

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

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

Caracterización química y nutracéutica de la fracción no digerible de hojas de moringa (*Moringa oleifera*) y su efecto en el perfil citotóxico de células de cáncer de colon humano HT29

TESIS

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

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Laura Helena Caicedo López

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Santiago de Querétaro, Qro., octubre, 2017



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

Caracterización química y nutracéutica de la fracción no digerible de hojas de moringa (*Moringa oleifera*) y su efecto en el perfil citotóxico de células de cáncer de colon humano HT29

TESIS

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

Presenta:

I.A. Laura Helena Caicedo López

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

SINODALES:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente


Firma

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Secretario


Firma

Dra. Rocio Campos Vega
Vocal


Firma

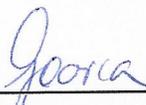
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Suplente


Firma

Dra. Ramón Gerardo Guevara González
Suplente


Firma


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


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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2017

RESUMEN

Existe una demostrada relación entre una dieta sana y la disminución del riesgo de padecer enfermedades no transmisibles (ENTs). Muchas plantas son reconocidas por sus altos contenidos de fibra y compuestos fenólicos (CF), sugiriendo su potencial nutracéutico, lo que ha generado un incremento de su consumo en el mercado de suplementos. Un ejemplo corresponde al género *Moringa* (*Moringa oleifera*), reconocida por su uso nutricional y terapéutico. Actualmente se encuentra diseminada en todo el mundo y en México es comercializada en cápsulas (hojas en polvo) como alternativa al tratamiento de diferentes padecimientos. Por tal razón, se caracterizó química y nutracéuticamente las hojas en polvo y se obtuvo la fracción no digerible (FNDM) y su extracto fermentado en colon (EFCM), simulando una digestión gastrointestinal y fermentación colonica *in vitro*, seguido de un ensayo biológico de cáncer colorrectal (CCR) con la línea celular HT29.

Se identificó la bioaccesibilidad de monosacáridos, oligosacáridos, además de CF y flavonoides libres a través de todas las etapas de la digestión hasta la fermentación colonica y se evaluó la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC: acético: 7.58, propiónico:3.92 y butírico: 1.33 mMol/L) y CF: ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido elágico (4.14, 6.18 y 10.43 µg/g, respectivamente). Considerando que éstos compuestos estarían fisiológicamente disponibles en el intestino grueso al finalizar su biotransformación, se evaluó el EFCM de 12 horas en el ensayo celular con la línea de cáncer de colon (HT29) y se encontró un efecto antiproliferativo dosis-dependiente y un CL₅₀ de: 5.9% (v/v), equivalente a la mezcla de 2.27 µg de CF y 0.7 mMol/L de AGCC. La inhibición de la sobrevivencia estuvo mediada por la inducción de apoptosis (68%) y necrosis (32%) de forma simultánea, sugiriendo perfil citotóxico potencialmente ejercido por necroptosis, iniciada por activación de autofagia (28%). Los resultados sugieren que los productos de la digestión de hojas de *Moringa*, presentan actividad biológica en el colon al inducir la muerte de células transformadas de CCR por diferentes mecanismos de regulación.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, compuestos bioactivos, bioaccesibilidad, cáncer, citotoxicidad.

ABSTRACT

There is a proven relationship between a healthy diet and a decreased risk of non-communicable diseases (NCDs). Exist many plants recognized for their high fiber content and phenolic compounds (CF), suggesting their nutraceutical potential, which has been generating an increase of their consumption in the supplements diet market. An example is the Moringa gender (*Moringa oleifera*), recognized for its nutritional and therapeutic use. It is currently spread throughout the world and in Mexico is marketed in capsules (powdered leaves) as an alternative to the treatment of different diseases. The aim of this study was made a chemically and nutraceutical characterization of leaves powder, and the non-digestible fraction (FNDM) obtained by a simulated *in vitro* gastrointestinal digestion and its fermented colon extract (EFCM) according to the methodology proposed by Campos-Vega *et al.*, (2015), followed by a biological assay of colorectal cancer (CCR) with the HT29 cell line.

The bioaccessibility of monosaccharides, oligosaccharides, CF and free flavonoids was identified through all the stages of digestion until colonic fermentation by microbiota and the short chain fatty acids production was evaluated (SCFA: acetic: 7.58, propionic: 3.92 and butyric: 1.33 mMol/L). Also, CF content was measure: Chlorogenic, caffeic acid and ellagic acid (4.14, 6.18 and 10.43 µg / g, respectively). Moreover, a dose-dependent antiproliferative effect was found in HT29 cell line, with an IC₅₀ of 5.9% (v / v), equivalent to the mixture of 2.27 µg CF and 0.7 mMol/L AGCC. Survival inhibition was mediated by apoptosis (68%) and necrosis (32%) simultaneously, suggesting a cytotoxic profile potentially exerted by necroptosis and autophagy (28%). activation The results suggest that the products of Moringa leaf digestion have biological activity in the colon and could induce cell death in CCR cells by different regulatory mechanisms.

Key words: *Moringa oleifera*, bioactive compounds, bioaccessibility, cancer, cytotoxicity.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los financiamientos durante el desarrollo de ésta investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo en el transcurso de la estancia en la maestría. Así mismo a México, especialmente a la ciudad de Querétaro por ofrecerme una oportunidad de intercambio cultural y formación académica, con gran calidez humana de todas las personas que contribuyeron al desarrollo de éste proceso.

A la Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca por su confianza y acompañamiento en todo momento, además de su paciencia y constancia para guiarme en la ejecución de este trabajo.

A la Dra. Rocío Campos Vega por su apoyo en cada detalle durante el trabajo en cultivo celular, a la Dra. Sandra Mendoza y a todo el cuerpo académico docente que hizo posible mi formación en los diferentes cursos durante la maestría, como también las aportaciones realizadas a ésta investigación.

A Carmelita, por su permanente apoyo con los procesos administrativos y documentales de la Facultad de Química, la UAQ y CONACYT.

A mis compañeros de laboratorio de Bioquímica Toxicológica y compañeros de generación 2015-2017, por compartir cada experiencia y conocimiento con la complicidad sincera de la amistad.

A Carlos González por acompañarme y apoyarme de forma incondicional.

A Dios, a mis hermanos y padres, a quienes dedico éste trabajo porque son mi mayor motivación y fortaleza para mantener la curiosidad por el mundo e inspirarme a continuar.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
ÍNDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE CUADROS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
I. INTRODUCCIÓN	14
II. ANTECEDENTES	16
II.1 Dieta y su efecto en la salud	16
II.2 Bioaccesibilidad y bioactividad	17
II.3 Enfermedades no transmisibles (ENT)	18
II.3.1 Estrés Oxidativo	19
II.3.2 Ciclo celular (CC)	22
II.3.3 Cáncer colorrectal (CCR)	27
II.3.4 Biología del cáncer colorrectal (CCR)	29
II.3.5 Nutracéuticos y cáncer colorrectal (CCR)	30
II.3.6 Modelos <i>in vitro</i> (línea de cáncer colorrectal HT29)	32
II.4 Generalidades de la moringa (<i>Moringa oleifera</i>)	33
II.4.1 <i>Moringa oleifera</i> en México	34
II.4.2 Hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>)	35
II.4.3 Composición química y nutracéutica de las hojas de <i>Moringa oleifera</i>	36
II.4.4 Compuestos bioactivos de las hojas de <i>Moringa oleifera</i>	38
II.5 Estructura química de compuestos bioactivos	39

II.5.1 Compuestos Fenólicos (CF)	41
II.5.2 Glucosinolatos e isotiocianatos	46
II.5.3 Taninos condensados	47
II.5.4 Saponinas	48
II.5.5 Fitatos y oxalatos	49
II.6 Fracción no digerible (FND)	50
II.6.1 Biotransformación de compuestos bioactivos	51
II.6.2 Metabolismo colónico de compuestos fenólicos	54
II.7 Estudios previos de la actividad biológica de las hojas de <i>Moringa oleífera</i>	56
III. JUSTIFICACION	58
IV. HIPÓTESIS	59
V. OBJETIVOS	59
V.1 Objetivo general	59
V.2 Objetivos específicos	60
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	60
VI.1 Materiales	60
VII 1.2 Material biológico	61
VI.2 Métodos	61
VI.2.1 Preparación de la muestra	61
VI.2.2 Caracterización nutrimental de las hojas de Moringa	61
VI. 2.3 Determinación de humedad (Método 925.09B)	61
VI. 2.4 Determinación de proteína (Método 925.09B)	61
VI.2.5 Determinación del extracto etéreo (Método 920.39)	62

VI.2.6 Determinación de cenizas (Método 923.03)	62
VI.2.7 Digestión Gastrointestinal <i>in vitro</i> : Obtención de la fracción no digerible (FNDM)	63
VI.2.8 Determinación de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos durante la digestión <i>in vitro</i>	66
VI.2.9 Capacidad antioxidante mediante el radical DPPH	68
VI.2.10 Capacidad antioxidante mediante el radical ABTS	68
VI.2.11 Ensayo celular (línea de cáncer de colon humano HT29)	69
VI.2.12 Determinación de la concentración letal media (CL ₅₀)	69
VI.2.13 Determinación de daño celular (citotoxicidad) LDH	70
VI.2.14 Técnica del TUNEL	70
VI.2.15 Ensayo de Peróxido de hidrógeno (Amplex Red)	71
VI.2.16 Ensayo de medición de Autofagia	72
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
VIII.1 Caracterización química proximal nutrimental	73
VIII.2 Potencial nutracéutico de las hojas de <i>Moringa oleifera</i>	75
VIII.2.1 Contenido de fibra dietaria	75
VIII.2.2 Contenido total de fenoles, flavonoides y taninos	77
VIII.2.3 Capacidad antioxidante de diferentes lotes (L1, L2, L3) de cosecha de las hojas de <i>Moringa oleifera</i> .	79
VIII. 3 Ensayo Biológico: Digestión gástrica y fermentación colonica <i>in vitro</i>	82
VIII.3.1 Flujo de agua y viabilidad del saco intestinal invertido durante el ensayo de permeabilidad <i>in vitro</i>	82
VIII.3.2 Contenido de compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) libres durante la digestión gastrointestinal y fermentación colonica <i>in vitro</i> de hojas de Moringa (<i>Moringa oleifera</i>) por HPLC-DAD.	85

VIII.3.3 Bioaccesibilidad de monosacáridos y oligosacáridos de las hojas de <i>Moringa oleifera</i>	96
VIII.3.4 Efecto de la fermentación colonica sobre el pH	99
VIII.3.5 Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante la fermentación colonica <i>in vitro</i> de la FNDM	101
VIII.3.6 Capacidad antioxidante durante la digestión y fermentación colonica <i>in vitro</i>	104
VIII.3.7 Contenido de proteína en la fracción no digerible de las hojas de Moringa (FNDM) y su transformación durante la fermentación colonica <i>in vitro</i>	107
VIII.4 Supervivencia en células de cáncer de colon sometidas a tratamiento de hojas de Moringa (HM) y el extracto de fermentación colonica de hojas de Moringa (EFCM).	109
VIII.4.1 Efecto del extracto de fermentación colonica de hojas de Moringa (EFCM) en la supervivencia de células de cáncer de colon sometidas a tratamiento con el extracto de fermentación colonica de Moringa	111
VIII.4.2 Contenido de ácidos grasos (AGCC) y compuestos fenólicos (CF) presentes en el EFCM para tratamientos celulares.	112
VIII.4.3 Efecto de la CL ₅₀ -EFCM sobre la producción de peróxido de hidrógeno en células HT-29.	115
VIII.4.4 Efecto del extracto de fermentación colonica de hojas de Moringa CL ₅₀ -EFCM sobre la toxicidad en células HT29.	117
VIII.4.5 Efecto del CL ₅₀ -EFCM sobre la muerte por apoptosis (TUNEL) en células de cáncer de colon HT29.	119
VIII.4.6 Efecto del CL ₅₀ -EFCM sobre la muerte celular por autofagia en células de cáncer de colon HT29	122
IX. CONCLUSIONES	125
X. REFERENCIAS	126

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Valores medios obtenidos en hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>).....	37
Cuadro 2. Contenido de proteína, lípidos, cenizas, humedad y carbohidratos de hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>) en polvo.	73
Cuadro 3. Porcentaje de fibra dietaria total, soluble e insoluble de hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>) en polvo.....	75
Cuadro 4. Contenido de fenoles totales, flavonoides y taninos libres de las hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>) deshidratadas.....	77
Cuadro 5. Evaluación de la capacidad antioxidante extractos metanólicos de hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>).	79
Cuadro 6. Cambios en el flujo de agua durante la absorción en el yeyuno de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	82
Cuadro 7. Transporte de glucosa en prueba de viabilidad del saco intestinal invertido.....	84
Cuadro 8. Bioaccesibilidad de flavonoides libres durante la digestión gastrointestinal y fermentación colonica <i>in vitro</i> de hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>).....	1
Cuadro 9. Bioaccesibilidad de ácidos fenólicos libres durante la digestión gastrointestinal y fermentación colonica <i>in vitro</i> de hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>).	90
Cuadro 10. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}), permeabilidad neta ($P_{app\ Neta}$) y relación de flujo de salida de los compuestos fenólicos en los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	93
Cuadro 11. Bioaccesibilidad de oligosacáridos y sus productos en la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in vitro</i> de hojas de moringa.	96

Cuadro 12. Efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible de hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>) sobre el pH.	99
Cuadro 13. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en los diferentes tiempos de fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible de las hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>) deshidratada.....	101
Cuadro 14. Capacidad antioxidante de las hojas de moringa durante la digestión gastrointestinal y fermentación colónica <i>in vitro</i>	104
Cuadro 15. Contenido de proteína de la fracción no digerible durante la digestión y fermentación colónica	107
Cuadro 16. Ácidos grasos de cadena corta del EFCM en la CL ₅₀	112
Cuadro 17. Compuestos fenólicos libres del EFCM en la CL ₅₀	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Influencia del estrés oxidativo en la salud	21
figura 2. Etapas de evolución del estrés oxidante	21
figura 3. Cuatro fases sucesivas del ciclo de una célula eucariota típica.	23
Figura 4. Regulación del ciclo celular. http://grupob2patologiausac.blogspot	24
Figura 5. Rutas metabólicas de apoptosis http://www.biooncology.com/biological-pathways/apoptosis/index.html	27
Figura 6. Origen del cáncer: células normales se transforman en cancerígenas http://www.secenterhealthcenter.org!colorectal-cancer-screening/pc9hx	29
Figura 7. Morfología de células HT29-transferencia 12.....	32
Figura 8. Hoja de <i>moringa oleifera</i> (broin y saint sauveur, 2010).....	34
Figura 9. Flavonoides. estructura básica y tipos. tomada de (Martínez-Flórez <i>et al.</i> , 2012).....	40
Figura 10. Estructura de flavonoides destacados en hojas de <i>Moringa oleifera</i>	45
Figura 11. Estructura química de compuestos bioactivos (Isotiocianatos) encontrados en las hojas de moringa (Leone <i>et al.</i> , 2015).....	47
Figura 12. Tipos de interacciones entre los compuestos fenólicos y la fibra dietaria dentro de una matriz alimentaria (Sauceda <i>et al.</i> , 2011).....	52
Figura 13. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos asociados a la fibra dietaria (modificado de Palafox-Carlos, 2011).	55
Figura 14. Capacidad antioxidante del extracto acuoso de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	80
Figura 15. Efecto de las hojas de (<i>Moringa oleifera</i>) en la sobrevivencia de células de cáncer de colon HT29.	109
Figura 16. Efecto de la fermentación colonica de hojas de (<i>Moringa oleifera</i>) sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon HT29.	111
Figura 17. Efecto de los compuestos bioactivos del EFCM en la sobrevivencia de células HT29.	113
Figura 18. Efecto del CL50-EFCM en la producción de H ₂ O ₂ en células HT29...	115

Figura 19. Efecto citotóxico del CL ₅₀ -EFCM en células HT29.....	117
Figura 20. Efecto del CL ₅₀ -EFCM sobre la apoptosis en células HT29.....	119
Figura 21. Fluorescencia de células en apoptosis.....	120
Figura 22 Porcentaje de autofagia detectado en células HT29 después de 24h de Tratamiento con CL ₅₀ -EFCM.....	122
Figura 23. fluorescencia de células activadas por autofagia (DAPI).....	123

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen compuestos químicos conocidos como fitoquímicos que cumplen un rol fundamental en su crecimiento y desarrollo. Una amplia diversidad de plantas, frutos, especias y semillas han sido utilizadas en la medicina tradicional y se ha reportado que sus componentes presentan efectos favorables para la salud humana, confiriéndoles la denominación de “nutracéuticos” a las matrices alimentarias que los contienen, por lo que se ha propuesto validar sus actividades biológicas y moleculares en diferentes modelos para explicar los mecanismos que intervienen en aquellas propiedades benéficas a la salud que les son atribuidas, considerando la biotransformación a la que son sometidos durante la digestión y así conocer si dichos compuestos son bioaccesibles y se encuentran en concentraciones suficientes en materias primas disponibles (Wang *et al.*, 2012; Kennedy y Wightman, 2011; Muñoz *et al.*, 2007).

Moringa (Moringa oleifera), es una especie perteneciente a la familia *Moringácea*, cultivar distribuido y valorado por su amplia gama de usos medicinales y nutricionales (Anwar *et al.*, 2007). Esta planta tradicional fue redescubierta en la década de 1990 y su cultivo se ha vuelto cada vez más popular en el mundo. En Asia y África, es uno de los cultivos económicamente más valiosos, por su reconocido aporte nutricional, según la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura, por sus siglas en inglés FAO (FAO, 2014). El interés sobre esta planta multiusos está relacionado además de su composición (contenido de fitoquímicos con potencial nutracéutico), su rendimiento en cultivo y capacidad de adaptación a diferentes condiciones edafológicas (Kasolo *et al.*, 2010; Iqbal *et al.*, 2006; Bhangar *et al.*, 2006).

