



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO  
DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

**“COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y LA  
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HARINAS COMERCIALES DE  
MAÍZ NIXTAMALIZADAS Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL  
QUIMIOPROTECTOR SOBRE EL ESTADIO TEMPRANO DE  
CÁNCER DE COLON”**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

**Q. EN A. CLAUDIA SÁNCHEZ IBARRA**

DIRIGIDO POR:

**DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA**

QUERÉTARO, QRO. NOVIEMBRE DE 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE HARINAS COMERCIALES DE MAÍZ NIXTAMALIZADAS Y  
EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL QUIMIOPROTECTOR SOBRE EL ESTADIO  
TEMPRANO DE CÁNCER DE COLON”**

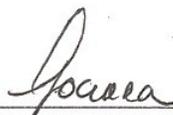
TESIS  
QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:  
**Q. EN A. CLAUDIA SÁNCHEZ IBARRA**

DIRIGIDO POR:  
**DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA**

SINODALES:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Presidente

  
Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Secretario

  
Firma

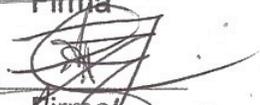
Dra. Minerva Ramos Gómez  
Vocal

  
Firma

Dra. Sandra Mendoza Díaz  
Suplente

  
Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Suplente

  
Firma

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

  
Dr Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre 2012  
México

## RESUMEN

El maíz es el cereal de mayor consumo en México, se ha reportado que contiene compuestos bioactivos con potencial anticarcinogénico en su composición. El principal uso del maíz en México es la producción de harinas y tortillas, donde el grano es sometido a una cocción alcalina conocida como nixtamalización. El proceso de nixtamalización tradicional (NT) incrementa la calidad nutricional de la tortilla; sin embargo, también ocurre la pérdida de nutrientes y la generación de contaminantes ambientales, por ello se han implementado tecnologías alternativas para la producción de harinas de maíz nixtamalizado (HMN), como la Tecnología Limpia (TL). El objetivo del estudio fue evaluar y comparar la composición química y el contenido de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos y fibra dietética total (FT), soluble (FS) e insoluble (FI)) de 4 harinas procesadas industrialmente: H1 y H2 procesadas mediante TL, H3 y H4 procesadas mediante NT; y tortillas elaboradas a partir de estas harinas. Los resultados no presentaron diferencia estadística significativa al comparar la composición química entre las diferentes harinas o tortillas. El contenido de fenoles totales, taninos condensados y flavonoides en las harinas no presentó diferencia estadística significativa; sin embargo, la cocción de la tortilla incrementa significativamente la concentración de fenoles y taninos condensados, y al mismo tiempo reduce el contenido de flavonoides. En general, las tortillas obtenidas mediante TL presentan una mayor concentración de compuestos bioactivos (FI, FT, fenoles totales y flavonoides) que las obtenidas por NT. También se evaluó el potencial quimioprotector de las tortillas sobre el estadio temprano de cáncer de colon, en ratas macho Sprague-Dawley inducidas con azoximetano (AOM) y alimentadas durante 15 semanas con una dieta basal adicionada con 22% de tortilla equivalente al consumo *pér capita* en la zona rural del país. Al finalizar el estudio los animales se sacrificaron y se cuantificó el número de fosas crípticas aberrantes (FCA) en tejido del colon distal. Los resultados muestran que la concentración de tortilla suministrada no disminuyó significativamente el desarrollo de FCA en ratas inducidas químicamente al comparar con el grupo control.

**(Palabras clave:** Maíz (*Zea mays*), nixtamalización, tortilla, cáncer de colon, fosas crípticas aberrantes (FCA))

## SUMMARY

Maize is the most consumed cereal in Mexico. It has been reported that it contains bioactive compounds with anticarcinogenic potential in its composition. The main use of maize in Mexico is for the production of flours and tortillas, in which the grain is submitted to an alkaline cooking, known as nixtamalization. The process of traditional nixtamalization (TN) increases the nutritional quality of the tortilla; however, there is also a loss of nutrients and the creation of environmental contaminants. For this reason, alternative technologies have been implemented for the production of nixtamalized maize flour (NMF), such as the Clean Technology (CT). The objective of this study was to evaluate and compare the chemical composition and content of bioactive compounds (phenolic compounds, and the total dietary fiber (TF), soluble (SF) and insoluble (IF)) of 4 industrially processed flours: H1 and H2 processed with CT, H3 and H4 processed with TN and tortillas made with these flours. Results showed no statistically significant difference upon comparing the chemical composition of the different flours or tortillas. The content of total phenolics, condensed tannins and flavonoids in the flours showed no statistically significant difference; however, cooking the tortilla significantly increases the concentration of phenolics and condensed tannins, while at the same time reducing the content of flavonoids. In general, tortillas obtained using CT have a higher concentration of bioactive compounds (IF, TF, total phenolics and flavonoids) than those obtained using TN. Also was evaluated the chemoprotective potential of tortillas on early stage colon cancer in male Sprague-Dawley rats given azoxymethane (AOM) and fed for 15 weeks with a basic diet to which was added 22% tortilla equivalent to the *per capita* consumption in rural areas of the country. At the end of the study, the animals were sacrificed and the number of aberrant crypt foci (ACF) was quantified in the distal colon tissue. Results show that the concentration of tortillas supplied did not significantly decrease the development of ACF in rats chemically induced when compared with the control group.

**(Key words:** Maize (*Zea mays*), nixtamalization, tortilla, colon cancer, aberrant crypt foci (ACF))

*A mi madre. Por su incanzable e  
incondicional apoyo, cariño y compañía  
en cada uno de mis días.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante mi estancia en el posgrado.*

*A la Dra. Flavia Loarca por confiar en mi capacidad para desarrollar el proyecto y por sus consejos e incondicional apoyo.*

*A los miembros de mi comité de evaluación: Dra. Rosalía Reynoso, Dra. Minerva Ramos, Dra. Sandra Mendoza y Dr. Eduardo Castaño, por el tiempo dedicado para mejorar el presente trabajo.*

*A mis compañeros de generación, especialmente a Ivonne y Ro, por su amistad y apoyo.*

*A Isela, por ser la mejor compañera de laboratorio que jamás haya existido, aunque nunca haya querido lavar mi material.*

*A la Dra. Estelita y al M. en C. Gustavo Pedraza, por permitirme hacer uso de sus instalaciones para realizar algunos análisis.*

*A Laurita y Carmelita por su invaluable ayuda en los miles de trámites administrativos requeridos.*

*A mi familia, quienes constituyen una parte fundamental en mi formación académica y en mi vida.*

*A Fabián, por su compañía, su confianza, y por motivarme a ser siempre una mejor persona.*

*Finalmente, agradezco infinitamente a Dios por el día a día, siempre lleno de bendiciones.*

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>DEDICATORIA</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iv
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	v
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
<b>1. Dieta y enfermedades crónico-degenerativas</b>	3
<b>2. Maíz (<i>Zea mays L.</i>)</b>	4
2.1. Generalidades	4
2.2. Estructura del grano	5
2.3. Composición química	6
2.3.1. Proteínas	6
2.3.2. Lípidos	7
2.3.3. Vitaminas y minerales	7
2.3.4. Compuestos bioactivos	8
2.3.4.1. Fibra dietética	8
2.3.4.2. Compuestos fenólicos	9
2.3.4.2.1. Flavonoides	10
2.3.4.2.2. Taninos	11
2.4. Nixtamalización	12

<b>3. Cáncer</b>	14
3.1. Generalidades	14
3.2. Proceso de carcinogénesis	17
3.3. Cáncer colorrectal (CCR)	20
3.3.1. Carcinogénesis colorrectal	20
3.4. Modelos experimentales de carcinogénesis	23
3.4.1. Azoximetano (AOM)	23
3.4.2. Fosas crípticas aberrantes (FCA)	25
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	27
<b>IV. OBJETIVOS</b>	28
A. General	28
B. Particulares	28
<b>V. ESTRATEGIA GENERAL</b>	29
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	30
<b>A. MATERIALES</b>	30
1. Compuestos químicos	30
2. Material biológico	30
<b>B. MÉTODOS</b>	31
1. Caracterización química y nutracéutica	31
1.1. Análisis proximal	31
1.2. Fibra total	31
1.3. Almidón resistente	32
1.4. Cuantificación de compuestos fenólicos	32

1.4.1. Obtención del extracto metanólico	32
1.4.2. Fenoles totales	32
1.4.3. Taninos condensados	33
1.4.4. Flavonoides	33
1.5. Capacidad antioxidante	33
1.5.1. Método del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbentazonil -6-sulfónico) (ABTS)	33
<b>2. Ensayo <i>in vivo</i></b>	<b>34</b>
2.1. Determinación de fosas crípticas aberrantes (FCA)	36
2.1.1. Tinción con azul de metileno	36
2.1.2. Tinción con hematoxilina y eosina (H&E)	36
2.2. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	37
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
7.1 Caracterización química y nutracéutica de harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas	38
7.1.1. Composición proximal de harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.	38
7.1.2. Contenido de fibra dietética en harina nixtamalizadas de maíz y tortillas.	41
7.1.3. Concentración de fenoles totales, taninos condensados y flavonoides en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.	44
7.2 Capacidad antioxidante de harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.	49
7.3 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto del consumo de tortilla de maíz sobre el desarrollo de fosas crípticas aberrantes inducidas con azoximetano.	51
7.3.1 Efecto de la adición de tortilla de maíz a la dieta, sobre el consumo de alimento, agua y ganancia de peso.	51

7.3.2. Evaluación del consumo de totilla sobre el desarrollo de FCA inducidas en ratas Sprague-Dawley.	54
7.3.3 Multiplicidad de las fosas críticas aberrantes.	58
7.4 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	60
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA</b>	<b>64</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Composición química del grano de maíz y sus fracciones.	6
2.	Grupos de tratamiento para el ensayo <i>in vivo</i> .	35
3.	Contenido de proteína, lípidos, cenizas, humedad y carbohidratos en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.	36
4.	Contenido de fibra dietética insoluble, soluble y total, y almidón resistente en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.	39
5.	Capacidad antioxidante de harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.	47
6.	Multiplicidad de las FCA de los diferentes grupos de tratamiento.	56
7.	Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el contenido cecal y fecal de los diferentes grupos de tratamiento.	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	Estructura del grano de maíz.	5
2.	Estructura química de los compuestos flavonoides presentes en cereales.	11
3.	Estructura química de los taninos condensados.	12
4.	Proceso general de carcinogénesis.	17
5.	Proceso de carcinogénesis colorrectal.	21
6.	Figura 6. Metabolismo del azoximetano (AOM).	24
7.	Diseño experimental del ensayo <i>in vivo</i> .	
8.	Contenido de fenoles totales en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.	43
9.	Contenido de taninos condensados en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.	45
10.	Contenido de flavonoides en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.	46
11.	Consumo de agua de los diferentes grupos evaluados evaluados al inicio (semana 1) y final (semana 15) del periodo experimental.	50
12.	Consumo de alimento de los diferentes grupos evaluados al inicio (semana 1) y final (semana 15) del periodo experimental.	50
13.	Ganancia de peso de los diferentes grupos evaluados.	51
14.	Fosas crípticas aberrantes (FCA) en la región distal del colon para cada grupo de tratamiento. Tinción con (A) azul de metileno y (B) hematoxilina y eosina.	53

## I. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios epidemiológicos han relacionado consistentemente el consumo abundante de alimentos de origen vegetal con una reducción del riesgo a padecer enfermedades de tipo crónico-degenerativas, entre las cuales se encuentra el cáncer (Béliveau y Gingras, 2007). Tal efecto ha sido atribuido, principalmente, a la presencia de un gran número de compuestos que exhiben propiedades quimiopreventivas, tales como los compuestos fenólicos, la fibra y el almidón resistente (Dham *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010).

Una importante fuente de compuestos nutraceuticos o bioactivos es el maíz (*Zea mays* L.) (Bressani *et al.*, 1999a; Adom y Liu, 2002). El maíz (*Zea mays* L.) ha sido la base de la alimentación de las culturas mesoamericanas desde tiempos prehispánicos. En la actualidad es el cereal más importante en México, esto debido en parte a su contribución en la economía del país al ser el cultivo más extenso, y por otro lado, por su importancia nutrimental, ya que es la materia prima fundamental para la elaboración del principal alimento en la dieta del pueblo mexicano: la tortilla (Paredes-López, *et al.*, 2006).

El consumo *per cápita* de tortilla es de aproximadamente 325 g, proporcionando el 70 % de las calorías y 50 % de las proteínas consumidas con la dieta diaria. Por otro lado, el consumo *per cápita* de harinas de maíz nixtamalizado se ha incrementado en los últimos años debido a las múltiples ventajas que se tienen al emplearlas en la elaboración de una gran variedad de productos (tortillas, botanas, pan, etc), reduciendo, entre otras cosas, el tiempo de fabricación en comparación con el empleo del grano de maíz como materia prima (Flores-Farías *et al.*, 2000).

Por otro lado, el cáncer representa un problema de salud pública. A nivel mundial, constituye una de las principales causas de muerte. En México, representa la tercera causa de muerte, y existe una marcada tendencia al incremento de la incidencia de este padecimiento. Dentro de los diversos tipos de

cáncer, el cáncer de colon representa el 6 y 6.02 % de muertes en México, para hombres y mujeres respectivamente (INEGI, 2010).

Debido a la creciente incidencia de cáncer de colon en México y tomando en cuenta los reportes en la literatura que sugieren que los cereales contienen agentes con propiedades quimioprotectoras y que dentro de ellos se encuentra el maíz, el cual es el cereal con mayor consumo en nuestro país, ya sea el grano entero o en forma de harina como materia prima para la elaboración de diversos productos, se considera importante evaluar el contenido de compuestos bioactivos presentes en harinas comerciales de maíz nixtamalizadas, así como su posible efecto quimioprotector en estadios tempranos de cáncer de colon.

## II. ANTECEDENTES

### 1. Dieta y enfermedades crónico-degenerativas

Diversos estudios epidemiológicos han sugerido fuertemente que la dieta desempeña un papel crucial en el control y prevención de enfermedades crónicas, tales como obesidad, diabetes, cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (Hu *et al.*, 2010). Un incremento en el consumo de frutas y vegetales, así como granos y legumbres ha sido ampliamente asociado con la reducción del riesgo a padecer este tipo de enfermedades (Key *et al.*, 2004, Béliveau y Gingras, 2007), atribuyendo el efecto, principalmente, a la presencia de compuestos fitoquímicos en dichos alimentos, tales como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides y compuestos fenólicos, los cuales ayudan a mantener el balance entre compuestos oxidantes y antioxidantes en el cuerpo (Adom y Liu, 2002; Choi *et al.*, 2007; Walter y Marchesan, 2011).

La pérdida del equilibrio en el balance entre compuestos oxidantes y antioxidantes debido a una alteración en su concentración se conoce como 'estrés oxidativo', y se caracteriza principalmente por una sobreproducción de sustancias oxidantes, las cuales muestran capacidad para causar daños a las células y tejidos, entre los que se destaca: a) daño a ciertas biomoléculas (lípidos, ADN y proteínas) y componentes celulares, b) activación de rutas específicas de señalización, c) generación de productos tóxicos, d) cambios en la expresión de genes y actividad de algunas enzimas, y e) la interrupción en los mecanismos de reparación celular. Razones por las cuales el estrés oxidativo ha sido ampliamente relacionado con el desarrollo de enfermedades crónicas (Stanner *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2007).

De forma específica, el consumo de cereales integrales ha sido relacionado con la reducción del riesgo de padecer enfermedades y desórdenes del sistema cardiovascular, la prevención de algunos tipos de cáncer y diabetes, e hipertensión. Los granos enteros contienen carbohidratos complejos (galacto y

fructooligosacáridos), almidón resistente, fibra dietética ( $\beta$ -glucanos y xilanos), vitaminas, minerales, fitoestrógenos y polifenoles. Generalmente los cereales integrales representan una buena fuente de compuestos antioxidantes, los cuales inhiben el estrés oxidativo (Hodzic *et al.*, 2009).

## **2. Maíz (*Zea mays L.*)**

### 2.1. Generalidades

El maíz (*Zea mays L.*) es un cultivo de gran relevancia para los pueblos latinoamericanos y en especial para México, considerado como centro de origen y diversidad (Bedoya y Chávez, 2010). Las pruebas arqueológicas indican que el maíz existió en América en forma silvestre hace 8,000 años. Dos mil años después desempeñaba un papel vital en el desarrollo de las grandes civilizaciones que se establecieron en Mesoamérica, particularmente la Nahua y la Maya (Paredes-López *et al.*, 2006).

La palabra maíz, de origen prehispánico, significa “lo que sustenta la vida”. Este cereal, junto con el trigo y el arroz, es uno de los más importantes a nivel mundial, ya que además de suministrar elementos nutritivos al hombre y a los animales es también, una materia prima básica para la industria del almidón, aceite, proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y recientemente combustibles (FAO, 2004).

En México, es el cultivo más extenso, encabezando la producción anual en cuanto a superficie sembrada, cuyo uso principal es la alimentación humana. De los cereales cultivados, también es el que ocupa la producción principal. De acuerdo con datos oficiales reportados por la SAGARPA, en el 2009 la producción total ascendió a los 20.14 millones de toneladas con un rendimiento de 3.24 ton/ha (SIAP, 2011).

La tortilla es el alimento básico para la población de nuestro país y el grano de maíz es la materia prima fundamental para su elaboración. En México el

consumo diario *per cápita* es de aproximadamente 325 g, proporcionando el 70 % de las calorías y 50 % de las proteínas consumidas con la dieta diaria, así como también el 37 % del calcio requerido por los adultos (Flores-Farías *et al.*, 2000).

## 2.2. Estructura del grano

El grano maduro de maíz está formado por cuatro estructuras físicas fundamentales: a) pericarpio, b) endospermo, c) germen y, d) pedicelo, las cuales se ilustran en la Figura 1 (Paredes-López *et al.*, 2006).

El pericarpio o cáscara comprende el 5 % del peso del grano, está constituido fundamentalmente por hemicelulosa y celulosa, las cuales forman una estructura fibrilar que contiene y protege a las demás estructuras del grano. El endospermo, que comprende aproximadamente el 83 % del peso del grano, posee un alto contenido de almidón y provee los nutrientes para el germinado de la semilla. El germen representa el 11 % del peso del grano, es la estructura a partir de la cual se desarrollará una nueva planta y se caracteriza por un elevado contenido de grasas, proteínas y minerales. El pedicelo es una estructura cónica de tejido inerte que une al grano y al carozo (comúnmente conocido como olote) (Benítez, 2006).

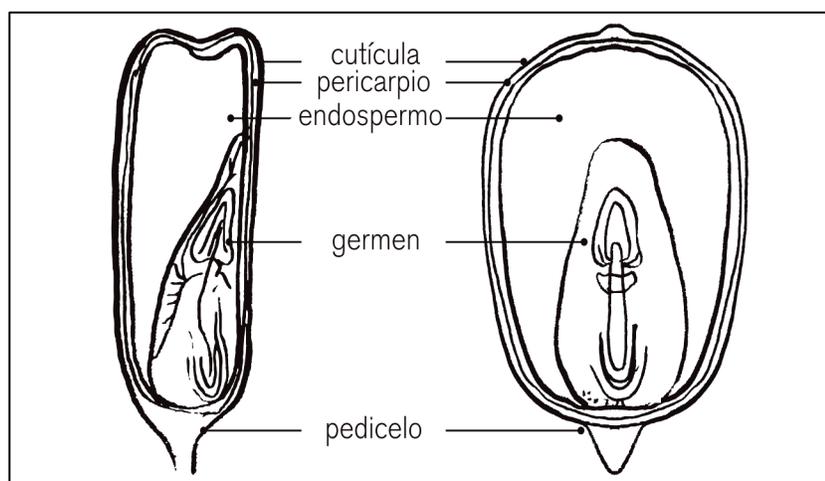


Figura 1. Estructura del grano de maíz (Paredes-López *et al.*, 2009).

### 2.3. Composición química

La composición química del grano de maíz, y por ende su valor nutritivo, dependen del genotipo de la variedad, el ambiente y las condiciones de siembra. En el Cuadro 1 se muestra la composición química del grano de maíz y sus diferentes fracciones.

Cuadro 1. Composición química del grano de maíz y sus fracciones.

	<i>Grano completo</i>	<i>Endospermo</i>	<i>Germen</i>	<i>Pericarpio</i>	<i>Pedicelo</i>
Proteínas %	10.3	9.4	18.8	3.7	9.1
Lípidos %	4.8	0.8	34.5	1.0	3.8
Azúcares %	2.0	0.6	10.8	0.3	1.6
Cenizas %	1.4	0.3	10.1	0.8	1.6
Almidón %	71.5	86.4	8.2	7.3	5.3

(Paredes-López, *et al.*, 2006)

#### 2.3.1. Proteínas

El contenido promedio de proteína en el grano de maíz es del 10 % (Cuadro 1), concentrando la mayor parte (18.8 %) en el germen del grano. No obstante, tanto el endospermo como el pedicelo llegan a tener hasta 9 % de proteínas, las cuales pueden ser clasificadas en cuatro tipos de acuerdo con su solubilidad: a) albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en soluciones alcohólicas) y glutelinas (solubles en soluciones alcalinas o ácidas diluidas) (Paredes-López *et al.* 2006).

