.32	ILE1: LEU330, ARG288, ILE341, LYS367. PRO: CYS285, VAL339, LEU330. ILE2: CYS285, LYS367, HIS449, PHE363. LEU: GLY284.
	PQPR	-4.96	PRO1: SER342, CYS285, ILE341 ARG: CYS285, LEU330, LYS367, PRO2: ILE341
	TQW	-5.31	THR: ARG280, GLY284, TRP: CYS285, ARG288, LEU330, ILE326, GLN: GLY285.
	VAF	-5.28	VAL: GLY284. ALA: ILE281, ILE341, MET348 PHE: MET364, CYS285, LEU353, LYS367.
Péptidos libres	AWAH	-5.32	ALA1: LEU330, MET334, VAL339, TRP: ARG288, LEU228, LEU333, GLU343, ALA2: CYS285, ILE341, HIS: SER342, ILE262, ARG280.
	DVVAH	-7.80	ASP: GLY284, ARG280, VAL1: SER342, ARG280, ARG288, ILE264, VAL2: SER342, ARG288, ALA: CYS285, VAL339, ILE341, MET348, HIS: CYS285, L330, VAL339
	YQH	-7.90	TYR: TYR473, LYS367, CYS285, PHE363. GLN: ARG288, CYS285, HIS: CYS285, GLY284, ARG288, ILE341.
Antagonistas de PPARγ	GW9662	-7.86	ILE326, CYS285, LEU330, MET364, LYS367, SER289, TYR473, LYS367.
	G3335	-4.92	CYS285, SER342, MET364, ILE281, VAL339, LEU353, LYS367.

Energía de unión determinada en Autodock Wizard en el programa PyRx <https://pyrx.sourceforge.io/> (Dallakyan y Olson., 2014).

Los péptidos DVVAH (-7.80 kcal/mol) y YQH (-7.90 kcal/mol) presentan energía de unión similar al antagonista GW9662 (-7.86 kcal/mol) donde CYS285 es el único residuo que forma puentes de hidrógeno con las 3 moléculas (Figura 10), a pesar de la similitud en cuanto a la energía de unión de estas moléculas, presentan puntos de unión diferentes al receptor, al analizarlas de manera

sobrepuesta se puede evidenciar que presentan puntos de unión intermoleculares diferentes entre sí (Figura 11).

Los puentes de hidrógeno son los enlaces involucrados en las interacciones intermoleculares que determina la estabilidad del complejo ligando - receptor. El péptido YQH realiza puentes de hidrógeno con TYR al residuo de aminoácido TYR473, GLN a CYS285 y ARG288, e HIS a CYS285; en el caso del péptido DVVAH, muestra puentes de hidrógeno con ALA a CYS285 y VAL a SER342, mientras que el antagonista GW9662 genero puentes de hidrógeno con SER289 y TYR473 (Figura 11).

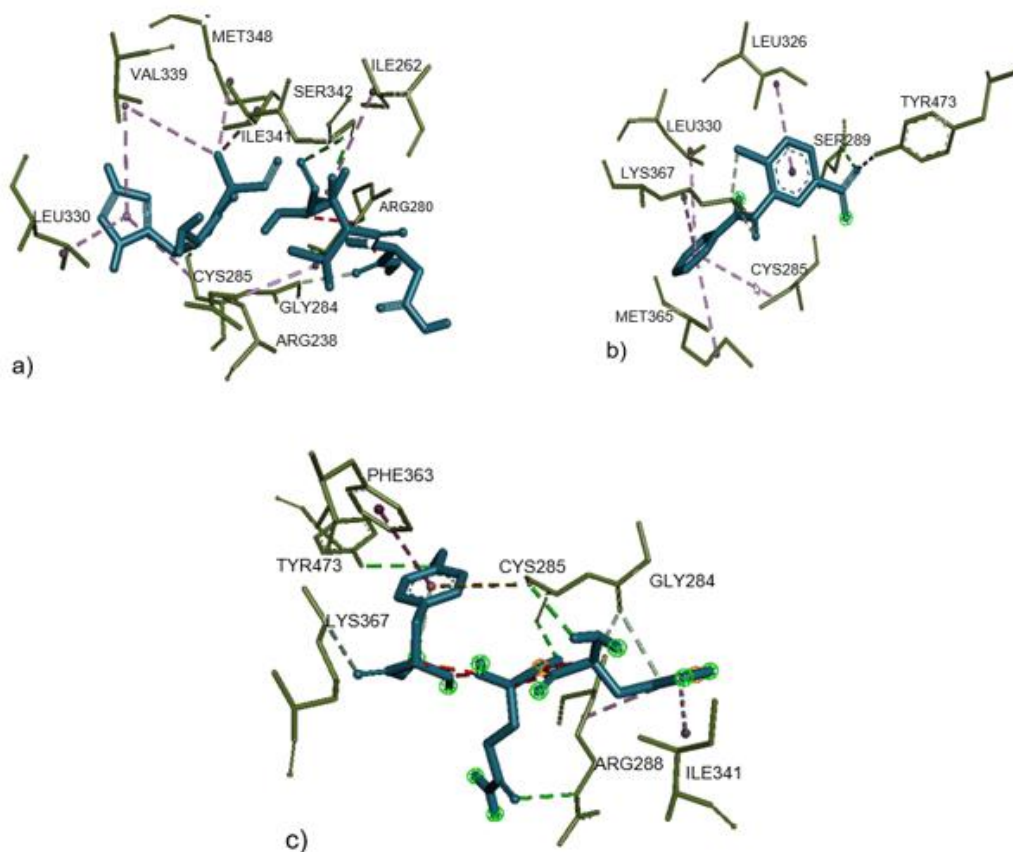


Figura 11. Uniones intermoleculares de los ligandos con energía de unión similar al antagonista GW9662, a) GW9662, b) DVVAH, c) YQH.

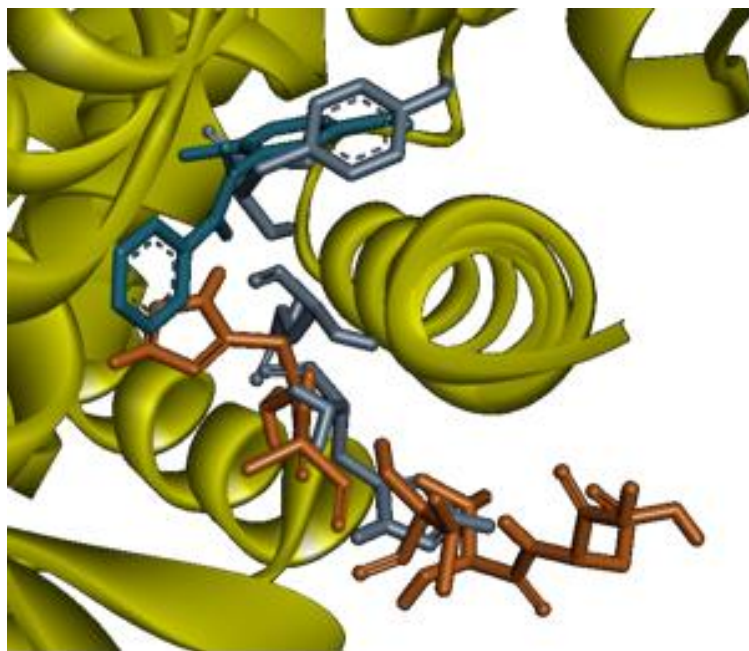


Figura 12. Superposición de los ligandos con energía de unión similar al antagonista GW9662

Por otro lado, los péptidos que mostraron energía de unión similar al antagonista G3335 (-4.92 kcal/mol) son PQPR (-4.96 kcal/mol), AIF (-5.26 kcal/mol), APH (-5.26 kcal/mol) donde los residuos de aminoácidos ILE341, CYS285 Y LYS367, forman puentes de hidrógeno en las 4 moléculas (Figura 13), en este caso, las moléculas si presentan uniones similares y se puede observar que se encuentran sobrepuestas en la mayoría de su estructura (Figura 14), lo que nos podría dar indicios de la capacidad de estos péptidos de unirse a la misma región que el inhibidor de PPAR γ .