Las investigaciones sobre *Moringa* corresponden a la identificación de compuestos bioactivos en diferentes partes de la planta (raíces, hojas, vainas, flores y semillas) además del perfil, concentración y método de extracción de los mismos. Las investigaciones han demostrado que las hojas presentan potencial de estudio en términos nutracéuticos, de composición y rendimiento, siendo la mayor fuente

nutrimental por su alto contenido proteico, vitamina A, vitamina C y antioxidantes, destacándose entre éstos, los compuestos fenólicos (en su mayoría flavonoides) de actividad biológica reportada en diversas investigaciones (Vongsak *et al.*, 2013; Mensah *et al.*, 2012; Kasolo *et al* 2010; Tree for Life,2005; Siddhuraju y Becker, 2003).

Estudios epidemiológica ha relacionado el consumo de la fibra dietética con la inhibición de la incidencia del cáncer colorectal (CCR), siendo dicha fibra un grupo heterogéneo de sustancias no digeribles, destacando la fibra soluble, insoluble y almidón resistente (Dahm *et al.*, 2010).

Otra familia de compuestos bioactivos son los compuestos fenólicos (taninos condensados, flavonoides y antocianinas), que han sido asociados con la reducción del riesgo de padecer ENTs mediante modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. En conjunto los metabolitos secundarios de las plantas, han mostrado tener un papel anticancerígeno al prevenir y/o reducir la progresión de ENTs, así como también la actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer, siendo relevante la línea de cáncer de colon humano HT29 (Cho y Park, 2013; Sreelatha *et al.*, 2011; Campos-Vega *et al.*, 2010; Beninger y Hosfield 2003; Waldecker *et al.*, 2008).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue cuantificar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos presentes en la fracción no digerible de las hojas de moringa (*Moringa oleifera*) al finalizar la transformación gastrointestinal y fermentación colonica usando un modelo de digestión *in vitro*, además de evaluar el efecto del extracto fermentado (EFCM) sobre el perfil citotóxico de células de cáncer de colon humano HT29.

II. ANTECEDENTES

II.1 Dieta y su efecto en la salud

La dieta es el medio de nutrición de los individuos y factor de bienestar en la salud humana. Ésta es también una fuente de compuestos bioactivos como lo son la fibra dietaria (FD), considerada un como grupo de carbohidratos complejos que no puede ser digerido por el organismo humano (Montagne *et al.*, 2003; Prosky, 2000).

Otros compuestos que se encuentran ligados a la fibra, son los compuestos fenólicos, saponinas, fitoesteroles entre otros, cuya actividad biológica es de importancia por estar relacionada con la reducción del riesgo a padecer ENTs, aunque los complejos estructurales de ambos compuestos pueden limitar su absorción y son variables dependiendo de la composición de la matriz completa (Pérez-Jiménez *et al.*, 2009; Porrini *et al.*, 2008; Parada y Aguilera, 2007; Faulks y Southon, 2005; DeVries, 2004).

La función que cumplen los compuestos bioactivos en los alimentos ha transformado el papel de la dieta en la salud y cuando una matriz alimentaria representa una fuente significativa de dichos compuestos, ésta se considera objeto de estudio por su potencial nutracéutico (Brusselmans *et al.*, 2005). Los mecanismos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos (CF) están condicionados a las interacciones fisicoquímicas entre éstos y otras macromoléculas presentes en matriz de origen, además de otros factores que condicionan la estabilidad de los mismos (Tagliacruzchi *et al.*, 2010).

Debido a lo anterior, su liberación y absorción en concentraciones óptimas para ejercer una actividad biológica específica en el organismo después de su consumo, presentará variabilidad dependiendo de las características de dicha matriz, tipo (líquido, sólido, cápsula) y microbiota asociada al tracto gastrointestinal y colonica del individuo (Palafox-Carlos *et al.*, 2011; Tagliacruzchi *et al.*, 2010; Parada y Aguilera 2007; Saura-Calixto *et al.*, 2007).

El conocimiento de alimentos considerados nutraceuticos se argumenta en la prevención o mejora de las condiciones de salud a partir del consumo de nutrientes y fitoquímicos debido a las funciones que desempeñan en el organismo, como: incremento de los mecanismos de defensa, recuperación y control de las condiciones físicas y/o mentales, prevención contra el desarrollo de (ENTs) que refieren las tres principales causas de muerte en el mundo: las enfermedades cardiovasculares e hipertensión, el cáncer y la diabetes, todas relacionadas con factores dietarios (Cancino *et al.*, 2001; Luengo, 2007; Asare *et al.*, 2012).

II.2 Bioaccesibilidad y bioactividad

Las propiedades de los compuestos bioactivos están limitadas en primera medida, por la cantidad de un nutriente que es ingerida y a su vez accesible en forma suficiente para su absorción intestinal (bioaccesibilidad) (Palafox *et al.*, 2010). Luego, la disponibilidad de éste para ejercer un efecto a nivel fisiológico, corresponde al concepto clave de biodisponibilidad, siendo determinante para la eficacia nutricional, independientemente del tipo de alimento (funcional o no), ya que sólo ciertas cantidades de todos los nutrientes o compuestos bioactivos son biodisponibles (Cilla *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista fisiológico, los alimentos después del consumo experimentan el proceso de digestión gastrointestinal que puede afectar el potencial antioxidante nativo de la mezcla compleja de compuestos bioactivos presentes en la matriz alimenticia antes de llegar al intestino proximal, por lo que métodos *in vitro* que permiten aplicar simulaciones humanas para obtener un estándar predictivo del comportamiento *in vivo* (Hur *et al.*, 2011; Fernández-García *et al.*, 2009)

Los modelos de digestión (incluyendo o no la fermentación del colon) se consideran herramientas valiosas y útiles estimar eventos previos a la absorción (estabilidad y bioaccesibilidad) de diferentes componentes de los alimentos y distintas fuentes. Además, ensayos *in vitro* que combinan la simulación del proceso de digestión

gastrointestinal y modelos preclínicos con cultivos celulares, pueden ser útiles para explicar posibles mecanismos (Liu *et al.*, 2005).

II. 3 Enfermedades no transmisibles (ENT)

La globalización se encuentra ligada a rápidos cambios socioeconómicos, demográficos y tecnológicos; lo que ha resultado en la modificación de los hábitos de alimentación, generando una transición nutricional, ligada a la urbanización, actividad física, crecimiento económico, cambios tecnológicos en el trabajo, procesamiento de alimentos, cultura y el crecimiento de la información masiva. Éstas condiciones han influido como factores de riesgo en el desarrollo de ENTs como componentes externos que condicionan su padecimiento. Los patrones de incremento en el consumo de alimentos de alto contenido calórico y el sedentarismo (disminución del gasto energético) están correlacionados al padecimiento de dichas patologías, destacándose entre ellas: la obesidad, disfunciones cardiovasculares, diabetes y cáncer (Del Gobbo *et al.*, 2015; Savino, 2011; Ferreira *et al.*, 2008).

El padecimiento de las (ENTs) se considera multifactorial, siendo relevantes aspectos socioeconómicos y demográficos (región, sexo, grupo de edad, entre otros), los cuales se suponen como elementos que aumentan su riesgo, además de algunos patrones de conducta como: tabaquismo, consumo de alcohol, actividad física, exposición a ambientes contaminados (laboral o recreativo y con mayor impacto, la dieta (Kumanyika *et al.*, 2008).

Los reportes muestran un aumento significativo de las ENTs en la población, alto costo económico y dificultad en la aplicación de políticas públicas para su prevención. Se ha reportado alrededor de 67 tipos de riesgos, que incluyen análisis estadísticos y correlaciones sistemáticas entre los cuales implican la dieta como un factor determinante (Lim *et al.*, 2012). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, OMS, existe un vínculo entre los consumos desequilibrados y una alta incidencia en afecciones a la salud por ENTs, es decir, debido a la deficiencia de una dieta sana según la organización mundial de la salud (OMS, 2015).

Para México es de interés considerar la dieta como enfoque principal de atención, debido a la asociación existente entre los cambios de consumo, alto porcentaje de obesidad y diabetes con el índice de enfermedades relacionadas al desbalance en consumo de nutrientes en la dieta. El sobrepeso y la obesidad se han convertido en el factor de riesgo modificable más importante, puesto que el 71.3% de los adultos mexicanos padecen una condición de éste tipo, especialmente en la cuarta y quinta década de vida (INSP, 2015; ENSANUT, 2012, Córdova-Villalobos *et al.*, 2008;). Se ha estimado que para el año 2017 las pérdidas económicas generadas por enfermedades atribuibles al sobrepeso y la obesidad llegará a los \$78 millones de pesos (Maldonado *et al.*, 2013).

El Informe emitido por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles en el año 2014, indicó que el existe un 32.8% de adultos obesos, sólo por arriba de Estados Unidos con 31. 8% Además 7 de cada 10 adultos tienen sobrepeso, la obesidad se triplico en la década y cerca del 30% de los adolescentes están gordos. Datos similares a los reportados por la Encuesta Nacional de Salud ENSANUT en el 2012 que informó un 42.3% de adultos obesos y una prevalencia de hipertensión arterial del 31.5%, siendo aún más alta en adultos con obesidad (42.3%), que en adultos con índice de masa corporal normal (18.5%) (FAO, 2015).

II.3.1 Estrés Oxidativo

Todos los desequilibrios que se presentan por factores externos tienen efectos a nivel biológico de forma directa y así, generan desequilibrios en los procesos de regulación del organismo. Se conoce que éstos han aumentado en las últimas décadas y a su vez el estrés oxidativo, característica que resulta por la pérdida de homeostasis o equilibrio que busca cada célula para adaptarse a condiciones estables (Barbosa *et al.*, 2008).

El estrés oxidativo caracteriza una alteración del balance biológico y puede presentarse en diversos grados, que van desde la adaptación, hasta el estrés

oxidante agudo y el crónico (procesos están estrechamente involucrados a diversas patologías), como los padecimientos crónico-degenerativos, procesos infecciosos e inmunitarios (Hicks *et al.*, 2006). El proceso descrito, ocurre por la perturbación entre los sistemas oxidativos y los mecanismos antioxidantes, a favor de los primeros, acarreando la generación de grandes cantidades de radicales libres que se traduce en la disminución de la velocidad de neutralización de éstos (Halliwell y Whiteman, 2004).

La superación de los sistemas pro-oxidantes por los antioxidantes favorece la instauración del estrés oxidativo, caracterizado por la producción exacerbada de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ERO) o de nitrógeno (ERN), continuando con la oxidación de biomoléculas y la consiguiente pérdida de sus funciones biológicas; así como el descontrol homeostático que conlleva a un potencial daño oxidativo de células y tejidos. La cronicidad del estrés oxidativo implica el desarrollo de las ENTs ya mencionadas (Hicks *et al.*, 2006). En la Figura 1 se presenta un esquema del desbalance que caracteriza las condiciones del estrés oxidativo y su influencia sobre enfermedades asociadas a éste y la Figura 2 muestra las etapas que caracterizan la intensidad del proceso oxidante y las interacciones que tienen los compuestos oxidantes frente a los sistemas de regulación que pueden ser endógenos (enzimas) o exógenos (origen dietético) (García Triana *et al.*, 2013).



Figura 1. Influencia del estrés oxidativo en la Salud
(Barbosa *et al.*, 2008).

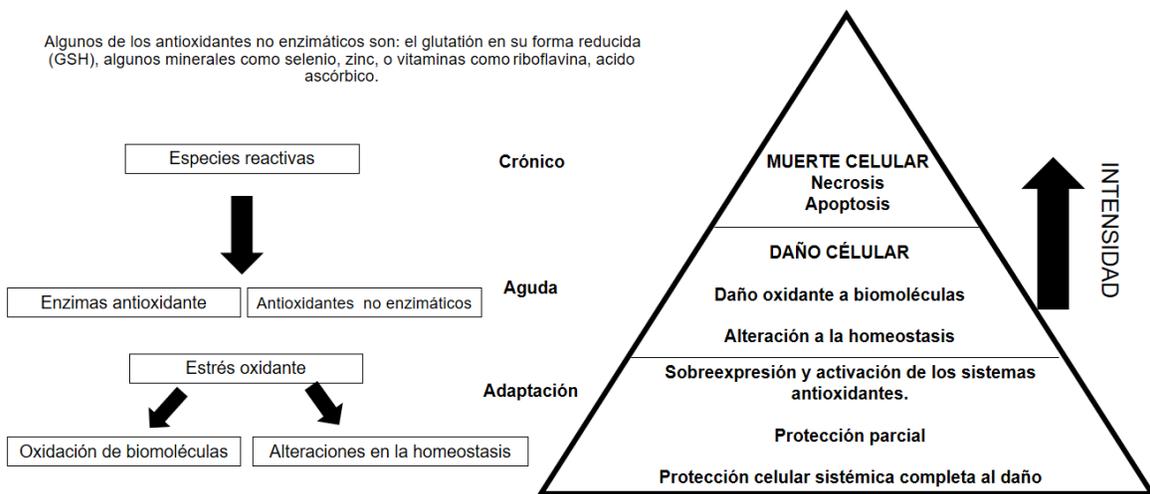


Figura 2. Etapas de evolución del estrés oxidante
(García Triana *et al.*, 2013).

A fin de correlacionar la intensidad y el grado de afectación en la salud, el proceso de estrés oxidante puede dividirse en tres etapas o niveles de progresión o intensidad (adaptación, agudo y crónico). Las defensas antioxidantes son clasificadas, principalmente, en enzimáticas y no enzimáticas. Estos últimos sistemas, incluyen, especialmente, los antioxidantes de origen dietético, entre los que se destacan vitaminas, minerales y polifenoles. Así, el α -tocoferol y β -caroteno

(precursores de las vitaminas E y A, respectivamente) junto con el ácido ascórbico (vitamina C), sustancias con gran potencial antioxidante (Jarcía Triana *et al.*, 2013).

Entre los minerales de importancia antioxidante se destacan el zinc, el cobre, el selenio y el manganeso debido a su actuación como cofactores de las enzimas antioxidantes con capacidad de neutralizar mecanismos oxidativos. Un antioxidante con función biológica se define como aquella sustancia que presente en concentraciones muy pequeñas, comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del mismo. Tales sustancias pueden tener acción directa, por medio de la neutralización de los radicales libres y especies reactivas no radicales o indirecta, a través de sistemas enzimáticos con capacidad para su neutralización (García Triana *et al.*, 2013; Hicks *et al.*, 2006).

La dieta ha sido reportada como un factor modulador del riesgo a padecer diferentes Enfermedades no transmisibles (ENTs). Las investigaciones sobre materias primas que componen la dieta y que pueden ejercer efectos benéficos a la salud a diferentes niveles, ya sea de forma individual y/o sinérgica derivada de la bioactividad de sus componentes, ha sido la principal oportunidad de investigación en el área de nutraceuticos. Entre las fuentes vegetales se incluyen las plantas utilizadas en la alimentación y medicina tradicional, como las hojas de Moringa, de las cuales se ha reportado diversos efectos biológicos *in vitro* asociados al arresto o detención del ciclo celular e inducción de muerte celular por apoptosis y de aquí su relevancia en padecimientos asociados a la alteración del ciclo, como lo es el cáncer.

II.3.2 Ciclo celular (CC)

Dado que el estrés oxidativo puede dañar las moléculas que constituyen las estructuras biomoleculares y por tanto la misma célula, es conveniente señalar el ciclo celular y sus etapas como un conjunto de eventos organizados, monitoreados y responsables de la división celular que resulta en dos células hijas (Fernández, 2015). El ciclo completo dura desde 12 horas hasta meses o años, mientras la

mitosis tiene una duración constante de 1 hora, las células pueden permanecer “arrestadas” en G0 durante años (Burgués *et al.*, 2005; Lomanto *et al.*, 2010).

Este proceso es fundamental tanto para generar nuevas células como para reemplazar las células dañadas. Se distinguen varias fases que se muestran en la Figura 3, la fase G0 o de reposo cuando las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido; en la fase G1, las células producen ARN y proteínas; en la fase S se replica el ADN; en la fase G2 o de post-síntesis el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o de mitosis (Burgués *et al.*, 2005). Así se presenta en la figura 3.

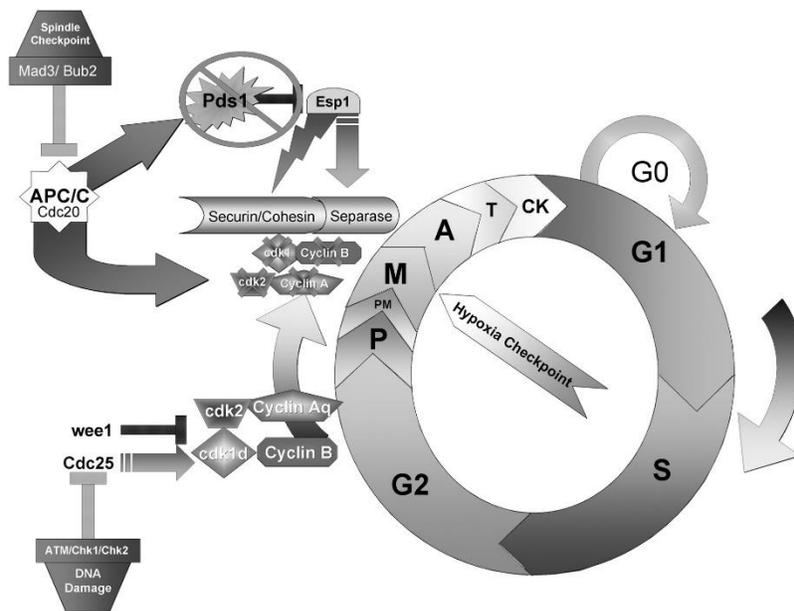


Figura 3. Cuatro fases sucesivas del ciclo de una célula eucariota típica.