Las prolaminas (también llamadas zeínas) y las glutelinas se localizan principalmente en la matriz proteínica del endospermo, y ambas constituyen aproximadamente el 90 % de las proteínas del grano completo, mientras que las

albúminas y globulinas son las principales estructuras localizadas en el germen del grano (Paredes-López *et al.*, 2009).

El maíz, como la mayoría de los cereales, es deficiente en los aminoácidos esenciales lisina y triptófano (de hecho la zeína carece de este), razón por la cual las proteínas presentes en el grano de maíz son consideradas de bajo valor nutricional (Figueroa *et al.*, 2001).

### 2.3.2. Lípidos

El contenido de lípidos varía de acuerdo a la proporción de germen presente en el grano y su contenido de aceite. En general, los lípidos representan aproximadamente el 5 % en peso del grano de maíz, y cerca del 85 % están presentes en el germen. El principal ácido graso presente en el maíz es el ácido linoléico (50 %), seguido del ácido oléico (35 %), el ácido palmítico (13 %), el ácido esteárico (<4 %) y el linolénico (<3 %) (Bressani, 1990).

### 2.3.3. Vitaminas y minerales

El maíz contiene dos vitaminas liposolubles,  $\beta$ -caroteno o provitamina A y  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E, además de gran parte de las hidrosolubles. El maíz amarillo es una buena fuente de provitamina A; sin embargo ésta se pierde paulatinamente con un almacenamiento prolongado. Por otro lado, el contenido de niacina en el grano de maíz es muy alto en comparación con los requerimientos mínimos, pero no está presente en forma disponible para ser asimilada por el cuerpo humano (Paredes-López *et al.*, 2006).

El maíz es considerado como una fuente importante de algunos minerales y vitaminas. En general, el pericarpio, el germen y la capa aleurona son ricos en estos constituyentes. El germen proporciona cerca del 78 % de todos los minerales presentes en el grano (FAO, 2004). El elemento inorgánico más abundante es el fósforo, el cual se encuentra presente en forma de fitato de

potasio y magnesio representando cerca del 0.25 % del grano seco; este compuesto interfiere en la absorción intestinal de muchos minerales esenciales. Otros elementos importantes presentes en el grano son el potasio, el calcio y el selenio (Bressani *et al.*, 1990a). El zinc, elemento de gran interés para la salud humana, se encuentra presente en el grano pero en niveles bajos en comparación con los requerimientos mínimos diarios (Paredes-López *et al.*, 2009).

#### 2.3.4. Compuestos bioactivos

##### 2.3.4.1. Fibra dietética

En una forma simple, los carbohidratos pueden ser separados en dos grupos básicos basados en su digestibilidad en el tracto gastrointestinal. En el primer grupo se ubican los carbohidratos simples o polisacáridos no fibrosos como el almidón y los azúcares simples, los cuales son fácilmente absorbidos e hidrolizados en el intestino delgado. En el segundo grupo se ubican la celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y el almidón resistente; estos carbohidratos complejos resisten la digestión en el intestino delgado, llegando intactos al intestino grueso (Lattimer y Haub, 2010).

Escudero y González (2006), definen la fibra dietética (FD) como un grupo heterogéneo de compuestos de origen vegetal, que resisten la hidrólisis de enzimas digestivas del ser humano, incluida la fibra (soluble e insoluble), el almidón resistente, y oligosacáridos tales como la inulina.

Hoy en día, la fibra es reconocida como un elemento importante para la sana nutrición. Entre los beneficios a la salud atribuidos a la ingesta de fibra dietética, Dham *et al.* (2010) asociaron su consumo con la prevención del riesgo a padecer cáncer colorrectal.

En un sentido estricto, casi el 100% de la fibra dietaria llega al colon. El destino o función de la fibra en el colon dependerá tanto de la microbiota colónica como de las características fisicoquímicas de la fibra en sí. De tal modo que,

basados en sus características fisicoquímicas, la fibra puede dividirse en dos grupos: a) insoluble o escasamente fermentable, y b) soluble o altamente fermentable (Hamer, 2009).

La fermentabilidad de la fibra juega un papel muy importante para la protección contra el cáncer de colon. La fibra insoluble puede acelerar el paso de las heces fecales a través del colon limitando el acceso de los constituyentes fecales (entre los cuales podrían localizarse agentes carcinógenos, procarcinógenos y promotores de tumores) a la mucosa colónica. En contraste, la fibra soluble al ser altamente fermentable produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC) , principalmente acético (C2), propiónico (C3) y butírico (C4), los cuales ejercen protección contra el cáncer de colon (Lupton, 2004; Young *et al.*, 2005).

La concentración total y la relación molar de los principales AGCC depende tanto del sitio de fermentación y la composición de la microbiota intestinal. especialmente la producción de ácido butírico en el intestino grueso es considerado de gran importancia, ya que además de ser una fuente de energía para las células epiteliales del colon reduce el desarrollo de células cancerosas mediante la inhibición de la proliferación celular y la promoción de la diferenciación y apoptosis (Lupton, 2004; Hamer, 2009).

#### 2.3.4.2. Compuestos fenólicos

Además de la fibra dietética, los granos enteros contienen otro tipo de componentes que ayudan a promover la salud, tales como los fitoquímicos, dentro de los cuales se incluyen a los compuestos fenólicos (Adom y Liu, 2002).

Los compuestos fenólicos son sustancias químicas ampliamente distribuidas en las plantas como producto de su metabolismo secundario, algunos de los cuales son indispensables para su funcionamiento y otros son útiles en los mecanismos de defensa bajo situaciones de tensión (Walter y Marchesan, 2011). Estos compuestos también poseen propiedades biológicas, como son:

antioxidante, antiapoptosis, anticarcinogena y antiinflamatoria, por destacar solo algunas (Widlansky *et al.*, 2005; Węsierska *et al.*, 2006; Johnson y Mukhtar, 2007; Sergent *et al.*, 2010).

De forma general, un compuesto fenólico es definido como cualquier compuesto que contiene en su estructura un anillo bencénico con uno o más grupos hidroxilo (Dykes y Rooney, 2007). Los polifenoles, son los antioxidantes mas abundantes en la dieta humana; en la actualidad se conocen más de 8000 variantes estructurales de estos compuestos; de acuerdo al número de anillos aromáticos que presentan y los elementos estructurales ligados a este, estos compuestos pueden ser divididos en cuatro grupos: 1) ácidos fenólicos, que pueden ser subdivididos en derivados de los ácidos hidroxibenzóicos, como el ácido gálico y derivados del ácido hidroxicinámico, como los ácidos caféico, ferúlico y cumárico; 2) flavonoides, donde se incluyen los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles; 3) estilbenos, y 4) lignanos y ligninas poliméricas (Han *et al.*, 2007).

Por otro lado, en los cereales los compuestos fenólicos pueden clasificarse como: a) solubles, b) insolubles y c) ligados. La mayor proporción de los compuestos fenólicos presentes en los granos de cereales se encuentra en la forma insoluble (aproximadamente el 74 % y 69 % de los fenoles presentes en arroz y maíz respectivamente) unidos a los materiales de la pared celular, siendo el ácido ferúlico el principal compuesto presente (0.92  $\mu\text{mol}$  de ác. ferúlico/100 g de grano de maíz) (Adom y Liu, 2002).

#### 2.3.4.2.1. Flavonoides

Los flavonoides son los principales compuestos fenólicos de las plantas, y por lo tanto, los más abundantes en la dieta humana (Han *et al.*, 2007). Están formados por 15 átomos de carbono organizados en dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos (esqueleto  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ ); en este grupo se incluyen las antocianidinas, flavanoles, flavonas, flavanonas y flavonoles, cuyas

estructuras químicas se muestran en la Figura 2; en los granos de los cereales, estos compuestos se localizan en el pericarpio (Dykes y Rooney, 2007).

Adom y Liu (2002), reportaron un mayor contenido de flavonoides totales en el grano de maíz (1.68  $\mu\text{mol eq. catequina/g}$ ) en comparación con otros cereales analizados, como es el trigo (1.24  $\mu\text{mol eq. catequina/g}$ ), la avena (1.16  $\mu\text{mol eq. catequina/g}$ ) y el arroz (0.92  $\mu\text{mol eq. catequina/g}$ ).

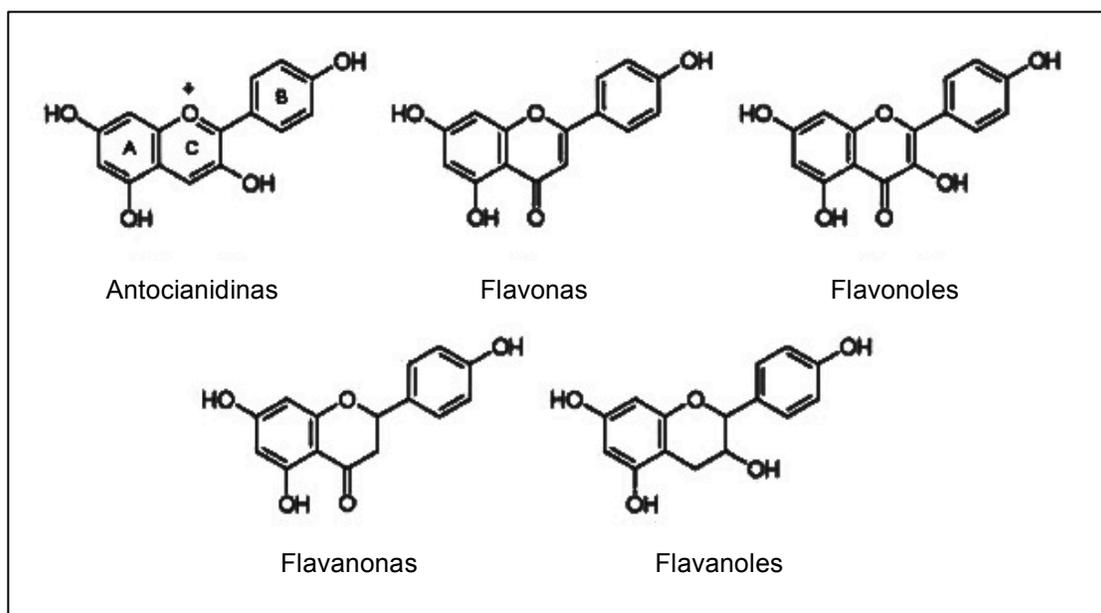


Figura 2. Estructura química de los compuestos flavonoides presentes en cereales (Dykes y Rooney, 2007).

#### 2.3.4.2.2. Taninos

Los taninos forman otro grupo de polímeros fenólicos con propiedades de defensa para las plantas, estos presentan alta solubilidad en agua y pueden ser divididos en dos grupos: a) condensados y b) taninos hidrolizables. Los taninos condensados, también llamados proantocianidinas o procianidinas, son formados por la polimerización de unidades de flavonoides (Figura 3). Los taninos

hidrolizables son polímeros heterogéneos de ácidos fenólicos, especialmente ácido gálico, y azúcares simples (Walter y Marchesan, 2011).

Este tipo de compuestos, es comúnmente encontrado formando complejos con proteínas, polisacáridos y minerales, lo cual disminuye la digestibilidad de estos nutrientes y reduce la eficiencia de los alimentos durante la alimentación de rumiantes y monogástricos (Dykes y Rooney, 2007).

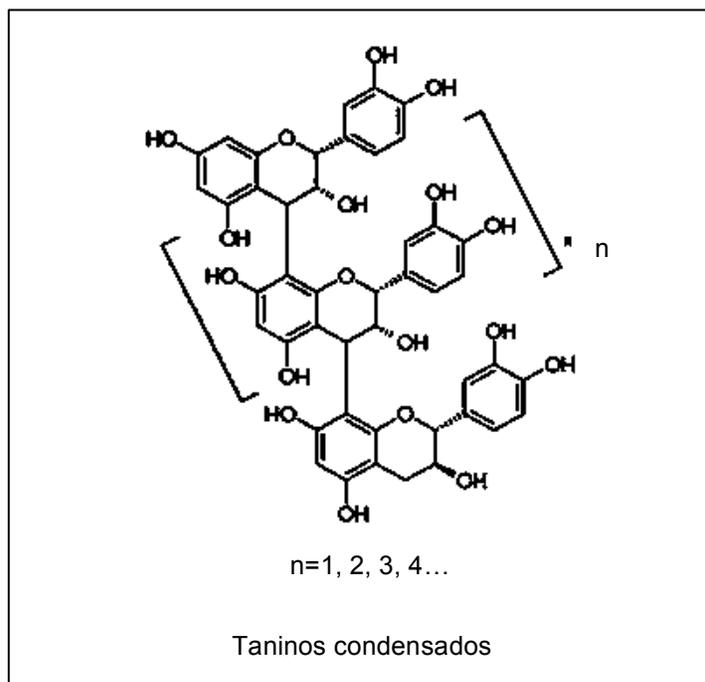


Figura 3. Estructura química de los taninos condensados (Dykes y Rooney, 2007).

#### 2.4. Nixtamalización

La nixtamalización, es un proceso tradicional mexicano desarrollado por las civilizaciones Mesoamericanas, consiste en la cocción del grano de maíz en una solución alcalina de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Actualmente, en México y algunos países de Centro América, este proceso continúa vigente y es utilizado para la elaboración de múltiples alimentos a base de maíz como tortillas, tamales,

totopos, así como también harinas instantáneas que facilitan la preparación de dichos alimentos (Carvajal-Millán, 2007; Méndez-Montealvo *et al.*, 2007).

La nixtamalización implica un tratamiento selectivo de las proteínas del maíz incrementa el balance de aminoácidos esenciales y libera niacina que de otra manera permanecería sin ser aprovechada. Asimismo, el proceso de nixtamalización provee beneficios como la alta disponibilidad de calcio en la tortilla (Figueroa *et al.*, 2001).

Diversos investigadores han descrito el método tradicional de nixtamalización del maíz utilizado en las zonas rurales de los países consumidores de tortilla. Paredes-López *et al.* (2006) describen que el proceso de nixtamalización consiste en mezclar una parte de maíz con dos partes de una solución de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) a una concentración del 1%. Esta preparación se cuece de 50 a 90 minutos (dependiendo del tipo y variedad de maíz), y se deja remojando en el agua de cocción de 14 a 18 horas. Posterior al remojo, el agua de cocción, conocida como nejayote, se retira y el maíz se lava dos o tres veces con agua hasta que quede sin residuos de hidróxido. El producto obtenido es conocido como maíz nixtamalizado o nixtamal.

Este tratamiento causa profundos cambios en la estructura, composición química, y valor nutricional de los alimentos. Uno de los cambios es la remoción parcial del pericarpio debido al tratamiento alcalino, el cual debilita las paredes del grano facilitando su eliminación (De la Parra *et al.*, 2007). Durante el proceso, un alto porcentaje de los sólidos solubles (tales como vitaminas, minerales, proteínas, lípidos y carbohidratos) son eliminados en el nejayote. También cerca del 64% (en peso) del pericarpio se pierde debido al tratamiento, en el cual se encuentra aproximadamente del 2 al 4% del total del peso del grano. El pericarpio residual es necesario para el desarrollo de las características adecuadas de la masa y la tortilla (Arámbula *et al.*, 2002).

La cocción alcalina y el remojo provocan la disolución y el hinchamiento de las capas del pericarpio (esto hace que las paredes celulares y los componentes

de esta parte del grano se vuelvan frágiles) facilitando su remoción, lo cual disminuye el contenido de fibra insoluble. Sin embargo existe un incremento en el contenido de fibra soluble en comparación con el grano de maíz sin cocción (Paredes-López *et al.*, 2008).

El contenido de grasa se reduce debido a la saponificación e hidrólisis de los ácidos grasos, principalmente el ácido linoléico. Así mismo, existe una disminución importante en el contenido de algunas proteínas que son solubles en condiciones térmico alcalinas, como es el caso de las gluteninas; sin embargo la calidad de las proteínas que permanecen en el nixtamal mejora notablemente debido a un incremento en la biodisponibilidad de algunos aminoácidos en las fracciones peptídicas después de la hidrólisis de las proteínas (Figuroa *et al.*, 2001).

Hoy en día existen en el mercado harinas instantáneas de maíz nixtamalizadas por un método ecológico, lo que ha permitido incrementar el contenido de fibra y evitar la producción de nejayote. Sin embargo estas harinas no han sido evaluadas en cuanto a su contenido de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos, fibra dietética, almidón resistente), así como su potencial nutracéutico.

### **3. Cáncer**

#### **3.1. Generalidades**

El cuerpo humano está compuesto por cientos de millones de células vivas. Las células normales del cuerpo, crecen, se dividen y mueren de una manera ordenada y oportuna; estos procesos están fuertemente regulados por los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Zhivotovsky y Orrenius, 2006). Todas las células de un organismo están en continua comunicación, ya sea de forma indirecta a través del intercambio de compuestos

mensajeros tales como las hormonas y los factores de crecimiento, o de forma directa mediante el contacto célula-célula a través de moléculas de adhesión celular. Una adecuada comunicación celular, permite un balance adecuado entre la proliferación y la apoptosis o muerte celular (Huston, 2006).

El cáncer puede definirse como un trastorno en los mecanismos celulares que rigen la proliferación normal de las células y la homeostasis. Existen más de 100 tipos distintos de cáncer, clasificados de acuerdo al tejido u órgano a partir del cual se originan las células cancerosas (Hanahan y Weinberg, 2000). Este padecimiento se distingue de muchas otras enfermedades humanas debido a que la causa principal no es la falta o reducción de la función celular (Chow, 2010).

Las células cancerosas son descendientes de células normales en las cuales algún tipo de estrés interno o externo provoca una modificación en su material genético, es decir, una mutación (Park y Lee, 2003). Una única mutación no es suficiente para convertir una célula sana en una célula cancerosa que prolifere sin restricciones. El desarrollo de neoplasias se basa en la existencia de varias mutaciones, y aunque el número exacto no es conocido, en la mayoría de los casos se supone que este varía entre los distintos tejidos y especies afectados. Si el daño causado por la mutación alcanza a un gen responsable del desarrollo de neoplasias entonces la probabilidad de desarrollar cáncer es mayor (Oliveira *et al.*, 2007).

La multiplicación no controlada de células cancerosas o dañadas puede conducir a la formación de un tumor o neoplasia, el cual se define como la aglomeración de células generadas a partir de una misma célula mutada (Chow, 2010). Sin embargo, no todas las neoplasias son cancerosas, estas pueden ser clasificadas como benignas o malignas dependiendo de sus características celulares. Las células constituyentes de una neoplasia maligna muestran aún más cambios en sus funciones biológicas: proliferan de forma autónoma, se diferencian por sí mismas, invaden tejidos adyacentes y con frecuencia generan metástasis en tejidos que no están relacionados con la neoplasia primaria. Las células que

forman parte de una neoplasia benigna, desarrollan más lentamente, y en general, no alteran la función normal del tejido a menos que compriman estructuras vitales (Oliveira *et al.*, 2007).

Los factores responsables del desarrollo del cáncer son clasificados en dos grupos: a) exógenos, dentro de los cuales se incluyen los hábitos nutricionales, socioeconómicos, estilo de vida, agentes físicos, compuestos químicos y agentes biológicos, y b) endógenos, en el cual se incluyen daños al sistema inmune, la inflamación causada por etiologías inciertas, edad, balance endocrino y condición fisiológica (Gooderham y Carmichael, 2007; Oliveira *et al.*, 2007; Sutandyo, 2010).

Los carcinógenos químicos causan alteraciones genéticas y epigenéticas en las células susceptibles, impartiendoles una ventaja de crecimiento selectivo (Gooderham y Carmichael, 2007; Lawrence y Harris, 2008). Estos compuestos pueden ser clasificados en dos grupos: a) agentes genotóxicos o carcinógenos genéticos, y b) agentes no genotóxicos o carcinógenos epigenéticos. Los agentes genotóxicos inician su actividad a nivel del ADN, causando daño a través de diferentes mecanismos, entre los que se incluyen las mutaciones puntuales en genes, eliminación o inserción de bases, recombinaciones, rearrreglos y amplificaciones, y aberraciones cromosomales. La mayoría de los agentes genotóxicos son microcomponentes de la nutrición, entre ellos se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos, aflatoxinas y N-nitrosamina. Los agentes no genotóxicos son menos definidos en su modo de acción, pero se presume que afectan indirectamente a la célula actuando como promotores tumorales (ya que no reaccionan directamente con el ADN) modulando el crecimiento y muerte celular. Este tipo de compuestos son específicos para un tejido o especie y su acción está limitada por su concentración. Estos agentes son generalmente macrocomponentes de la dieta, tales como las grasas, proteínas, etc. Los agentes no genotóxicos junto con los agentes genotóxicos incrementan el riesgo de carcinogénesis, aunque usualmente se requiere de largas exposiciones (Oliveira *et al.*, 2007; Sutandyo, 2010).