Los puentes de hidrógeno en la molécula PQPR se presentan en el aminoácido PRO1 al residuo SER342 y de ARG a CYS285; en el péptido AIF van de PHE a LEU340 y de ALA a CYS285; en el péptido APH van de HIS a MET364 y a CYS285. Por último, el antagonista G3335 presentó enlaces de hidrógeno con SER342, MET364, ILE281 y dos enlaces diferentes con CYS285 (Figura 13).

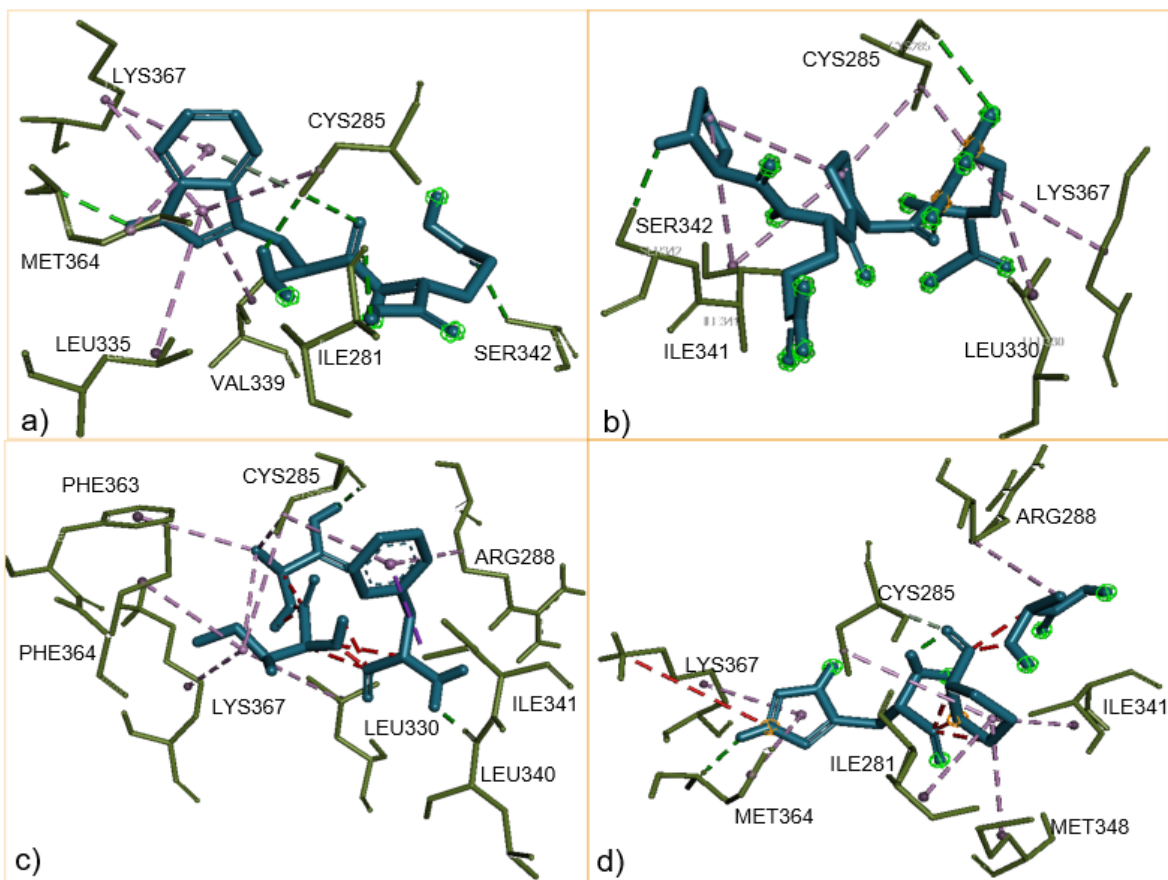


Figura 13. Uniones intermoleculares de los ligandos con energía de unión similar al antagonista G3335, a) G3335, b) PQR, c) AIF, d) APH

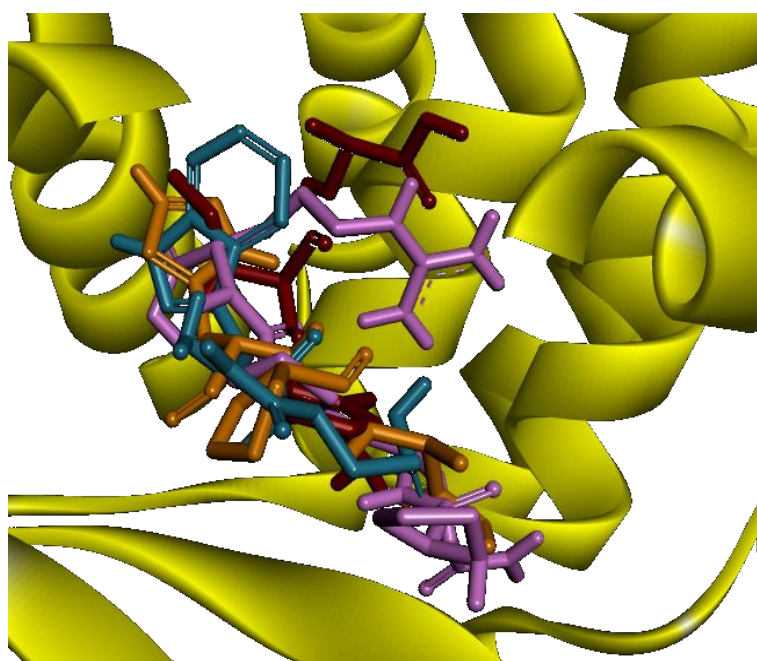


Figura 14. Superposición de los ligandos con energía de unión similar al antagonista G3335.

8.5.5 Características de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los péptidos con capacidad de unión al receptor.

Se evaluaron las características ADME de los péptidos con energía de unión < -4.8 kcal/mol en el programa Swiss-ADME y se compararon con el fármaco agonista de PPAR γ rosiglitazona, (tabla XVIII) los valores más importantes para determinar su capacidad de absorción son la hidrofobicidad y el área de superficie polar topológica, los péptidos AIF, IF, IPIL y VAF son los que cumplen con todas las características necesarias para considerarse con una buena absorción GI. En el caso de los antagonistas de PPAR γ , solo GW9662 cumple con las características para tener alta absorción GI. En la puntuación de la biodisponibilidad, a excepción de AWAH, DVVAH y YQH, el resto de péptidos mostraron un puntaje de 0.55, similar a los antagonistas de PPAR γ y al antagonista rosiglitazona.

En la figura 15 se muestran los resultados del BOILED-Egg, donde los péptidos que se encuentran en la parte blanca (clara) tienen capacidad de absorberse de manera pasiva en el tracto gastrointestinal (GI), mientras que las moléculas en la parte amarilla (yema) tienen la capacidad de permeación cerebral, los puntos azules son para las moléculas que se prevé que sean expulsadas del sistema nervioso central por la glicoproteína P, mientras que los puntos rojos son para moléculas que se prevé que no serán expulsadas del sistema nervioso central por la glicoproteína P, los péptidos AIF, IF, IPIL, VAF y el fármaco rosiglitazona, muestran una capacidad de absorción gastrointestinal, mientras que los péptidos PQPR, DVVAH y YQH no cumplen con las características adecuadas para ser biodisponibles (MW, HBD, HBA, TPSA) y por lo tanto no se muestran en el BOILED-Egg.