Tomado de (Douglas *et al.*, 2003)

Distintas proteínas ejercen el control en la entrada y la progresión de las células a lo largo de las fases del CC (Burgués *et al.*, 2005). Se consideran como elementos clave de dicho evento, la activación secuencial de los complejos de enzimas

heterodiméricos ciclina- cinasas dependientes de las ciclinas (CDK). La actividad cinasa de las CDK es estrechamente regulada por la unión a las ciclinas, las subunidades activadoras, la unión a reguladores negativos (inhibidores de CDK, CKI) y eventos de fosforilación/fosforilación.

La progresión a través de cada fase del ciclo celular y su transición entre éstas, está monitoreada por mecanismos sensores, llamados puntos de restricción, los cuales mantienen la exactitud de la secuencia del ciclo (Lomanto *et al.*, 2010).

En la en la figura 4 se indican los puntos de control y los reguladores génicos y proteicos de restricción y control.

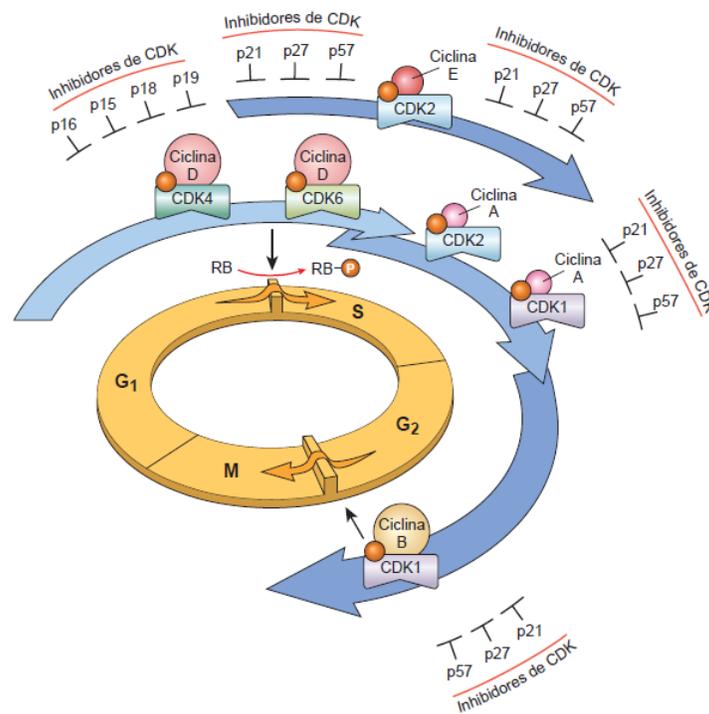


Figura 4. Regulación del ciclo celular. <http://grupob2patologiausac.blogspoto>

Los puntos de restricción (PR) del ciclo celular previenen la transición a la siguiente fase hasta que la previa haya sido satisfactoriamente completada. El mal funcionamiento de los puntos de restricción del ciclo celular puede resultar en enfermedades como cáncer (Fernández, 2015; Manchado *et al.*, 2012; Hartwell y

Weinert, 1989). Los PR se activan cuando se detectan problemas induciendo arresto al ciclo celular hasta que el problema se resuelva, si es posible, o si la reparación no es satisfactoria, dirigir la célula hacia la senescencia o apoptosis (Viallard *et al.*, 2001).

II.1.2.2.1 Cáncer

La desregulación del ciclo celular resulta en la proliferación celular aberrante que caracteriza el cáncer y la pérdida de un punto de control del ciclo celular lo que promueve la inestabilidad genética. Durante las últimas dos décadas, la genética del cáncer ha demostrado hiperactividad en las mutaciones que implican redes de señalización del crecimiento celular, unido a la pérdida de la función de las proteínas supresores de tumores, que impulsa la proliferación oncogénica. Existen decenas de formas en que se presenta el cáncer, pero su fisiopatología básica comprende aberraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que dirige el CC y que causan sus desregulaciones (Golias *et al.*, 2004).

En condiciones normales existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, pero en el cáncer aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de oncogenes (codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular) o a la inactivación de genes supresores (codifican proteínas que frenan el ciclo celular). De este modo el equilibrio se rompe y la balanza se inclina hacia la proliferación desenfrenada y la inmortalización de la línea celular (García y Vecino, 2003).

Un cáncer se define no sólo por la inmortalización de las células sino también por la capacidad invasora local y a distancia, para lo cual son necesarias mutaciones adicionales. Aquellas mutaciones que favorezcan la angiogénesis mediada por los factores de crecimiento, conocidos por sus siglas (VEGF y PD-EDGF) y la adhesión intercelular a membranas basales mediada por las e-cadherinas, integrinas, cateninas, tailinas y otras moléculas de adhesión (genes *car* y *nm-23*) serán

decisivas en la agresividad local y la capacidad metastásica del tumor (Bai y Wang, 2014; Gupta *et al.*, 2000).

II.1.2.2.2 Muerte celular

La apoptosis es la forma fisiológica de suicidio celular que interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas. Morfológicamente, la diferencia con la necrosis es que en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular.

Bioquímicamente, la característica diferencial consiste en un proceso dependiente de energía y de la síntesis de nuevas proteínas, mientras que en la necrosis falla el aporte de energía y la síntesis de proteínas se interrumpen. Las principales dianas para el daño genético son los protooncogenes, los reguladores de la muerte celular programada o apoptosis y los genes implicados en la reparación del ADN.

Los protooncogenes son genes normales que codifican los componentes del mecanismo de control normal de la célula y proteínas que activan señales celulares que definen el estado mitogénico de la célula y que favorecen la duplicación del ADN y los genes implicados en la reparación del ADN no afectan de forma directa a la célula más, sin embargo, alteran la capacidad de reparar los genes relacionados a la apoptosis.

Los reguladores de la muerte celular programada pueden comportarse como protooncogenes o genes supresores de tumores (Alberts *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2006).

Se muestra en la figura 5 los mecanismos que se reconocen hasta ahora y que intervienen en la apoptosis.

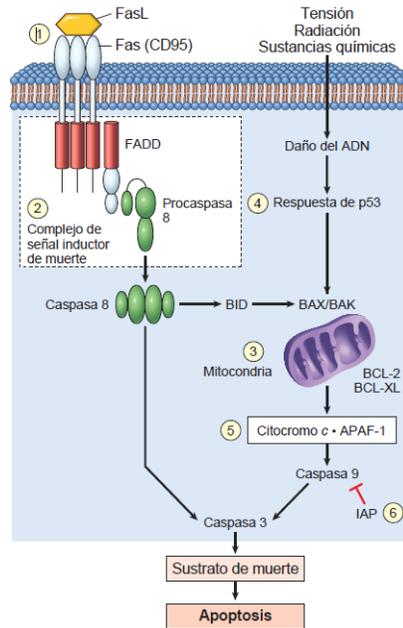


Figura 5. Rutas metabólicas de apoptosis <http://www.bioncology.com/biological-pathways/apoptosis/index.html>

En el proceso de apoptosis se distinguen varias fases: en la fase D1 se producen los mecanismos moleculares que inician el fenómeno; en la fase F se fragmenta el ADN; en la fase D2 se produce la destrucción nuclear y citoplásmica, y los restos son fagocitados por macrófagos (Gupta *et al.*, 2000).

II.3.3 Cáncer colorrectal (CCR)

En los últimos 25 años se ha reportado más de un millón de casos nuevos de cáncer colorrectal (CCR) en el mundo (Tenesa y Dunlop, 2009), siendo una de las causas más comunes de muerte por cáncer. Los factores etiológicos de éste padecimiento incluyen el consumo de grandes cantidades de alcohol y carne roja, dietas bajas en fibra, altas en grasas y una falta de actividad física (Huxley *et al.*, 2009), por lo que se ha sugerido que la dieta y otros factores de estilo de vida están estrechamente relacionados al desarrollo del cáncer (Steina *et al.*, 2011).

Éste tipo de cáncer se ha convertido en un problema de salud pública, de acuerdo a estimaciones en las que Latinoamérica y el Caribe, se esperaban 1.1 millones de

casos de cáncer en 2015, y más de seis mil muertes, siendo el cáncer colorrectal el responsable del 7% de éstos casos y muertes (Ferlay *et al.*, 2013). Recientemente se identificó como el tercer tipo de cáncer más común tanto en hombres como mujeres (Siegel *et al.*, 2014).

Además, se estima que aumente en un 60% a más de 2,2 millones de nuevos casos y 1,1 millones de muertes para el año 2030 (ACS, 2015; Arnold *et al.*, 2016). En México, la mortalidad por tumores malignos ha aumentado de 3.2 a 4.8 por cada 100 mil habitantes en las últimas tres décadas (Sanchez-Barriga, 2017).

Para que se produzca el cáncer es necesario que, de forma acumulativa y continuada, se produzcan alteraciones celulares durante un largo periodo de tiempo, generalmente años. Como resultado, las células están aumentadas en número, presentan alteraciones de forma, tamaño y función y poseen la capacidad de invadir otras partes del organismo como resultado de una programación genética anormal en la cual se producen cambios en la secuencia genómica (mutación de oncogenes y genes supresores de tumores) que alteran la estructura, función y expresión de proteínas que controlan procesos celulares esenciales como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Williams, 2001).

Se considera que el origen de todos los tumores malignos es la adquisición de una naturaleza monoclonal, lo que significa que todas las células tumorales de un cáncer específico se derivan de una sola célula normal que se ha transformado. A medida que el tumor se desarrolla, la población inicial de células monoclonales puede convertirse cada vez más heterogénea conforme las células adquieren nuevas aberraciones genéticas, lo cual conduce a subpoblaciones dentro del tumor (Hanahan y Weinberg, 2000).

Las mutaciones adicionales, así como lo rearreglos, duplicaciones y las deleciones de porciones de sus cromosomas durante la división celular, son nuevas características que pueden adquirirse durante la tumorigénesis. Se cree que esta

inestabilidad genómica se debe a puntos de control perturbados que siguen operando en diversos puntos en el ciclo celular. Las células que acumulan cambios genéticos que favorecen un crecimiento más rápido y agresivo (Hanahan y Weinberg, 2000; Williams, 2001).

La masa de tejido formado como consecuencia de este proceso puede afectar la función del órgano originario puede infiltrar los tejidos vecinos y diseminarse por vía sanguínea o linfática a otros tejidos distantes, comprometiendo su funcionalidad, como se muestra en la Figura 6.

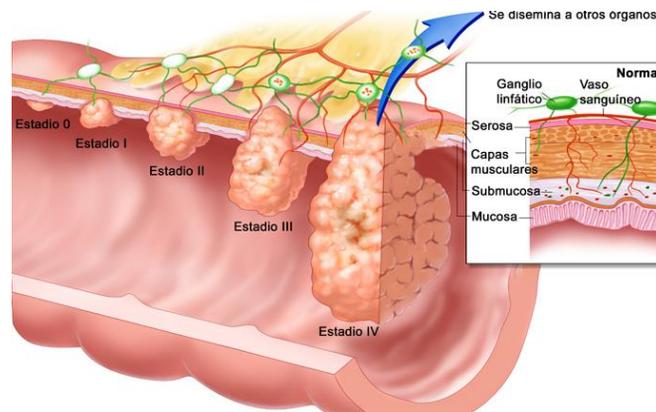


Figura 6. Origen del cáncer: células normales se transforman en cancerígenas
<http://www.seCenterhealthcenter.org/colorectal-cancer-screening/pc9hx>

II.3.4 Biología del cáncer colorrectal (CCR)

El CCR se desarrolla con el inicio de una lesión conocida como adenoma. Un adenoma puede progresar a cáncer y éste proceso puede tomar fácilmente más de 10 años, otorgando una excelente ventana de oportunidades para ser analizado. Basándose en la incidencia de hallazgos de cáncer en adenomas, se estima que aproximadamente el 5% de todos los adenomas progresen a cáncer.

Durante éste proceso de múltiples mutaciones genómicas son acumuladas en las células transformadas dando lugar a la activación de vías de señalización Wnt,

como un evento temprano que ocurre alrededor del 80% de todos los adenomas de colon y está presente en el 93% de los cánceres colorrectales. Éste es el resultado de mayor frecuencia en la mutación de adenomas polipósicos de colon o (APC) gen supresor tumoral. Otras alteraciones genéticas frecuentes incluyen la activación de mutaciones en KRAS y BRAF, inactivación de TP53, alteraciones de PI3K/Akt y el factor de crecimiento beta (TGF-Beta) (Castells y Piqué, 2000; Lim *et al.*, 2012).

El cambio de número específico de cromosomas 20q, también está asociado a la progresión del cáncer colorrectal. Esta ganancia y pérdida de cromosomas pueden a su vez ser detectados en una pequeña parte de los adenomas y aquellos adenomas que presentan éstos cambios, son considerados además como de alto riesgo para la progresión a CCR (Napa-Valle, 2003; Jänne y Mayer, 2000).

El papel que juega la dieta y nutrición entre los factores mencionados, la fibra es un compuesto significativo ya que poblaciones con dietas pobres en fibra tienen mayor frecuencia de cáncer colorrectal (Wolin *et al.*, 2010). Otros factores reportados con relación a la incidencia de cáncer colorrectal es el padecimiento de pólipos adenomatosos en el colon, colitis ulcerosa y en menor grado la Enfermedad de Crohn (Tobon, S. *et al.*, 2007). Asimismo, la predisposición genética también juega un papel importante en el desarrollo de cáncer de colon (Jasperson *et al.*, 2010).

II.3.5 Nutraceuticos y cáncer colorrectal (CCR)

En nutrición y cáncer se han analizado los efectos que tienen algunos nutrientes y compuestos bioactivos de los alimentos. Como resultado a las cifras mencionadas, ha surgido la necesidad de desarrollar diferentes tipos de terapias, dónde los nutraceuticos han cobrado relevancia por su potencial para reducir el riesgo a padecer cáncer de colon y disminuir su progresión. Estos compuestos en la dieta podrían modular a nivel molecular diferentes etapas desarrollo de éste padecimiento (Wang *et al.*, 2012; Kuppusamy *et al.*, 2014).

En general, los suplementos alimentarios antioxidantes son un componente en el control del desarrollo carcinogénico. Demostraciones clínicas han atribuido a un consumo dietario controlado de compuestos fitoquímicos de plantas y a sus estructuras análogas, el mantenimiento de la salud y la prevención del desarrollo de cáncer de colon (González-Sarrías *et al.*, 2013; Hubner *et al.*, 2009).

Por ejemplo, el té verde contiene altas cantidades de polifenoles que han demostrado controlar efectivamente el crecimiento de células carcinogénicas mediante mecanismos de arresto al ciclo celular y apoptosis en modelos *in vivo* e *in vitro*, atribuyendo dicha propiedad a los efectos sinérgicos de la mezcla de sus compuestos (Alshehri *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011). Compuestos como la quercetina, un flavonoide derivado de una variedad de frutas y plantas con propiedades antioxidantes, puede limitar el daño oxidativo en células de cáncer de colon. Así mismo, se ha reportado su efectividad en la inducción de apoptosis en células de cáncer de colon (Center *et al.*, 2009).

Modelos *in vivo* como el propuesto por Feregrino *et al.*, (2014), ha resaltado los efectos quimiopreventivos de fuentes alimentarias como el frijol, leguminosa destacada por su alto consumo en países como México. Otras investigaciones también sugieren el potencial de inhibición que presentan las fracciones no digeribles y proteicas del frijol en células de cáncer de colon humano (Luna-Vital *et al.*, 2015; Cruz bravo *et al.*, 2014; Campos-Vega *et al.*, 2012).

Por lo tanto, aquellas matrices que exhiban características nutrimentales con potencial nutracéutico, presentan relevancia biológica que debe ser evaluada a partir de condiciones que simulen o establezcan parámetros de comparación con las condiciones fisiológicas, como lo son la digestión gástrica y la etapa colonica de un alimento o suplemento. Por esto, resulta de interés la investigación a partir de modelos de digestión y fermentación colonica *in vitro*, para evaluar posibles efectos después del consumo en un modelo biológico, como el cáncer de colon, del cual son representativas diferentes líneas celulares, entre ellas la HT29.

II.3.6 Modelos *in vitro* (línea de cáncer colorrectal HT29)

La línea celular HT29 (figura 7), fue establecida en 1975, derivada de células de adenocarcinoma de colon humano. A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación. Así pues, en condiciones estándar de cultivo, la población HT29 contiene más de un 95% de células morfológicamente indiferenciadas: durante el crecimiento hacia postconfluencia, las células se van apilando y no se polarizan, formando multicapas, y no expresan marcadores de diferenciación característicos de células del epitelio intestinal adultas (Verhoeckx, K *et al.*, 2015). Sin embargo, el 5-10% restante de la población total desarrolla características diferenciadas: expresan enzimas como la aminopeptidasa N (APN), dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), antígeno carcinoembrionario (CEA), la glicoproteína membrana MUC1, así como otras mucinas (Lesuffleur *et al.*, 1990; Fogh, 1975).

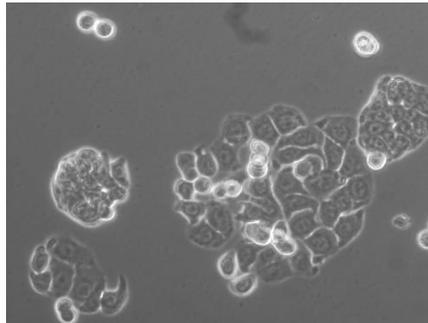


Figura 7. Morfología de células HT29-Transferencia 12

A nivel genético, las células HT29 presentan alteraciones típicas de tumores colorrectales, como son mutaciones en APC y Tp53 con la consiguiente pérdida de sus funciones, la amplificación de c-myc, así como un fenotipo de inestabilidad cromosómica y aneuploidía (Corzo *et al.*, 2003). Su expresión de genes consta de: componente secretor IgA; Antígeno carcinoembrionario (CEA); factor de crecimiento transformador para proteína de unión beta; mucina; myc+; ras; myb+; fos; sis; p53; abl-; ros-; src-. Son negativas para CD4 (Hsu *et al.*, 2012)

II.4 Generalidades de la moringa (*Moringa oleifera*)

La familia *Moringácea* está conformada entre 12 y 14 especies que pertenecen a un solo género llamado Moringa, de las cuales se reconocen 13 especies que abarcan una gama muy diversa de hábitos o formas de crecimiento, desde hierbitas y arbustos hasta árboles grandes. Todas ellas nativas del norte de la India (Olson y Fahey, 2011; Fuglie, 2005; Foidl *et al.*, 2001; Price, 1985). Ésta planta constituye un recurso filogenético destacado porque crece en sistemas naturales de diferentes regiones tropicales y en regiones como India y África, el consumo de sus hojas frescas hace parte de la dieta básica.