### 3.2. Proceso de carcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso complejo multifásico, que involucra una gran cantidad de eventos o alteraciones que ocurren a nivel celular, molecular y morfológico. Dichas alteraciones conducen a la transformación progresiva de las células normales en derivados de alta malignidad. Desde el punto de vista operacional, el proceso puede ser dividido en tres estados: a) iniciación, b) promoción, y c) progresión, los cuales son mostrados en la Figura 4 (Gooderham y Carmichael, 2007; Oliveira *et al.*, 2007; Sutandyo, 2010).

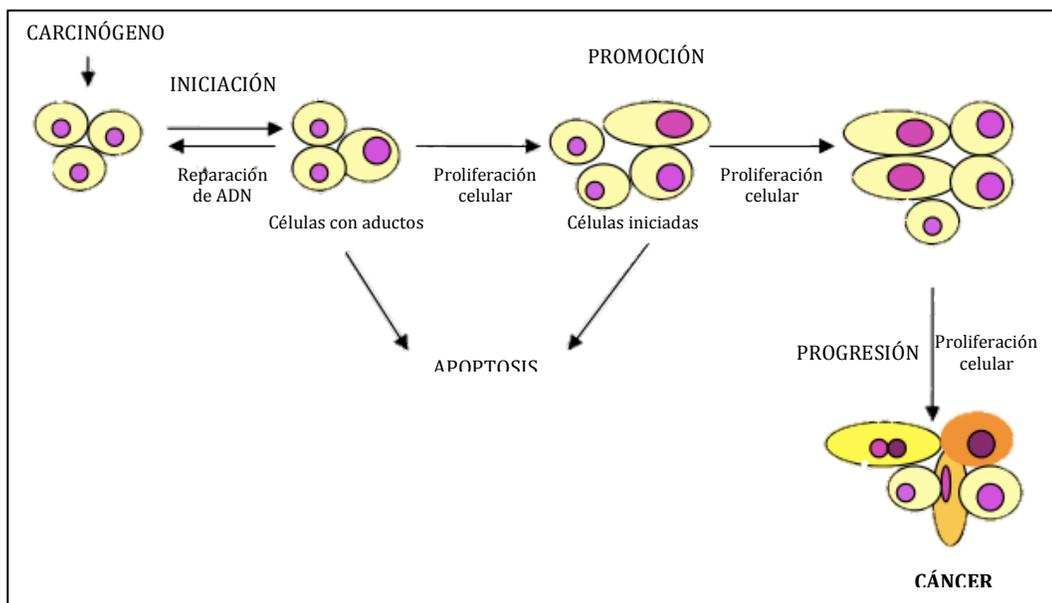


Figura 4. Proceso general de carcinogénesis (Sun *et al.*, 2004).

La fase de iniciación, es un acontecimiento irreversible y relativamente rápido, que se produce cuando una célula ha sido expuesta a la acción de un agente carcinógeno (Sun *et al.*, 2004), el cual es responsable de los cambios genéticos irreparables que predisponen a las células normales susceptibles a la evolución maligna. La célula iniciada no es una célula neoplásica, pero ha dado el primer paso hacia este estado, después de que se han producido sucesivos

cambios en sus características genotípicas y fenotípicas (Sun *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007).

La proliferación celular es esencial en esta etapa, ya que si la división celular se produce antes de que los sistemas de reparación del ADN puedan actuar, la lesión será permanente e irreversible.

Las células iniciadas pueden permanecer latentes durante semanas, meses o años. No todas las células de un organismo vivo expuesto a un agente iniciador pueden ser iniciadas, incluso si estas han sufrido mutaciones, y los genes que regulan la diferenciación también han sido mutados. En los organismos vivos existen células iniciadas espontáneamente, las cuales surgen debido a los errores naturales producidos durante en la replicación del ADN, aunque su incidencia es menor comparada con la iniciación inducida por agentes carcinógenos (Oliveira *et al.*, 2007).

La fase de promoción, es un largo proceso que puede requerir varios años o décadas para poder establecerse. Consiste, principalmente, en la expansión de las células mutadas (durante la fase de iniciación) para establecer una lesión premaligna multicelular (Lawrence y Harris, 2008). Los agentes promotores no actúan directamente sobre el ADN, su actividad más importante es durante la mitogénesis, por lo que las acciones genotóxicas y mutacionales no son importantes en esta etapa. Por otro lado, los promotores pueden dañar indirectamente al ADN mediante oxidación; en un principio, estos hechos estaban asociados con mecanismos epigenéticos, pero hoy en día es ampliamente aceptado que la promoción también implica cambios genéticos (Gooderham y Carmichael, 2007).

A medida que la población de células iniciadas se expande durante la promoción, las células individuales adquieren un mayor daño genético, el cual puede ser mediado por un agente o ser espontáneo, introduciendo de este modo

la heterogeneidad genética en la población promovida (Gooderham y Carmichael, 2007).

La eficiencia de un agente promotor depende de su concentración en el tejido blanco. Algunos agentes promotores son específicos para un determinado tejido, pero otros actúan de forma simultánea en varios tejidos. La promoción, es una etapa reversible, ya que una vez que el promotor desaparece puede ocurrir un retroceso en la proliferación celular, probablemente por apoptosis (Oliveira *et al.*, 2007).

La secuencia de las lesiones identificadas, a través de histopatología, entre la iniciación y la promoción son designadas como lesiones preneoplásicas o neoplasias benignas. Su transformación en lesiones malignas es la última de las etapas de la carcinogénesis, conocida como progresión. Durante esta etapa, la proliferación celular es completamente independiente de la presencia de estímulos. La progresión es caracterizada principalmente por la irreversibilidad, la inestabilidad genética, el rápido crecimiento, la invasión o metastización, y cambios en las características bioquímicas, metabólicas y morfológicas de las células (Gooderham y Carmichael, 2007; Oliveira *et al.*, 2007).

La metástasis, es la propagación de las células cancerosas desde su sitio primario a un órgano distante. Durante esta etapa las células cancerosas pierden la capacidad de adherirse a las células vecinas y adquieren capacidad migratoria e invasiva. La degradación de la matriz extracelular y los componentes de la membrana basal por la acción de proteasas, permite a las células cancerosas penetrar la membrana basal, invadiendo los tejidos circundantes y accediendo directamente a los vasos sanguíneos y linfáticos, a través de los cuales pueden diseminarse por todo el cuerpo (Chia *et al.*, 2010).

La angiogénesis, es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, y es esencial para la progresión neoplásica y el desarrollo de metástasis de los tumores, ya que en su ausencia el desarrollo del tumor es

restringido a pocos milímetros de diámetro debido a la restricción física para la difusión simple de los nutrientes y el oxígeno (Chia *et al.*, 2010).

### 3.3. Cáncer colorrectal (CCR)

El cáncer colorrectal (CCR) es reconocido como la segunda causa más común de cáncer en países desarrollados, presentándose con mayor incidencia en los países de occidente. Este hecho es atribuido principalmente al tipo de dieta que predomina, la cual consiste en una elevada ingesta de grasas saturadas y una baja ingesta de fibra (Fearnhead *et al.*, 2002; Salucci *et al.*, 2002; Panala *et al.*, 2009; Sutandyo, 2010). De acuerdo con datos reportados por la Sociedad Americana de Cáncer (ACS, por sus siglas en inglés), en el 2010 en los Estados Unidos de Norte América se diagnosticaron 142, 570 nuevos casos de CCR y 51,370 muertes fueron atribuidas a este padecimiento (Jemal *et al.*, 2010). En México se estima que la incidencia de CCR se ha triplicado en la última década, en el 2010 se reportó que el 6.0 y 6.02 % de las muertes en el país, para hombre y mujeres respectivamente, fueron a causa de esta enfermedad (INEGI, 2010).

#### 3.3.1. Carcinogénesis colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) se caracteriza por distintos eventos genético, morfológicos y celulares, los cuales se encuentran influenciados por factores ambientales, genéticos y epigenéticos (Riehl *et al.*, 2006). Se conocen dos formas fundamentales de este padecimiento: a) esporádica y b) hereditaria. La mayoría de los casos de CCR son esporádicos, una minoría significativa se producen como resultado de una mutación genética heredada. Las formas hereditarias de CCR más conocidas son la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) y el Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipoideo (CCHNP), debidas a alteraciones genéticas transmitidas por la línea germinal (Fearnhead *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2006).

La poliposis adenomatosa familiar (PAF), es una enfermedad autosómica dominante en la que se desarrollan múltiples pólipos adenomatosos en el colon durante la segunda o tercera década de vida. Estos pólipos son histológicamente idénticos a los que se desarrollan en el cáncer colorrectal esporádico y, aunque poseen un bajo riesgo de malignización, su elevado número aumenta el riesgo de padecer la enfermedad en edad adulta. El cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (CCHNP), es descrito como una predisposición autosómica al padecimiento de cáncer colorrectal, que carece de la elevada poliposis característica de FAP. Como características clínicas de HNPCC se incluyen la asociación con otros tumores, la predilección por el lado derecho del colon y una alta frecuencia de tumores mucinosos poco diferenciados con alta probabilidad de invasión (Catalán *et al.*, 2003).

La carcinogénesis colorrectal implica la transformación de una célula normal de la mucosa del epitelio a un carcinoma colorrectal a través de etapas bien definidas a nivel histológico representadas en la Figura 5 (Takhar *et al.*, 2004).



Figura 5. Proceso de carcinogénesis colorrectal (Takhar *et al.*, 2004)

El adenoma o pólipo adenomatoso, es una neoplasia benigna y aunque se acepta generalmente que el CCR surge a partir de los adenomas colónicos, se sabe que la mayoría de estos no se desarrollan para formar carcinomas, si bien, la mayor parte del CCR humano proviene de adenomas displásicos (Chen *et al.*, 2005).

A nivel microscópico, el colon posee criptas que tienen una profundidad aproximada de 50 células. En el epitelio sano del colon se produce una renovación casi constante y normal del epitelio superficial, aproximadamente cada seis días, mediante proliferación celular y diferenciación de las células de la cripta. La proliferación de los enterocitos se lleva a cabo en la porción inferior de la cripta, y se caracteriza por sufrir mitosis, debido a que las células del colon migran hacia la parte superior de la cripta alejándose de las células madre.

La diferenciación y la maduración de las células nuevas se llevan a cabo a medida que estas suben a lo largo de la cripta. Las células maduras pierden su capacidad de dividirse de nuevo y finalmente mueren por apoptosis y se desprenden hacia la luz intestinal. En el adenoma esta secuencia está alterada, por lo tanto ocurre una mitosis continua y las células no sufren la diferenciación, de manera que el compartimento donde proliferan puede llegar a ocupar la cripta completa (Potter, 1999).

La transformación de adenoma a carcinoma implica una cascada de fallos genéticos que afectan diferentes genes como son: a) genes reparadores del ADN, que codifican factores esenciales para mantener la fidelidad de la replicación, b) oncogenes, los cuales codifican proteínas que están implicadas en el crecimiento y la diferenciación celular, y c) genes supresores de tumores, cuya función es la de inhibir la proliferación celular. La acumulación de estas alteraciones genéticas en el epitelio colónico requiere algunos años, normalmente décadas.

### 3.4. Modelos experimentales de carcinogénesis

Una forma de estimar la etiología, el tratamiento y la prevención del cáncer es mediante los modelos experimentales en animales empleando carcinógenos conocidos. Estos modelos permiten al investigador analizar el papel de los factores ambientales, la dieta y algunos parámetros inmunológicos que son importantes en la etiología del cáncer.

#### 3.4.1. Azoximetano (AOM)

La 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y su metabolito el azoximetano (AOM) son agentes ampliamente utilizados para la inducción de carcinogénesis colorrectal en roedores. Estos compuestos precarcinogénicos requieren de activación metabólica para formar productos reactivos para el ADN. El metabolismo de estos compuestos involucra varios sistemas enzimáticos, como se ilustra en la Figura 6, los cuales llevan a cabo reacciones de oxidación y N-hidroxilación. En el hígado, el azoximetano puede ser transformado en metiazoximetanol (MAM) mediante una reacción de hidroxilación mediada por el complejo citocromo P450 (CYTP450), específicamente la isoforma CYP2E1 (enzima de fase I). Debido a que el MAM es muy inestable a la temperatura corporal, se descompone hasta formar el metabolito carcinogénico final: el ión metildiazonio, altamente reactivo. Este compuesto es responsable de la metilación de bases del ADN de varios órganos, incluyendo las células epiteliales en el compartimiento proliferativo de las criptas, lo cual se traduce en una gran pérdida de células colónicas por apoptosis, un aumento en la proliferación y un aparente incremento en las mutaciones de las células epiteliales del colon (Sohn *et al.*, 2001; Rosenberg *et al.*, 2009; Perše y Cerar, 2011).

Por otro lado, el MAM también puede conjugarse con ácido glucorónico (enzima de fase II) y ser eliminado vía riñón (orina) o intestino (bilis). Al ser excretado en bilis el conjugado llega al intestino, donde puede ser biotransformado

por la enzima  $\beta$ -glucoronidasa de la probiota y generar metazoximetanol, el cual por su reactividad, produce nuevamente el ión metildiazonio; el desarrollo de tumores en el intestino delgado distal a la entrada del conducto biliar se atribuye a esta ruta, aunque también puede entrar directamente a las células epiteliales del colon a partir del torrente circulatorio (Perše y Cerar, 2011).

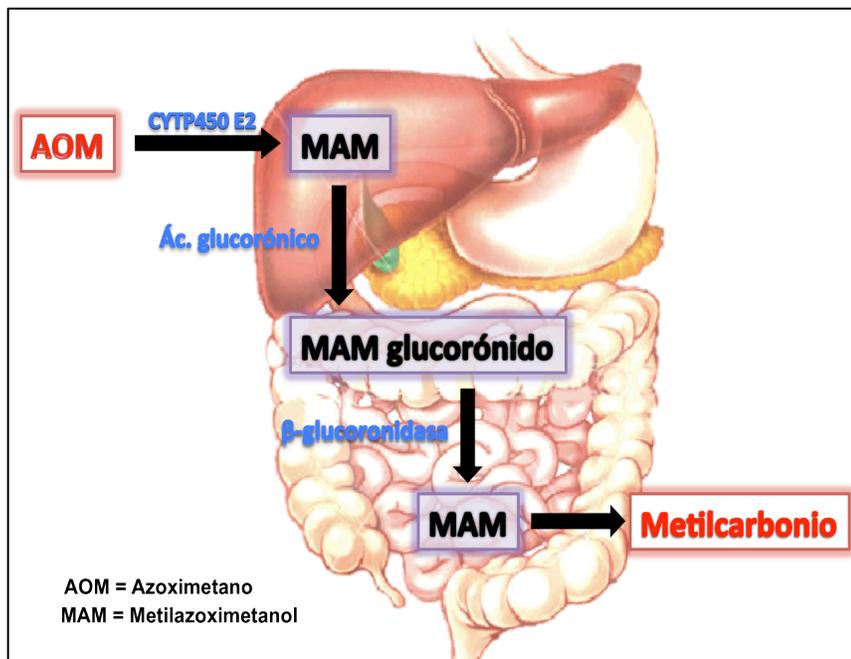


Figura 6. Metabolismo del azoximetano (AOM).

El DMH y AOM son carcinógenos altamente específicos que inducen tumores en colon de una forma dependiente de la dosis. Diversas cepas de ratas y ratones, difieren en la susceptibilidad a estos carcinógenos; esta variación en la susceptibilidad también es dependiente del sexo y la edad de los animales. Generalmente para llevar a cabo estudios *in vivo* sobre carcinogénesis colónica se utilizan ratas F344, Sprague-Dawley y Wistar, machos, de 6 semanas de edad; la carcinogénesis es inducida por dos aplicaciones de DMH (150 mg/kg) o AOM (15 mg/kg) administradas con una semana de diferencia. Siguiendo este protocolo, los animales son evaluados por la presencia de biomarcadores intermedios de la carcinogénesis colónica denominados fosas cripticas aberrantes (FCA), 8-12

semanas después de la aplicación del carcinógeno (estudio a corto plazo), o por el número de tumores colónicos 40 semanas después (estudio a largo plazo) (Perše y Cerar, 2011).

Las neoplasias colónicas proximales en el humano presentan características distintas en cuanto a histología y genética molecular. Por lo general son menos diferenciados y tienen una mayor propensión a la inestabilidad de microsatélites que los distales. La mayoría de los tumores de colon en el modelo de rata DMH/AOM se encuentran en el colon distal, mientras que son menos frecuentes en el colon proximal. Histológicamente, los tumores en el colon distal son comúnmente adenomas y adenocarcinomas bien o moderadamente diferenciados; en el colon proximal, los tumores son en su mayoría pobremente diferenciados o mucinosos. Además, la densidad de FCA es significativa y progresivamente mayor del colon proximal hacia el distal, siendo más elevado en el colon medio y distal, lo cual concuerda con la localización de los adenomas y carcinomas (Pěrse y Cerar, 2011).

#### 3.4.2. Fosas crípticas aberrantes (FCA)

Las FCA son las primeras lesiones en el desarrollo del cáncer colorrectal que pueden ser identificadas microscópicamente sobre la superficie de la mucosa colónica después de la tinción con azul de metileno. Ellas han sido identificadas en roedores tratados con carcinógenos y en humanos en alto riesgo de desarrollar cáncer de colon (de acuerdo con su historia personal o familiar). Una serie de estudios en roedores y humanos, incluyendo el análisis molecular, han demostrado que las FCA son lesiones que representan un valioso biomarcador intermedio en el desarrollo de la carcinogénesis colónica. Las FCA hasta la fecha han sido utilizadas como un punto final en la identificación y evaluación de la función preventiva o de promoción de compuestos naturales y farmacológicos, así como de factores dietéticos y ambientales en el proceso de carcinogénesis colónica. Un incrementado número de estudios ha demostrado que las FCA, tanto

en animales como en humanos, son un grupo heterogéneo de lesiones que contienen múltiples alteraciones genéticas, epigénéticas y fenotípicas. Cuando se utilizan las FCA como biomarcador, es importante tomar en cuenta que estas son un grupo heterogéneo de lesiones; el número total de FCA sólo puede ser considerado como un biomarcador viable en estadios muy tempranos de la carcinogénesis, también es importante mencionar que las FCA no se distribuyen por igual entre el colon proximal, medio o distal (su principal desarrollo es en el colon medio y distal) (Perše y Cerar, 2011).

### III. JUSTIFICACIÓN.

En las últimas décadas se ha observado un incremento en la incidencia de enfermedades crónico degenerativas, un ejemplo de ellas es el cáncer de colon, el cual representa la tercera causa de muerte por cáncer en nuestro país. Por otro lado, diversos estudios epidemiológicos han relacionado consistentemente el consumo abundante de alimentos de origen vegetal con una reducción del riesgo a padecer enfermedades de tipo crónico-degenerativas. Tal efecto ha sido atribuido, principalmente, a la presencia de compuestos bioactivos que contribuyen a mantener la salud. Una importante fuente de compuestos nutraceuticos o bioactivos es el maíz (*Zea mays* L), el cereal de mayor consumo en México y la materia prima fundamental para la elaboración del principal alimento en la dieta del pueblo mexicano: la tortilla. La transformación del maíz en tortilla o harina (como materia prima para la elaboración de tortillas) requiere la cocción alcalina del maíz mediante nixtamalización. No obstante, el proceso tradicional de nixtamalización presenta diversas limitantes tecnológicas y medioambientales, entre las que destaca la pérdida de compuestos bioactivos y la generación de un gran volumen de desechos contaminantes. Debido a lo anterior, se han desarrollado métodos alternativos de nixtamalización, como la 'Tecnología Limpia' propuesta por la empresa Sodif S.A. de C.V. En este proceso el maíz es sometido a una cocción alcalina al vapor y posteriormente a una molienda del grano entero, lo que permite retener todas las porciones del mismo incluido el pericarpio, el cual se ha reportado que contiene compuestos bioactivos como la fibra dietética y los fenólicos. Por lo anterior, resulta de interés evaluar el efecto de ambos métodos de nixtamalización sobre los compuestos bioactivos presentes de manera natural en el maíz, así como su posible efecto quimioprotector en estadios tempranos de cáncer de colon.