Tabla XVIII. Características ADME de los péptidos con capacidad de unión a PPAR γ

	MW (g/mol)	iLOGP (o/w)	WLOGP (o/w)	TPSA (Å ²)	HBA	HBD	RB	HA	logP (o/w)	Potencial cómo fármaco	Biodisponibilidad	Absorción GI
AIF	349.42	1.89	0.68	121.52	5	4	11	25	0.62	Si (0)	0.55	High
APH	323.35	0.66	-1.52	141.41	6	4	8	23	-1.47	Si (0)	0.55	Low
IF	278.35	2.02	1.17	92.42	4	3	8	20	.98	Si (0)	0.55	High
IPIL	454.60	2.59	1.12	141.83	6	4	15	32	1.08	Si (0)	0.55	High
PQPR	469.56	1.27	-3.37	283.03	8	7	16	35	-2.29	No (2)	0.17	Low
TQW	394.42	0.81	-1.74	184.84	7	6	13	28	-1.38	Si (1)	0.55	Low
VAF	335.40	1.66	0.29	121.52	5	4	10	24	0.29	Si (0)	0.55	High
AWAH	483.52	1.65	-0.42	195.09	7	7	14	35	-0.41	No (2)	0.17	Low
DVVAH	539.58	0.76	-1.89	245.70	10	8	19	38	-1.40	No (3)	0.17	Low
YQH	446.46	0.24	-1.45	213.52	8	7	14	32	-1.38	No (2)	0.17	Low
GW9662	275.68	1.81	3.31	74.92	3	1	4	12	2.71	Si (0)	0.55	High
G3335	333.34	1.00	0.47	145.51	6	5	9	9	1.03	Si (0)	0.56	Low
Rosiglitazona	357.43	2.41	2.11	96.83	4	1	7	12	2.54	Si (0)	0.55	High

MW: peso molecular. ILogP/WLogP: Hidrofobicidad, TPSA: área de superficie polar topológica, HBA: aceptores de enlaces de hidrógeno, HBD: donadores de enlaces de hidrógeno. RB: enlaces rotables. HA: átomos pesados. MR: refracción molecular. absorción GI: absorción gastrointestinal. Semejanza a los fármacos calculada con la cantidad de violaciones de los parámetros Lipinski (MW \leq 500, MLOGP \leq 4.15, CLogP \leq 5, donadores de enlaces H \leq 5, aceptores de enlaces H \leq 10).

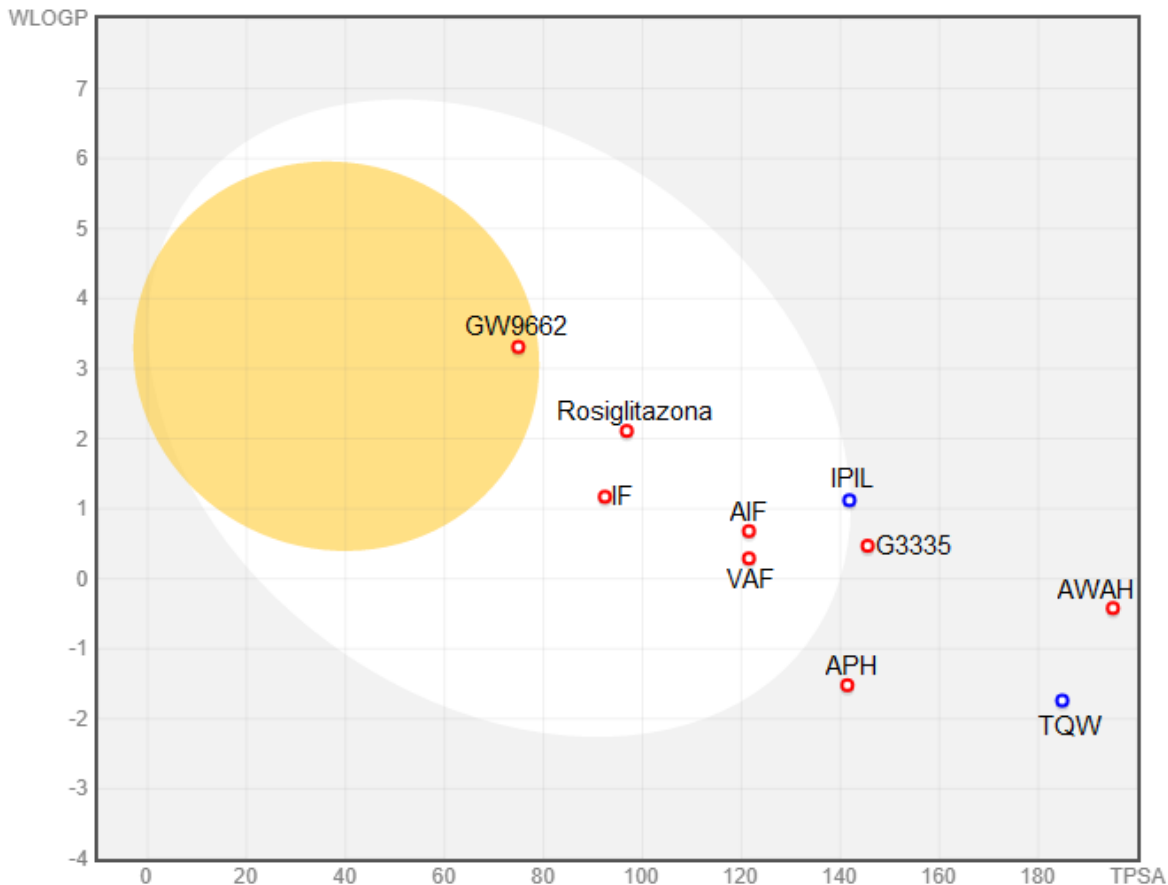


Figura 15. BOILED-Egg de los péptidos con capacidad de unión a PPAR γ . PQPR, DVVAH, YQH fuera del rango. Swiss-ADME. <http://www.swissadme.ch/>

Los datos *in silico* nos muestran que los péptidos IF, AIF, VAF y APH, resultantes de la digestión simulada con enzimas gastrointestinales de la globulina de almacenamiento 11S, tienen una posible bioactividad predictiva sobre enzimas relacionadas con el SM metabólico como ECA, además de la capacidad de unión a los residuos del sitio activo de PPAR γ demostrado por el acoplamiento en autodock tools, mientras que el BOILED-egg determinado por SWISSADME demuestra la capacidad de estos péptidos de ser absorbidos y llegar al receptor sin generar toxicidad.

9. Discusión

9.1 Análisis proximal de los residuos de café

Los compuestos presentes en los residuos de café han sido estudiados recientemente debido a su perfil de compuestos orgánicos. El contenido de carbohidratos ha sido reportado con valores que van desde el 45% hasta el 61% de la materia seca. En el presente estudio, la presencia de carbohidratos en la muestra es del 26.47%, sin embargo, este contenido fue calculado en base húmeda. La determinación del contenido de carbohidratos se puede ver afectada por el proceso de tostado, que incrementa la solubilidad de los mismos gracias a la pérdida de la estructura celular del café, además, durante la preparación de la bebida de café se pierde una fracción de hemicelulosa. Debido a estos cambios estructurales generados durante el proceso de tostado y de preparación de la bebida de café, el contenido de carbohidratos puede tener ligeras diferencias de una matriz alimentaria a otra (Ballesteros et al., 2014; Campos-Vega, Ocio, et al., 2015; Franca & Oliveira, 2022).

El rango de las proteínas presentes en los residuos de café es variable entre el 12 a 15 %, sin embargo, se considera que en algunos casos donde se realiza la cuantificación del nitrógeno total presente en la muestra, este valor puede estar sobreestimando debido a la presencia de otros compuestos nitrogenados (cafeína, melanoidinas, productos de la reacción de Maillard). En el presente estudio, se reporta una presencia de proteínas del $10.25\% \pm 0.15$. En el caso de la proteína, este compuesto se mantiene relativamente estable durante el proceso de tostado y no es extraído durante la preparación de la bebida de café (Ballesteros et al., 2014; Campos-Vega, Ocio, et al., 2015; Franca & Oliveira, 2022).

En el caso de los minerales, el rango va de los 4 a 5% en el café tostado, sin embargo, los valores disminuyen significativamente en los residuos de café que van desde los 0.1 al 1%, en nuestro estudio las cenizas representan los minerales presentes en los residuos de café y son del 1.15%. Esta disminución de los

minerales se debe a que una gran cantidad de los mismos se extraen por lixiviación durante la preparación de la bebida de café (Campos-Vega, Vázquez-Sánchez, et al., 2015; Franca & Oliveira, 2022).

El contenido de lípidos en el café tostado va de 15 a 20% en la variedad Arabica y 11 a 16% en Robusta, durante el proceso de tostado existe poca variación en el contenido de lípidos, además que, al ser de naturaleza hidrofóbica, tampoco existe pérdida durante la preparación de la bebida de café, quedando en un rango de 22 a 27%. Esto varía dependiendo del estudio, donde también han existido reportes de contenido de lípidos de 13.90% (Ballesteros et al., 2014; Campos-Vega, Vázquez-Sánchez, et al., 2015; Franca & Oliveira, 2022). Sin embargo, el contenido de lípidos en nuestro estudio fue menor a lo reportado, siendo de 6.80%.