La Moringa (*Moringa oleifera*) presenta un rápido crecimiento y no es exigente a requerimientos de clima y calidad del suelo, siendo la especie más común que se cultiva en el mundo y se caracteriza por ser resistente a la sequía (Mudyiwa *et al.*, 2013; Gorashi, 2001; Foidl *et al.*, 2001).

También es conocida como el árbol de rábano picante, marango, Moonga, mulangay, nébéday, saijhan, o sajna. Puede encontrarse en México en toda la costa del Pacífico, dónde se ha fortalecido su producción e investigación (SAGARPA, 2014; Olson y Fahey, 2011).

Cabe señalar que éste árbol se está propagando hace 20 años con rapidez por zonas tropicales a medida que se difunde mayor información sobre sus beneficios nutricionales y económicos por ser un recurso prometedor para los países en desarrollo, ya que todas las partes de la Moringa se consumen como alimento (Teixeira *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2010). La planta produce hojas durante la estación seca y en tiempos de sequía, cuando otras fuentes alimentarias no son disponibles según la FAO en el 2013. En la figura 8 se muestran las hojas de Moringa *oleifera*.



Figura 8. Hoja de *Moringa oleifera* (Broin y Saint Sauveur, 2010).

La Moringa es fácil de identificar por la siguiente combinación de caracteres: hojas grandes y pinnadas que pueden alcanzar hasta 60 cm de longitud; están divididas en folíolos (piezas separadas de las hojas) (Olson y Fahey, 2011).

Las hojas tienen alto contenido de proteínas, vitaminas A, B y C, y minerales. Se ha sugerido su consumo en mujeres embarazadas y lactantes, así como los niños pequeños. Se cocinan (hervidas o freídas) y se consumen como la espinaca, sopas y salsas. Su consumo se está fortaleciendo principalmente por su valor nutritivo, específicamente para la re-nutrición de los lactantes que sufren de desnutrición en países como África y Guatemala (Price, 1985; García Fayos, 2011; FAO, 2013).

La presentación en polvo está dirigida a mercados occidentales, donde el consumo de suplementos elaborados a base de plantas medicinales va en aumento (Global Industry Analysts Inc., 2013).

II.4.1 *Moringa oleifera* en México

En el año 2014, la secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARAPA), promueve a través del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias (INIFAP) el cultivo de Moringa, debido a las propiedades que le han sido atribuidas a su composición, por lo que se están desarrollando investigaciones multipropósito en las regiones de Sonora, Yucatán, Jalisco y Chiapas, con el objetivo de conocer su comportamiento agronómico, nutricional y energético para el consumo humano, animal, o como una

nueva especie productora de aceite para biodiesel. Además, se investiga su variabilidad genética para optimizar su explotación (SAGARAPA, 2014).

India es el mayor productor de Moringa en el mundo con una producción anual de 1.1 a 1.3 millones de toneladas al año y Estados Unidos la cultiva en Hawái, para su distribución comercial dentro del País. En Latinoamérica, Guatemala inició su producción para enfrentar la crisis alimentaria del país, donde ya se han desarrollado programas que incluyen su consumo para suplemento nutricional, demostrando el auge y potencial de ésta materia prima en los países que comparten fronteras con México (SAGARPA, 2014).

II.4.2 Hojas de moringa (*Moringa oleifera*)

El interés en la investigación de compuestos identificados en diferentes partes de la planta, particularmente en sus hojas, se debe a la presencia de compuestos bioactivos o con potencial beneficio a la salud.

Las hojas de *Moringa oleifera* son las partes más aprovechadas comercialmente. Además, se ha reportado un alto contenido de compuestos antioxidantes, entre los que sobresalen los glucosinolatos, compuestos azufrados que se encuentran en hortalizas que también pertenecen al orden de las *Brassicales*, como el brócoli, coliflor, entre otros. Éstos son ampliamente estudiados por sus propiedades anticancerígenas y antibióticas (Qwele *et al.*, 2013; Mishra, *et al.*, 2011; Alfaro, 2008).

Las hojas secas y molidas presentan hasta un 30% de proteína en base seca, presentando mayor fuente de nutrientes que las vainas, semillas y demás partes de la planta, además es una ventaja en comparación con otras leguminosas cuyo contenido proteico se encuentra en la semilla, como es el caso de los frijoles y la soya. También, pueden ser cosechadas cada 40 días, secadas y procesadas, siendo éste periodo, suficiente para alcanzar la madurez fisiológica necesaria para alcanzar mayores contenidos proteicos, dado que después de los 50 días se

comienza a producir más fibras y disminuye la cantidad de proteínas (Teixeira *et al.*, 2015; Manguro y Lemmen 2007; Siddhuraju y Becker, 2003).

Estudios señalan que las hojas contribuyen con altos valores de calcio, magnesio, fósforo, potasio, azufre, manganeso, zinc, selenio, vitamina E, vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), colina, alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ferúlico, ácido salicílico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, y clorofila, entre otros (Coppin, 2008; Manguro y Lemmen, 2007; Iqbal y Bhanger, 2006)

Se destacan compuestos fenólicos como la quercetina y el kaempferol, flavonoides con reportada actividad biológica. Sin embargo, también se discute la variabilidad entre investigaciones debido a que muchos compuestos pueden presentarse en diferente concentración de acuerdo a diferentes factores ambientales, técnicas y metodologías de cuantificación utilizadas (Moyo *et al.*, 2011; Atawodi *et al.*, 2010; Sreelatha y Padma, 2009).

Los compuestos anti nutricios presentes en hojas como taninos, lecitinas e inhibidores de proteasas son insignificantes, por esta razón son comestibles en su totalidad, al mismo tiempo contienen un perfil de aminoácidos esenciales balanceados y son una fuente importante de vitaminas A, C y antioxidantes (Stohs y Hartman, 2015; Verma *et al.*, 2009; Olson y Fahey, 2011).

II.4.3 Composición química y nutracéutica de las hojas de *Moringa oleifera*

Los contenidos nutrimentales de las hojas frescas han sido comparados con otros alimentos, así: Contienen al menos dos veces más proteínas que la leche y la mitad de las proteínas de los huevos, mayor contenido de hierro que las lentejas y la carne de res, mayor contenido de calcio que la leche y más vitamina A y C que las naranjas (Tree for life, 2005).

Los valores nutricionales de Hojas de *Moringa oleifera* se muestran a continuación en el cuadro 1.

Cuadro 1. Valores medios obtenidos en hojas de *Moringa oleifera*

Nutriente	Valores representativos para 100g de materia seca
Proteína (g)	29 ± 6
Minerales (g)	11 ± 2.2
Grasa (g)	8 ± 2.5
Carbohidratos (g)	38 ± 7
Fibra (g)	10 ± 3
Calcio (mg)	1924 ± 288
Cobre (mg)	1.0 ± 0.2
Hierro (mg)	28 ± 6
Potasio (mg)	13384 ± 420
Magnesio (mg)	422 ± 52
Fosforo (mg)	267 ± 49
Manganesio (mg)	8.4 ± 0.6
Zinc (mg)	2.5 ± 0.6
Vitamina A (IU)	15620 ± 6475
Vitamina C (IU)	773 ± 91

Adaptada de (Broin y Saint Sauveur, 2010; Broin, 2013).

El cuadro presenta el promedio de diferentes estudios. Igualmente, en las hojas se ha identificado un contenido importante de calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, azufre, zinc, cobre, manganeso, hierro, y selenio. Estos resultados son similares a lo reportado por Moyo *et al.*, (2011) y Teixeira *et al.*, (2014), en cuanto a la composición química proximal de hojas deshidratadas y liofilizadas.

En literatura se reporta que las hojas secas pueden presentar contenidos de 77 mg / 100 g de vitamina E y 18.5 mg / 100 g de ácido ascórbico, 30.3 % de proteínas, 19.89 % de fibra, 1.8 % de lignina, 4.0 % de celulosa, 3.2 % de taninos, y 2.0 % de polifenoles (Muhammad *et al.*, 2015).

II.4.4 Compuestos bioactivos de las hojas de *Moringa oleifera*

En el área de los alimentos ha definido como compuestos bioactivos a aquellos que, por su bioaccesibilidad o el producto de su metabolismo, influyen en mecanismos fisiológicos con efectos beneficiosos para la salud. La biomasa vegetal está compuesta de diferentes estructuras acomplejadas como la fibra dietaria (FD) y los compuestos fenólicos (CF) que son degradadas durante el metabolismo, en el que intervienen una serie de factores que determinan la bioaccesibilidad de los mismos (Palafox-Carlos *et al.*, 2011; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009; Parada y Aguilera, 2007).

Las hojas son la parte más usada por el contenido y variedad de fitoquímicos, como los compuestos polifenólicos, principalmente: ácidos fenólicos y flavonoides, también se encuentran presentes alcaloides, glucosinolatos, isotiocianatos, taninos, saponinas, oxalatos y fitatos. También, se reconocen actividades biológicas como: antioxidante, antimutagénica, anticancerígena e hipoglucemiante, anti-inflamatoria, aumento del potencial inmune, efecto antihormonas, modificación de enzimas metabolizadoras de drogas, influencia sobre el ciclo celular y diferenciación celular, inducción de apoptosis, supresión y proliferación, angiogénesis, los cuales cumplen roles en la iniciación y modificación del estado secundario del desarrollo neoplásico (Leone *et al.*, 2015; Perumal *et al.*, 2003).

Algunos fitoquímicos han sido considerados como factores anti nutricionales debido a su efecto en la calidad dietaria: los inhibidores enzimáticos, las lectinas, el ácido fítico y algunos compuestos fenólicos pueden reducir la digestibilidad proteica (Neergheen *et al.*, 2012; Liener, 1994; Belitz y Weder, 1990) y disminuir la biodisponibilidad de minerales (Sandberg, 2002). Sin embargo, se ha informado que

la mayoría de éstos compuestos son termolábiles y no todos actúan negativamente en el metabolismo.

En general, las hojas presentan bajas concentraciones de factores antinutricionales en las hojas de Moringa, con cantidades apreciables de saponinas (80 g / kg), además de baja cantidad de fitatos (21g/ kg) y taninos (12g / kg) (Makonnen *et al.*,1998).

Por tal razón, se ha establecido una asociación entre el consumo de compuestos con actividad antioxidante dentro la dieta o como suplemento y la reducción del riesgo a padecer enfermedades que en su mayoría corresponden a las ENT's como las cardiovasculares, hipertensión, cáncer y diabetes. Su efecto benéfico a la salud corresponde a una relación de estructura y actividad biológica (Tsuda *et al.*, 2014).

II.5 Estructura química de compuestos bioactivos

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenil-piranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Moon *et al.*, 2006).

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (Kühnau, 1976).

Tres características estructurales son importantes para su función:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 (Letan, 1966).

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- Flavanos: como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonoles: representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonas: como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- Antocianidinas: que tienen unido el grupo-OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

A continuación, se ilustra la estructura química de los distintos tipos de polifenoles en la figura 9.

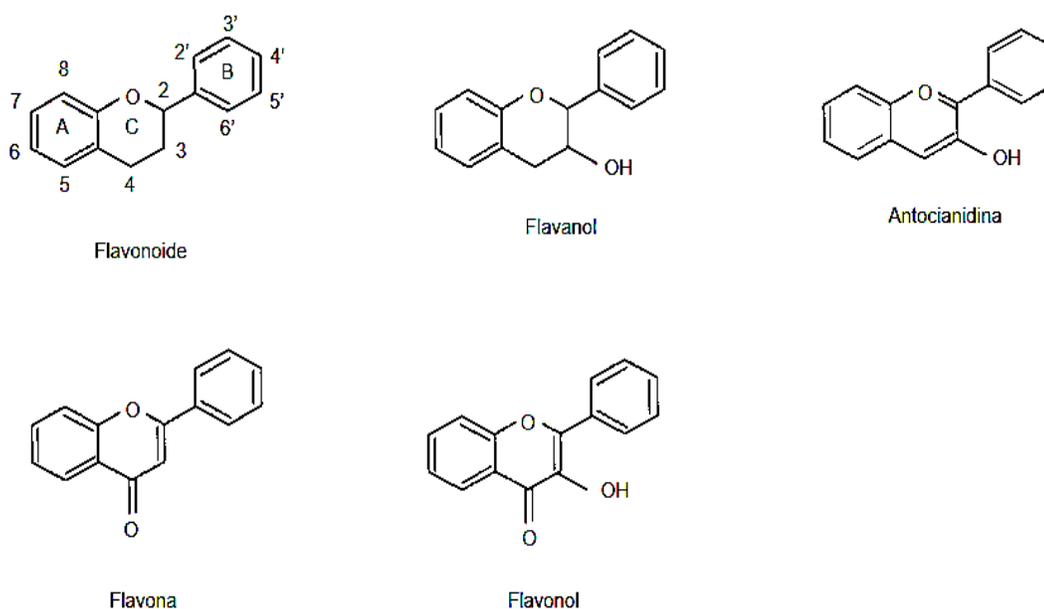


Figura 9. Flavonoides. Estructura básica y tipos. Tomada de (Martínez-Flórez *et al.*, 2012).

La quercetina, por ejemplo, presenta las tres características mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera. A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor

frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (Martínez-Flórez *et al.*, 2012).

Las propiedades ácido-base muestran que los radicales flavonoides son neutros en un medio ácido. Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día (Hertog *et al.*, 1996).

En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones pro-oxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (Coppin *et al.*, 2013).

II.5.1 Compuestos Fenólicos (CF)

Los fenoles son compuestos químicos ampliamente distribuidos en las plantas en general. Ellas los sintetizan como productos del metabolismo secundario, el cual es activado como mecanismo de defensa en respuesta a condiciones de estrés ambiental. En su mayoría son compuestos derivados de aminoácidos como la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina y constituyen un amplio grupo de

sustancias con diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas (Sharma *et al.*, 2011; Porras y López-Malo, 2009).

Los polifenoles pertenecen a un gran número de moléculas que tienen una estructura fenólica (grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos), éstas moléculas pueden clasificarse en diferentes grupos, en función del número de anillos fenol que poseen y de los elementos estructurales que unen a estos anillos entre sí (Manguro y Lemmen., 2007; Manach *et al.*, 2004).

Tanto flavonoides como ácidos fenólicos tienen las propiedades antioxidantes mencionadas (Yeh y Yen, 2003; Pietta, 2000). Aunque la concentración de éstos en los alimentos es relativamente baja, su consumo a través de la dieta puede ayudar a prevenir estados de estrés oxidativo crónico que conllevan al desarrollo de procesos patológicos de inflamación. Existen diversos factores que interfieren en la bioaccesibilidad de estos compuestos, como lo son, la matriz alimentaria y las interacciones químicas con otros fitoquímicos y/o biomoléculas (Aguilar, 2011).

Entre los CF con reconocido potencial antioxidante destacan los flavonoides (quercetina, kaempferol, miricetina), los ácidos fenólicos (gálico, cumárico, clorogénico) y taninos (elagitaninos); los cuales constituyen la fracción polifenólica (Omotoso *et al.*, 2015).

II.5.1.1 Ácidos fenólicos

Una de las principales propiedades de los CF es su potencial antioxidante y su actividad biológica es responsable de inhibir la oxidación de biomoléculas, promoviendo un efecto preventivo sobre determinadas enfermedades. Ésta actividad de los CF parece estar relacionada con su capacidad quelante, inhibición de la lipoxigenasa y captura de radicales libres. (Neergheen *al.*, 2012).

Los ácidos fenólicos corresponden a un subgrupo de los compuestos fenólicos, derivados del ácido hidrogenoico y el ácido hidroxibenzoico, presentes de forma

natural en las plantas. Gracias a sus efectos en la salud humana, la participación de los ácidos fenólicos en la dieta es un tema de interés creciente. Estos ácidos abundantes en frutas y verduras, también están en cantidades significativas en las hojas de Moringa (Leone *et al.*, 2015).

En hojas secas, el ácido gálico parece ser el más abundante, con una concentración de 1.034 mg/g de materia seca (Singh *et al.*, 2009; Prakash *et al.*, 2007), aunque Bajpai *et al.*, (2005) encontraron mínimas detectables del mismo. Las concentraciones de ácido clorogénico oscilan desde 0.018 hasta 0.489 mg/g de materia seca y desde cantidades no detectables (ND) hasta 0.409 mg/g respectivamente (Singh *et al.*, 2009; Prakash *et al.*, 2007).

En concentraciones menores, se encontraron los ácidos elágico y ferúlico, que varían desde cantidades no detectables (ND) hasta 0.189mg/g y 0.078 mg/g de materia seca, respectivamente. Se destaca, que estos compuestos se encuentran en mayor concentración en hojas liofilizadas. Por ejemplo, valores de 6.457mg/g de ácido cumárico y 0.5536 mg/g de ácido cafeico (Zhang *et al.*, 2011).

II.5.1.2 Flavonoides

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de la luz de la fotosíntesis, durante el cual catalizan el transporte de electrones. Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina. Estos compuestos fenólicos juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina. La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido p-hidroxicinámico que, al condensarse con acetato, originan la estructura del cinamol de los flavonoides. Posteriormente se forman los derivados glicosilados o sulfatados (Dixon y Paiva, 1995).