## IV. OBJETIVOS

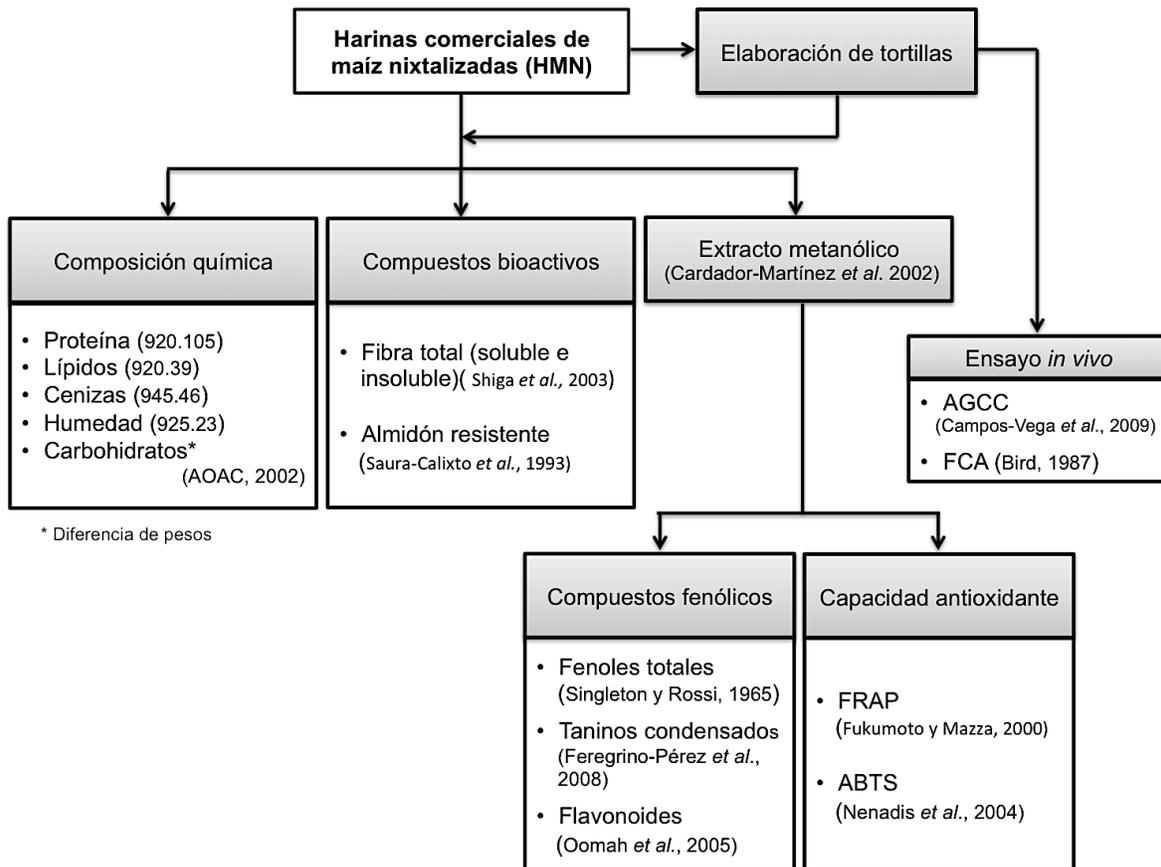
### A. General

Comparar la composición química y la capacidad antioxidante de harinas comerciales de maíz nixtamalizadas, y evaluar su potencial quimioprotector sobre el estadio temprano de cáncer de colon.

### B. Particulares

1. Caracterizar química y nutracéuticamente 4 diferentes harinas nixtamalizadas, así como tortillas elaboradas a partir de estas.
2. Determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de cada una de las muestras de harina y tortilla, mediante los métodos ABTS y FRAP.
3. Evaluar el potencial quimioprotector de tortillas elaboradas a partir de las harinas nixtamalizadas sobre el estadio temprano de cáncer de colon.

## V. ESTRATEGIA GENERAL



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. MATERIALES

#### 1. Compuestos químicos

La  $\alpha$ -amilasa, proteasa, amiloglucosidasa, 2-aminoetildifenilborato, rutina, (+)-catequina, ácido ferúlico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido fórmico, vainillina, ABTS, azul de metileno, hematoxilina y eosina, y azoximetano (AOM) se adquirieron de Sigma Chemical Co. El metanol, etanol, éter de petróleo, éter etílico, formaldehído, xileno, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, sulfato de sodio, sulfato de cobre, hidróxido de sodio (NaOH) e hidróxido de potasio (KOH) se adquirieron de J.T. Baker. Por último el trolox, y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se adquirieron de Aldrich Chemical Co.

#### 2. Material biológico

Se utilizaron cuatro diferentes harinas comerciales de maíz nixtamalizado. Dos de ellas fueron obtenidas mediante la Tecnología Limpia para la elaboración de harina de maíz nixtamalizado (H1 y H2), y dos muestras comerciales obtenidas mediante el método tradicional de nixtamalización (H3 y H4). Todas las harinas fueron proporcionadas por la empresa Sodif S.A. de C.V.

Para llevar a cabo el ensayo *in vivo* se produjeron tortillas a partir de cada una de las harinas, en una troqueladora convencional. Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 4 semanas de edad, de la misma línea genética adquiridas en Harlan Laboratories, Inc.

## **B. MÉTODOS**

### **1. Caracterización química y nutracéutica**

#### **1.1. Análisis proximal**

Se determinó el contenido de cenizas (técnica No. 945.46), humedad (técnica No. 925.23), proteína (técnica No. 920.15) y lípidos (técnica No. 920.39) de las diferentes muestras de harina de maíz y tortilla mediante las metodologías descritas por la Asociación Americana de Químicos Analistas (AOAC, 2002). El contenido de carbohidratos se obtuvo por diferencia de peso.

#### **1.2. Fibra total (soluble e insoluble)**

Se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Shiga *et al.*, (2003) por medio de la hidrólisis enzimática de las muestras de maíz con  $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa. Para la extracción de fibra insoluble, se adicionó solución amortiguadora de fosfato 0.08 mM a pH 6 a la muestra pulverizada, seguida de la adición de  $\alpha$ -amilasa (0.1 mL); el frasco se tapó y protegió de la luz, se incubó en baño María a 95 °C por 30 min, agitando cada 5 min. Transcurrido el tiempo se llevó a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 0.275N. Posteriormente, se adicionó proteasa (5 mg/mL) y se incubó en baño María a 60 °C por 30 minutos con agitación continua. Transcurrido el tiempo la muestra se llevó a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 4-4.6 con HCl 0.325N. Se adicionó amiloglucosidasa (0.1 mL), y se incubó nuevamente en baño María por 30 min a 60 °C con agitación continua. Al término de la incubación, se filtró al vacío con papel Whatman No. 4 y se realizaron dos lavados con agua a 60 °C. El papel filtro se secó en estufa a 60 °C.

Para la fracción soluble, se adicionó etanol al 78% al sobrenadante obtenido en la parte insoluble (en una porción 1:1 v/v) y se almacenó en refrigeración durante 24 h. Finalmente se filtró al vacío con papel Whatman No. 42 y se realizaron dos lavados con acetona. El papel filtro se secó en estufa a 60 °C.

### 1.3. Almidón resistente

El contenido de almidón resistente se cuantificó por el método propuesto por Saura-Calixto *et al.* (1993), mediante una hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa. Se adicionó solución de KOH (2M) a la muestra, con agitación continua por 30 minutos a una temperatura de 25 °C. Posteriormente se adicionó solución amortiguadora de acetatos (0.4 M, pH 4.75) y se ajustó el pH a 4.74 con HCl 2N. Se adicionó amiloglucosidasa y se incubó por 30 min a 60 °C en baño María con agitación continua. Las muestras se centrifugaron a 3000 g por 15 min y se colectó el sobrenadante. El residuo remanente se resuspendió en agua destilada y se centrifugó nuevamente. El residuo obtenido es el almidón resistente.

### 1.4. Cuantificación de compuestos fenólicos

#### 1.4.1. Obtención del extracto metanólico

Los compuestos fenólicos se extrajeron mediante la metodología propuesta por Cardador-Martínez *et al.* (2002). Brevemente, 1 g de muestra se colocó en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 10 mL de metanol. El matraz protegido de la luz se colocó en agitación por 24 h a 25 °C. Posteriormente se centrifugó a 4000 g por 10 min y se utilizó el sobrenadante para la cuantificación de compuestos fenólicos.

#### 1.4.2. Fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales (FT) se llevó a cabo mediante la técnica propuesta por Singleton y Rossi, (1965). Se tomaron 500 µl de extracto metanólico y se adicionó reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10). La reacción se neutralizó con NaCO<sub>3</sub> (60 g/L) y se mantuvo en reposo durante 2 h en oscuridad. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Lambda 40, UV-visible) a una longitud de onda de 760 nm. La concentración se determinó comparando contra una curva estándar de ácido ferúlico en un intervalo de 0 a 1 µg/mL (Anexo 1). Los resultados se expresan como µg equivalentes de ácido ferúlico/ g de muestra.

#### 1.4.3. Taninos condensados

Los taninos condensados (TC) se cuantificaron de acuerdo al método propuesto por Deshpande y Cheryan (1985) acoplado a microplaca (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008). Brevemente, se tomaron 50  $\mu$ l del extracto metanólico y se colocaron en una microplaca. Se adicionaron 200  $\mu$ l de solución 1:1 de vainillina 1% - HCl 8%. La cuantificación se realizó en un Multiskan (Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascent, Modelo 51118307) a una absorbancia de 495 y 540 nm. La concentración se determinó comparando con una curva estándar de (+)-catequina con un intervalo de 0 a 1 mg/mL (Anexo 2). Los resultados se expresan como mg equivalentes de (+)-catequina/ g de muestra.

#### 1.4.4. Flavonoides

Se determinó mediante el método propuesto por Oomah *et al.* (2005). Se mezclaron 50  $\mu$ l de extracto metanólico con 180  $\mu$ l de agua destilada y solución de 20  $\mu$ l de 2-aminoetil-difenilborato (10%) en los pozos de la microplaca. La lectura se llevó a cabo a una absorbancia de 404 nm en un espectrofotómetro. La concentración se determinó comparando con una curva estándar de rutina con un intervalo de 0 a 50  $\mu$ g/mL (Anexo 3). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de rutina/ g de muestra.

### 1.5. Capacidad antioxidante

#### 1.5.1. Método del ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)

La determinación de la capacidad antioxidante por el método ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Nenadis *et al.* (2004), en microplaca.

Se preparó una solución acuosa 7 mM de ABTS y una solución de  $K_2S_2O_8$  140 mM, se mezclaron 5 mL y 88  $\mu$ l, respectivamente. Se dejaron reposar durante 12 h en oscuridad para favorecer la generación del radical. Posteriormente, se

realizó una dilución mezclando 500  $\mu$ l de la solución con 20 mL de etanol. La solución se leyó a una longitud de onda de 734 nm.

Para la cuantificación en las muestras, se colocaron 20  $\mu$ l del extracto metanólico en una microplaca de 96 pozos y se adicionaron 230  $\mu$ l de ABTS<sup>+</sup>. Las muestras se prepararon por triplicado y la placa se leyó al tiempo 0 y 6 min a 734 nm en un espectrofotómetro.

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

$$\% \text{Inhibición} = [(1 - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

## **2. Ensayo *in vivo***

Se utilizaron 60 ratas macho Sprague Dawley, de 4 semanas de edad. Los animales se sometieron a un periodo de adaptación de una semana en bioterio a 25 °C, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y con acceso libre a alimento y agua. Después del periodo de aclimatación, los animales se dividieron en 10 grupos, tal como se muestra en el Cuadro 2.

El cáncer de colon se indujo con dos dosis (una por semana) de 15 mg/kg de azoximetano (AOM) vía subcutánea, suministradas en las semanas 7 y 8 de tratamiento. Los tratamientos se administraron durante 15 semanas (Figura 7). Se llevó un registro semanal de la ganancia en peso de los animales, así como del consumo de agua y alimento. Por otra parte, a lo largo del periodo experimental se tomaron tres muestras de heces (inicial, media y final) por grupo de tratamiento para determinar la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Cuadro 2. Grupos de tratamiento para ensayo *in vivo*

Grupo	Tratamiento	n
1	Control (alimento comercial)	4
2	Control de tortilla de maíz derivada del proceso 1	4
3	Control de tortilla de maíz derivada del proceso 2	4
4	Control de tortilla de maíz derivada del proceso 3	4
5	Control de tortilla de maíz derivada del proceso 4	4
6	AOM* (AOM + alimento comercial)	8
7	AOM + tortilla de maíz derivada del proceso 1	8
8	AOM + tortilla de maíz derivada del proceso 2	8
9	AOM + tortilla de maíz derivada del proceso 3	8
10	AOM + tortilla de maíz derivada del proceso 4	8

AOM\* = Azoximetano

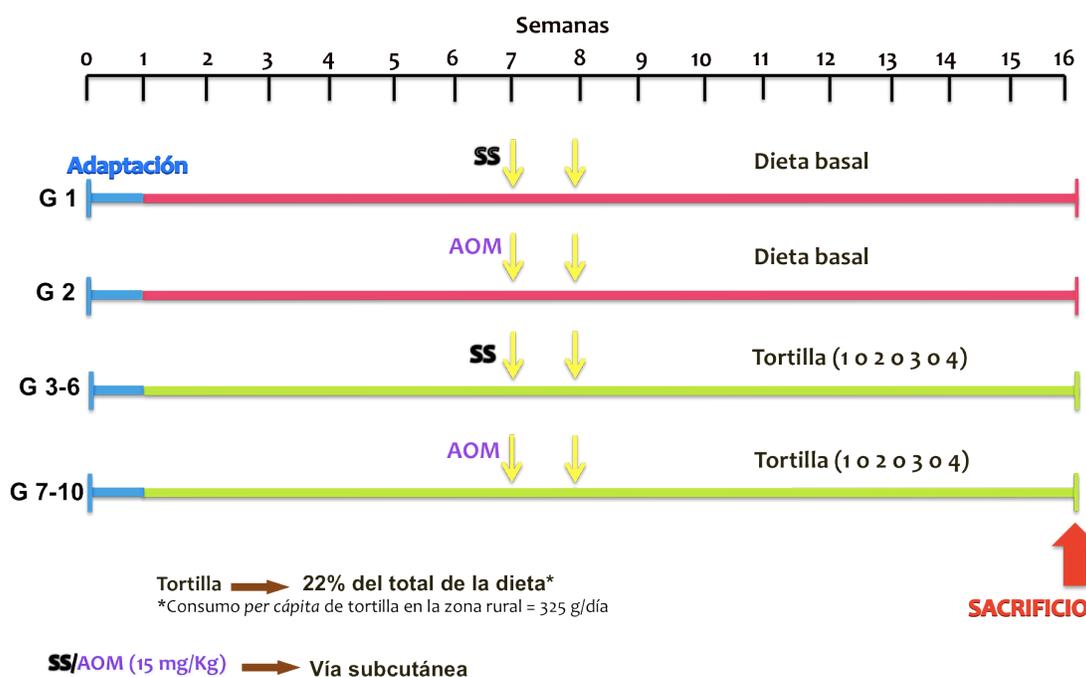


Figura 7. Diseño experimental del ensayo *in vivo*

Al final del experimento todos los animales de cada uno de los grupos de tratamiento se sacrificaron. Para ello, primero se anestesiaron con éter etílico, posteriormente se cortó la vena aorta y se extirpó el colon, cortando desde el ciego hasta el ano. El contenido cecal por grupo de tratamiento; se recolectó y almacenó a -70°C para realizar la cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Una vez recolectado el contenido cecal, el colon se lavó con solución salina y se cortó longitudinalmente; se removió la parte proximal y el ano, almacenando para los análisis histológicos posteriores solo la parte distal.

## 2.1. Determinación de fosas crípticas aberrantes (FCA)

En cada grupo de tratamiento, el tejido colónico del 50% de los animales sacrificados se tiñó con azul de metileno, mientras que el otro 50% se utilizó para la tinción con hematoxilina y eosina. Las técnicas empleadas se describen a continuación.

### 2.1.1 Tinción con azul de metileno

Una vez obtenido el colon distal, se fijó en paraformaldehído al 10% por 24 horas, después el colon se tiñó con azul de metileno 0.2% (en etanol) y se observó con un estereomicroscopio para determinar el número de FCA en la porción distal del colon, por grupo de tratamiento. Las FCA se distinguen del tejido normal por su deformidad en el tamaño y forma, agrandamiento hacía la mucosa superficial, agrupamiento de núcleos en la zona apical de la cripta colónica de acuerdo al método usado por Bird (1987).

### 2.1.2 Tinción con hematoxilina y eosina (H&E)

Posterior a la fijación, las muestras se deshidrataron con gradientes de alcohol-xilol y se realizó la inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm en microtomo (con orientación de tejido horizontal), y se tiñeron con H&E. Las muestras se observaron en un estereomicroscopio y se determinó el número de FCA por grupo de tratamiento (Wijnands *et al.*, 2001).

## 2.2. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

La concentración de AGCC se determinó siguiendo la metodología descrita por Campos-Vega *et al.* (2009), para lo cual 1 g de contenido cecal o fecal, se suspendieron en agua (5 veces su volumen) y se homogenizaron. La suspensión se centrifugó a 8 000 g durante 10 min a 4 °C y se ajustó el pH (2-3) con HCl 0.1M. El sobrenadante se filtró con una membrana (0.45 µm) y se llevó a cabo la determinación mediante cromatografía de gases (CG), utilizando He como gas acarreador a un flujo de 0.5 ml/min. Se utilizaron los ácidos acético, propiónico y butírico puros (0-100 mM/ml) como estándares externos para la construcción de la curva de calibración (Anexo 4) .

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización química y nutracéutica de harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas

#### 7.1.1 Composición proximal de harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas

Se realizó el análisis bromatológico (proteína, lípidos, cenizas, humedad y carbohidratos) de las cuatro harinas nixtamalizadas de maíz (H), así como de las tortillas frescas (TF) y tortillas deshidratadas (T) obtenidas a partir de cada una de las harinas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Contenido de proteína, lípidos, cenizas, humedad y carbohidratos en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.

	<b>Proteína</b>	<b>Lípidos</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Humedad</b>	<b>Carbohidratos</b>
<b>H1</b>	9.25 ± 0.17	4.39 ± 0.11	2.17 ± 0.09	9.79 ± 0.09	74.41 ± 0.05
<b>TF1</b>	9.36 ± 0.16	4.16 ± 0.03	2.08 ± 0.07	42.11 ± 1.01*	42.12 ± 0.89*
<b>T1</b>	9.34 ± 0.39	4.33 ± 0.14	2.15 ± 0.24	11.52 ± 0.65	72.84 ± 0.63
<b>H2</b>	9.32 ± 0.07	4.28 ± 0.17	1.99 ± 0.26	9.76 ± 0.03	74.66 ± 0.11
<b>TF2</b>	9.04 ± 0.28	3.97 ± 0.23	1.90 ± 0.11	44.28 ± 2.33*	40.70 ± 2.17*
<b>T2</b>	9.26 ± 0.15	4.09 ± 0.16	2.18 ± 0.04	9.87 ± 0.31	74.72 ± 0.25
<b>H3</b>	8.97 ± 0.05	4.48 ± 0.06	1.49 ± 0.18	10.28 ± 0.03	74.76 ± 0.16
<b>TF3</b>	8.81 ± 0.21	3.93 ± 0.04	1.31 ± 0.22	45.67 ± 1.32*	39.55 ± 1.67*
<b>T3</b>	9.05 ± 0.10	4.73 ± 0.13	1.52 ± 0.16	9.15 ± 0.93	76.40 ± 1.12
<b>H4</b>	8.78 ± 0.13	3.90 ± 0.13	1.59 ± 0.13	11.06 ± 0.14	74.68 ± 0.02
<b>TF4</b>	8.70 ± 0.12	3.45 ± 0.11	1.24 ± 0.13	44.91 ± 2.01*	41.13 ± 3.25*
<b>T4</b>	8.82 ± 0.04	4.03 ± 0.39	1.68 ± 0.11	10.12 ± 0.73	75.93 ± 1.27

H = Harina, TF = Tortilla fresca, T = Tortilla deshidratada. Los resultados son expresados en porcentaje por gramo de muestra en base seca. Cada valor expresa la media de dos experimentos con dos repeticiones ± el error estándar. \* Indica diferencia estadística significativa respecto a la harina a partir de la cual se elaboró la tortilla, mediante prueba de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

Como se puede observar la concentración de proteína en las diferentes muestras varía de 8.78-9.32% en HMN y de 8.70-9.36% en tortillas (incluidas frescas y deshidratadas). Estos valores son superiores a los ya reportados por otros autores; específicamente, Agama-Acevedo *et al.* (2004) informaron un contenido entre 8.28-9.33% y 7.51-8.63% para harinas de maíz y tortillas, respectivamente. Así mismo, Maya-Cortés *et al.* (2010) reportaron porcentajes de proteína de 8.90% para maíz crudo, y 7.37 y 7.96% para tortillas preparadas utilizando el método ecológico de nixtamalización y tortillas elaboradas con harina instantánea, respectivamente.