9.2 Rendimiento de la extracción proteica de SCG

Durante el proceso de extracción de proteína se utilizó el protocolo propuesto por Samssalee y Sothornvir (2021), con modificaciones de Ayala-Rodríguez et al., (2022) mediante la dilución de las proteínas en un medio alcalino y la posterior precipitación en un medio ácido. Los solventes alcalinos ayudan a romper los puentes de hidrógeno y a disociar el hidrógeno de los grupos sulfato carbónico, así el incremento de la carga superficial de las moléculas proteicas aumenta la solubilidad en agua (Guerra et al., 2015). En este caso, diversos estudios han reportado que el pH 8 es el adecuado para favorecer la solubilidad de las proteínas de SCG. La dilución en medio alcalina fue dada a un pH 8 (Ribeiro et al., 2021; Ramírez et al., 2021).

Por otro lado, el proceso de precipitación por punto isoelectrico es crucial para la recuperación del concentrado proteico, en este caso nos encontramos con pocos estudios que reportan el punto isoelectrico de las proteínas de SCG, donde solamente se ha estudiado en formato *in silico* con valores de 4.8 (Ramirez et al., 2021) o en café verde con valores de 4 – 4.5 (Emerson-Undergrwood, 1951; Souza-Almedia, 2021). Sin embargo, se ha demostrado que durante el proceso de tostado se afecta el punto isoelectrico de las proteínas, en donde los

polifenoles del café juegan un papel importante en el proceso de polimerización durante el tostado. La derivatización de proteínas con ácidos clorogénicos se acompaña de un cambio de su punto isoeléctrico hacia valores de pH más bajos (Montavon, 2003).

Si bien existen diversos estudios donde se ha recuperado y analizado la fracción proteica de SCG, (Valdés et al., 2020; Ribeiro et al., 2021; Ramírez et al., 2021) estos autores han demostrado una recuperación del concentrado proteico en pocas cantidades (de 0.9 – 2.9%) pero con una concentración de proteína del 51 al 69%. En el presente estudio, la concentración de proteína en el extracto fue de 21%, valores inferiores a lo reportado, esto puede deberse a que la proteína de almacenamiento G11S, presente en los SCG sigue un proceso específico de degradación durante el tostado del grano del café. La desnaturalización de la fracción proteica, inducida por las condiciones de temperatura y presión, puede conducir posteriormente a la fragmentación de las subunidades en polipéptidos más pequeños y/o a una serie de reacciones oxidativas, dando como resultado la incorporación de estos fragmentos proteicos a la matriz polimérica de las melanoidinas que, representan el 25% del producto final (Figueroa-Campos 2022).

9.3 Digestión *in vitro*

9.3.1 Digestibilidad y bioaccesibilidad proteica *in vitro*

La digestión gastrointestinal *in vitro* de proteína de SCG con pepsina y pancreatina ha sido poco descrita en muestras de café. En el estudio de Ramírez et al. (2021) se realizó una hidrólisis con pepsina y pancreatina de proteína aislada de residuo de café, se dializó con membrana de 10 kDa y a la proteína dializada se le denominó proteína soluble, en donde, se recuperó un total de 17.41 % \pm 3.51 de proteína. Este porcentaje es mayor que el mostrado en el presente estudio (5.48%). Bahttarai et al., (2022) mostró una digestibilidad de 33% en proteína aislada de SCG, valores mayores a lo determinado en el presente estudio 17%, sin embargo, es importante tomar en cuenta que la matriz alimentaria utilizada en el presente estudio son los residuos de café y no la

proteína aislada, en donde, existe la adherencia de proteínas a polisacáridos lo que vuelve más complejo el proceso de digestión y, por ende, la liberación de proteínas.

9.3.2. Electroforesis SDS-Page

Al analizar las muestras ND, ND (C-), NBA y BA mediante electroforesis SDS-Page, solamente ND mostró dos bandas, con un peso molecular de 160 kDa y otra tenue de 10 kDa (Tabla VII, Imagen 7), se puede inferir que existe un grado de digestión en comparación con ND (C-), ya que, las proteínas presentes en la muestra siguen unidas a las melanoidinas, lo que dificulta su migración a través del gel. En el caso de la fracción ND, la banda identificada corresponde a la fracción de proteína que fue liberada de la matriz polimérica por las enzimas proteolíticas y a la acción de α -amilasa. Se ha demostrado que la derivatización de las proteínas durante el proceso de tostado forma estructuras poliméricas de >200 kDa lo que dificulta la permeación de las proteínas a través del gel de electroforesis (Ribeiro et al., 2021). En el estudio de Vázquez-Sanchez et al, (2018) se realizó el perfil electroforético de proteína extraída de SCG mediante diferentes métodos, en donde se encontraron bandas de 150 kDa y de 10 kDa, resultados similares a lo identificado en la fracción ND de nuestro estudio. La banda visible a 160 kDa puede representar la liberación de las proteínas polimerizadas, mediante la acción de la α -amilasa salival, mientras que la banda de 10 kDa representa a aquellos polipéptidos liberados por la fragmentación de la globulina 11S (Ribeiro et al., 2021).

En el estudio de Ribeiro et al, (2021), se realizó un perfil electroforético de la fracción digerida de proteínas extraídas de SCG, se demostró la presencia de fracciones peptídicas con un peso molecular de 26, 10, 5 y 3 kDa, en el caso de la banda de 26 kDa, puede representar la subunidad β de la globulina de almacenamiento 11S que fue resistente a la digestión realizada en el estudio. En nuestro estudio no se presentan bandas que puedan representar esta subunidad en la fracción NBA o BA, el proceso de digestión pudo haber actuado sobre esta fracción proteica generando un grado de digestión mayor, generando péptidos

con pesos moleculares < 10 kDa. Se estima que tanto en la fracción NBA como en la BA existen péptidos de bajo peso molecular que no fueron identificados en el presente estudio ya que se evaluaron pesos moleculares de 10 a 220 kDa.

9.4 Inhibición enzimática *in vitro*

La inhibición enzimática de α -amilasa se realizó mediante el método de Kwon et al, (2008), utilizando la fracción BA de SCG tostado medio, a concentraciones de 0.1, 0.5 y 0.5 mg/dL, en este caso, solamente la concentración de 0.5 mg/mL mostró un porcentaje de inhibición de α -amilasa, mientras que en de α glucosidasa, la inhibición enzimática se presentó en una dilución de 1.25 mg/mL, Sin embargo, los resultados mostrados pueden llegar a ser variables, ya que, dentro de la fracción BA de los SCG se puede encontrar azúcares reductores resultantes del proceso de digestión como manosa y galactosa las cuales se pueden unir al ácido dinitrosalicílico (DNS) y genera absorción lo que puede estar afectando la lectura y los resultados (Passos et al., 2019). Es importante realizar una purificación de la fracción BA de SCG para recuperar los péptidos y determinar la inhibición enzimática de una manera más precisa. Debido a complicaciones en el estudio se dificultó la realización de replicaciones de ambos análisis.

Si bien, con péptidos de SCG no se ha realizado inhibición de enzimas α -amilasa o α -glucosidasa, otras fuentes de globulina G11S han demostrado inhibición de la enzima, como el caso de péptidos de proteína digerida de quinua, que mostraron IC50 de 1.01 ± 0.04 , sin embargo, la concentración de péptidos utilizados fue de 6 mg/mL, una concentración 12 veces mayor a la utilizada en el presente estudio (Vilcacundo, Martínez y Hernández, 2017).

Los resultados del porcentaje de inhibición de α -glucosidasa muestran que la fracción BA de residuos de café presenta un elevado porcentaje de inhibición, diversos estudios han demostrado que el IC50 necesario para generar una inhibición enzimática de α -glucosidasa es > 1mg/mL de péptidos (Vilcacundo,

Villaluenga y Hernández-Ledezma, 2017), en este caso, la dilución utilizada (1.25 mg/mL) demostró tener capacidad inhibitoria de la enzima.