La concentración de flavonoides en hojas secas de *Moringa oleifera* se encuentra en un intervalo entre 5.059 y 12.16mg/g de materia seca, valores cercanos e incluso mayores los contenidos en muchas frutas y verduras de consumo regular. Por

ejemplo, la miricetina, quercetina y kaempferol son los principales flavonoides que se encuentran en las hojas de *Moringa oleifera* (Coppin *et al.*, 2013).

En hojas secas, la concentración de miricetina, varía desde cantidades no detectables hasta 5.804 mg/g de materia seca, mientras que la quercetina presenta de 0.207 a 7.57 mg/g y, el kaempferol desde cantidades no detectables hasta 4.59 mg/g de materia seca. Mayores cantidades de dichos compuestos han sido encontradas e hojas liofilizadas, particularmente de quercetina y kaempferol con 16.64 mg/g y 3.5 mg/g respectivamente. Otros flavonoides, como la luteolina, apigenina, daidzeína y genisteína, se encontraron en concentraciones no detectables en las hojas de *Moringa oleifera* (Leone *et al.*, 2015).

Al mismo tiempo, se encuentran reportados 21 tipos de flavonoides, un subgrupo de compuestos polifenólicos que tienen una estructura benzopirona, la cual es sintetizada en las plantas como respuesta a infecciones microbianas. Estudios epidemiológicos muestran que un alto consumo de flavonoides, presentan efectos protectores contra diversas infecciones (enfermedades bacterianas y virales), además de enfermedades degenerativas, también causada por estrés oxidativo (Yang *et al.*, 2008; Bajpai *et al.*, 2005).

La concentración total de éstos, está reportada entre 5.06 y 12.16 mg/g cuantificados en base seca. Estos valores son cercanos e incluso mayores que los presentes en muchas frutas y hortalizas de consumo regular. Incluso, dichas cantidades pueden variar dependiendo del tipo de obtención de materia prima. Por ejemplo, en hojas liofilizadas, las cantidades varían entre 21.0 y 61.62 mg/g (Leone *et al.*, 2015).

En la figura 10 se muestran las estructuras de los compuestos con mayor contenido reportados en *Moringa*.

Estructura básica de flavonoides

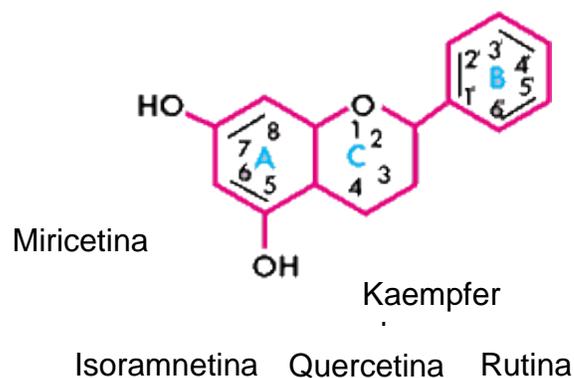


Figura 10. Estructura de flavonoides destacados en hojas de *Moringa oleifera*

Se considera que la variación de los resultados reportados corresponde a diferentes condiciones ambientales, temporada de cosecha, genética de la planta, el método de secado, una etapa foliar de madurez, método de extracción utilizado y, por último, la diferente sensibilidad de los métodos analíticos. Sin embargo, es relevante la presencia de dichos compuestos, ya que éstos pueden aumentar la capacidad antioxidante del cuerpo como defensa contra los radicales libres, que promueven el desarrollo del cáncer (Leone *et al.*, 2015; Chen y Chen, 2013; Manguro y Lemmen, 2007; Bajpai *et al.*, 2005).

El consumo de alimentos que contienen altas cantidades de flavonoides, disminuye el riesgo de contraer varios tipos de cánceres. Algunos de los flavonoides a los que particularmente se les atribuye esta propiedad son la quercetina y el kaempferol entre otros. Estos dos flavonoides también presentes en las hojas de Moringa, han demostrado que inhiben la lipogénesis y la formación de células cancerígenas. Igualmente, la inhibición de células de cáncer tanto de mama como de próstata y el paralelismo de respuesta sobre la inhibición del crecimiento de células y la inducción de apoptosis (Brusselmans *et al.*, 2005). De éste modo se justifica el potencial nutracéutico de ésta planta y el interés por demostrar la bioaccesibilidad de sus compuestos bioactivos.

II.5.2 Glucosinolatos e isotiocianatos

Los glucosinolatos son un grupo de metabolitos secundarios en las plantas. Estructuralmente se β -S-glucósidos de tio-oxima-O-sulfatos y sintetizado a partir de aminoácidos. Cantidades apreciables de estos compuestos se encuentran en las hojas de *Moringa oleifera*. En particular, en torno a 116 y 63 mg / g en hojas jóvenes y las hojas más viejas, respectivamente. Estas cantidades son cercanas e incluso mayores que en vegetales que son fuentes principales de estos compuestos (Foster *et al.*, 2015; Bennet *et al.*, 2003).

El 4-O- (α -L-ramnopiranosiloxi)-bencil ha sido identificado como el glucosinolato predominante en las hojas de *Moringa oleifera* y está acompañado de niveles más bajos del isómero 3 de glucosinolato 4-O- (α -L-acetylramnopiranosyloxy) -bencil, que reflejan la posición tres del grupo aceto en el resto de la molécula de ramnosa (Foster *et al.*, 2015; Bennet, *et al.*, 2003).

Las concentraciones de estos compuestos parecen afectadas por el estado fisiológico de la planta y por la etapa de madurez de las hojas. La concentración de glucosinolatos 4-O- (α -L-ramnopiranosiloxi)-bencil está en rangos de 21.84 a 59.4 mg / g de MS, mientras que las concentraciones del isómero tres 4-O- (α -L-acetylramnopiranosyloxy) glucosinolatos -bencil está en intervalos de 2,16 hasta 5,0 mg / g de 1.2 a 1.8 mg / g de MS y 12,76 a 50,2 mg / g de MS para isómero 1, 2 y 3, respectivamente (Chennpracha *et al.*, 2010).

Amaglo *et al.*, (2010), reportó el 4-hidroxi-bencil (sinalbina) presenta una concentración promedio de 2,36 mg / g de MS. Los glucosinolatos pueden ser hidrolizados por la enzima mirosinasa, la cual es activada en la planta como respuesta al daño mecánico para producir D-glucosa y otros productos de degradación como isotiocianatos. Éstos isotiocianatos variarán dependiendo de aminoácido precursor que determina su estructura. (Prakash *et al.*, 2007), también presentes en las hojas de *Moringa oleifera* (Waterman *et al.*, 2015).

Ambos glucosinolatos e isotiocianatos, juegan un papel importante en la promoción de la salud y la prevención de enfermedades (Dinkova-Kostova *et al.*, 2012). Algunos de estos se relacionan estructuralmente en la figura 11.

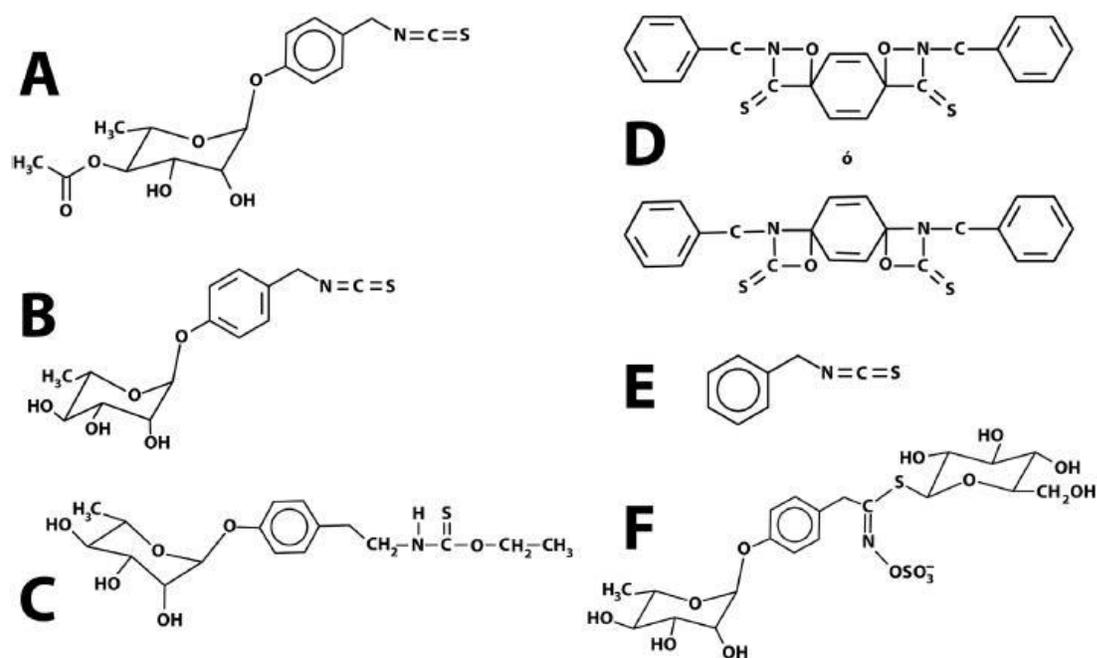


Figura 11. Estructura química de compuestos bioactivos (Isotiocianatos) encontrados en las hojas de Moringa. (Leone *et al.*, 2015).

II.5.3 Taninos condensados

Los taninos son compuestos fenólicos solubles en agua y con un peso molecular entre 500 y 3000, tienen la propiedad de precipitar alcaloides, gelatinas y proteínas, además de formar complejos con los carbohidratos y proteínas. Pueden distinguirse de otros compuestos polifenólicos que no precipitan proteínas. Los polímeros polifenólicos no constituyen un grupo químico uniforme, sino que presentan una gran variedad de estructuras moleculares. Contienen 1 o 2 grupos fenólicos hidroxilo por 100 unidades de peso molecular. Un grupo OH puede ser sustituido por un grupo metil o glucósido (Wheeler *et al.*, 1994; Leinmüller *et al.*, 1991).

La toxicidad de los fenoles se incrementa rápidamente por oxidación, la cual ocurre enzimáticamente y ésta ocurre siempre cuando el tejido es dañado (Harborne, 1999). Generalmente los taninos se encuentran en vacuolas o están separados del protoplasma de las células (Buttriss, 2007).

Estos compuestos se clasifican en dos grupos: hidrolizables y condensados (TC). Los hidrolizables son altamente tóxicos para los animales, y derivan en gallotaninos y ellagitaninos por hidrólisis ácida (Wheeler *et al.*, 1994). Los taninos condensados son compuestos poliméricos de flavan-3-ol (catequina) o flavan-3,4-diol (leucoantocianidina) o sus derivados y son más correctamente llamados proantocianidinas o poliflavonoides (Leinmuller *et al.*, 1999).

En las hojas secas y hojas liofilizadas los contenidos varían entre 5.0 y 12.0 g TAE/kg, considerando que las mayores concentraciones se encuentran en las hojas liofilizadas (Makkar y Becker, 1997). Los taninos condensados presentan diversas propiedades biológicas: anticancerígenos, anti-aterosclerótica, anti-inflamatorios, anti-hepatotóxicas, la actividad de replicación antibacteriana e incluso, anti-VIH (Kancheva *et al.*, 2013).

II.5.4 Saponinas

La Saponina constituye un grupo de compuestos naturales que consisten con en un derivado isoprenoidal de aglicona, denominado genina o sapogenina, unido covalentemente a uno o más restos de azúcar (Augustin *et al.*, 2011).

Las saponinas esteroides son glicósidos esteroides con un núcleo espirostano que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas. Se encuentran de manera natural en las plantas y representan las defensas constitutivas de como metabolitos secundarios. Estos compuestos se encuentran generalmente te almacenados en vacuolas u organelos, y son liberados al citoplasma o extracelularmente (Waller y Yamasaki, 1996).

Se ha comprobado que las saponinas pueden ser valiosas promotoras contra la carcinogénesis gracias a su efecto antioxidante y sus efectos citotóxicos selectivos y directos contra células cancerígenas y regulación de la proliferación celular que resultan de actividades moduladoras del sistema inmune al incrementan actividad antitumoral en el cuerpo (Rao y Sung, 1995).

Los efectos biológicos de las saponinas dependen de las estructuras químicas, así como el número de contaminantes dentro del extracto de interés (Tiang *et al.*, 2013; Kaiser *et al.*, 2010; Man *et al.*, 2010).

Las hojas de Moringa son una buena fuente de saponinas. Su concentración en las hojas secas es de aproximadamente 50-69 g /kg de materia seca, mientras que las hojas liofilizadas presentan valores entre 64 y 81 g DE/kg de MS (Makkar y Becker, 1997; Richter *et al.*, 2003). Estas cantidades presentan mayores concentraciones que en otras plantas, aunque ligeramente menores que en las raíces de ginseng, la principal fuente vegetal reconocida de dichos compuestos (Yun *et al.*, 1996).

II.5.5 Fitatos y oxalatos

El contenido de oxalatos de hojas secas cubre desde 430 hasta 1050 mg/100 g de MS (Joshi *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2014). La concentración de fitatos oscila entre 25-31 g / kg de MS (en hojas secas y de 21 y 23 g / kg de MS en hojas liofilizadas (Makkar y Becker, 1997).

Estas cantidades son mayores que las que se encuentran en las legumbres y cereales, pero inferior a los salvados. Los oxalatos y fitatos son compuestos anti-nutricionales, ya que se unen minerales que inhiben la absorción intestinal. Las hojas de Moringa oleifera presentan altos contenidos de estos compuestos (García-Esteba *et al.*, 2005).

II.6 Fracción no digerible (FND)

La fracción no digerible de una matriz alimentaria se encuentra asociada a la fibra dietaria (FD), considerada como un grupo de carbohidratos complejos que no puede ser digerido por el organismo humano, es decir, resiste la digestión gastrointestinal y llega al colon, dónde es fermentada y representa diferentes implicaciones biológicas y fisiológicas que cumplen un papel importante en la dieta y salud humana (Sauceda *et al.*, 2011).

La FD consiste en una variedad de polisacáridos que constituyen las paredes celulares de tejidos vegetales. Éstos son: Celulosa, hemicelulosa, pectina, Beta-glucanos, gomas y lignina (Michaelides y Cooper, 2005; Sudha *et al.*, 2007). Estos son compuestos que resisten la hidrólisis enzimática de enzimas digestivas (Saura calixto *et al.*, 2010; Figuerola *et al.*, 2005).

La fibra dietaria se clasifica en función a su solubilidad en fibra dietaria soluble (FDS) y fibra dietaria insoluble (FDI) (Días-Rubio *et al.*, 2008). La FDS incluye pectinas, β -glucanos, arabinosilanos, galactomananos, así como otros polisacáridos y oligosacáridos indigeribles. Por otra parte, la FDI está compuesta por polisacáridos como la celulosa y otros compuestos como lignina y cutina (Figuerola *et al.*, 2005).

Evidencia científica respalda que, además de los polisacáridos de las plantas y lignina, existen otros compuestos indigeribles como el almidón resistente, oligosacáridos y fitoquímicos que pueden considerarse componentes de la FD (Diaz-Rubio y Saura-Calixto, 2006). Estudios epidemiológicos demuestran el papel de la FD sobre la salud intestinal y la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, obesidad y diabetes, lo que se ha relacionado a la interacción estructural que presentan éstas moléculas complejas con fitoquímicos que pueden ser responsables de los beneficios a la salud que proporciona la FD; Siendo que (De La Rosa *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2009).

El alto contenido de FDS de fuentes vegetales ha sido asociada a efectos más pronunciados en el ámbito intestinal. La ingesta diaria recomendada de FD es de 25-30 g/persona (Lunn y Buttriss, 2007).

Sólo una pequeña cantidad de fibra es metabolizada en el estómago y el intestino; el resto pasa a través del tracto gastrointestinal y hace parte de las heces. La fibra soluble retiene el agua y se vuelve gel durante la digestión e igualmente retarda la digestión y la absorción de nutrientes desde el estómago y el intestino. La fibra insoluble acelera el paso de los alimentos a través del estómago, los intestinos y agrega volumen a las heces (Huerta, 2009).

II.6.1 Biotransformación de compuestos bioactivos

Los polifenoles se encuentran en los alimentos principalmente como ésteres, glicósidos y polímeros que no pueden ser absorbidos en sus formas nativas, requieren de hidrólisis enzimáticas que tienen lugar en el sistema digestivo, gracias a la microbiota intestinal. Se estima que 48% de polifenoles son digeridos en el intestino delgado y 42% en el intestino grueso; solamente el 10% no son digeridos y permanecen intactos en la matriz alimentaria (Saura-Calixto *et al.*, 2007). De todos los polifenoles, las agliconas son capaces de pasar a través de las membranas biológicas ya que son altamente lipofílicas.

Para ejercer su actividad biológica, los antioxidantes tienen primero que ser bioaccesibles, es decir presentes en cantidad suficiente para ser absorbidos en el lumen intestinal, donde son liberados de la matriz del alimento y se da lugar a la solubilización (Bouayed *et al.*, 2011; Holst y Williamson, 2008). La biodisponibilidad de los polifenoles también depende de la matriz alimentaria; ya que pueden reaccionar con algunos constituyentes de los alimentos, como proteínas y carbohidratos que pueden afectar significativamente la forma de absorción. Otros factores importantes son el pH y la presencia de sales biliares en el ambiente intestinal (Manach *et al.*, 2004). Así se muestra en la figura 12.