Se ha sugerido que el contenido de proteína en el maíz y sus derivados depende principalmente de la variedad de maíz empleada, así como las condiciones ambientales, por lo que la disimilitud de los valores del presente estudio con los reportes existentes podría atribuirse al uso de diferentes variedades de grano (Bressani, 2008).

El análisis estadístico del contenido de proteína no mostró diferencia significativa al comparar la harina con las tortillas frescas o deshidratadas, independientemente de la muestra; sin embargo, se puede observar que las muestras 1 y 2, tanto en harinas y tortillas, presentan un contenido ligeramente mayor a las muestras restantes. Lo anterior posiblemente se deba a que en el proceso de obtención de H1 y H2 se retiene el pericarpio y las capas externas del grano de maíz, las cuales principalmente contienen fibra y proteínas.

Para la población mexicana la tortilla representa una de las principales fuentes de proteína. Se estima que provee alrededor del 50% de las proteínas ingeridas en la dieta diaria en las zonas rurales del país, por lo cual la concentración de este nutriente resulta relevante (Flores-Farías *et al.*, 2000).

En el contenido de lípidos fue de 3.90 - 4.48%, 3.45 - 4.16% y 4.03-4.73%, para HMN, TF y T, respectivamente. Los valores son ligeramente mayores a los reportados por Agama-Acevedo *et al.* (2004) quienes encontraron un

contenido entre 3.15 - 3.97% y 2.75 - 4.10% para HMN y tortillas, lo cual puede deberse a la variedad de maíz utilizada.

Dentro de la composición de lípidos en el grano de maíz se destaca una baja cantidad de ácidos grasos saturados, así como niveles considerables de ácidos grasos esenciales y antioxidantes naturales, todos ellos relacionados con una buena nutrición y salud (Bressani, 2008; Vázquez *et al.*, 2010).

En lo referente al contenido de cenizas, para todas las muestras analizadas se observó que no existe diferencia estadística significativa al comparar las HMN con las TF y T derivadas de las mismas independientemente del proceso de nixtamalización empleado, lo que sugiere que ambos procesos permiten retener parte de los compuestos minerales presentes en el grano de maíz. Sin embargo, también se observó que la muestra H1 presentó el mayor contenido de cenizas lo que era de esperarse ya que en el proceso de Tecnología Limpia (TL) no se desecha el pericarpio. Este comportamiento es similar para las TF y T elaboradas a partir de esta harina. Paredes-López *et al.* (2006) señalan que existe una pérdida de vitaminas y minerales por su solubilización durante las etapas de cocción y remojo del grano de maíz empleadas en el proceso de NT. Mientras que en el proceso de TL se utiliza una mínima cantidad de agua para la cocción del grano (suficiente para una cocción al vapor), lo cual posiblemente permita retener la mayor parte de estos compuestos.

El contenido de cenizas en harina y tortillas de maíz expresa la concentración de minerales como Ca, Fe, Mg, P y Zn presentes en la muestra. Algunos investigadores han reportado un incremento en el contenido de cenizas en tortillas comparado con el maíz crudo atribuyéndolo esencialmente al hidróxido de calcio que se incorpora durante la nixtamalización del grano, el cual incrementa hasta 20 veces el contenido de calcio en la tortilla comparada con el grano crudo (Bressani *et al.*, 1958; Gómez-Aldapa *et al.*, 1999; Maya-Cortés *et al.*, 2010).

En general, el contenido de proteína, lípidos y cenizas no mostró variaciones estadísticas significativas al comparar las HMN contra TF y T derivadas de cada harina, lo que sugiere que la aplicación de los procesos térmicos para la cocción y deshidratación de las tortillas no influye en el contenido de dichos nutrientes, independientemente del método de nixtamalización utilizado para la obtención de las harinas.

El contenido de carbohidratos fue determinado por diferencia de pesos. El análisis estadístico de los datos mostró diferencia estadística significativa al comparar las harinas versus las TF derivadas de ellas, en todos los casos. Este comportamiento puede atribuirse a que el contenido de humedad es significativamente mayor en las TF que en las HMN, para todas las muestras evaluadas en el estudio.

#### 7.2.2 Contenido de fibra dietética y almidón resistente en harina nixtamalizadas de maíz y tortillas

Se ha informado que el grupo de sustancias que conforman la fibra dietética (celulosa, hemicelulosa, gomas, lignina, pectinas, entre otras) se han relacionado ampliamente con el correcto funcionamiento del intestino y la prevención de enfermedades crónico degenerativas (Escudero y González, 2006).

El Cuadro 4 presenta el contenido de fibra dietética insoluble (FI), soluble (FS) y total (FT), así como el contenido de almidón resistente (AR), para las muestras de harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas deshidratadas derivadas de las mismas.

El contenido de fibra en muestras de HNM fue mayor a lo reportado por Palacios-Fonseca *et al.* (2009), quienes encontraron concentraciones de 7.74 - 9.83% para FT, 0.75 - 1.93 para FS y 6.04 - 8.26% para FI, en muestras de harinas comerciales de maíz. Por otra parte, Mora-Escobedo *et al.* (2009) reportaron una diferencia del 45% en el contenido de FT al evaluar dos variedades

de maíz, y sugieren que ésta puede ser atribuida a las diferencias en el morfología del grano, ya que el tamaño en las variedades evaluadas era distinto. Si bien el contenido de fibra en el maíz y sus derivados puede estar directamente relacionado con la variedad de grano que se utiliza, el proceso de obtención de las harinas y la técnica empleada en la cuantificación de los compuestos también resultan fundamentales.

Cuadro 4. Contenido de fibra dietética insoluble, soluble y total, y almidón resistente en harinas de nixtamalizadas de maíz y tortillas.

	<b>Fibra Insoluble</b>	<b>Fibra Soluble</b>	<b>Fibra Total</b>	<b>Almidón Resistente</b>
<b>H1</b>	24.49 ± 0.22	1.19 ± 0.03	25.70 ± 0.25	26.09 ± 1.01
<b>T1</b>	24.01 ± 0.23	2.17 ± 0.09*	26.17 ± 0.30	28.69 ± 0.52
<b>H2</b>	22.16 ± 0.30	1.90 ± 0.08	24.17 ± 0.35	25.46 ± 1.67
<b>T2</b>	22.27 ± 0.43	2.63 ± 0.11*	24.89 ± 0.80	27.99 ± 0.65
<b>H3</b>	18.83 ± 0.38	1.37 ± 0.10	20.20 ± 0.33	27.11 ± 0.83
<b>T3</b>	18.50 ± 0.25	2.94 ± 0.07*	21.44 ± 0.21*	28.03 ± 0.52
<b>H4</b>	17.55 ± 0.27	1.46 ± 0.08	19.00 ± 0.24	30.88 ± 0.77
<b>T4</b>	17.74 ± 0.13	3.09 ± 0.05*	20.82 ± 0.12*	31.64 ± 0.87

H = Harina, T = Tortilla. Los resultados son expresados en porcentaje por gramo de muestra en base seca. Cada valor expresa la media de dos experimentos con dos repeticiones ± el error estándar. \* Indica diferencia estadística significativa respecto a la harina a partir de la cual se elaboró la tortilla, mediante prueba de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

También se puede apreciar que no existe diferencia significativa en el contenido de fibra dietética insoluble al comparar la harina con la tortilla, independientemente de la muestra, lo que sugiere que el proceso de cocción y secado de las tortillas no tiene influencia sobre la concentración de esta. No obstante, como se esperaba, las muestras 1 y 2 presentaron un mayor contenido que 3 y 4, obtenidas mediante el proceso tradicional de nixtamalización. Respecto a este comportamiento algunos autores sugieren que las etapas de cocción alcalina y el remojo del grano de maíz utilizadas en la nixtamalización tradicional provocan la disolución e hinchamiento de las capas del pericarpio lo que causa

que las paredes celulares (principales componentes de la fracción de fibra insoluble del maíz) se vuelvan frágiles facilitando con ello su remoción (Paredes-López *et al.*, 2006).

La cantidad de fibra dietética soluble (FS) en tortillas mostró un incremento significativo en comparación con las HMN, para todas las muestras analizadas. De igual manera se puede apreciar una mayor concentración en el contenido de fibra dietética total de la tortilla en comparación con las HMN, el cual está relacionado con el incremento de la fracción soluble; sin embargo, éste sólo es significativo para las muestras 1 y 2. El incremento en la fracción soluble se puede vincular a diversos factores como el tratamiento alcalino al que previamente se somete el maíz durante la cocción el cual ocasiona una reducción del peso molecular de sustancias solubles unidas a los polisacáridos, así como también a alteraciones del almidón causadas por la temperatura de cocción de la tortilla, entre otros (Singh *et al.*, 2007).

El contenido de FS en los alimentos es de gran interés debido a que se le ha relacionado con beneficios a la salud por servir como sustrato a las bacterias colónicas, las cuales liberan como producto de su metabolismo ácidos grasos de cadena como: acético, propiónico y butírico, que han sido relacionados con un efecto quimioprotector contra el cáncer de colon (Lupton, 2004; Young *et al.*, 2005).

En cuanto al contenido de almidón resistente (AR) se observó un incremento en tortillas comparadas con harinas independiente del proceso de nixtamalización empleado para la obtención de las harinas, sin embargo, dicho incremento no es estadísticamente significativo para ninguna de las muestras. Autores como Rendón-Villalobos *et al.* (2002) y Mora-Escobedo *et al.* (2009) reportan un comportamiento similar al analizar el contenido de AR en muestras de maíz crudo, masa y tortilla, encontrado la mayor concentración en estas últimas. Respecto a este efecto, los autores señalan que el tratamiento térmico aplicado en la cocción de la tortilla seguido de una etapa de enfriamiento y almacenamiento a

bajas temperaturas, favorecen la retrogradación del almidón y con ello un incremento en la concentración de AR, el cual forma parte de la fracción soluble de la fibra dietética.

Dependiendo de la velocidad y grado de digestión del almidón y, por lo tanto, del contenido de AR en los alimentos, este puede ejercer diferentes efectos sobre la salud incluyendo: reducción del índice glicémico, efecto hipocolesterolémico, y protección contra cáncer colorectal (Jenkins, 2000; Le Leu *et al.*, 2006; Sánchez, 2012).

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Meza-Rivera (2011), quien informa valores de 29.93% y 32.50% para harina de maíz crudo y maíz extrudido, respectivamente.

### 7.1.3 Concentración de fenoles totales, taninos condensados y flavonoides en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas

Diversos estudios han demostrado que el consumo de granos integrales ayuda a la reducción del riesgo a padecer enfermedades crónico-degenerativas, como obesidad, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Esto a su vez está relacionado con la presencia de compuestos fitoquímicos como los compuestos fenólicos (taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, etc.), los cuales poseen propiedades antioxidantes (Dykes y Rooney, 2007; Mukhtar, 2007; Hu *et al.*, 2010; Sergent *et al.*, 2010).

La concentración de fenoles totales se presenta en la Figura 8. El contenido de estos compuestos en las muestras bajo estudio presentó un incremento significativo al pasar de harinas a tortillas, mostrando valores entre 0.88 - 1.20 y 1.99 - 2.80  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido ferúlico por gramo de muestra, para HMN y tortillas, respectivamente.

Es importante mencionar que los compuestos fenólicos presentes en los cereales y productos derivados de ellos, pueden encontrarse en dos formas: libres

(extraídos con solventes orgánicos) o ligados (extraídos mediante hidrólisis). Estos últimos representan aproximadamente el 80% de los compuestos fenólicos presentes en el maíz (Adom y Liu, 2002; De la Parra *et al.*, 2007; Dykes y Rooney, 2007).

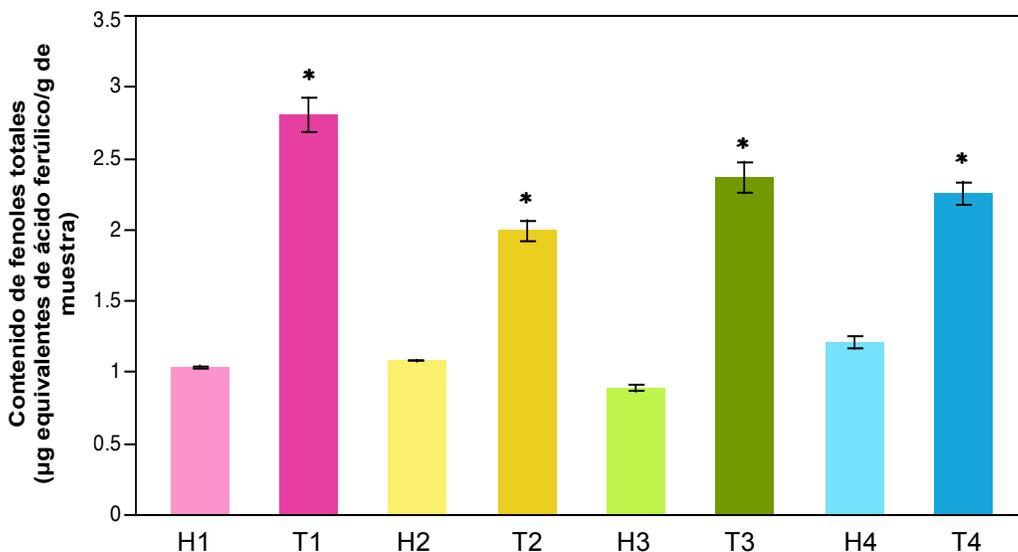


Figura 8. Contenido de fenoles totales en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas. H = Harina, T = Tortilla. Cada valor expresa la media de dos experimentos con dos repeticiones  $\pm$  el error estándar. \* Indica diferencia estadística significativa respecto a la harina a partir de la cual se elaboró la tortilla, mediante prueba de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

Un comportamiento similar al de las muestras bajo estudio fue reportado por Salinas-Moreno *et al.* (2007) quienes evaluaron la concentración de fenoles libres y fenoles totales en maíz crudo, masa y tortillas, reportando valores entre 6.05 - 8.75  $\mu\text{mol/g}$  y 5.46 - 9.03  $\mu\text{mol/g}$  para masa y tortillas, respectivamente. De acuerdo a sus resultados, los autores informan que existe un incremento en el contenido de fenoles libres en masa y tortillas comparadas con el maíz crudo, encontrando la mayor concentración en tortillas. Estos autores señalan que este incremento se debe en parte a la hidrólisis alcalina que sufren las diferentes estructuras del grano durante el cocimiento con hidróxido de calcio en la nixtamalización, lo que induce la liberación de algunos de los compuestos fenólicos ligados a la hemicelulosas del pericarpio. Por otra parte, la aplicación de

calor durante la cocción de la tortilla también ejerce un efecto, aunque en menor medida.

La muestra T1 presentó el mayor incremento en el contenido de fenoles totales respecto a la harina a partir de la cual se elaboró, presentando 1.67  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido ferúlico/g de muestra más que H1, lo cual sugiere que el proceso de Tecnología Limpia como alternativa para la obtención de harinas nixtamalizadas de maíz permite una mayor retención de los compuestos bioactivos presentes de manera natural en el grano de maíz, en contraparte con el proceso tradicional de nixtamalización.

Mora-Rochin *et al.* (2010) analizaron el contenido de fenoles libres y ligados en cuatro variedades de maíz crudo, así como en tortillas elaboradas a partir de harinas de maíz extrudidas y tortillas obtenidas mediante nixtamalización tradicional. Ellos observaron que en ambos tipos de tortilla existe una reducción en el contenido de fenoles totales en comparación con el maíz crudo; sin embargo, la pérdida es menor en el proceso de extrusión, y esto lo atribuyen tanto a la retención de todas las fracciones del grano, como a las condiciones de obtención de las harinas de maíz.

La Figura 9 presenta el contenido de taninos condensados en las muestras de harina de maíz y tortillas derivadas de ellas. Los taninos condensados son compuestos a lo que se les consideraba como antinutricios; sin embargo, en los últimos años han recibido mayor interés como antioxidantes naturales, ya que reaccionan con los radicales libres del organismo considerados causantes de diversos tipos de cáncer.

La concentración de taninos obtenida para las HMN se encuentran dentro del rango 2.04 - 3.97 mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra. Los valores obtenidos en este estudio resultan inferiores a lo reportado por Pineda-Rodríguez (2009) para harinas de maíz crudo (6.25 - 9.68 mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra) y Meza-Rivera (2011) para maíz extrudido (12.0

mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra). Las diferencias encontradas pueden deberse a que existen variaciones en el contenido de taninos de acuerdo a la variedad del grano bajo estudio. Cabe destacar que estos serían los primeros reportes sobre la concentración de taninos condensados en harinas nixtamalizadas de maíz. Los taninos son metabolitos secundarios de la planta, por lo que su presencia puede variar por las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrolle; incluso dentro de una misma variedad se encuentran fluctuaciones en la concentración dependiendo de la región en que se encuentre.

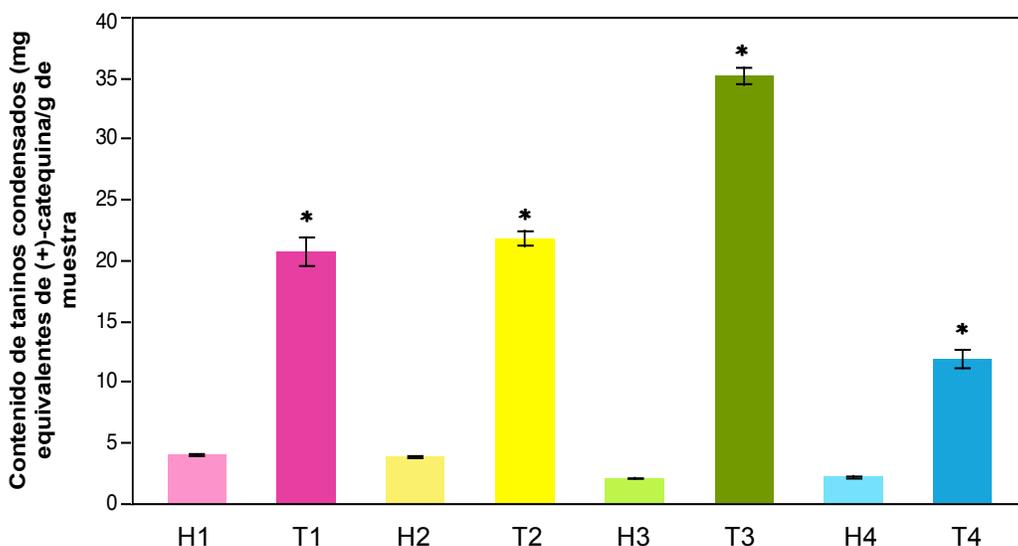


Figura 9. Contenido de taninos condensados en harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas. H = Harina, T = Tortilla. Cada valor expresa la media de dos experimentos con dos repeticiones  $\pm$  el error estándar. \* Indica diferencia estadística significativa respecto a la harina a partir de la cual se elaboró la tortilla, mediante prueba de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

La muestra T3, obtenida mediante el empleo del proceso tradicional de nixtamalización, presentó el mayor contenido de taninos condensados (35.11 mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra) de todas las muestras.

De manera general, las muestras de tortillas evaluadas en el presente estudio exhibieron un incremento significativo en la concentración de taninos condensados en comparación con las harinas a partir de las cuales se elaboraron.

Dicho incremento fue de 16.74, 17.97, 33.07 y 9.68 mg equivalentes de (+)-catequina para H1, H2, H3, y H4, respectivamente, cada una de ellas comparada con su contraparte en tortillas. Estas diferencias posiblemente sean a consecuencia de la formación de complejos entre los taninos condensados y proteínas, polisacáridos o algunos minerales presentes en las HMN, lo cual dificulta su extracción y por tanto su cuantificación. No obstante, es posible que los diferentes cambios estructurales que sufren los nutrientes al aplicar el tratamiento térmico necesario para la cocción de la tortilla provoquen la hidrólisis de dichos complejos, dejando algunos taninos condensados libres para su cuantificación.

En la Figura 10 se muestra el contenido de flavonoides en las muestras de HNM y tortillas. Se observó una reducción estadísticamente significativa en el contenido de dichos compuestos al pasar de harinas a tortillas en las muestras 1 y 3, lo cual pudiera sugerir que la aplicación del tratamiento térmico en la cocción de la tortilla posiblemente causó la degradación de algunos compuestos.