La actividad inhibitoria de α -glucosidasa de péptidos bioactivos se relaciona a la presencia de residuos de aminoácidos serina, treonina, tirosina, lisina, arginina en N-terminal y prolina cerca de C-terminal con metionina o alanina en posición C-terminal (Di Stefano et al., 2018). Esta información está respaldada con estudios donde se ha demostrado que el tetrapéptidos STYV derivado de *Aspergillus awamori* es el péptido con mayor capacidad de inhibición de α -glucosidasa descrito, por otro lado, el péptido SQSPA de *Bombyx mori* ha demostrado una inhibición reversible de α -glucosidasa. Estos datos fueron comprobados mediante estudios *in silico* donde se evaluaron las interacciones moleculares de los péptidos con α -glucosidasa mediante interacciones electrostáticas de los enlaces de hidrógeno (Ibrahim et al., 2018). Si bien, las fuentes de estos péptidos no son de fuentes vegetales, se demuestra la capacidad de péptidos de diversas fuentes con capacidad de inhibir α -glucosidasa.

9.5 Análisis *in silico*

9.5.1 Digestión *in silico*

Diversos estudios han comparado la utilidad del programa BIOPEP-UWM con estudios *in vitro* e *in vivo*. En el estudio de Barati et al., (2020), se demostró que existía una similitud de 33.6% entre péptidos resultado de la digestión *in silico* y péptidos reportados de digestión en modelo murino. Por otro lado, en el estudio de Gómez et al, (2019) demostró que la bioactividad predictiva sobre ECA y DPPIV de péptidos de ostra hidrolizados *in silico* con el programa BIOPEP-UWM es similar a la inhibición realizada *in vitro* de péptidos hidrolizados *in vitro*.

Debido a la poca disponibilidad de estudios que reportan la hidrólisis de G11S sobre SCG o café *in silico*, se comparó con G11S de otra fuente vegetal, en este caso avena, donde, el grado de hidrólisis de la G11S de SCG (37%) resultó similar al grado de hidrólisis de la G11S de avena (35%). Es posible que la especificidad de las enzimas proteolíticas utilizadas, limite el alcance de la

hidrólisis; cada enzima escinde a residuos de aminoácidos al reconocerlos, la pepsina actúa sobre fenilalanina y tirosina, mientras que tripsina actúa sobre lisina y arginina y la quimiotripsina muestra afinidad por aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), esto lleva a la liberación de péptidos con tamaños variables (Ribeiro et al., 2021). En este caso, los péptidos de interés son aquellos de 2 a 5 aminoácidos, son los que presentan una mejor biodisponibilidad según lo reportado, ya que péptidos mayores pueden ser expuestos a un proceso hidrolítico que afecta su biodisponibilidad y se ha visto que péptidos pequeños muestran mayor bioactividad que péptidos de mayor tamaño. (Thakkar et al., 2008; Barati et al., 2020).

Si bien en el caso de la proteólisis *in silico* existe un bajo grado de hidrólisis, esto se podría asemejar a lo encontrado en una digestión *in vitro* o *in vivo*, ya que, la digestión de las proteínas de café se ve afectada por diversos procesos térmicos como el proceso de tostado que promueven la unión de las proteínas a las melanoidinas y disminuye la solubilidad en agua. Esto afecta la digestibilidad de las proteínas de café tostado y da como resultado una menor cantidad de proteína soluble, sin embargo, durante la preparación de la bebida de café, el agua caliente puede acentuar la desnaturalización de estas, resultando en una exposición de mayores sitios de unión, lo que aumenta su solubilidad y promueve el proceso de digestión, además que resulta en la exposición de más cadenas de péptidos susceptibles a la acción de proteasas, lo que promueve la liberación de péptidos más pequeños (Beckdam et al., 2006; Ribeiro et al., 2021).

La globulina de almacenamiento 11S presente en los SCG es un hexámero de 55 kDa con dos subunidades de 33 y 24 kDa, está formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. La región hidrofílica C-terminal de la cadena α está ubicada en la superficie de la proteína y protege los dominios estructurales y la solubilidad de las globulinas 11S, además parece ser el sitio de reacción preferido para el ácido clorogénico que también participa en las modificaciones estructurales de las proteínas durante el proceso de tostado. La hidrólisis de la globulina 11S da como resultado la división de las regiones expuestas en la superficie de cadenas α , mientras que las cadenas β ubicadas

en la parte interna de la molécula de proteína permanecen intactas (Ali et al., 2012).

En el estudio de Ribeiro et al, (2021) se realizó una digestión *in silico* con enzimas pepsina, tripsina y quimiotripsina en el programa BIOPEP-UWM-UWM, a su vez se realizó una digestión *in vitro* y se comparó los resultados de ambas digestiones, mostrando la capacidad de la globulina de almacenamiento 11S de liberar péptidos de bajo peso molecular, donde la subunidad α demuestra ser altamente hidrofílica y más accesible a la acción de las enzimas como tripsina, mientras que la subunidad β demuestra ser más hidrofóbica y tiene mayor resistencia a la digestión. Esto nos demuestra que el método *in silico* supone una aproximación de lo que sucede en estados físicos, pero no es exacto ya que existen factores externos que pueden afectar la acción de las enzimas en la estructura de las proteínas.

9.5.2 Bioactividad predictiva

Para evaluar la actividad biológica de los péptidos se utilizó el programa BIOPEP-UWM-UWM el cual utiliza datos reportados sobre la actividad biológica de diversos péptidos, en este caso se determina la actividad biológica potencial de los péptidos solo si se dispone del IC 50 o EC 50 (Minkiewiz et al., 2019). En el caso de los péptidos de SCG analizados mostraron capacidad inhibitoria de ECA, DPPIV, DPPIII y actividad antioxidante, lo que les confiere la capacidad de actuar sobre diversas enfermedades como hipertensión, y diabetes mellitus. Por otro lado, la capacidad inhibitoria de ECA de los péptidos provenientes de SCG ha sido demostrada en estudios *in vitro* donde se evalúa la actividad de péptidos resultantes de un proceso de hidrólisis, resultando en la disminución de la actividad enzimática luego de la adición de los péptidos (Valdés et al., 2020; Ribeiro et al., 2021). El mecanismo de acción propuesto para la actividad antioxidante de los péptidos incluye la regulación de las enzimas antioxidantes, los grupos tiol e hidroxilo disponibles en las secuencias peptídicas, el equilibrio de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno y la reducción de la oxidación de lípidos. La actividad de algunos péptidos para inhibir las enzimas ECA y DPP-IV se ha relacionado con cambios conformacionales debido a

interacciones hidrofóbicas y eléctricas de las secuencias peptídicas con las enzimas (Ramírez et al., 2021). Diversos estudios que evalúan la bioactividad de los péptidos de SCG han demostrado que aquellos péptidos con fragmentos que presentan el aminoácido hidrofóbico tirosina (Y) en el C-terminal presentan una mayor bioactividad (Valdés et al., 2020; Pérez-Migues, Marina y Castro-Puyana, 2019).

Otros estudios han demostrado que los péptidos con residuos de aminoácidos hidrofóbicos (L, I, V, A, W y M) y aromáticos (F y Y) tienen mayor capacidad inhibitoria de ECA, DPP-IV y actividad antioxidante (Ramírez et al., 2021). También se ha analizado que los péptidos cortos que contienen fenilalanina tienen más probabilidades de predecirse como bioactivos, esto sugiere que este aminoácido puede ser particularmente útil para conferir bioactividad a los péptidos más cortos y es un determinante utilizado en el programa PeptideRanker (Mooney et al., 2012).

En nuestro estudio, los péptidos con mayor bioactividad predictiva determinada en el programa Peptide Ranker fueron IF (0.94) y AIF (0.83), con el aminoácido hidrofóbico isoleucina, alanina y fenilalanina. De los péptidos con más del 0.5 de bioactividad, el 87.5% presenta al menos un aminoácido hidrofóbico y el 75% presenta un aminoácido hidrofóbico en C-terminal o N-Terminal. Se ha demostrado que los péptidos de naturaleza hidrofóbica generalmente tienen propiedades antioxidantes y de inhibición de la ECA. Estos aminoácidos hidrofóbicos normalmente pueden interactuar con las enzimas diana o los radicales libres (Peighambardoust et al., 2021).

Los péptidos pueden presentar múltiples actividades biológicas en el organismo, dadas principalmente gracias a su hidrofobicidad, por lo que nos puede dar una idea de la capacidad de los péptidos de actuar sobre diversos receptores como el caso de ECA y PPAR γ .