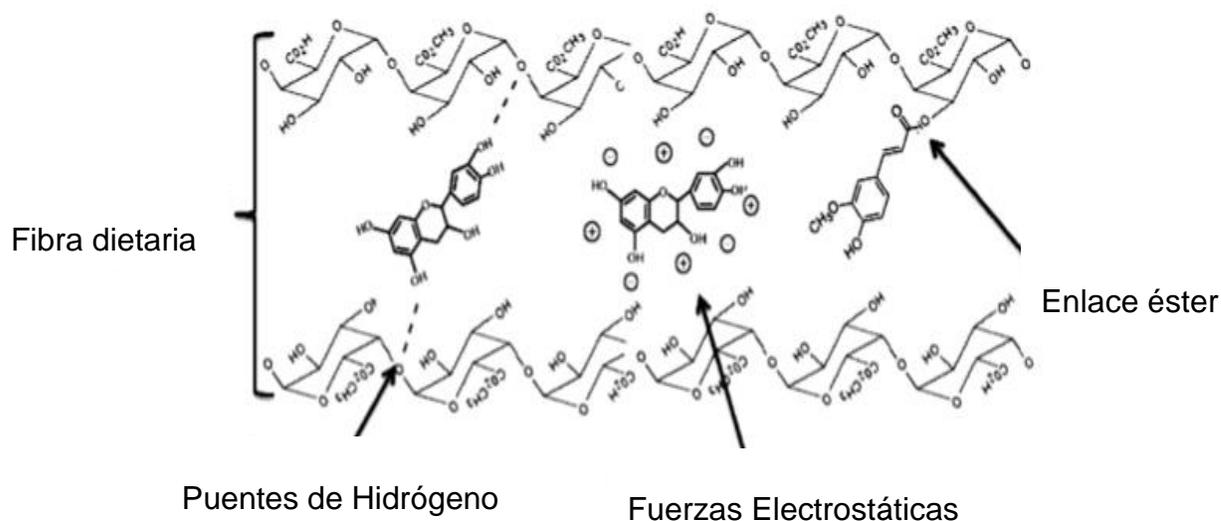


Figura 12. Tipos de interacciones entre los compuestos fenólicos y la fibra dietaria dentro de una matriz alimentaria (Sauceda *et al.*, 2011).

La información de biodisponibilidad, absorción y metabolismo de compuestos bioactivos es limitada, aunque se reconocen sus propiedades (estructura-función). Los compuestos solubles son metabolizados en el tracto gastrointestinal, las agliconas libres como la quercetina, genisteína y compuestos simples como el ácido ferúlico, cafeico y p-cumárico son absorbidos a través de la mucosa (modelos *in vivo*) a del intestino delgado (Aura, 2008).

La fermentación bacteriana de carbohidratos podría liberar compuestos fenólicos unidos a la fibra, estando la aglicona libre en el colon, dónde pueden ser absorbidas por el epitelio intestinal, metiladas y/o conjugadas con ácido glucurónico o sulfato en el hígado y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar, en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de la fase I en las que se introducen o exponen grupos polares y en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de la fase II en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. (Zapata Giraldo y Cardona; 2015; Saura Calixto, 2000).

La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos o glicina, parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados solubles en agua, pueden excretarse por la orina. La hidrólisis de glucósidos de flavonoides comienza en la boca, por acción de la β glucosidasa, no obstante, su efectividad depende del tipo de azúcar presente en la molécula. Los conjugados de glucosa son rápidamente hidrolizados a diferencia de otros, como los de ramnosa (Martínez *et al.*, 2002).

En el estómago, los oligómeros de flavonoides se degradan a unidades más pequeñas, debido al bajo pH. De todos los flavonoides, los flavon-3-oles se encuentran como agliconas y pasan intactos en el duodeno. La deglicosilación, glucoronidación, metilación, sulfonación e hidroxilación de los flavonoides ocurre en el intestino delgado. Como el flavonoide galato de epigalocatequina (EGCC), que en condiciones de alto pH puede ser oxidado a formas potentes para eliminar los radicales libres y quelar iones de hierro, además ocurre la absorción de ácidos fenólicos, lo cuales se conjugan con ácido glucurónico. Los ésteres de los ácidos fenólicos son degradados por estereasas presentes en el intestino grueso (Scalbert *et al.*, 2002).

Los polifenoles no digeridos en el intestino delgado pasan al intestino grueso, donde son sometidos a una mayor degradación en ácidos fenólicos por la microbiota, como se ha demostrado en varios estudios (Saura-Calixto *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2006; Déprez *et al.*, 2000).

En resumen, los glucósidos son hidrolizados por bacterias a agliconas, las cuales son transformadas en varios ácidos por la acción de la β -glucosidasa, β ramnosidasa y esterasas. A diferencia de las enzimas nativas, las de la microflora pueden catalizar la degradación de cadenas de flavonoides a unidades simples y también pueden realizar hidrólisis, dehidroxilación, desmetilación y descarboxilación. Dependiendo de la estructura de los polifenoles, se puede producir una gran variedad de sustancias.

II.6.2 Metabolismo colonico de compuestos fenólicos

Los flavonoles dan lugar a ácidos hidroxifenilacéticos, mientras que las flavonas y flavononas son degradadas a ácidos hidroxipenilpropiónicos, Los flavanoles se degradan tanto a ácidos fenilvalerolactenos como a hidroxifenilpropiónicos. Los metabolitos de todos estos compuestos son etapas que conducen en última instancia al ácido benzoico, su presencia se debe a la acción de la microbiota y pueden absorberse en la circulación, donde se unen a albúmina y son transportados al hígado (Manach *et al.*, 2004).

En el hígado se someten a hidroxilación, desmetilación o metilación; así como la conjugación con glucurónidos y derivados sulfatados a través de enzimas de fase I y II. Una parte significativa de estos pueden, en etapas posteriores, ser secretados de nuevo junto con las sales biliares en el intestino, donde otra vez son sometidos a hidrólisis para ser absorbidos de nuevo o excretados por las heces. (Rasmussen *et al.*, 2005)

También ha reportado que los flavonoides pueden ser metabolizados, sin la ayuda de bacterias intestinales, a través de la acción de la florizina hidrolasa (glicosilceramidasa), una enzima del borde en cepillo del intestino delgado (Williamson *et al.*, 2000). Por último, los flavonoides entran en la circulación luego de someterse a la desintoxicación en el hígado (Gordon, 2012).

Dependiendo del grado de complejidad estructural y polimerización, los compuestos fenólicos pueden ser absorbidos en el intestino delgado (polifenoles de bajo peso molecular tales como estructuras monoméricas y diméricas) (Appeldoorn *et al.*, 2009) o llegar al colon casi sin alteraciones (polifenoles oligoméricos y poliméricos tales como taninos condensados o hidrolizables, de pesos moleculares cerca a los 40 000 Da (Monagas *et al.*, 2010; Bosscher *et al.*, 2009; Manach *et al.*, 2004; Walle, 2004). Se ha estimado que sólo del 5-10% de la ingesta total de polifenoles es absorbida en el intestino delgado, generalmente después de las reacciones de desconjugación tales como desglucosilación (Manach *et al.*, 2004).

Los polifenoles restantes (90-95% de la ingesta total) pueden acumularse en el lumen del intestino grueso hasta el intervalo milimolar donde, junto con los conjugados, se excretan en el lumen intestinal a través de la bilis, siendo sujetos a actividades enzimáticas de la flora intestinal (Kutschera *et al.*, 2011; Jacobs *et al.*, 2009; Stoupi *et al.*, 2010; Larrosa *et al.*, 2010).

La microbiota colonica es responsable de la extensa ruptura de las estructuras fenólicas originales en una serie de metabolitos fenólicos de pesos moleculares bajos que, al ser absorbidos en el colon, pueden llegar a ser responsables de efectos en la salud derivados del consumo de alimentos ricos en polifenoles, en lugar de los compuestos originales, como se ilustra en la figura 13

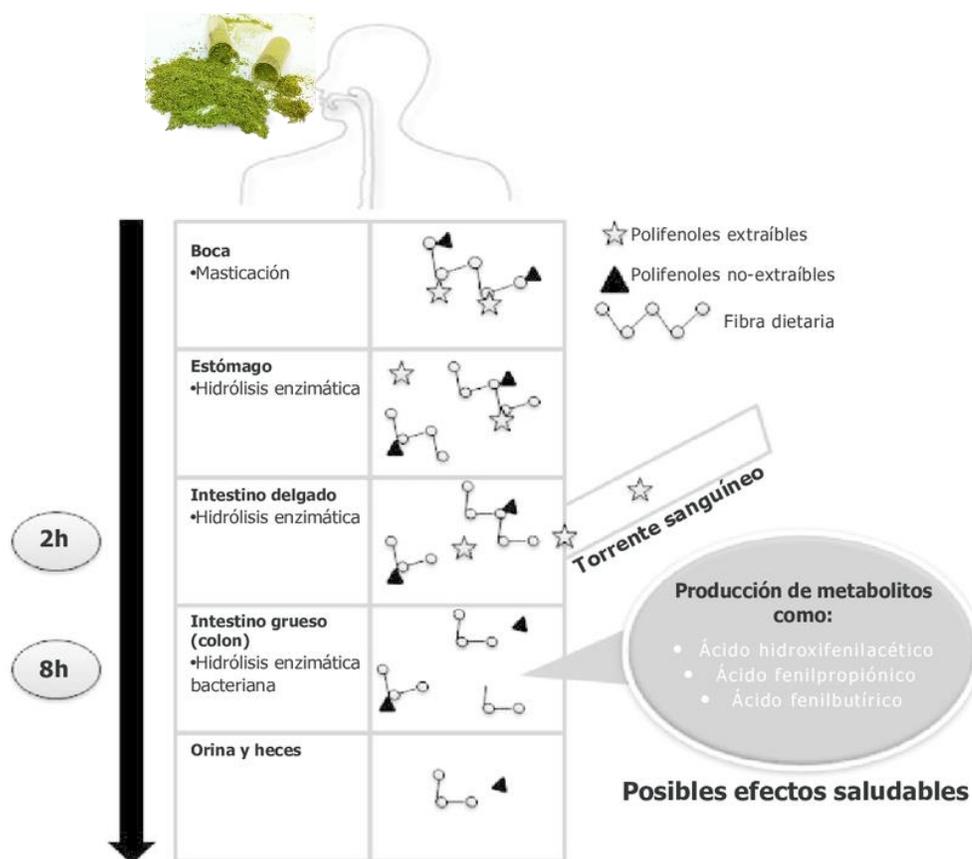


Figura 13. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos asociados a la fibra dietaria (Modificado de Palafox-Carlos, 2011).

II.7 Estudios previos de la actividad biológica de las hojas de *Moringa oleifera*

Estudios *in vitro* han evaluado las propiedades anticancerígenas, de los extractos acuosos y alcohólicos de las hojas de *Moringa oleifera* en diferentes tipos de líneas de células tumorales.

Uno de los primeros estudios *in vitro*, se reporta para el año 2007 por Parvath y Umamaheshwari (2007), quienes encontraron que el extracto metanólico de las hojas de *Moringa oleifera* exhibió menos viabilidad de células de mieloma tanto en dosis más alta (2% a 200 mg / ml) y en dosis más baja (12% a 0.5 mg/ml). Así mismo, Khalafalla *et al.*, (2010) encontraron que, tanto el uso de agua caliente como medio de extracción, como los extractos etanólicos de hojas de *Moringa oleifera* inhibieron la viabilidad de la leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y células de carcinoma hepatocelular. Por otra parte, todos los extractos probados no mostraron efectos tóxicos contra las células mononucleares normales.

Posteriormente, Purwal *et al.*, (2010) estudiaron los efectos de la administración oral de los extractos hidrometanólicos y metanólicos de hojas de *Moringa oleifera* en el modelo de tumor de melanoma murino. Los autores observaron que una administración oral de 500 mg/kg durante 15 días de los extractos determina un retraso en el crecimiento de tumores y un aumento significativo de la duración de la vida de 48% y 32% para extractos metanólicos e hidrometanólicos respectivamente. Igualmente, los resultados reportados por Sreelatha., *et al.*, (2011), establecieron que el extracto acuoso de las hojas, exhibió una inhibición dosis-dependiente en la proliferación de células de tumor humano de la línea celular (KB). Éste efecto antiproliferativo también se asoció con una inducción de la apoptosis, cambios morfológicos y fragmentación del ADN.

Tiloke *et al.*,(2013) observaron efectos antiproliferativos en células de cáncer de pulmón humano tratadas con extracto de hojas de Moringa, identificando un incremento significativo en las especies reactivas de oxígeno (ROS), además de la disminución de glutatión (GSH), principal antioxidante de las células y una reducción

de la proteína Nrf2, factor de transcripción que regula la expresión de proteínas antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo provocado por lesiones e inflamación (1.89 veces) y la expresión de ARNm (1.44 veces), en comparación con las células no tratadas.

Estos oxidantes pueden reaccionar con el ADN en la célula siendo determinante para la fragmentación del ADN con la consiguiente muerte de célula misma. Las propiedades pro-apoptóticas de los extractos de las hojas de *Moringa oleifera* mostraron aumento significativo de la proteína p53, guardián del genoma (1,02 veces) y la expresión de ARNm (1,59 veces), en la caspasa-9 (1,28 veces) y la caspasa-3/7 (1,52 veces) y actividades con una mayor expresión de Smac / DIABLO en las células tratadas con el extracto. El extracto de las hojas de *Moringa oleifera* también causó la escisión y la activación de PARP-1 en 89 y 24 kDa fragmentos.

Las actividades de inhibición, inducción de apoptosis y el crecimiento de células tumorales tratadas con extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* en células cancerosas de pulmón humano también fueron estudiadas por Jung *et al.*, (2014). Este estudio confirmó los resultados previos y demostró que los extractos de las hojas presentan una mayor citotoxicidad para las células tumorales que para las células normales, lo que sugiere fuertemente que podría ser un candidato terapéutico contra el cáncer, ideal y específico para las células cancerosas.

En el mismo año, el estudio reportado por Berkovich *et al.*, (2013) investigó concentraciones ≥ 0.75 mg / mL de extracto de hojas de *Moringa oleifera* y se determinó una inhibición significativa de las células de cáncer de páncreas (Panc-1) demostrando la supervivencia como resultado de la apoptosis celular progresiva. En particular, el tratamiento con 2 mg/mL de extracto de hojas de *Moringa oleifera*, resultó en una reducción de 98% de supervivencia de células Panc-1, atribuible, al menos en parte, por una baja regulación de la expresión de una vía clave de señalización de las proteínas NF-kB.

Charoensin *et al.*, (2014), reportaron que el extracto de diclorometano de las hojas de *Moringa oleifera* era más citotóxica contra carcinoma humano hepatocelular (HepG2; IC₅₀ = 120.37 g / ml), adenocarcinoma colorrectal (Caco-2; IC₅₀ = 112.46 g / ml) y adenocarcinoma de mama (MCF- 7; IC₅₀ = 133.58 g / ml) de extracto metanólico (IC₅₀> 250 mg / ml). Ambos extractos tenían ninguna toxicidad en fibroblastos humanos. Finalmente, Pamok *et al.*, (2011) observaron el extracto acuoso y el etanólico inhibe la proliferación de células de tres tipos diferentes de líneas de células de cáncer de colon, con mejores resultados utilizando extracto etanólico. Sólo un estudio *in vivo* está disponible en la literatura sobre las propiedades anticancerígenas del extracto de hojas de *Moringa oleifera*.

En conclusión, los estudios *in vitro* sugieren posibles propiedades anticancerígenas de las hojas de *Moringa oleifera*. Sin embargo, se necesitan más estudios con animales para confirmar estos efectos. Por último, no hay estudios sobre humanos disponibles en la literatura.

III. JUSTIFICACION

La dieta cumple un factor determinante en la salud. Los vegetales provenientes de la dieta han sido investigados, relacionando el efecto de su consumo como mediadores de prevención en el desarrollo de enfermedades no transmisibles (ENT's), como lo es el cáncer. Las plantas son elementales en la medicina tradicional y farmacéutica, desde la síntesis de compuestos hasta la evaluación de sus efectos biológicos.

La línea de investigación de nutraceuticos tiene como propósito abordar la identificación de fuentes vegetales con potencial nutraceutico, de importancia económica y cuya producción local beneficie el contexto nacional. Además del reconocimiento de mecanismos reportados sobre la composición de éstas fuentes y sus efectos benéficos para la salud desde la perspectiva nutrimental y nutraceutica.

Las hojas de moringa (*Moringa oleifera*), son una fuente de compuestos bioactivos reconocida y de amplio uso como alimento y tratamiento terapéutico en lugares de donde es originaria y cultivada, como en México. Estudios reportan el uso de extractos acuosos y metanólicos de diferentes partes de ésta planta, en modelos *in vitro* e *in vivo*, concluyendo su alto potencial biológico en tratamientos para reducir dislipidemias e inflamación.

Considerando que las anteriores condiciones representan un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de colon (tercer cáncer causante de muertes en México), que la planta es regularmente comercializada en el mercado de los suplementos herbales, y que nuestro grupo de investigación ha establecido protocolos de estudio para el modelo de biotransformación por digestión *in vitro*, es relevante señalar las características nutrimentales y nutracéuticas de las hojas de moringa, a las cuales son atribuidas propiedades terapéuticas anticancerígenas. Éstas carecen de evaluaciones que contemplen la transformación digestiva, para lo cual se propone un modelo *in vitro* de digestión gastrointestinal para evaluar la bioaccesibilidad de sus compuestos bioactivos y su efecto en el perfil citotóxico de células HT29 de cáncer de colon

IV. HIPÓTESIS

Los compuestos bioactivos como fibra total, compuestos fenólicos y flavonoides libres presentes en la fracción no digerible de hojas de moringa (FNDM) son bioaccesibles al finalizar la digestión gastrointestinal y tienen efecto antiproliferativo durante la fermentación colonica en células de cáncer de colon HT29.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Obtener la fracción no digerible de hojas de moringa (*Moringa oleifera*) después de simular la digestión gastrointestinal para su posterior fermentación colonica e identificar su efecto en el perfil citotóxico en la línea celular de cáncer de colon HT29.