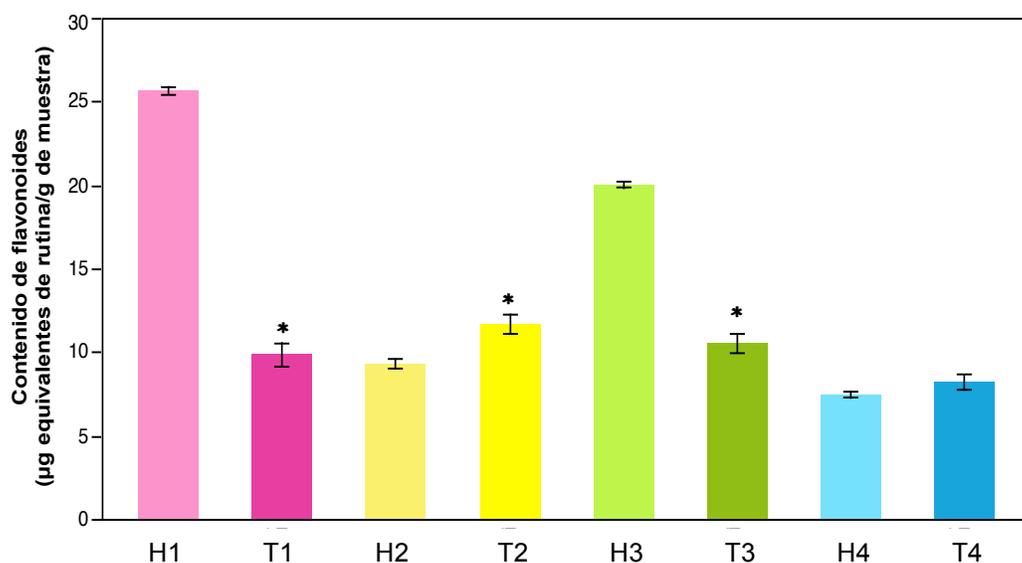


Figura 10. Contenido de flavonoides en harinasnixtamalizadas de maíz y tortillas. H = Harina, T = Tortilla. Cada valor expresa la media de dos experimentos con dos repeticiones  $\pm$  el error estándar. \* Indica diferencia estadística significativa respecto a la harina a partir de la cual se elaboró la tortilla, mediante prueba de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

## 7.2 Capacidad antioxidante de harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas

Se realizó la medición de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas mediante las metodologías ABTS y FeSO<sub>4</sub>. Los resultados se presentan en el Cuadro 5.

En general, los resultados muestran que existe una reducción significativa estadísticamente, de la capacidad antioxidante de las tortillas comparadas con harinas, independientemente de la metodología empleada para la determinación de dicho parámetro, siendo más marcada para el método de ABTS.

Cuadro 5. Capacidad antioxidante de harinas nixtamalizadas de maíz y tortillas.

	ABTS		FRAP
	$\mu\text{mol eq. de Trolox/}$ $\text{g muestra}$	ARA (%)	$\mu\text{mol eq. de FeSO}_4/\text{g}$ $\text{muestra}$
<b>H1</b>	8.01 ± 0.06	58.63 ± 0.06	14.58 ± 0.64
<b>T1</b>	1.79 ± 0.09*	9.69 ± 0.70*	9.08 ± 0.34*
<b>H2</b>	9.08 ± 0.03	67.11 ± 0.25	17.01 ± 0.49
<b>T2</b>	2.36 ± 0.07*	14.22 ± 0.55*	12.41 ± 0.34*
<b>H3</b>	8.28 ± 0.08	60.63 ± 0.61	17.07 ± 0.17
<b>T3</b>	1.13 ± 0.01*	4.54 ± 0.06*	7.97 ± 0.19*
<b>H4</b>	9.23 ± 0.09	68.00 ± 0.68	18.75 ± 0.35
<b>T4</b>	1.33 ± 0.07*	6.15 ± 0.36*	10.97 ± 0.16*

H = Harina, T = Tortilla. Cada valor expresa la media de tres experimentos independientes ± el error estándar.  
\* Indica diferencia estadística significativa respecto a la harina a partir de la cual se elaboró la tortilla, mediante prueba de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

El porcentaje de pérdida de la capacidad antioxidante también es independiente del proceso de nixtamalización utilizado en la obtención de las harinas de maíz; sin embargo, se puede apreciar que la reducción es mayor en las muestras 3 y 4 que derivan de la NT (tanto en el método ABTS como en FRAP). Esto concuerda con lo reportado por Mora-Rochin *et al.* (2010), quienes evaluaron la pérdida de la capacidad antioxidante de tortillas obtenidas a partir de cuatro

diferentes variedades de maíz, y utilizando dos procesos de nixtamalización; reportando una mayor pérdida en las tortillas obtenidas por el método tradicional que en la extrusión, para todas las variedades de maíz.

Por otra parte, los resultados son contrarios a lo esperado, ya que el contenido de compuestos fenólicos totales y taninos condensados fue significativamente mayor en las tortillas respecto a las harinas. Respecto a lo anterior, Siddhuraju (2006) menciona que los compuestos fenólicos de alto peso molecular presentan una mayor capacidad para neutralizar radicales libres, como el ABTS<sup>+</sup>, y que su efectividad depende además del peso molecular, del número de anillos aromáticos y la naturaleza de la sustitución del grupo hidroxilo.

De acuerdo con lo anterior, se podría sugerir que si bien el contenido de compuestos fenólicos en las tortillas es mayor que en las harinas, estos no presentan las características estructurales más favorables para ejercer un efecto antioxidante. Además se podría sugerir, que el calor aplicado en los procesos de cocción y deshidratación de la tortilla pudo causar la degradación de algunos de los compuestos fenólicos, como los taninos condensados, dando lugar a compuestos con menor peso molecular, afectando así su potencial antioxidante.

En lo que respecta al método ABTS, las harinas mostraron valores de capacidad antioxidante, expresada en  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/g muestra (TEAC por sus siglas en inglés), entre 8.01 y 9.23. Estos resultados son similares a lo reportado por Pineda-Rodríguez (2009), quien informa 7.81  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/g muestra, para maíz crudo.

Los valores de TEAC para las tortillas se encuentran dentro del rango 1.13 - 2.36  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/g muestra, siendo inferiores a lo reportado por Meza-Rivera (2011) para totopos de maíz nixtamalizado (4.59  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/g muestra).

En el método FRAP se observó que también la muestra H4 presenta la mayor capacidad antioxidante con  $18.75 \pm 0.35$   $\mu\text{mol}$  equivalentes de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  muestra, mientras que T3 presentó el menor valor con  $7.97 \pm 0.19$   $\mu\text{mol}$  equivalentes de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  muestra. Los porcentajes de pérdida de la capacidad antioxidante de las tortillas en comparación de las harinas fueron de 38, 27, 53 y 41%, para T1, T2, T3 y T4, respectivamente, los cuales son menores a los obtenidos en el método ABTS.

### **7.3 Evaluación *in vivo* del efecto del consumo de tortilla de maíz sobre el desarrollo de fosas crípticas aberrantes inducidas con azoximetano**

#### **7.3.1 Efecto de la adición de tortilla de maíz a la dieta sobre el consumo de alimento, agua y ganancia de peso**

Se evaluó el efecto de la adición de 22% de tortilla de maíz a la dieta, sobre la ingesta de agua y alimento de los animales bajo estudio. El porcentaje de tortilla añadida se estableció en proporción al consumo de tortilla por una persona adulta en la zona rural del país, el cual es de aproximadamente 325 g al día. Se registró dos veces por semana el consumo de agua y alimento de los grupos experimentales.

En las Figuras 11 y 12 se representa el promedio del consumo semanal de agua y alimento para cada grupo de tratamiento, al inicio y al final del experimento (semanas 1 y 15 de tratamiento, respectivamente). Los resultados muestran que a lo largo del periodo experimental, el consumo de agua y alimento entre los grupos de tratamiento no presentó diferencia estadística significativa al ser comparados con el grupo control y el grupo AOM. Este comportamiento sugiere que ni la adición de tortilla a la dieta ni la administración de AOM, influyeron en el patrón de consumo de los animales bajo estudio.

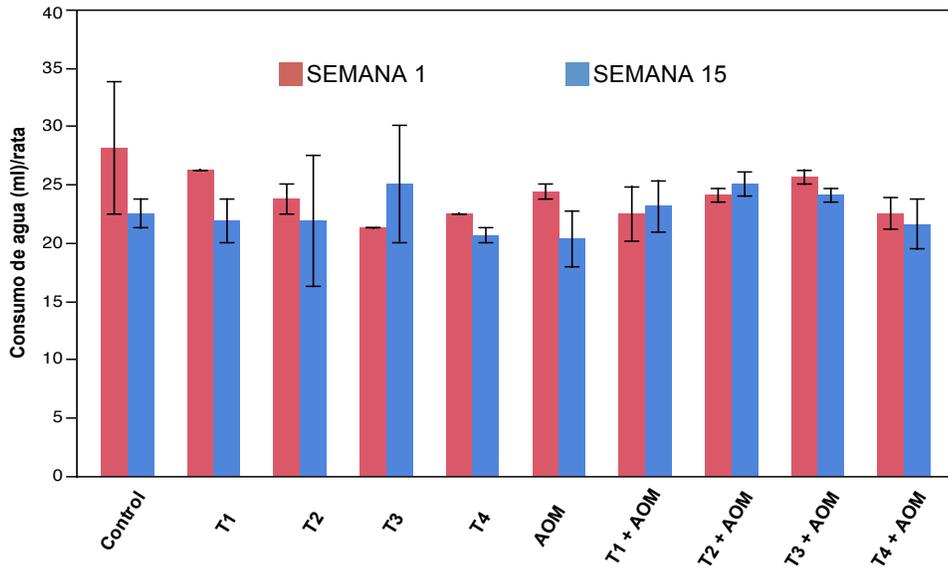


Figura 11. Consumo de agua de los diferentes grupos evaluados al inicio (semana 1) y final (semana 15) del periodo experimental. T = Tortilla; AOM = Azoximetano. Cada valor expresa la media del consumo semanal por grupo de tratamiento  $\pm$  el error estándar.

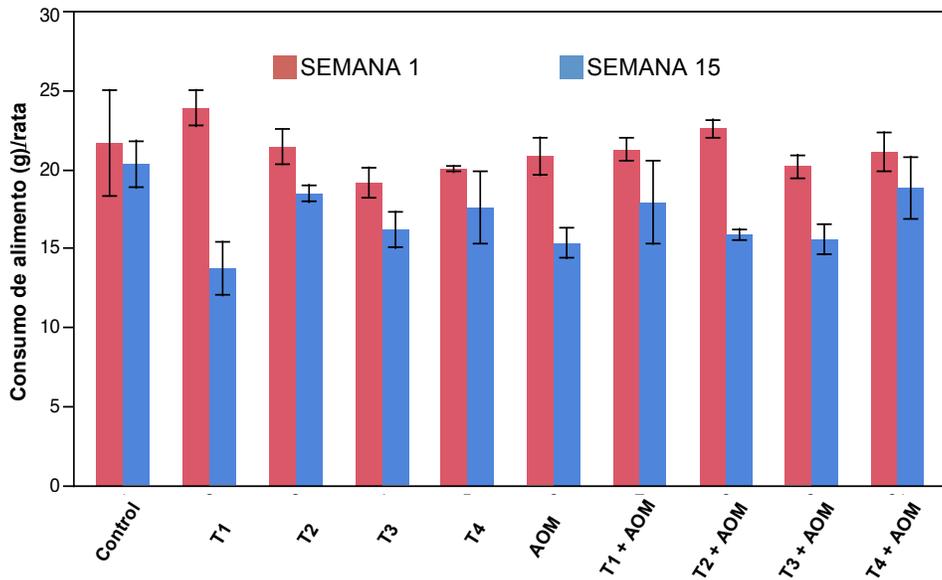


Figura 12. Consumo de alimento de los diferentes grupos evaluados al inicio (semana 1) y final (semana 15) del periodo experimental. T = Tortilla; AOM = Azoximetano. Cada valor expresa la media del consumo semanal por grupo de tratamiento  $\pm$  el error estándar.

En el consumo de alimento se observó una reducción generalizada en la ingesta a partir de la semanas 8 de experimentación. El mayor consumo de alimento al inicio del estudio posiblemente esté relacionado con el crecimiento normal de los animales, lo cual se vio reflejado en una ganancia promedio de peso de 40 g por semana durante las primeras 7 semanas de tratamiento, mientras que en las semanas posteriores la ganancia de peso semanal se redujo a 15 g.

La ganancia de peso de los diferentes tratamientos evaluados, expresada como la diferencia de peso por animal entre la semana 1 y 15 del estudio, es presentada en la Figura 13. El análisis estadístico de los datos no mostró diferencia significativa al comparar los valores obtenidos en el grupo control versus el grupo AOM, sugiriendo que el AOM no tiene ningún tipo de efecto sobre el peso corporal de los animales. Este comportamiento ha sido reportado por otros autores al evaluar el efecto de dosis similares de AOM (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008; Vergara-Castañeda *et al.*, 2010). Por otra parte, los grupos suplementados con tortilla tampoco mostraron algún efecto significativo en la ganancia de peso comparados con el grupo control o AOM.

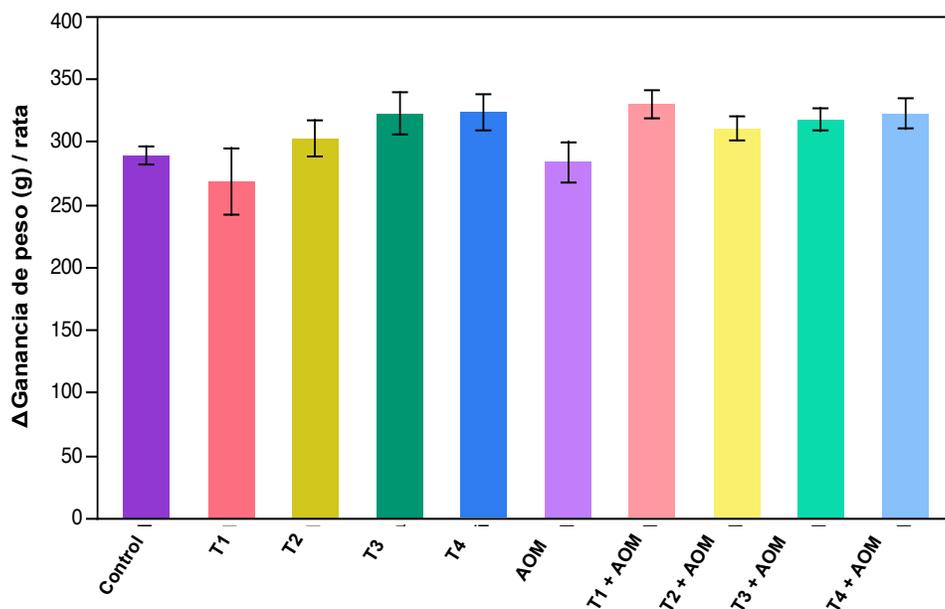


Figura 13. Ganancia de peso de los diferentes grupos evaluados. T = Tortilla; AOM = Azoximetano. Los valores expresan la media de la diferencia de peso entre la semana 1 y 15 de tratamiento  $\pm$  error estándar.

### 7.3.2. Evaluación del consumo de tortilla sobre el desarrollo de FCA inducidas en ratas Sprague-Dawley

Las FCA se han identificado como las primeras lesiones en el desarrollo del cáncer colorrectal en roedores tratados con carcinógenos y en humanos en alto riesgo de desarrollar cáncer de colon. Estas lesiones son utilizadas como un punto final en la identificación y evaluación de la función preventiva o de promoción de factores dietéticos y ambientales en el proceso de carcinogénesis colónica. Las FCA, al ser observadas al microscópico con ayuda de diferentes técnicas de tinción, se distinguen del tejido normal por su deformidad en el tamaño y forma, generalmente son de dos a tres veces mas grandes que las criptas normales, presentan una forma alargada y son microscópicamente elevadas además de presentar un incrementado índice de proliferación (Bird y Good, 2000).

En la Figura 14 se resume el efecto observado al suministrar una concentración de 22% de tortilla en la dieta sobre la formación de FCA en colon de ratas inducidas químicamente con AOM, mediante el uso de dos técnicas de tinción: azul de metileno y hematoxilina-eosina (H&E).

Se observó que no existe diferencia estadística significativa al comparar el número de FCA en los grupos tratados con tortilla (T1 a T4) contra el grupo control. Este comportamiento es similar tanto en la tinción con azul de metileno, como en la de H&E, lo que sugiere que la concentración de tortilla adicionada a la dieta no promueve por sí sola el desarrollo de FCA.

En la tinción con azul de metileno se observó que todos los animales inducidos con AOM presentaron FCA a lo largo de la porción distal del colon, por lo cual podemos considerar o sugerir que este es un buen modelo para el estudio del estadio temprano de cáncer de colon. Los resultados concuerdan con lo reportado por Velmurugan *et al.* (2008) quienes informan que dos dosis (una por semana) de 15 mg/kg de peso de AOM vía subcutánea, inducen la formación de FCA en ratas 10 semanas después de la última inyección, independientemente del

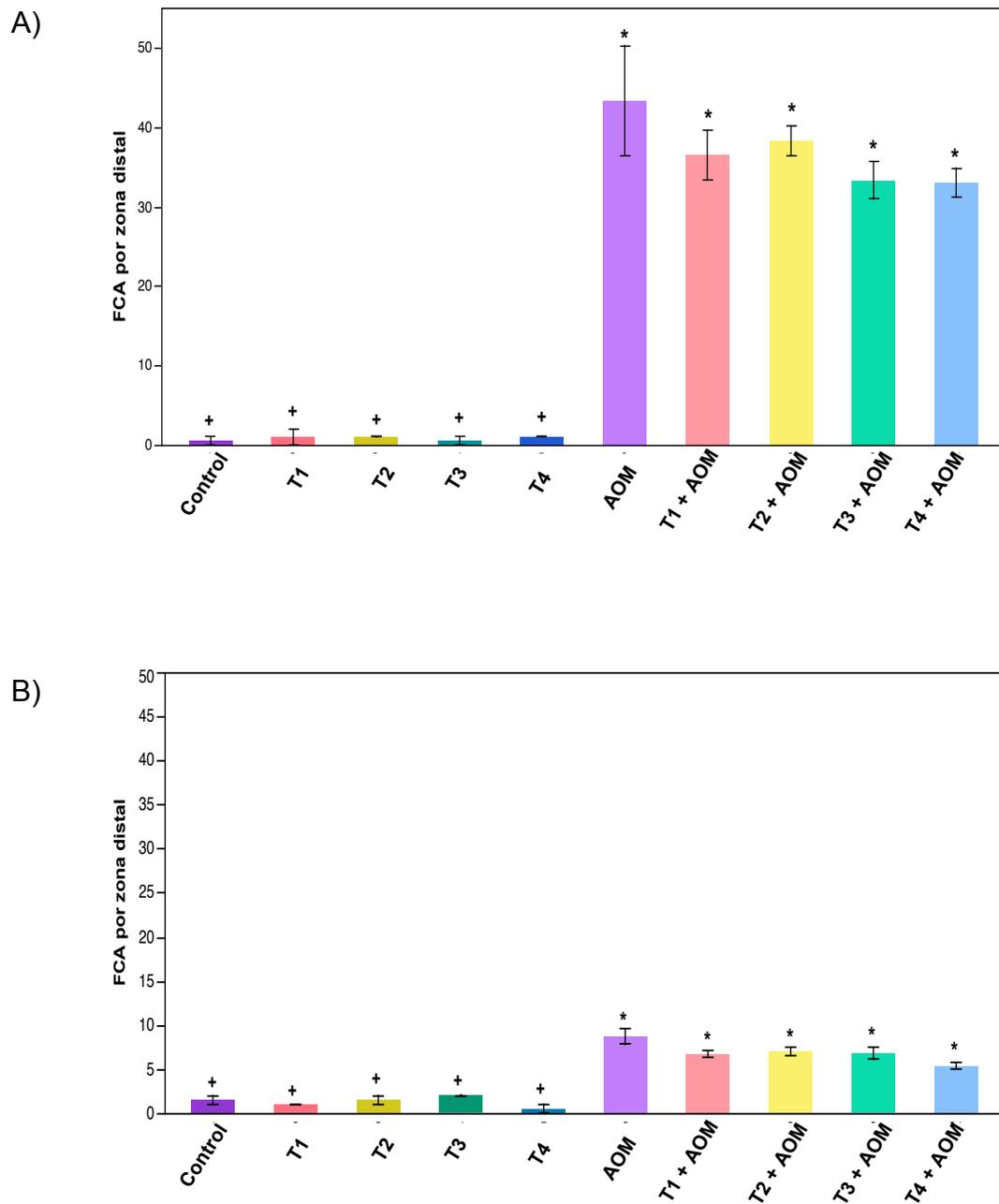


Figura 14. Fosas crípticas aberrantes (FCA) en la región distal del colon para cada grupo de tratamiento. Tinción con (A) azul de metileno y (B) hematoxilina-eosina. T = Tortilla, AOM = Azoximetano. Los valores expresan la media por grupo de tratamiento  $\pm$  error estándar. \*Indica diferencia significativa respecto al grupo control sano mediante prueba de Dunnet ( $\alpha=0.05$ ). +Indica diferencia significativa respecto al grupo AOM.

tratamiento que recibieron. Otros autores como Feregrino-Pérez *et al.* (2008) y Vergara-Castañeda *et al.* (2010), también reportan que el AOM induce la formación de FCA 10 semanas después de la segunda administración.