9.5.3. Afinidad ligando-receptor de los péptidos resultantes de la digestión *in silico*

Una estrategia para el control de la obesidad es reducir la adipogénesis mediante la regulación sobre la actividad de PPAR γ . Los estudios realizados sobre la unión de ligandos en PPAR γ han identificado los residuos de aminoácidos CYS285, MET364, ILE264, ARG288, SER289, ILE281 y LEU 330 del receptor, como el sitio de unión de moléculas con actividad antiadipogénica (Selvaraj et al., 2014; Aranaz et al., 2019).

Tanto el antagonista G3335 como los péptidos mostraron enlaces de hidrógeno al residuo CYS285, mientras que en el caso de GW9662 ha sido reportado y confirmado en el presente estudio que muestra enlace covalente con el residuo, principal interacción por la que se le atribuye su capacidad antagonista de PPAR γ (Ohtera et al., 2015). CYS285 se encuentra en la región central del sitio de unión del receptor, se ha demostrado la importancia de la interacción con este residuo sobre la capacidad de diversos ligandos de actuar sobre el receptor. En el estudio de Harada et al, (2015), se realizó una mutante de PPAR γ donde se sustituyó la cisteína del residuo por alanina y se demostró que los ligandos no afectaban al receptor a pesar de tener interacción con otros residuos.

Como se ha mencionado en la sección 9.3.2, es importante considerar la hidrofobicidad de los péptidos, la cual está dada por el contenido de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica. De los péptidos que presentaron afinidad con el receptor PPAR γ , un 80% presenta un aminoácido hidrofóbico en su estructura, 40% en C-terminal, 70% en N-terminal y 40% en ambas porciones terminales, como es el caso del péptido RLLPH del hidrolizado de alcalasa de avellana (*Corylus heterophylla*) y los péptidos FFL, LLSL y LVLL de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con aminoácidos hidrofóbicos en ambas terminaciones presentan una inhibición de la acumulación lipídica del en la línea celular 3T3-L1 (Oseguera-Toleto et al., 2016).

También se han estudiado péptidos de origen animal con efectos sobre adipogénesis, como el caso del péptido de atún DIVDKIEI con aminoácidos

hidrofóbicos, sobre todo en C-terminal que demostró disminuir la ingesta de glucosa y triglicéridos e inhibir PPAR γ y C/EBPs en línea celular 3T3-L1 (Kim et al., 2015); péptidos hidrolizados de caseína que han demostrado una disminución del 4% de la adipogénesis en la línea celular 3T3-L1 (Martínez-Villaluenga et al., 2008), y péptidos con <1 kDa de mejillón azul por hidrólisis de pepsina exhibieron efectos antiobesidad al mejorar la lipólisis y regular a la baja los factores de transcripción adipogénicos, como PPAR - γ , C/EBP- α y SREBP1 (Hong et al., 2019).

Los diferentes compuestos de SCG que pudieran encontrarse unidos a las proteínas, ya que durante el proceso de tostado de café, la polimerización de las melanoidinas se ve acompañada de la unión de ácidos clorogénicos, que a su vez se unen a la estructura de la G11S, esto podrían tener un impacto en la bioactividad de las proteínas y cambiar su conformación, pudiendo así, presentar un efecto antagónico a la actividad ejercida por las proteínas en su estado puro, así como también, un efecto sinérgico en la que podría presentar una bioactividad mayor comparada con su estado puro (Prabhu & Rajeswari, 2018., Montavon et al., 2003).

9.5.4. Características de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los péptidos con capacidad de unión al receptor.

La rosiglitazona es un fármaco perteneciente a las tiazolidinedionas altamente estudiado como agonista de PPAR γ , el cual ejercen efectos hipoglucemiantes mediante la regulación de genes sensibles a PPAR γ . Se han realizado estudios *in silico* e *in vitro* de la interacción del fármaco con el receptor y se ha demostrado que actúa sobre el sitio activo, especialmente sobre los residuos de aminoácidos CYS285 y SER289 (Kotha et al., 2020). Los datos obtenidos en ADME de rosiglitazona sirven como parámetro para medir las características necesarias para que una molécula pueda llegar al receptor, los péptidos se analizaron en ADME y se compararon con dichas características.

Los citocromos P450 (CYP) pertenecen a una superfamilia multigénica de genes que codifican una serie de enzimas que catalizan la oxidación de funciones mixtas de una amplia variedad de compuestos endógenos y xenobióticos, incluidos contaminantes ambientales, mutágenos proximales y carcinógenos (Katiyat, Afaq y Mukhtar, 2001). Se determinó la interacción de los péptidos con la familia de enzimas del CYP, el antagonista GW9662 inhibe a CYP1A2, CYP2C19 y CYP2c9, el resto de los péptidos no tiene interacción con CYP, mientras que IPIL inhibe la glicoproteína P. La interacción de los compuestos activos con cualquiera de las isoenzimas CYP podría conducir a un metabolismo rápido (cuando se induce una isoenzima CYP) o a una bioacumulación (cuando se inhibe una isoenzima CYP) en el cuerpo. Ambos escenarios son indeseables, ya que el primero puede provocar una sobredosis y el segundo, toxicidad. En este caso podemos interpretar que los péptidos bioactivos de PPAR γ no generan toxicidad alguna con las enzimas de CYP (Ji et al., 2020).

Por otro lado, para la similitud a los fármacos se utiliza la "regla de 5" de Lipinski et al, (2001) que predice que es más probable una mala absorción o permeación cuando hay más de 5 donantes de enlaces H, 10 aceptores de enlaces H, el peso molecular (MWT) es superior a 500 y el Log calculado P (CLogP) es mayor que 5 (o MlogP>4.15). Analizando estos datos, ambos antagonistas y los péptidos AIF, APH, IF, IPIL, TQW y VAF tienen buena semejanza a los fármacos ya que cumplen con todas las características. En la puntuación de la biodisponibilidad, a excepción de AWAH, DVVAH y YQH, el resto de los péptidos mostraron un puntaje de 0.55, similar a los antagonistas de PPAR γ y al antagonista rosiglitazona.

Dos propiedades importantes utilizadas para predecir la biodisponibilidad oral de los compuestos son la flexibilidad (FLEX, determinada por el número de enlaces giratorios) y la polaridad (POLAR, determinada por el área superficial polar topológica (TPSA)). Se sabe que los compuestos con más de 10 enlaces giratorios tienen una biodisponibilidad oral baja, y aquellos con un área de superficie polar topológica baja (entre 20 y 130 Å) tienen una biodisponibilidad oral alta (Ji et al.,

2020). En este caso se pudo analizar todos los péptidos a excepción de APH y el antagonista G3335 tienen biodisponibilidad oral baja, sin embargo, según la TPSA, AIF, IF, GW9662 y Rosiglitazona pueden llegar a tener biodisponibilidad oral alta.

En la Figura 14 se presenta el BOILED-Egg de todos los péptidos analizados. El BOILED-Egg es una representación gráfica que nos ayuda a determinar la capacidad de un péptido de absorberse en el tracto GI o permear la barrera hematoencefálica. Los péptidos AIF, IF, IPIL y VAF, muestran una capacidad de absorción gastrointestinal, mientras que los péptidos PQPR, DVVAH y YQH no cumplen con las características adecuadas para ser biodisponibles (MW, HBD, HBA, TPSA).

A pesar de que diversos péptidos no cumplen con las características para ser absorbidos en el tracto gastrointestinal de manera pasiva, existe la posibilidad de ser absorbidos mediante transportadores peptídicos, ya que, a diferencia de los fármacos, los péptidos cuentan con diversos transportadores de membrana que se encuentran en los enterocitos y pueden transportar a los péptidos al torrente sanguíneo. Los di y tri-peptidos suelen ser absorbidos gracias a los transportadores intestinales PEPT1 y PEPT2 (Vij et al., 2016), mientras que péptidos de 4 y 5 aminoácidos son transportados por SOPT1 y SOPT2 y por difusión pasiva (Chothe et al., 2011). El antagonista de PPAR γ G3335 al ser un dipeptido podría ser transportado por PEPT1, ya que en el programa SwissADME no muestra tener características adecuadas para su absorción de manera pasiva.