V.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar parcialmente la composición química y nutracéutica de las hojas de moringa (*Moringa oleifera*) deshidratadas (HM).
2. Simular en un modelo de *in vitro*, la digestión de las hojas de moringa deshidratada (HM) para la obtención de la fracción no digerible (FNDM).
3. Someter la fracción no digerible (FNDM) a condiciones colonica mediante una fermentación colonica *in vitro* (EFCM) utilizando microbiota de donante promedio sano para la cuantificación de metabolitos (ácidos grasos de cadena corta, ácidos fenólicos y flavonoides libres)
4. Evaluar el extracto de fermentación colonica (EFCM) sobre el perfil citotóxico de células HT29 (sobrevivencia, apoptosis, necrosis, peróxido de hidrógeno, autofagia)

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Materiales

Los reactivos y solventes de uso general fueron de J.T. Baker, el medio de cultivo DMEM de American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EUA). El medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco, el suero fetal bovino (SFB), antibióticos y antimicóticos (Gibco, Grand Islan, NY). Reactivo de Folin, (+)-catequina, rutina, quercetina, vainillina, ácido elágico, cafeico, p-cumárico, gálico, clorogénico, ácido sinápico, α -amilasa, amiloglucosidasa, proteasa, pepsina, pancreatina de origen porcino y las sales biliares, se adquirieron de la marca (Sigma-Aldrich Chemical, CANADA Ltd.) Los ensayos celulares se realizaron por Kit: Peróxido de hidrógeno por Amplex Red (Invitrogen European Headquarters), Apoptosis por *In Situ* Cell Death detection (Roche Germany), Citotoxicidad-LDH y Autofagia (Sigma-Aldrich Germany).

VI.1.2 Material biológico

Hojas deshidratadas de moringa (*Moringa oleifera*), tipo comercial, proveniente de San Bartolo Tutotepec, población ubicada en la Sierra de Hidalgo, Hidalgo, México. La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT29 se obtuvo de (ATCC, Manassa, EUA).

VI.2 Métodos

VI.2.1 Preparación de la muestra

Se dispuso de lotes aleatorios de hojas deshidratadas de Moringa tipo comercial que serán molidas y tamizadas en malla del No. 60 para la determinación proximal. Se tendrán en cuenta 3 lotes de cosechas diferentes y como control 2 tipos de polvo de hojas de Moringa provenientes de capsulas que se comercializan en el mercado.

VI.2.2 Caracterización nutrimental de las hojas de Moringa

El análisis proximal se realizó siguiendo la metodología descrita por la técnica de la AOAC (2002).

VI. 2.3 Determinación de humedad (Método 925.09B)

Se pesó 2 gramos de la muestra en una cápsula o charola previamente tarada. Luego, se colocó en una estufa a 130°C por 2 horas. Posteriormente se debe llevar la cápsula con la muestra a un desecador y pesar. El porcentaje de humedad se obtuvo mediante la ecuación siguiente:

% Humedad= $\frac{\text{Peso inicial de la muestra} - \text{peso final de la muestra}}{\text{peso inicial de la muestra}} \times 100$

VI. 2.4 Determinación de proteína (Método 925.09B)

Se pesó 1g de la muestra previamente desgrasada, este se colocó en un matraz Kjeldahl, donde se adicionará 1g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de potasio

anhidro y 15 mL de ácido sulfúrico. Una vez adicionados los reactivos, el matraz se deberá colocar en el digestor y calentar gradualmente. Una vez observado un cambio en el color de la mezcla a verde claro, se detuvo el calentamiento y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 15 mL de agua destilada para disolver completamente el residuo dentro del matraz y 50 mL de solución de hidróxido de sodio al 40%. Por otra parte, en un matraz erlenmeyer se añadió 50 mL de ácido bórico al 4%, previamente preparado. Este se destiló hasta recolectar 150 mL, hubo un cambio en la coloración del ácido bórico de morado a verde oscuro. Finalmente se retiró del destilador y procedió a valorar con ácido clorhídrico 0.1N. Se utilizará 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

$$\% N = \text{mL} \times 0.1 \text{ N HCl} \times 0,014 / \text{g muestra} \times 100\% \quad P = \%N \times 6.25$$

VI.2.5 Determinación del extracto etéreo (Método 920.39)

Se pesaron 2 gramos de muestra en base seca en cartuchos de celulosa. Se colocaron dentro del aparato de extracción soxhlet, se adicionó 100 mL de éter de petróleo a los matraces. El periodo de extracción fue de 4 horas. Transcurrido el tiempo, se dejaron secar los matraces en la estufa a 50°C durante 2 horas o hasta que alcanzaron un peso constante. Finalmente se pesaron los cartuchos. Se calculó el porcentaje de extracto etéreo mediante la siguiente formula:

$$\%EE = \frac{\text{Peso del extracto} - \text{peso del blanco}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

VI.2.6 Determinación de cenizas (Método 923.03)

Se pesó 2g de la muestra en una capsula de porcelana previamente tarada, se carbonizó sobre la flama de un mechero y llevó a la mufla a 550°C. Se suspendió cuando las cenizas se tornaron blancas. Posteriormente, se llevaron a un desecador para enfriar y finalmente registrar su peso. El contenido de cenizas se determinó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{\text{Peso de las cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

VI.2.7 Digestión Gastrointestinal *in vitro*: Obtención de la fracción no digerible (FNDM)

Se simuló el proceso digestivo de las hojas de *Moringa oleifera* en la forma comercial de consumo. Se describe la metodología por etapas, incluyendo la participación de individuos sanos e intestinos de ratas, previo análisis y aprobación del protocolo por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. La digestión gastrointestinal *in vitro* simula el proceso digestivo desde la boca hasta su fermentación en el colón, usando el modelo adaptado por Campos-Vega *et al.*, (2015). Se realizó utilizando diferentes enzimas (α amilasa salival proveniente de la boca de personas sanas; pepsina y pancreatina de origen porcino, y hiel de buey suministradas por Sigma).

VI.2.7.1 Simulación de las condiciones del estómago

Para la etapa de estómago se tomaron 10 mL de la suspensión anterior y se les añadió una solución de HCl 2N con el fin de bajar el pH hasta 2.0. Se adicionó a cada muestra, una solución de pepsina (0.055 g, Sigma Aldrich) previamente disuelta en 0.94 mL de HCl 20 mM y luego se incubaron en agitación por 2 horas a 37°C.

VI.2.7.2 Simulación de las condiciones del intestino delgado

Para la etapa del intestino delgado se preparará previamente una disolución de 3mg de Hiel de Buey con 2.6 mg de pancreatina, que fueron disueltos en 5 mL de solución amortiguadora de Krebs-Ringer [118 mM de NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM Glucosa y 2.5 mM CaCl₂] a pH 6.8. Ésta fue preparada 30 minutos su uso. La solución se añadió a la muestra y al blanco, mientras la suspensión (15 mL) fué transferida a un falcon de 15mL con el saco intestinal invertido.

VI.2.7.3 Técnica del saco intestinal invertido utilizando ratas

Se preparó de acuerdo a la metodología descrita por Patil *et al.*, (2010) con adaptaciones por Campos-Vega *et al.*, (2015). Una vez realizada la disección de los 30 cm de intestino, fueron cortados en segmentos de 6cm e invertidos, manteniendo su viabilidad utilizando buffer Krebs-Ringer.

VI.2.7.4 Manejo de los animales

Se emplearon 6 ratas macho de la cepa Wistar (peso entre 250 y 300 g), clínicamente sanas. Se realizó la verificación del sexo, peso y constancia de salud. Las ratas se mantuvieron por 16 horas de ayuno en el bioterio de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, mantenidas bajo condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10\%$), ciclos día/noche de 12/12 h, a temperatura adecuada (23 ± 2 °C) y condiciones limpieza y ventilación constante (NOM-062-200-199) y agua potable ad libitum.

VI.2.7.5 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal

Para el sacrificio, las ratas fueron anestesiadas (pentobarbital 60 mg/kg) y se les escindió el intestino delgado (yeyuno de aproximadamente 30cm). Posteriormente, El yeyuno proximal de cada rata y se colocó en una solución amortiguadora de Krebs-Ringer gasificado con CO₂ y mantenido a 37°C. El segmento de intestino removido se lavó con la misma solución amortiguadora para retirar residuos y posteriormente fue volteado suavemente sobre una varilla de vidrio y cortado en segmentos de 6 cm de longitud (aproximadamente), se ligaron de los extremos para evitar la pérdida de viabilidad del tejido y formar el saco).

El intestino se llenó con 1 mL de la solución amortiguadora de Krebs-Ringer y el otro extremo se ligó para crear un saco, que fue inmediatamente incubado en un baño conteniendo los 15 mL de la suspensión anterior (procedente de la simulación del estómago) a 37°C por 2 h, en agitación continua (80 ciclos por minuto) y en atmósfera anaerobia (CO₂).Luego del período de incubación los sacos fueron

retirados y la parte de las muestras contenida en el recipiente (posterior a retirar el saco intestinal), se denominó fracción no digerible (FNDM) y luego fue sometida a una fermentación colónica *in vitro*. Los experimentos se realizarán por triplicado.

VI.2.7.6 Fermentación *in vitro* de la fracción no digerible de moringa (FNDM)

Se siguió el método de fermentación *in vitro* descrito por Campos-Vega *et al.*, (2009). Las fermentaciones se realizaron en tres experimentos independientes con duplicado para cada FNDM. Se empleó rafinosa (100 mg) como control positivo del carbohidrato fermentable bajo las mismas condiciones. El inóculo fecal humano, empleado como fuente de microbiota colónica, se obtuvo de dos individuos voluntarios sanos en su primera evacuación del día, con ausencia de enfermedades gastrointestinales y sin haber consumido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de la muestra.

Tubos estériles (15 mL) con 9 mL de medio de cultivo basal que contenían (g/L): agua peptonada 2.0, extracto de levadura 2.0, cloruro de sodio 0.1, fosfato dibásico de potasio 0.04, fosfato monobásico de potasio 0.04, sulfato de magnesio heptahidratado 0.01, cloruro de calcio dihidratado 0.01, carbonato de sodio 2.0, cisteína HCl 0.5, sales biliares 0.5, Tween-80 2 mL y hematina 0.2 g (previamente diluida en 5 mL de NaOH). Se sellaron los tubos y se mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia con una mezcla de gases (H₂- CO₂-N₂: 10:10:80, volumen) durante 12 horas. El inóculo fecal (3 g de materia fresca) se homogenizó con 27 mL de solución de fosfato de sodio 1 M pH 7.0.

Los tubos con el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 mL de homogenizado fecal y se adicionó 70mg de la FNDM, excepto para el control negativo. Se agitaron los tubos con vórtex durante 30 s y se incubaron en baño de agua a 37°C. Se mantuvo un flujo continuo de la mezcla de gases hasta el término de la fermentación (24 h).

Durante la fermentación, el pH y la producción de AGCC se determinarán a las 0, 6, 12 y 24 h. La fermentación se detuvo centrifugando y congelando las muestras a -70°C hasta su análisis.

VI.2.7.7 Manejo de los animales después del sacrificio

Debido a que éste estudio tuvo como interés en el del intestino de los animales, los restos de ratas no requeridos fueron destinados a desecho; se almacenaron en una bolsa grande color amarillo en un congelador (temperatura máxima de 4°C), las bolsas se marcaron con la leyenda “desechos patológicos” y almacenadas por un período de 15 días hasta su debido transporte e incineración (NOM-087-ECOL-SSA1-2002). El material quirúrgico utilizado se dejó remojando con cloro por 12 h y posteriormente se higienizó.

VI.2.8 Determinación de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos durante la digestión *in vitro*

VI.8.1 Coeficiente de permeabilidad aparente (CP o P_{app}), Coeficiente de permeabilidad neta (CP_{neta} $P_{app\ neta}$) y Relación de Flujo de Salida

El coeficiente de permeabilidad aparente (CP o P_{app} por sus siglas en inglés) se calculó utilizando la siguiente ecuación (Lassoued *et al.*, 2011):

$$P_{app} = \frac{V}{A \cdot t} \cdot \left(\frac{C_f}{C_0} \right)$$

Donde V es el volumen del contenido del saco intestinal, A es el área o superficie del segmento intestinal (calculada por la ecuación $A=2\pi rh$, siendo r el radio del segmento intestinal y h es la longitud del segmento intestinal disponible para la permeabilización), t es el tiempo de incubación, C_0 es la concentración inicial en el lado de la mucosa (fuera del saco intestinal, es decir, la concentración del metabolito

a calcular que provenía de la fase estomacal) y C_i es la concentración en el lado serosal (dentro del intestino) luego de un tiempo determinado (en minutos).

El coeficiente de permeabilidad neta (CP_{neta} o $P_{app\ net}$ por sus siglas en inglés) fue calculado de la siguiente forma (Lassoued *et al.*, 2011; Wahlang *et al.*, 2011):

$$P_{app\ net} = P_{app} (BL \cdot AP) - P_{app} (AP \cdot BL)$$

Donde $P_{app} (BL \cdot AP)$ es el coeficiente de permeabilidad aparente del lado basolateral hacia el lado apical y $P_{app} (AP \cdot BL)$ es el coeficiente de permeabilidad aparente del lado apical hacia el basolateral.

La relación de flujo de salida se calculó utilizando la siguiente ecuación (Lassoued *et al.*, 2011; Wahlang *et al.*, 2011):

$$Fljo\ de\ Salida = \frac{P_{app} (BL \cdot AP)}{P_{app} (AP \cdot BL)}$$

VI.8.2 Flujo de Agua (FA)

El flujo de agua fue calculado mediante la siguiente ecuación (Khemiss *et al.*, 2009):

$$FA = \frac{W_3 - W_2}{W_1}$$

Donde W_3 representa el peso del segmento intestinal lleno luego del período respectivo de incubación, W_2 es el peso del segmento intestinal antes de realizar la incubación y W_1 es el peso inicial del segmento intestinal (vacío).

VI.8.3 Bioaccesibilidad de compuestos

La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos libres, flavonoides libres y oligosacáridos a lo largo del tracto gastrointestinal se calculó por medio de la siguiente ecuación (D'Antuono *et al.*, 2015).

$$\text{Bioaccesibilidad} = \frac{C_i - C_T}{C_T} \cdot 100\%$$

Donde C_i es la concentración inicial de los compuestos y C_T es la concentración final obtenida en los diferentes tiempos de incubación.

VI.2.9 Capacidad antioxidante mediante el radical DPPH

Se prepararon extractos siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015 y se adecuaron muestras de las diferentes etapas de digestión gastrointestinal y fermentación colonica *in vitro*. La estimación de los valores de la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC) se determinó usando el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), de acuerdo al método reportado por Nenadis *et al.*, (2004). Un total de 20 μL de una solución de compuestos fenólicos a 2 mg/mL se mezcló con 200 μL de DPPH 150 μM in metanol 80%. Las mediciones se realizaron por triplicado. Se midió la absorbancia a 520 nm después de 0, 4, 10, 30, 60 y 90 minutos. Los valores TEAC se calcularon una curva estándar utilizando trolox, y se reportaron los resultados como μmoles equivalentes de trolox por miligramo de péptido (μmol Trolox/mg).

VI.2.10 Capacidad antioxidante mediante el radical ABTS

Se prepararon extractos siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015 y se adecuaron muestras de las diferentes etapas de digestión gastrointestinal y fermentación colonica *in vitro*. La estimación de los valores TEAC para muestras de Moringa y sus diferentes etapas de digestión y fermentación colonica se realizó utilizando el ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico,

con la metodología propuesta por Loarca-Piña *et al.*, (2010). 20 μ L de un extracto (2 mg/mL) se mezcló con 230 μ L de solución con el radical ABTS. La absorbancia se leyó a 570 nm a temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los valores TEAC se calcularon una curva estándar utilizando trolox, y se reportaron los resultados como μ moles equivalentes de trolox por miligramo de péptido (μ mol Trolox/mg).

VI.2.11 Ensayo celular (línea de cáncer de colon humano HT29)

Los cultivos *in vitro* han sido ampliamente utilizados para evaluar el efecto de la fermentación colonica sobre el perfil citotóxico de las células humanas, sólo las células tumorales proliferan de forma indefinida, tal es el caso de la línea celular, la cual pertenece a un grupo de células epiteliales originalmente aisladas de adenocarcinoma de colon humano.

VI.2.12 Determinación de la concentración letal media (CL₅₀)

Las células se sembraron en cajas de 96 pozos (5×10^3 células/pozo) en medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino al 5%. A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido a diferentes concentraciones del extracto de la fermentación colonica de las hojas de *Moringa oleifera*, filtrado con membrana de 0.22 micras, a las siguientes concentraciones 16, 12, 8, 4 y 2%, disueltos en medio con suero fetal bovino al 5%. Se incluyeron controles negativo y positivo (ausencia de tratamiento y con DMSO%, respectivamente). Las células fueron manejadas en una cámara de bioseguridad (NuAire) (López-Barrera *et al.*, 2016).

Se realizó el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para viabilidad celular y consiste en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por parte de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo así determinar la funcionalidad mitocondrial de las células

tratadas. Después de 24 h de tratamiento el medio de cultivo se aspiró y las células fueron adicionadas con MTT (sal de tetrazolio) en una proporción 1:1 del medio con células. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia proporcional a la absorbancia emitida por el formazán producido durante la reacción y se determinó la concentración letal cincuenta (C_{L50}), que se refiere a la concentración necesaria del EFCM para inhibir la sobrevivencia del 50% de la población celular sometida al tratamiento. El porcentaje de sobrevivencia se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación.

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

VI.2.13 Determinación de daño celular (citotoxicidad) LDH

La muerte celular por necrosis o citotoxicidad se evalúa clásicamente por la cuantificación de los daños en la membrana plasmática. El ensayo con el kit de citotoxicidad Plus-LDH (Roche) para cuantificar la citotoxicidad basada en la medición de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por las células dañadas, la cual se puede determinar mediante una reacción enzimática acoplada, donde la LDH oxida al lactato en piruvato, el que posteriormente reacciona con sal de tetrazolio para formar un compuesto colorido (formazán). El aumento en la cantidad de formazán producido en el medio de cultivo se correlaciona directamente con el aumento en el número de células lisadas. El formazán es soluble en agua y pueden detectarse espectrofotométricamente a 500 nm.