Por otra parte, se observó una reducción en el número de FCA en los grupos inducidos con AOM y tratados con tortilla (T1 + AOM a T4 + AOM) al compararlos con el grupo AOM, independientemente del tipo de tinción. El grupo T4 + AOM presentó el mayor porcentaje de reducción de FCA respecto al grupo AOM (24% con azul de metileno y 22% con H&E); sin embargo, la disminución no fue significativa estadísticamente; cabe resaltar que la muestra T4 deriva del uso del proceso de NT. Contrario a lo esperado, estos resultados sugieren que el consumo de tortilla en una proporción del 22% del total de la dieta diaria (que es proporcional al consumo *pér capita* en la zona rural del país) no presenta efectos importantes sobre el desarrollo de FCA en animales inducidos con dos dosis de 15 mg/Kg de AOM, independientemente del método de nixtamalización empleado, es decir, no ejerce un efecto quimioprotector en el estadio temprano de cáncer de colon.

No se tienen informes sobre la evaluación del efecto quimioprotector del maíz nixtamalizado y los productos derivados de este, que nos permitan comparar los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, se tienen algunos reportes sobre algunos compuestos aislados del maíz, como por ejemplo el salvado de maíz que de acuerdo con Barnes *et al.* (1983) la adición de 20% a la dieta incrementa la incidencia de tumores en ratas inducidas con 1,2-dimetilhidrazina, en una mayor proporción que otros tipos de salvado. Reddy *et al.* (1983) por su parte, informan que la incidencia de tumores en ratas tratadas con AOM es menor en el grupo AOM comparada con el grupo suministrado con 15% de salvado de maíz en la dieta. Ambos autores sugieren que el efecto quimioprotector en el desarrollo de cáncer de colon depende del tipo de fibra suministrada.

En este sentido, existen diversos estudios en animales que han demostrado que no todos los tipos de fibra pueden inhibir el desarrollo de tumores (Castaño,

2004). Se ha sugerido que las fibras menos solubles y menos fermentables consistentemente inhiben la inducción de tumores en el intestino grueso de roedores. En contraste, un número importante de otras fibras han mostrado un incremento en el desarrollo de tumores en modelos animales, lo cual se atribuye principalmente al incremento en la proliferación celular, entre estas fibras se incluye el agar, el salvado de maíz y avena, y la pectina (Jacobs, 1983; Wong y Gibson, 2003).

Los mecanismos por los cuales algunos tipos de fibra estimulan la proliferación celular incluye muchas posibilidades. Por ejemplo, Jacobs (1987), menciona que algunas fibras incrementan la concentración de ácidos biliares en el colon, los cuales se han relacionado con actividad promotora de tumores en modelos animales. Los ácidos biliares que no son reabsorbidos en el íleon son vertidos en el intestino grueso, donde son degradados a ácidos biliares secundarios por la microflora colónica. Los ácidos biliares secundarios a su vez, han demostrado ser tóxicos para el epitelio colónico favoreciendo el incremento en la proliferación y regeneración de las células epiteliales. Esta estimulación de la proliferación celular puede promover el desarrollo de tumores debido al incremento en la población de células que sintetizan ADN, las cuales son más susceptibles a sufrir mutaciones y la subsecuente transformación maligna.

Otro posible mecanismo por el cual la fibra no inhibe la formación de FCA, es el descrito por Harris y Ferguson (1993), quienes sugieren que ciertos tipos de fibra tienen efecto sobre la detoxificación de carcinógenos. Muchos carcinógenos son eliminados del organismo mediante la formación de compuestos más hidrofílicos, como ocurre al conjugarse con glutatión o el ácido glucorónico. Sin embargo, las enzimas glucuronidasas producidas por las bacterias en el colon liberan a los carcinógenos del conjugado glucorónico, lo que puede causar daño genético a los colonocitos. Y aunque algunas fibras insolubles reducen las actividades de las glucuronidasas, algunas solubles, como las pectinas y gomas pueden amplificar sus actividades. También señalan que la fibra insoluble puede ser abrasiva y aumentar la adhesión del excremento, especialmente en la parte

final del colon después de que el agua haya sido absorbida, lo que posiblemente promueve un incremento en la proliferación celular en el colon (Harris y Ferguson, 1993).

Se considera comúnmente que el consumo de fibra dietaria es saludable porque ayuda al tránsito intestinal y protege contra el cáncer, en especial el colorectal. Sin embargo, aumentar la cantidad de fibra en la dieta, no necesariamente es saludable debido en parte, a que algunos constituyentes de la fibra dietaria son realmente protectores, mientras que otros promueven la carcinogénesis (Castaño, 2004).

En lo referente a los compuestos fenólicos, Saura-Calixto *et al.* (2007) mencionan que las propiedades biológicas de estos compuestos dependen de su absorción en el intestino y su biodisponibilidad, por lo que solo los polifenoles liberados de la matriz alimenticia por la acción de las enzimas digestivas y/o la microflora colónica son bioaccesibles en el intestino.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede sugerir que los compuestos fenólicos de la tortilla posiblemente presenten una baja biodisponibilidad debido a la formación de complejos con otros compuestos como pueden ser proteínas o carbohidratos complejos, lo cual podría limitar su acción biológica en el colon y por tanto su efecto quimioprotector. Por otra parte, también es posible que estos compuestos hayan sufrido una degradación durante el periodo de almacenamiento de la tortilla previo al suministro a los animales, lo que obviamente, provocaría una reducción en la concentración de los compuestos.

### 7.3.3 Multiplicidad de las fosas crípticas aberrantes

El número de FCA puede indicar el número de lesiones iniciadas; no obstante, se ha reconocido que existe una relación entre la multiplicidad de las criptas (número de criptas aberrantes por cada foco) y la frecuencia de desarrollo

de tumores inducidos por la administración de sustancias carcinógenas, encontrando que la incidencia FCA consistentes en 4 o más criptas presentan mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon (Pretlow *et al.*, 1992; Uchida *et al.*, 1997; Fenoglio-Preiser y Noffsinger, 1999).

Los resultados sobre la multiplicidad de las criptas obtenidos en este estudio se presentan en el Cuadro 6. El grupo AOM presentó la mayor cantidad de fosas que contienen entre 1 y 3 criptas; sin embargo no se observó diferencia estadística significativa al compararlo con los demás grupos inducidos.

Cuadro 6. Multiplicidad de las FCA de los diferentes grupos de tratamiento.

Grupo	Total FCA	Número de criptas por fosa	
		1-3	≥4
<b>AOM</b>	44.25 ± 4.97	36.75 ± 4.00	7.50 ± 1.04
<b>T1 + AOM</b>	36.50 ± 3.10	31.00 ± 2.48	6.50 ± 0.50
<b>T2 + AOM</b>	38.25 ± 1.89	30.25 ± 1.55	7.75 ± 2.06
<b>T3 + AOM</b>	33.25 ± 2.33	28.00 ± 2.80	5.50 ± 0.29
<b>T4 + AOM</b>	33.00 ± 1.83	26.00 ± 1.58	7.00 ± 0.41

T = Tortilla, AOM = Azoximetano. Los valores expresan la media por grupo de tratamiento ± error estándar.

En cuanto a las fosas con 4 o más criptas no se observó diferencia estadística significativa al comparar los grupos inducidos con AOM y tratados con tortilla contra el grupo AOM; sin embargo, el grupo T2 + AOM presentó la mayor cantidad con 7.75 fosas, siendo incluso mayor que el grupo AOM. El grupo T3 + AOM presentó el menor número con 5.55 fosas. Tomando en cuenta que la muestra T2 deriva del uso de la TL como método de nixtamalización y T3 deriva del uso de la NT, los resultados obtenidos son contrarios a lo esperado, ya que el proceso de TL sugiere una mayor retención de compuestos bioactivos con potencial quimioprotector en comparación con la NT. Estos resultados coinciden con lo reportado por Magnuson *et al.* (1993), quienes evaluaron el efecto del tratamiento con ácido cólico sobre la incidencia de tumores en colon en ratas inducidas con AOM, encontrando que el grupo tratado con ácido cólico e inducido con AOM presentó un menor número de FCA en comparación con el grupo que

fue solo inducido AOM; sin embargo, la multiplicidad de las criptas a lo largo del experimento y la incidencia de tumores en colon después de 18 semanas de tratamiento fue mayor en el grupo tratado con ácido cólico que en el grupo AOM, por lo que sugieren que la multiplicidad de las FCA puede predecir el desarrollo de tumores en colon de una forma más confiable que el número total de FCA.

#### **7.4 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)**

En el Cuadro 7 se muestra la producción de AGCC en contenido cecal y fecal de los diferentes grupos de tratamiento. El análisis estadístico indica que no existe diferencia significativa en la producción de AGCC al comparar los grupos T1 a T4 con el grupo control, tanto en el contenido cecal como en el fecal. Estos resultados difieren de los reportados por otros autores, quienes sugieren que la adición de carbohidratos no digeribles a la dieta favorece o incrementa la producción de AGCC (Lupton, 2004; Feregrino-Pérez *et al.*, 2008).

En general, se observó que la concentración de ácido acético, propiónico y butírico fue mayor en el contenido cecal comparado con el contenido fecal, excepto para los grupos T3 + AOM y T4 + AOM los cuales presentaron una mayor concentración de ácido acético en la porción fecal. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Feregrino-Pérez *et al.* (2008), quienes reportan una mayor concentración de AGCC en el contenido cecal de ratas inducidas con AOM y tratadas con un extracto de polisacáridos de frijol variedad Negro 8025. McIntyre *et al.* (1993) señalan que la fibra dietaria presenta diferentes efectos en diferentes regiones del lumen intestinal, dependiendo de su fermentabilidad, en base a ello sugieren que una mayor concentración de AGCC en la porción fecal se debe a la presencia de un sustrato lentamente fermentable, a lo largo del colon.

Vergara-Castañeda *et al.* (2010), quienes evaluaron el efecto quimioprotector de un extracto de polisacáridos de frijol común variedad Bayo

Cuadro 7. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el contenido cecal y fecal de los diferentes grupos de tratamiento.

Grupo	Contenido cecal			Contenido fecal		
	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico
Control	4.23 ± 0.28 <sup>b</sup>	4.37 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.28 ± 0.02 <sup>a</sup>	6.18 ± 0.21 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.30 ± 0.03 <sup>a</sup>
T1	4.62 ± 0.28 <sup>b</sup>	4.37 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.30 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.28 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.45 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.05 <sup>a</sup>
T2	5.06 ± 0.29 <sup>ab</sup>	4.36 ± 0.03 <sup>b</sup>	2.31 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.38 ± 0.21 <sup>a</sup>	4.57 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.18 ± 0.03 <sup>a</sup>
T3	4.84 ± 0.28 <sup>ab</sup>	4.36 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.32 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.40 ± 0.53 <sup>a</sup>	4.38 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.04 <sup>a</sup>
T4	4.92 ± 0.23 <sup>ab</sup>	4.39 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.29 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.35 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.39 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.04 <sup>a</sup>
AOM	6.05 ± 0.45 <sup>ab</sup>	4.66 ± 0.06 <sup>ab</sup>	2.07 ± 0.06 <sup>b</sup>	4.92 ± 0.46 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.02 <sup>a</sup>
T1 + AOM	6.80 ± 1.09 <sup>a</sup>	4.98 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.17 ± 0.21 <sup>a</sup>	4.45 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.03 <sup>a</sup>
T2 + AOM	6.17 ± 0.19 <sup>ab</sup>	4.45 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.34 ± 0.01 <sup>a</sup>	5.15 ± 0.25 <sup>a</sup>	4.48 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.03 <sup>a</sup>
T3 + AOM	4.69 ± 0.33 <sup>b</sup>	4.44 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.26 ± 0.05 <sup>ab</sup>	5.33 ± 0.10 <sup>a</sup>	4.57 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.25 ± 0.04 <sup>a</sup>
T4 + AOM	5.19 ± 0.17 <sup>ab</sup>	4.56 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.23 ± 0.06 <sup>ab</sup>	5.30 ± 0.82 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.16 ± 0.10 <sup>a</sup>

T = Tortilla; AOM = Azoximetano. Los valores son expresados como mM de ácido acético (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), propiónico (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) y butírico (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), respectivamente, por gramo de muestra analizada. Cada valor representa la media de dos experimentos con dos repeticiones ± error estándar. Letras distintas por columna indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Madero sobre ratas inducidas con AOM, encontraron una mayor producción de AGCC en los grupos tratados con el extracto de polisacáridos e inducidos con AOM.

En el contenido fecal, la concentración de AGCC no mostró diferencia estadística significativa entre los tratamientos. El grupo T4 presentó la mayor producción de ácido butírico con  $2.32 \pm 0.04$  mM/g de muestra, mientras que el grupo T4 + AOM presentó la menor concentración con  $4.57 \pm 0.05$  mM de ácido butírico/g de muestra. El contenido de AGCC en el contenido fecal puede considerarse un reflejo del contenido en la parte distal del colon en donde más común la formación de neoplasias colónicas, por lo que es de esperarse que las dietas que muestran un incremento en la producción de butirato colónico o fecal deberían ser más protectoras que aquellas en las cuales no ocurre (McIntyre *et al.*, 1993; Perrin *et al.*, 2001).

Los efectos variables de la fibra dietaria sobre la incidencia de cancer de colon puede atribuirse a la fermentabilidad de la fibra, la cual determina su capacidad para influenciar las concentraciones de ácido butírico en la parte distal del colon, en donde es más común la formación de tumores (McIntyre *et al.*, 1993).

## VII. CONCLUSIONES

El uso del proceso de Tecnología Limpia en la producción industrial de harinas nixtamalizadas de maíz no causa modificaciones importantes en la composición química (proteína, lípidos, cenizas, humedad y carbohidratos) de harinas y tortillas de maíz en comparación con el proceso tradicional; sin embargo, permite una mayor retención de algunos compuestos bioactivos (fibra dietética, fenoles totales, taninos condensados y flavonoides) que el proceso tradicional.

El consumo de tortilla en una proporción del 22% del total de la dieta diaria, bajo las condiciones de este estudio, no inhibe el desarrollo de FCA en animales inducidos con dos dosis de 15 mg/Kg de AOM, independientemente del proceso utilizado para la obtención de las harinas y tortillas.

El suministro de tortilla en la proporción empleada en este estudio no influye de manera significativa en la producción de ácidos grasos de cadena corta ni en el contenido cecal ni en el fecal, es decir, no causa un incremento en la concentración de dichos ácidos. En base a esto podría sugerirse que el tipo de fibra presente en las tortillas de maíz nixtamalizado no es susceptible a la fermentación colónica, lo que a su vez se refleja en el desarrollo de FCA en todos los grupos experimentales inducidos con AOM independientemente de la dieta.

## VIII. LITERATURA CONSULTADA

- Adom KK, Liu RH. 2002. Antioxidant activity of grains. *J Agric Food Chem* 50:6182-6187.
- Agama-Acevedo E, Rendón-Villalobos R, Tovar J, Paredes-López O, Islas Hernández JJ, Bello-Pérez LA. 2004. *In vitro* starch digestibility changes during storage of maize flour tortillas. *Nahrung/Food* 48:38-42.
- Alonso A, Moreno S, Valiente A, Artigas M, Pérez-Juana A, Ramos-Arroyo MA. 2006. Mecanismos genéticos en la predisposición hereditaria al cáncer colorrectal. *An Sist Sanit Navar* 29:59-76.
- AOAC (Association of Oficial Analytical Chemists). 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed. AOAC, Arlington, VA. Método 920.105, 925.23, 945.46, 985.29, 991.43.
- Arámbula VG, González-Hernández J, Moreno ME, Ordorica FCA. 2002. Characteristics of tortillas prepared from dry extruded masa flour added with maize pericarp. *J Food Sci* 67:1444-1448.
- Barnes DS, Clapp NK, Scott DA, Oberst DL, Berry SG. 1983. Effects of wheat, rice, corn, and soybean bran on 1,2-dimethylhydrazine-induced large bowel tumorigenesis in F344 rats. *Nutr Cancer* 5:1-9.
- Bedoya AC, Chávez TV. 2010. Teocintle: el ancestro del maíz. *Claridades Agropecuarias* 201:32-42.
- Béliveau R, Gingras D. 2007. Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician* 53:1905-1911.
- Benítez CCG. 2006. El Maíz: origen, composición química y morfología. *Materiales Avanzados* 7:15-20.
- Bird RP. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 30:147-151.
- Bird RP, Good CK. 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Tox Lett* 112:395-402.
- Bressani R, Paz RP, Scrimshaw NS. 1958. Chemical changes in corn during preparation of tortillas. *J of Agric Food Chem* 6:770-774.
- Bressani R. 1990. Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Reviews International* 6:225-264.

- Bressani R, Benavides V, Acevedo E, Ortiz MA. 1990a. Changes in selected nutrient contents and in protein quality of common and quality-protein maize during rural tortilla preparation. *Cereal Chem* 67:515-518.
- Bressani R. 2008. Cambios nutrimentales en el maíz inducidos por el proceso de nixtamalización. En: Nixtamalización, del maíz a la tortilla. Aspectos nutrimentales y tecnológicos. Universidad Autónoma de Querétaro. 19-80.
- Burda S, Oleszek W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 49:2774–2779.
- Campos-Vega R, Reynoso-Camacho R, Pedraza-Aboytes G, Acosta-Gallegos JA, Guzman-Maldonado SH, Paredes-López O, Oomah BD, Loarca-Piña G. 2009. Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Sci* 74:59-65.
- Cardador-Martínez A, Castaño-Tostado E, Loarca-Piña G. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) against aflatoxin B1. *Food Addit. Contam.*19: 62–69.
- Carvajal-Millán E. 2007. Una alternativa para convertir un residuo del proceso de 'nixtamalización' del maíz en un producto de alto valor agregado. *Tecnociencia* 1:4-6.
- Castaño ME. 2004. El mayor consumo de fibra no significa siempre mejorar la salud. *Hacia la promoción de la salud* 9:17-25.
- Catalán V, Honorato B, García F, Bandrés E, Zabalegui N, Zárata R, Salgado E, García-Foncillas J. 2003. Carcinogénesis colónica: porceso de transformación neoplásica. *Rev Med Univ Navarra* 47:15-19.
- Chia JS, Du JL, Hsu WB, Sun A, Chiang CP, Wang WB. 2010. Inhibition of metastasis, angiogenesis, and tumor growth by Chinese herbal cocktail Tien-Hsien liquid. *BMC Cancer* 10:175-190.
- Chen R, Rabinovitch PS, Crispin DA, Emond MJ, Bronner MP, Brentnall TA. 2005. The initiation of colon cancer in a chronic inflammatory setting. *Carcinogenesis* 26: 1513-1519.
- Choi Y, Jeong HS, Lee J. 2007. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chem* 103:130-138.
- Chow AY. 2010. Cell cycle control by oncogenes and tumor suppressors:driving the transformation of normal cells into cancerous cells. *Nature Education* 3:7-12.

- Corte OLY, Martínez FHE, Ortíz AR. 2011. Efecto del consume de fibra dietética en la expresión cuantitativa del receptor de butirato GPR43 en colon de ratas. *Nutr Hosp* 26:1052-1058.
- De la Parra C, Serna SS, Hai RL. 2007. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas and tortilla chips. *J Agric Food Chem* 55:4177-4183.
- Dykes L, Rooney LW. 2007. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World* 52:105-111.
- Escudero AE, González SP. 2006. La fibra dietética. *Nutr Hosp* 21:61-72
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2004. El maíz en la nutrición humana. Disponible en [www.fao.org.mx](http://www.fao.org.mx). Consultado en junio de 2011.
- Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. 2002. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British Medical Bulletin* 64:27-43.
- Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. 1999. Aberrant crypt foci: a review. *Toxicologic pathology* 27:632-642.
- Feregrino-Pérez AA, Berumen LC, García-Alcocer G, Guevara-González RG, Ramos-Gómez M, Reynoso-Camacho R, Acosta-Gallegos JA, Loarca-Piña G. 2008. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoximethane-induced coloncancer. *J Agric Food Chem* 56:8737-8744.
- Figuroa JDC, Acero GMG, Vasco MNL, Lozano GA, Flores ALM, González HJ. 2001. Fortificación y evaluación de tortillas de nixtamal. *Archiv Latinoam Nutrición* 51:293-302.
- Flores-Farías R, Martínez-Bustos F, Salinas-Moreno Y, Kil-Chang Y, González-Hernández J, Ríos E. 2000. Physicochemical and rheological characteristics of commercial nixtamalised Mexican maize flours for tortillas. *J Sci Food Agric* 80:657-664.
- Fukumoto LR, Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48:3597-3604.
- Gómez-Aldapa C, Martínez-Bustos F, Figuroa JD, Ordorica CA. 1999. A comparison of the quality of whole corn tortillas made from instant corn flours by traditional or extrusión processing. *International J Food Sci Tech* 34:391-399.