Con los datos anteriores se puede determinar que las proteínas de SCG pueden presentar digestibilidad y bioaccesibilidad mediante una digestión simulada *in vitro*, lo que indica que a pesar de la dificultad de extracción mediante punto isoeléctrico, el proceso de digestión puede liberar péptidos potencialmente bioactivos, estos péptidos demuestran actividad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro*, mientras que *in silico* muestran una potencial bioactividad sobre enzimas involucradas en el síndrome metabólico como ECA y capacidad

de unión sobre el sitio activo de PPAR γ , donde los péptidos IF, AIF, VAF y APH son los que tienen mayor capacidad de unión y mejor absorción determinado por sus características ADME.

10. Conclusiones

Al someter los SCG a una digestión gastrointestinal *in vitro*, se determinó que las proteínas tienen buena digestibilidad y bioaccesibilidad. Por lo que se puede estimar que la fracción bioaccesible de SCG presenta péptidos con un peso <12 kDa. La fracción bioaccesible de SCG demostró una capacidad de inhibición a una concentración de muestra de 0.5 mg/mL de α -amilasa, mientras que con α -glucosidasa se encontró inhibición a una concentración de muestra de 1.25 mg/mL, la fracción bioaccesible aún puede contener carbohidratos o compuestos fenólicos que estaban unidos a las melanoidinas y se liberaron durante el proceso de digestión, por lo cual, no se puede concluir que el efecto inhibitorio de α -amilasa y α -glucosidasa es exclusivo de los péptidos de SCG.

Por otro lado, el estudio *in silico* reveló que los péptidos hidrofóbicos demuestran una mayor bioactividad predictiva sobre ECA, además de mostrar fuertes energías de unión a PPAR γ y con una capacidad de absorción alta determinada por ADME. Por lo que se podrían identificar como los péptidos con mejores características y mayor probabilidad de ser ligandos antagonistas de PPAR γ y ECA.

Por lo anterior, se propone una posible interacción de los péptidos resultantes de la digestión de residuos de café, sobre la actividad de proteínas relacionadas con el SM

11. Recomendaciones para investigaciones futuras

Realizar una purificación de los péptidos de la fracción bioaccesible de SCG para eliminar carbohidratos, sales y otros compuestos que puedan interferir en los resultados.

Implementar metodología *in vitro* con líneas celulares 3T3-L1 o estudios *in vivo* donde se pueda analizar el efecto de los péptidos sometidos a una digestión completa en animales y analizar otros factores que pueden estar involucrados en el proceso de digestión y absorción de las proteínas de SCG.

Mejorar el proceso de extracción de proteínas de SCG para poder obtener un aislado proteico de las mismas, evaluar y caracterizar su estructura, someterla a un proceso de digestión y evaluar los péptidos resultantes mediante HPLC-MS y de esta manera poder hacer el análisis con las secuencias identificadas.

12. Anexos

12.1 Anexo de información personal

RESUMEN CURRICULAR

Rosa Isela Pizaña Cisneros

Candidato para el Grado de Maestra en Ciencias en Nutrición

Tesis: EVALUACIÓN LA DIGESTIBILIDAD PROTEICA DE RESIDUOS DE CAFÉ Y EL POTENCIAL DE SUS PÉPTIDOS BIOACTIVOS PARA EL MANEJO DEL SÍNDROME METABÓLICO.

Campos de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Durango, Durango, el 30 de agosto de 1997, hija de María Isabel Pizaña Cisneros.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Nutrición en 2020 con mención honorífica gracias a la elaboración de tesis de licenciatura titulada “Asociación Del Polimorfismo C677t Y A1298c Del Gen *MTHFR* Con Cintura Hipertrigliceridemia Y Disfunción Del Tejido Adiposo Como Marcadores De Riesgo Cardiovascular En Mujeres De 18 A 50 Años De Nuevo León”

13. Referencias

- Admassu, H., Gasmalla, M. A. A., Yang, R., & Zhao, W. (2018). Identification of Bioactive Peptides with α -Amylase Inhibitory Potential from Enzymatic Protein Hydrolysates of Red Seaweed (*Porphyra* spp). *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(19), 4872–4882. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00960>
- Aguilar, V., Sánchez-Páez, R., Gutiérrez-Salomón, A., Barajas-Ramírez, K. (2019). Spent coffee grounds cookies: Sensory and texture characteristics, proximate composition, antioxidant activity, and total phenolic content. *Journal of Food Processing and Preservation*. 43. 10.1111/jfpp.14223.
- AOAC International. (2019). Official Methods of Analysis, 21st Edition (2019). AOAC INTERNATIONAL. <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
- AOAC. (1980a). Official Method 7.056 (16th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC. (1980b). Official Method 14.003 (16th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC. (1990a). Official Method 14.006 (15th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC. (1990b). Official Method 962.09 (15th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC. (2005). Official Method 992.23 (18th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.
- Barati, M., Javanmardi, F., Jabbari, M., Mokari, A., Farahmand, F., Es, I., Farhadnejad, H., Davoodi, S. (2020). An *in silico* model to predict and estimate digestion-resistant and bioactive peptide content of dairy products: A primarily study of a time-saving and affordable method for practical research purposes. *LWT- Food Science and Technology*. 10.1016/j.lwt.2020.109616.
- BAÚ, S. M. T., MAZZAFERA, P., & SANTORO, L. G.. (2001). Seed storage proteins in coffee. *Revista Brasileira De Fisiologia Vegetal*, 13(Rev. Bras. Fisiol. Veg., 2001 13(1)). <https://doi.org/10.1590/S0103-31312001000100004>
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2014). *Mini-PROTEAN® 3 Cell. Instruction Manual*. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006157B.pdf>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le

- Feunteun, S., Lesmes, U., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Camacho-Espinoza, M., Peinado-Guevara, L., López-Valenzuela, J., Valdez, A., Salinas-Pérez, R., Moreno-Herrera, C., Medina, S. (2010). Caracterización proteómica de granos de frijol azufrado (*Phaseolus Vulgaris*) cultivados en el estado de Sinaloa. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, ISSN 1665-0441, Vol. 6, N°. 1, 2010, pags. 23-36. 6. 10.35197/rx.06.01.2010.04.mc.
- Chothe, P. P., Gnana-Prakasam, J. P., Ananth, S., Martin, P. M., Kannan, R., Hinton, D. R., Smith, S. B., & Ganapathy, V. (2011). Transport of hepcidin, an iron-regulatory peptide hormone, into retinal pigment epithelial cells via oligopeptide transporters and its relevance to iron homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications*, 405(2), 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.018>
- CiAnciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Quiles, J. L., Gil, E., Bompadre, S., Simal-Gandara, J., Battino, M., & Giampieri, F. (2020). The Influence of In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Anticancer Activity of Manuka Honey. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 64. <https://doi.org/10.3390/antiox9010064>
- Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1263, 243–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19
- Dima, C, Assadpour, E, Dima, S, Jafari, S.M. (2020). Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by *in vitro* methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 19: 2862– 2884. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12623>
- Fan, J.S., Huang, J.Y., Wong, K.H., & Tay, S.V. (2020). Coffeetides: iron-binding cysteine rich peptides from coffee waste.
- Gomez, H. L. R., Peralta, J. P., Tejano, L. A., & Chang, Y.-W. (2019). *In silico* and *in vitro* assessment of portuguese oyster (*crassostrea angulata*) proteins as precursor of bioactive peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5191. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20205191>
- Gonzalez-Chávez, A., Chávez-Fernández, J. A., Elizondo-Argueta, S., González-Tapia, A., León-Pedroza, J. I., & Ochoa, C. (2018). Metabolic Syndrome and

- Cardiovascular Disease: A Health Challenge. *Archives of medical research*, 49(8), 516–521.
- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Mora-Escobedo, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Bioactive Peptides from Germinated Soybean with Anti-Diabetic Potential by Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-IV, α -Amylase, and α -Glucosidase Enzymes. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 2883. <https://doi.org/10.3390/ijms19102883>
- Guerra, A., Vásquez-Osorio, D., Martínez, D., Hincapié, G.. (2015). Comparación de dos técnicas de deshidratación de guayaba-pera (*Psidium guajava* L.) sobre los efectos del contenido de vitamina C y el comportamiento de las propiedades técnico-funcionales de la fibra dietaria. *Revista Lasallista de Investigación*. 12. 10-20. 10.22507/rli.v12n1a1.
- Harada, S., Hiromori, Y., Nakamura, S., Kawahara, K., Fukakusa, S., Maruno, T., Noda, M., Uchiyama, S., Fukui, K., Nishikawa, J., Nagase, H., Kobayashi, Y., Yoshida, T., Ohkubo, T., & Nakanishi, T. (2015). Structural basis for PPAR γ transactivation by endocrine-disrupting organotin compounds. *Scientific reports*, 5, 8520. <https://doi.org/10.1038/srep08520>
- Herman, L. L., Padala, S. A., Ahmed, I., & Bashir, K. (2022). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors (ACEI). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Hong, F., Pan, S., Guo, Y., Xu, P., & Zhai, Y. (2019). PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(14), 2545. <https://doi.org/10.3390/molecules24142545>
- Katiyar, S. K., Afaq, F., Azizuddin, K., & Mukhtar, H. (2001). Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicology and applied pharmacology*, 176(2), 110–117. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9276>
- Kaur J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*, 2014, 943162. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>
- Klingel, T., Kremer, J. I., Gottstein, V., Rajcic de Rezende, T., Schwarz, S., & Lachenmeier, D. W. (2020). A Review of Coffee By-Products Including Leaf, Flower, Cherry, Husk, Silver Skin, and Spent Grounds as Novel Foods within the European Union. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(5), 665. <https://doi.org/10.3390/foods9050665>
- Kotha, S., B, S., Kulkarni, V. M., S, R. S., B, H. K., & R, H. (2021). An in-silico approach: identification of PPAR- γ agonists from seaweeds for the

- management of Alzheimer's Disease. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 39(6), 2210–2229. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1747543>
- Kwon, Y.-I., Apostolidis, E. And Shetty, K. (2008), Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *Journal Of Food Biochemistry*, 32: 15-31. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2007.00165.x>
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lawrence, J., Lawrence, A., Watts, S. (2020). Ingestion, digestion, and digestibility of regular sea urchins. 10.1016/B978-0-12-819570-3.00009-3.
- Lipinski, C.A., Lombard, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 46 (1–3): 3–26. [doi:10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0). PMID 11259830.
- Martinez-Villaluenga, C., Bringe, N. A., Berhow, M. A., & Gonzalez de Mejia, E. (2008). Beta-conglycinin embeds active peptides that inhibit lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), 10533–10543. <https://doi.org/10.1021/jf802216b>
- Massaya, J., Chan, K., Mills-Lamprey, B., Chuck, C. (2021). Developing a biorefinery from spent coffee grounds using subcritical water and hydrothermal carbonisation. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 13. 10.1007/s13399-020-01231-w.
- Ohtera, A., Miyamae, Y., Yoshida, K., Maejima, K., Akita, T., Kakizuka, A., Irie, K., Masuda, S., Kambe, T., & Nagao, M. (2015). Identification of a New Type of Covalent PPAR γ Agonist using a Ligand-Linking Strategy. *ACS chemical biology*, 10(12), 2794–2804. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00628>
- Okur, I., Soyler, B., Sezer, P., Oztop, M. H., & Alpas, H. (2021). Improving the Recovery of Phenolic Compounds from Spent Coffee Grounds (SCG) by Environmentally Friendly Extraction Techniques. *Molecules*, 26(3), 613. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26030613>
- Organización Mundial de la Salud (2021a). *Hipertensión*. https://www.who.int/es/health-topics/hypertension#tab=tab_1
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Diabetes*. <https://www.paho.org/es/temas/diabetes#:~:text=La%20diabetes%20es%20una%20enfermedad,los%20ri%C3%B1ones%20y%20los%20nervios.>

- Organización Mundial de la Salud. (2021b). *Obesidad y sobrepeso*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Pasca, A. J., & Móntero, J. C. (2015). *El Corazón del obeso*. Buenos Aires: Inter-médic
- Passos, C. P., Rudnitskaya, A., Neves, J. M. M. G. C., Lopes, G. R., Evtuguin, D. V., & Coimbra, M. A. (2019). Structural features of spent coffee grounds water-soluble polysaccharides: Towards tailor-made microwave assisted extractions. *Carbohydrate polymers*, 214, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.094>
- Peighambardoust, S. H., Karami, Z., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2021). A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in Food Applications. *Biomolecules*, 11(5), 631. <https://doi.org/10.3390/biom11050631>
- Pérez-Míguez, R., Marina, M. L., & Castro-Puyana, M. (2019). High resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry for the separation and identification of peptides in coffee silverskin protein hydrolysates. *Microchemical Journal*, 149, 103951. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.05.051>
- Prabhu, S.D. and Rajeswari, D.V. (2018) Nutritional and Biological Properties of *Vicia faba* L.: A Perspective Review. *International Food Research Journal*, 25, 1332-1340.
- Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Romero-Martínez, M., Castro-Porras, L., Gómez-Velasco, D., & Mehta, R. (2021). Trends in the prevalence of metabolic syndrome and its components in Mexican adults, 2006-2018. *Salud pública de México*, 63(6, Nov-Dic), 713–724. <https://doi.org/10.21149/12835>
- Samsalee, N., & Sothornvit, R. (2021). Physicochemical, functional properties and antioxidant activity of protein extract from spent coffee grounds using ultrasonic-assisted extraction. *AIMS Agriculture and Food*.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018). *México, onceavo productor mundial de café*. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/mexico-onceavo-productor-mundial-de-cafe?idiom=es>
- Shaman-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gaona-Pineda, E.B., Gómez-Acosta, L.M., Méndez-Gómez, I., Rivera-Dommarco, J. (2020). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2018 - 19) Resultados Nacionales*. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

- Shaman-Levy, T., Rivera-Domarco, J. (2022). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Siow, H. L., Lim, T. S., & Gan, C. Y. (2017). Development of a workflow for screening and identification of α -amylase inhibitory peptides from food source using an integrated Bioinformatics-phage display approach: Case study - Cumin seed. *Food chemistry*, 214, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.069>
- Souza-Almeida, F., Furlan-Goncalves Dias, F., Kawazoe-Sato, A. C., & Leite-Nobrega de Moura-Bell, J. M. (2021). From solvent extraction to the concurrent extraction of lipids and proteins from Green Coffee: An eco-friendly approach to improve process feasibility. *Food and Bioproducts Processing*, 129, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.08.004>
- Stefano., Oliviero, E., Udenigwe, T. (2018). Functional significance and structure-activity relationship of food-derived α -glucosidase inhibitors. *Current Opinion in Food Science*. 20. 7-12. [10.1016/j.cofs.2018.02.008](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.008).
- Swarup, S., Goyal, A., Grigorova, Y., & Zeltser, R. (2022). Metabolic Syndrome. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Thakkar, S., Miyauchi, S., Prasad, P., Ganapathy, V. (2008). Stimulation of Na⁺/Cl⁻-coupled Opioid Peptide Transport System in SK-N-SH Cells by L-kyotorphin, an Endogenous Substrate for H⁺-coupled Peptide Transporter PEPT2. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 23. 254-62. [10.2133/dmpk.23.254](https://doi.org/10.2133/dmpk.23.254).
- Tiwari, S., Srivastava, R., Singh, C., Singh, R., Pushpendra, S., Ravindra, N.I., Sharma, Rajesh. (2015). Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Biosciences*. 4. 1886-1901.
- Underwood, G. E. (1951). *A study of the non-caffeine nitrogenous compounds of coffee* / [Doctoral dissertation, Ohio State University]. OhioLINK Electronic Theses and Dissertations Center. http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=osu148639742434299
- Vij, R., Reddi, S., Kapila, S., & Kapila, R. (2016). Transepithelial transport of milk derived bioactive peptide VLPVPQK. *Food chemistry*, 190, 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.121>
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., Hernández-Ledesma, B. (2017). *Liberación de péptidos con potencial hipoglucémico durante la digestión gastrointestinal de proteínas de quinoa (Chenopodium Quinoa Willd.) simulando condiciones fisiológicas*. <http://hdl.handle.net/10261/172004>

- Wang, Y., Nakajima, T., Gonzalez, F. J., & Tanaka, N. (2020). PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2061. <https://doi.org/10.3390/ijms21062061>
- Zhang, H., Zheng, W., Hua, L., Wang, Y., Li, J., Bai, H., Wang, S., Du, M., Ma, X., Xu, C., Li, X., Gong, B., & Wang, Y. (2017). Interaction between PPAR γ and SORL1 gene with Late-Onset Alzheimer's disease in Chinese Han Population. *Oncotarget*, 8(29), 48313–48320. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15691>