- Gooderham NJ, Carmichael PL. 2007. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *The Cancer Handbook*. 1-16.
- Hamer HM. 2009. Short chain fatty acids and colonic health. *Nutrim* 1-165.
- Han X, Shen T, Lou H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci* 8:950-988.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hodzic Z, Pasalic H, Memisevic A, Srabovic M, Salatovic M, Poljakovic M. 2009. The influence of total phenols content on antioxidant capacity in the whole grain extracts. *Eur J Sci Res* 28:471-477.
- Huston LM. 2006. Development of cancer and characteristics of cancer cells. *Carcinogenesis* 9:187-190.
- Hu J, La Vecchia C, Negri E, Mery L. 2010. Nutrients and risk of colon cancer. *Cancers* 2:51-67.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). INEGI. 2010. Disponible en [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). Consultado en julio de 2011.
- Jacobs LR. 1983. Enhancement of rat colon carcinogenesis by wheat bran consumption during the stage of 1,2-dimethylhydrazine administration. *Cancer Res* 43:4057-4061.
- Jacobs LR. 1987. Dietary fiber and cancer. *J Nutr* 117:1319-1321.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. Cancer Statistics, 2010. *CA-Cancer J Clin* 60: 277-300.
- Jenkins LS. 2000. Mechanism for the impact of whole grain foods on cancer risk. *J Am Coll Nutr* 19:300s-307s.
- Johnson JJ, Mukhtar H. 2007. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett* 255:170-181.
- Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. 2004. Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr* 7:187-200.
- Lattimer JM, Haub MD. 2010. Effectsof dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* 2:1266-1289.
- Lawrence AL, Harris CC. 2008. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res* 68:6863-6872.

- Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Morita T, Esterman A, Young G. 2007. Effect of dietary resistant starch and protein on colonic fermentation and intestinal tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 28:240-245.
- Lupton JR. 2004. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr* 134:479-482.
- Maya-Cortés DC, Figueroa-Cárdenas JD, García-Romo MG, Alfaro R, Cortés-Martínez R, Velés-Medina JJ, Martínez-Flores HE. 2010. Whole-grain corn tortilla prepared using an ecological nixtamalisation process and its impact on the nutritional value. *J Food Sci Tech* 45:23-28.
- Magnuson BA, Carr I, Bird RP. 1993. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res* 53:4499-4504.
- McIntyre A, Gibson PR, Young GP. 1993. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut* 34:386-391.
- Méndez-Montevalvo G, Solorza-Feria J, García-Suárez F, Bello-Pérez LA. 2007. Rheological changes in nixtamalised maize starch. *J Cent South Univ Technol* 14:518-521.
- Meza-Rivera CD. 2011. Elaboración, evaluación nutrimental y nutracéutica de una botana a partir de harinas extrudidas de maíz/frijol. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Mora-Escobedo R, Osorio-Díaz P, García-Rosas MI, Bello-Pérez A, Hernández-Unzón H. 2009. Cambios en nutrientes seleccionados y microestructura del maíz mejorado "Costeño" y el maíz común durante la preparación y el almacenamiento de tortillas. *J Food Sci Tech Int* 10:79-85.
- Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, Zhang H-Y. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS<sup>+</sup> assay. *J Agric Food Chem* 52:4669-74.
- Palacios-Fonseca AJ, Vázquez-Ramos C, Rodríguez-García ME. 2009. Physicochemical characterizing of industrial and traditional nixtamalized corn flours. *J Food Eng* 93:45-51.
- Panala V, Varghese M, Boateng J, Field R, Shackelford L, Walker LT. 2009. A comparison of rice bran, corn oil and soybean oil against azoximethane induced colon cancer in a Fisher 344 rat model. *Int J Cancer Res* 5:25-35.
- Paredes-López O, Guevara-Lara F, Bello-Pérez LA. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas Mesoamericanas. Colección "La ciencia para todos, no.212". Primera Edición. Ed. FCE. Capítulo II. 16-58.

- Paredes-López O, Guevara Lara F, Bello Pérez LA. 2009. La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias* 92-93:60-70.
- Park MT, Lee SJ. 2003. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol* 36:60-65.
- Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K, Menanteau J. 2001. Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut* 48:53-61.
- Perše M, Cerar A. 2011. Morphological and molecular alterations in 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol* 2011:1-14.
- Pineda-Rodríguez S. 2009. Elaboración, evaluación nutrimental y nutracéutica de mezclas de harinas extrudidas maíz/frijol, trigo/frijol y tostadas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Potter JD. 1999. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 91:916-932.
- Pretlow TP, O'Riordan MA, Somich GA, Amini SB, Pretlow TG. 1992. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rat treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis* 13:1509-1512
- Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz LF, Lopes C. 2007. Chemical Carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc* 79:593-616.
- Oomah BD, Cardador-Martínez A, Loarca-Piña G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus Vulgaris L*). *J Sci Food Agric* 85:935-942.
- Reddy BS, Maeura Y, Wayman M. 1983. Effect of dietary corn bran and autohydrolyzed lignin on 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced intestinal carcinogenesis in male F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 2:419-423.
- Rendón-Villalobos R, Bello-Pérez LA, Osorio-Díaz P, Tovar J, Paredes-López O. 2002. Effect of storage time on in vitro digestibility and resistant starch content of nixtamal, masa and tortilla. *Cereal Chem* 79:340-344.
- Riehl TE, George RJ, Sturmoski MA, May R, Dieckgraefe B, Anant S, Houchen CW. 2006. Azoxymethane protects intestinal stem cells and reduces crypt epithelial mitosis through a COX-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Physiol* 291:G1062-G1070.
- Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. 2009. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 30(2):183-196.

- Salinas-Moreno Y, López-Reynoso JJ, González-Flores GB, Vázquez-Carrillo G. 2007. Compuestos fenólicos del grano de maíz y su relación con el oscurecimiento de masa y tortilla. *Agrociencia* 41:295-305.
- Salucci M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R, Vannini V. 2002. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cell (Caco2). *Br J Cancer* 86:1645-1651.
- Sánchez-Muniz FJ. 2012. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 27:31-45.
- Saura-Calixto F, Goñi I, Bravo L, Mañas E. 1993. Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *J Food Sci* 58:642-643.
- Saura Calixto F, Serrano J, Goñi I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem* 101:492-501.
- Sergent T, Piront N, Meurice J, Toussaint O, Schneider YJ. 2010. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium. *Chem Biol Interact* 5:659-667.
- Shiga TM, Lajolo FM, Filisetti TMCC. 2003. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cienc Tecnol Aliment* 23:141-148.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2011. Disponible en [www.siap.org.mx](http://www.siap.org.mx). Consultado en junio de 2011.
- Siddhuraju P. 2006. The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolic of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. *Food Chem* 99:149-157.
- Singleton VL, Rossi JA Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic and reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
- Singh S, Gamlath S, Wakeling L. 2007. Nutritional aspects of food extrusion: a review. *Int J Food Sci Tech* 42:916-929.
- Sohn OS, Fiala ES, Requeijo SP, Weisburger JH, Gonzalez FJ. 2001. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Res* 61:8435-8440.
- Stanner SA, Hughes J, Kelly CNM, Buttriss J. (2003). A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. *Public Health Nutr* 7:407-422.

- Sun SY, Haild N, Lotan R. 2004. Apoptosis as anovel target for cancer chemoprevention. J Natl Cancer Inst 96: 662-672.
- Sutandyo N. 2010. Nutritional carcinogenesis. J Intern Med 42:36-42.
- Takhar AS, Eremin O, Watson SA. 2004. The role of gastrin in colorectal carcinogénesis. Surgeon 2(5):251-257.
- Uchida H, Kado S, Onoue M, Tohyama K. 1997. Relationship between nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in rat colon. Jpn J Cancer Res. 88:807-814.
- Vázquez CMG, Pérez CJP, Hernández CJM, Marrufo DML, Martínez RE. 2010. Calidad de grano y tortillas de maíces criollos del Altiplano y Valle del Mezquital, México. Rev Fitotec Mex 33:49-56.
- Velmurugan B, Singh RP, Tyagi A, Agarwal R. 2008. Inhibition of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation by silibinin in male fisher 344 rats. Cancer Prev Res 1:376-384.
- Vergara-Castañeda H A., Guevara-Gonzalez R G., Ramos-Gomez M., Reynoso-Camacho R., Guzman-Maldonado H., Feregrino-Perez A A., Oomah B D.and Loarca-Piña G. 2010. Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. Food & Function. 1:294-300
- Walter M, Marchesan E. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. Braz Arch Biol Technol 54:371-377.
- Węsierska JG, Schreiner T, Gueorguieva M, Ranftler C. Phenol red reduces ROSC mediated cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 cells. J Cell Biochem 98:1367-1379.
- Widlansky ME, Duffy SJ, Hamburg NM, Gokce N, Warden BA, Wiseman S, Keaney JF, Frei B, Vita JA. 2005. Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients whit coronary disease. Free Radic Biol Med 38:499-506.
- Wijnands MVW, Schoterman HC, Bruijntjes JP, Hollanders VMH, Woutersen RA. 2001. Effect of dietary galacto-oligosaccharides on azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colorectal cancer in Fischer 344 rats. Carcinogenesis 22:127-132.
- Wong CSM, Gibson PR. 2003. The trophic effect of dietary fibre is not associated with a change in total crypt number in the distal colon of rats. Carcinogenesis 24:343-348.

Young GP, Hu Y, Le Leu RK, Nyskohus L. 2005. Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment – gene interactions. *Mol Nutr Food Res* 49:571-584.

Zhivotovsky B, Orrenius S. 2006. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis* 27:1939-1945

## IX. ANEXOS

a) Anexo 1. Curva de calibración de fenoles totales

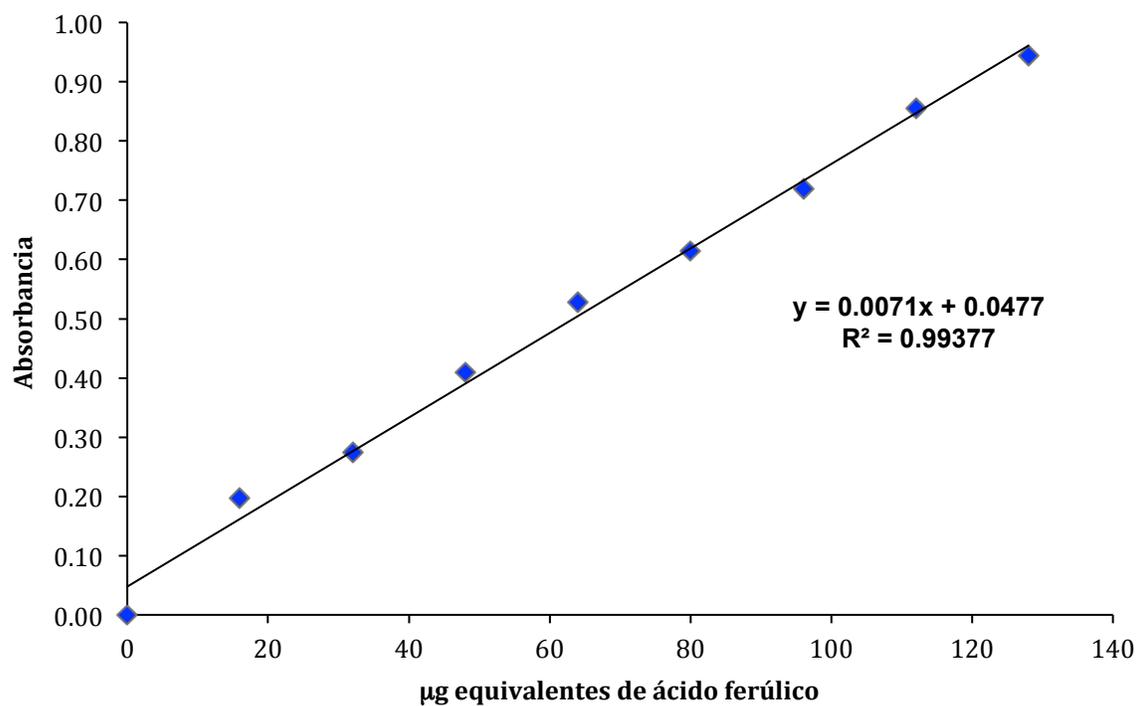


Figura 13. Curva de calibración de fenoles totales expresados como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido ferúlico. Cada punto representa la media de tres experimentos independientes.

b) Anexo 2. Curva de calibración de taninos condensados

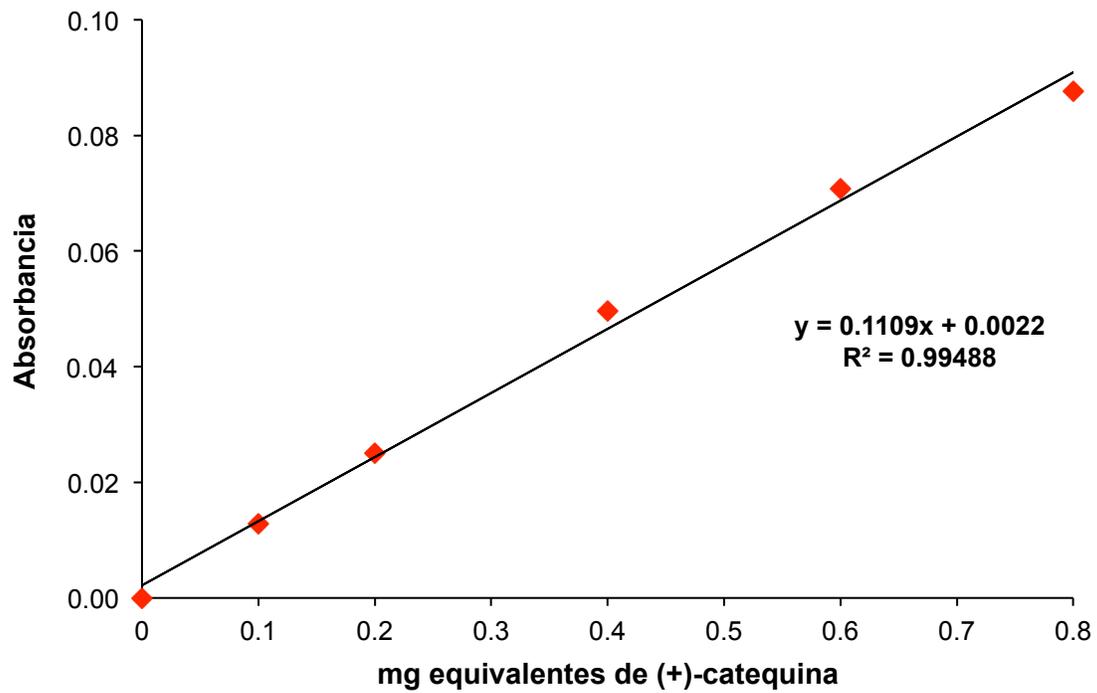


Figura 14. Curva de calibración de taninos condensados expresados como mg equivalentes de (+)-catequina. Cada punto representa la media de tres experimentos independientes.

c) Anexo 3. Curva de calibración de flavonoides

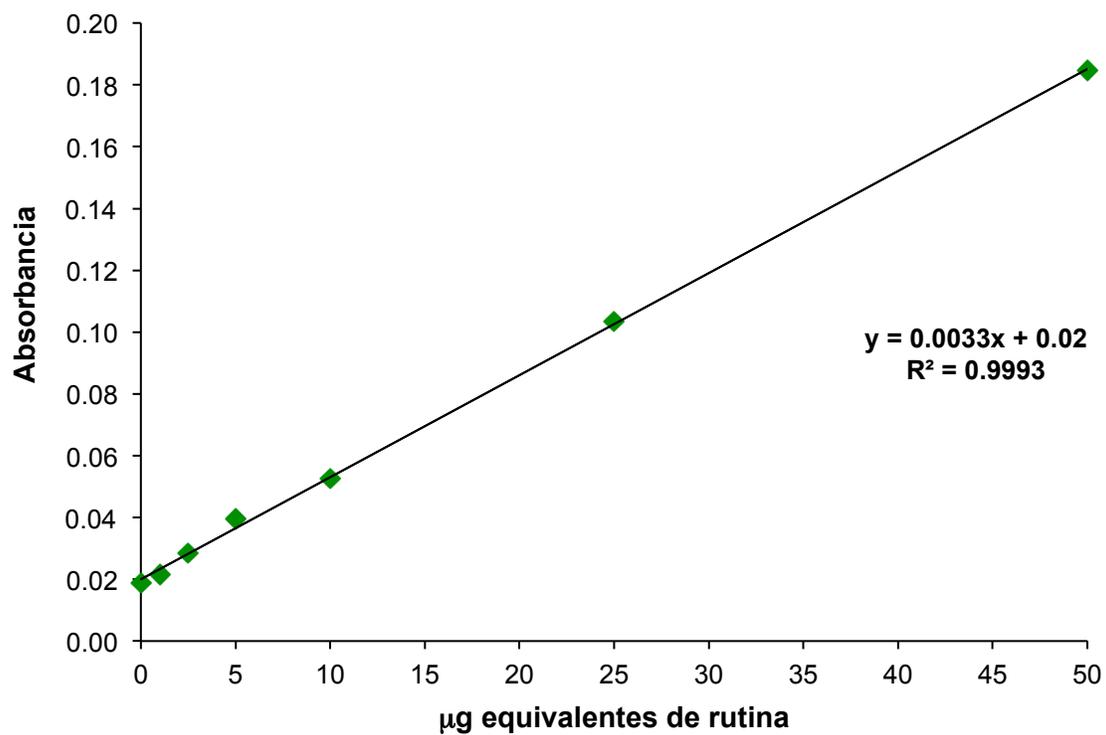


Figura 15. Curva de calibración de taninos condensados expresados como  $\mu\text{g}$  equivalentes de rutina. Cada punto representa la media de tres experimentos independientes.

d) Anexo 4. Curva de calibración de ácidos grasos de cadena corta

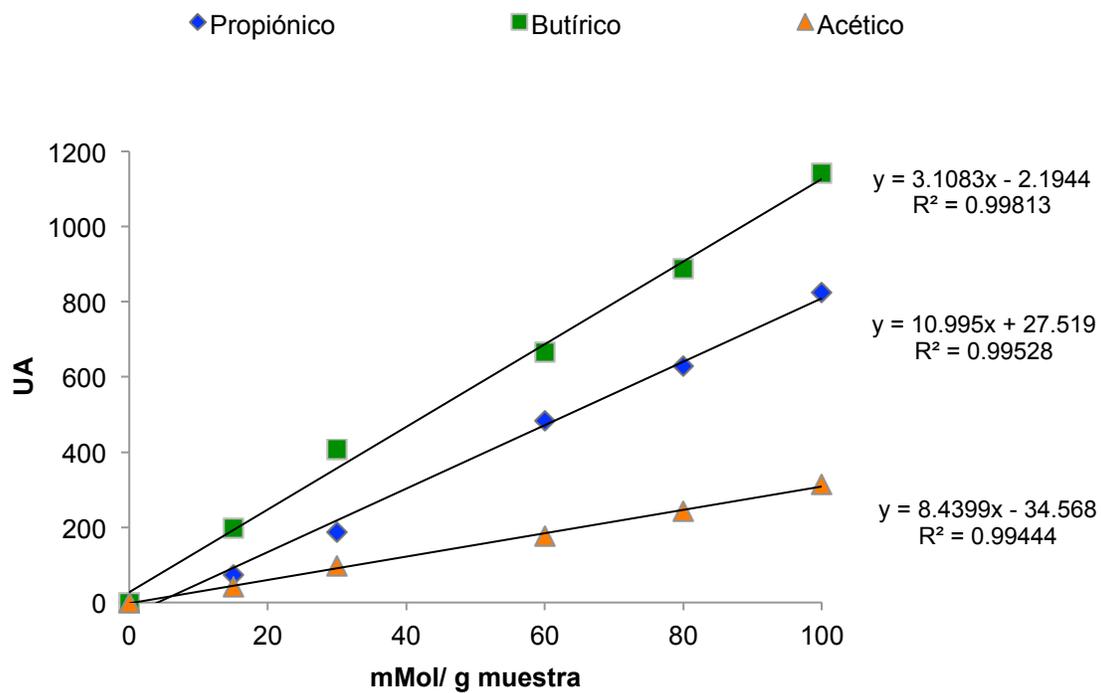


Figura 16. Curva de calibración de ácidos grasos de cadena corta expresados en milimoles. Cada punto representa la media de tres experimentos independientes.