VI.2.14 Técnica del TUNEL

Este método se realizó por el kit de detección de muerte celular *In Situ* (Roche) La especificidad de la reacción de TUNEL consiste el marcaje preferente de roturas de la cadena de ADN generadas durante la apoptosis, lo que permite discriminar la apoptosis de la necrosis. Las células serán tratadas con el EFCM durante 24 horas en bajo las mismas condiciones usadas en la curva de crecimiento. Después de someterse al tratamiento, el medio de cultivo se recuperará para inmediatamente después realizar el ensayo de citotoxicidad. Se utilizó el medio base (McCoy's 5A)

al 0.5 % de albúmina sérica bovina (medio-ASB) como control negativo de daño celular.

Para evaluar la apoptosis en las células tratadas con EFCM -CL₅₀ y de las células control (sin tratamiento) se utilizará el marcaje del ADN fragmentado por la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling, por sus siglas en inglés), la cual consiste en la marcación de los extremos 3' terminal cortados (en el proceso de apoptosis) de ADN genómico con dUTP conjugado con biotina por la acción de la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal. El ADN fragmentado se detectará por la unión de la streptavidina (marcada con peroxidasa) con los nucleótidos biotinilados. Este método permite la detección específica e inequívoca de células cuyo ADN nuclear (visualizado en color verde-DAPI) se encuentra segmentado por el proceso de apoptosis.

VI.2.15 Ensayo de Peróxido de hidrógeno (Amplex Red)

Se utilizó el reactivo (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) del kit Amplex Red, para detectar la actividad del peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El reactivo en combinación con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés), se utiliza para detectar H₂O₂ liberado de muestras biológicas como los cultivos celulares. En presencia de peroxidasa, el reactivo reacciona con H₂O₂ en una relación estequiometría 1:1 para producir el producto de oxidación fluorescente rojo, resorfurina. La resorfurina tiene máximos de excitación y emisión de aproximadamente 571 nm y 585 nm, respectivamente. La mezcla debe de la solución del kit debe contener 50 µM de reactivo Amplex red y 0,1 u/ml de HRP disuelto en fosfato de Krebs-Ringer preparado antes del ensayo (145 mM de NaCl, 5.7 mM de sodio Fosfato, KCl 4,86 mM, CaCl 0,54 mM, MgSO 1,22 mM, glucosa 5,5 mM, pH 7,35). Cada volumen de reacción en placa fue de 100 µl y la mezcla se adicionó a cada pozo de microplaca, se incubó a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente se añadió 20 µl de 1.5 × 10⁴ células suspendidas en 100 µl tampón. Se usó un control negativo sin células con 100 µl de la mezcla de reacción (células sin tratamiento) y se midió la fluorescencia de 530-560 nm.

VI.2.16 Ensayo de medición de Autofagia

El kit de autofagia (Autophagy Assay) proporciona una solución simple y directa para medir la autofagia, utilizando un autofagosoma patentado fluorescente que funciona como marcador a 518 nm. Las células se cultivan en placas de 96 pozos a una densidad óptima para Inducción de autofagia (1×10^4 células / pozo), se aplicó el tratamiento por 24 horas. También se utilizan células en las mismas condiciones (sin tratamiento) para determinar el control negativo, luego de la incubación por 30 minutos con la mezcla del kit, se procedió a la lectura en el lector de placas.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio nutrimental y nutracéutico los resultados que se expresaron como la media \pm desviación estándar. Cada uno de los valores se obtendrá a partir de tres réplicas de manera independiente y aleatoria. Las diferencias entre medias se analizarán por el método de Tukey

Para el análisis de los resultados de los tratamientos de EFCM se realizará la comparación entre medias con la prueba de Tukey. La concentración letal media (CL_{50}) se calculó por regresión lineal y se expresará como el Log de la concentración del EFCM y su equivalencia en mMol de ácido acético, propiónico y butírico. El programa estadístico que se utilizará será JMP versión 8.1.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 Caracterización química proximal nutrimental

En el Cuadro 2 se presenta el contenido de proteína, lípidos, humedad y carbohidratos de diferentes lotes de Moringa (*Moringa oleifera*).

Cuadro 2. Contenido de proteína, lípidos, cenizas, humedad y carbohidratos de hojas de Moringa (*Moringa oleifera*) en polvo.

Lote	Proteína	Lípidos	Cenizas	Humedad	¹ Carbohidratos
L1	36.12 ± 2.35	6.75 ± 0.09	13.26 ± 0.14	4.03 ± 0.62	41.62 ± 1.83
L2	29.22 ± 1.48	5.70 ± 0.34	9.95 ± 0.13	7.06 ± 0.16	45.69 ± 2.04
L3	31.66 ± 0.18	6.13 ± 0.18	13.67 ± 0.18	4.05 ± 0.04	46,14 ± 0.44
LC1	32.23 ± 0.31	7.29 ± 0.5	11.33 ± 0.06	3.79 ± 0.29	46.80 ± 0.37
LC2	24.55 ± 0.41	6.83 ± 0.73	11.33 ± 0.06	9.98 ± 0.45	47.29 ± 0.14

L1, L2, L3: Muestras de Moringa de lotes cosechados en diferentes estaciones del año; LC1, LC2: Muestras comerciales de Moringa. Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de experimentos independientes (expresados en porcentaje de base seca, excepto para humedad). ¹Calculado por diferencia estadístico

Los resultados del contenido de proteína en las hojas de Moringa presentan una diferencia de 11.57% para diferentes lotes (cosechas), sugiriendo que las condiciones de crecimiento afectan dichos contenidos en la planta (Moyo *et al.*, 2011). Estos valores oscilan entre 24.55% de LC2 y 31.12% de L1. Ambos valores son similares a lo reportado por autores como: Teixeira *et al.*, (2015) con 28.7%, Witt, (2013) con 24% y Moyo *et al.*, (2011) con un 30.3%. Aunque éstos valores son elevados, desafortunadamente están condicionados al porcentaje de digestibilidad proteica, reportándose en la literatura un amplio intervalo de la misma, que va del 56% (bajo) al 89% (alto) en hojas de Moringa, siendo mayor en comparación con la digestibilidad de otras proteínas de origen vegetal Witt, (2013). El contenido de proteína en las hojas de Moringa, se ha considerado una ventaja en el aspecto nutricional (Moyo *et al.*, 2011).

En cuanto al contenido de lípidos, el valor más bajo corresponde L2 con un 5.32% y el más alto al LC1 con un 7.29%. Entre éste intervalo, se encuentra el valor de 6.50% reportado por Moyo *et al.*, (2011), quienes además confirman que éste corresponde a una proporción importante de ácidos grasos mono y poliinsaturados. Así mismo Guevara y Rovira (2012), sugieren para lípidos un intervalo del 5 al 7%, mientras Valdéz-Solana *et al.*, (2015) reportan valores de 10.31% para hojas de Moringa cultivadas en México.

En lo referente al contenido de cenizas presentó un mínimo de 9.95% para L2 y un máximo de 13.26% para el L1, similar a los valores reportados en la revisión realizada por Broin, (2013) para hojas de Moringa frescas y secas, con un intervalo entre el 8 y el 11%.

El contenido de carbohidratos obtenidos por diferencia, presentó valores con una variación de 5.7% entre muestras de diferentes lotes (cosechas), con un valor mínimo de 41.6% en L1 y un máximo de 47.2% en el LC2. Al igual que en los otros componentes, los valores resultan cercanos a lo reportado por autores como: Valdez-solana *et al.*, (2015) con 54 y 57% con, Teixeira *et al.*, (2015) con 44.36% y Witt, (2013) con 36%.

En general, la variabilidad presente en los datos proximales del valor nutricional de *Moringa oleifera*, dependen de varios factores como los antecedentes genéticos, el medio ambiente y los métodos de cultivo, según lo reportado por Moyo *et al.*, (2011).

De acuerdo a su composición nutrimental, las hojas de Moringa han sido consideradas como una excelente fuente alimentaria por organizaciones internacionales como: El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos por sus siglas en inglés (USDA), El consejo de Investigación médica de la India (ICMR) con su Instituto Nacional de la Alimentación y, por último, La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación (FAO) refiere las hojas de Moringa en su tabla de composición de alimentos de África Occidental. Todas ellas han presentado

reportes avalando el uso directo de éstas hojas en el desarrollo de dietas animales y humanas. (Witt, 2013).

VIII.2 Potencial nutracéutico de las hojas de *Moringa oleifera*

VIII.2.1 Contenido de fibra dietaria

El contenido de fibra total dietaria, insoluble y soluble se continuó con 2 lotes que fueron seleccionados por ser proporcionados y cultivados en México (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de fibra dietaria total, soluble e insoluble de hojas de *Moringa (Moringa oleifera)* en polvo.

Lote	Fibra Total	Fibra Insoluble	Fibra Soluble
L2	28.91 ± 0.13 ^a	25.35 ± 0.47 ^a	3.43 ± 0.13 ^a
L3	25.02 ± 0.08 ^b	21.72 ± 0.38 ^b	3.21 ± 0.16 ^b

L2, L3: Muestras de *Moringa* por lotes cosechados en diferentes estaciones del año. Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de experimentos independientes. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Los resultados presentan una variación del 3.9% en el contenido de fibra total dietaria, siendo 25% para lote 3 (L3) y 28.9% para el lote 2 (L2). Las hojas de *Moringa* se consideran como un alimento rico en fibra total dietaria (FTD), con valores similares a los reportados por Mallillin *et al.*, (2014) quienes obtuvieron un 26.2 y un 39.9% de fibra total en hojas de *Moringa*, 23 y 34.9 % de fibra insoluble y un 3.1 y 5% de fibra soluble, respectivamente. Igualmente, Witt, (2013) reporta el contenido de fibra total en un rango que va desde 20.6 hasta 28.6%, valores similares a los presentados en éste trabajo.

Moyo *et al.*, (2011) informaron el contenido de fibra por el método de fibra detergente neutro (FDN), obteniendo un valor aproximado de 21.69% de fibra total, siendo ligeramente menor al presentado anteriormente. Además, el uso de técnicas de cuantificación diferentes aunado de las correcciones hechas por la AOAC hoy en

día donde se incluyen valores de fibra dietaria de bajo peso molecular, componentes como inulina y povidextranos, además de algunos tipos de almidón resistente, limitan la comparación de éste componente con otros autores (Megazyme, 2016).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés), ha aprobado declaraciones de propiedades saludables que afirman el efecto de la fibra dietética en la prevención del cáncer (FDA, 2010). Además, la literatura sugiere una destacada asociación entre la alta ingesta de fibra dietética y una baja incidencia de cáncer de colon, atribuyéndole propiedades anticancerígenas (Zeng, *et al.*, 2014; Kaczmarczyk *et al.*, 2012; Lattimer *et al.*, 2010).

Los carbohidratos más complejos o aquellos que resisten las transformaciones enzimáticas de la digestión y llegan al intestino grueso para ser sustrato de la microbiota colonica, son responsables de la producción de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácidos fenólicos metabolizados que favorecen la homeostasis o equilibrio del tracto intestinal (Tabernero., *et al.*, 2011). Además, la estructura química de los carbohidratos que componen la fibra, condicionará su perfil fermentativo o cantidades y proporciones en la producción de AGCC, además de variar su velocidad de producción (Van der Beek *et al.*, 2017).

De tal manera que la fermentación de la fibra y la consecuente producción de AGCC y metabolitos fenólicos asociados a ésta, es una de las características relevantes de la fibra en la prevención del cáncer de colon, además de otros efectos fisiológicos que favorecen la salud del colon, como: aumento del volumen y tránsito intestinal, disminución del tiempo de fermentación proteolítica (producción de sustancias nocivas), reducción del contacto entre compuestos carcinógenos y las células de la mucosa del epitelio colónico (Van der Beek *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2014; Lattimer *et al.*, 2010).

Por lo tanto, debido a que la fibra puede unirse a potenciales carcinógenos (por ejemplo, ácidos biliares secundarios), facilitando su excreción y disminuyendo el pH en el colon (Kern *et al.*, 1978; Courtney *et al.*, 2004), se ha sugerido que matrices alimentarias como las hojas de Moringa al ser utilizadas como suplementos dietarios, podrían atribuir sus efectos a la salud, a su contenido de fibra dietaria y compuestos fenólicos.

VIII.2.2 Contenido total de fenoles, flavonoides y taninos

En el Cuadro 4 se muestra el contenido de fenoles totales, flavonoide y taninos libres en hojas de Moringa.

Cuadro 4. Contenido de fenoles totales, flavonoides y taninos libres de las hojas de Moringa (*Moringa oleifera*) deshidratadas.

LOTE	Fenoles Totales (mg EGAL/g)	Flavonoides totales (mg ER/g)	Taninos (µg ECAT/g)
L1	30.42 ± 0.15 ^a	34.82 ± 3.27 ^b	9.69 ± 1.86 ^a
L2	32.75 ± 0.07 ^a	42.64 ± 2.76 ^a	6.08 ± 0.57 ^b
L3	22.65 ± 7.88 ^a	30.64 ± 0.57 ^b	6.47 ± 0.17 ^b

L1, L2, L3: Muestras de Moringa de lotes cosechados en diferentes estaciones del año; Moringa. Los resultados se presentan en mg/g de muestra (hojas secas), como la media ± la desviación estándar de experimentos independientes por lote.

En cuanto a los compuestos fenólicos totales determinados por la técnica de Folin Ciocalteau, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre lotes de cosecha (30.42, 32.75 y 22.65 mg/g) para L1, L2 y L3 respectivamente, aun cuando el L2 presentó el contenido más alto. Estos valores son similares a los reportados por Prakash *et al.*, (2007) con 32.9 mg/g, Sreelatha *et al.*, (2009) con 36.02 y 45.81 mg/g y Vongsack *et al.*, (2013) con 37.1 mg/g. Todos éstos resultados son ligeramente menores a lo reportado por Perez-Rodriguez *et al.*, (2015) con 47 mg/g en la optimizaron de metodología para la extracción de compuestos fenoles y flavonoides en hojas de Moringa, aplicando sonicación asistida.

Estudios previos como lo reportan Siddhuraju y Becker, (2003) compararon contenidos de fenoles totales y flavonoides de plantas de Moringa que fueron cultivadas en Nicaragua, India y Nigeria con 42.5 y 44.3, 29 y 21 y 36.6 y 38.1 mg/g de hojas respectivamente. El lote que presentó mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, fue el de Moringa cultivada en Nicaragua. Las similitudes de dicho reporte con ésta investigación, podrían atribuirse a que tanto México como Nicaragua se ubican en Centroamérica y comparten cultivares y condiciones edafológicas similares.

Por otro lado, los valores de fenoles totales resultan menores en comparación con lo reportado por Charoensin, (2012) para extractos con metanol y diclorometano (216.45 y 100.12 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g extracto respectivamente). Aproximadamente el doble a lo cuantificado en lotes de Moringa cultivada en México.

El contenido de flavonoides para L1, L2 y L3 presentó valores de 34.8, 42.6 y 30.6 mg/g equivalente de rutina por gramo de muestra respectivamente, son menores comparados con los resultados de Charoensin, (2012) quien reportó un contenido de flavonoides de 65.38 y 40.14 mg equivalentes de quercetina (QE) en extractos elaborados con metanol y diclorometano. En un otro reporte realizado por el mismo autor Charoensin *et al.*, (2014), las cuantificaciones de flavonoides fueron similares con 65.35 mg equivalentes de quercetina.

Los resultados obtenidos en éste trabajo, son mayores a lo reportado Yang *et al.*, (2008), quienes cuantificaron en 91 especies de plantas el contenido total de flavonoides e informaron que el contenido total en hojas de Moringa se encuentra en un rango de 5.06 a 12.16 mg/g de hojas secas, valores cercanos y mayores a los contenidos en diferentes frutas y vegetales de consumo regular dentro de la dieta (Coppin *et al.*, 2013; Harnly *et al.*, 2006).

La variación podría estar condicionada a los estándares de referencia en que se expresan las cuantificaciones y las técnicas de extracción. Considerando la cuantificación preliminar de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos, se eligió el L2, por presentar mayor potencial para utilizar técnicas más finas como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), en posteriores determinaciones.

VIII.2.3 Capacidad antioxidante de diferentes lotes (L1, L2, L3) de cosecha de las hojas de *Moringa oleifera*.

El contenido de compuestos fenólicos se ha asociado con la capacidad antioxidante (AA) (Gorinstein *et al.*, 2010). Se determinó la AA de extractos de las hojas de *Moringa* como se presentan en el Cuadro 5 y la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) (Figura 10).

Cuadro 5. Evaluación de la capacidad antioxidante extractos metanólicos de hojas de *Moringa (Moringa oleifera)*.

LOTE	DPPH		ABTS	
	(% ARA)	TEAC/g	(% ARA)	TEAC/g
L1	90.45 ± 0.07 ^b	67.30 ± 0.45 ^b	94.70 ± 0.04 ^a	59.77 ± 0.47 ^a
L2	92.59 ± 0.34 ^a	54.83 ± 2.02 ^a	93.63 ± 0.06 ^b	72.07 ± 0.71 ^b
L3	90.46 ± 0.24 ^b	67.22 ± 1.42 ^b	94.51 ± 0.34 ^a	61.91 ± 3.92 ^a

L1, L2, L3: Muestras de *Moringa* de lotes cosechados en diferentes estaciones del año. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. ¹Capacidad antioxidante expresada en % de inhibición del radical (ARA) y como μmol equivalentes de trolox/g de muestra.

Los resultados mostraron valores de 54.83 a 67.30 mediante DPPH y de 59.77 a 72.07 por ABTS TEAC/g de muestra. Los extractos metanólicos de hojas mostraron inhibir el radical DPPH de manera dosis dependiente. En ambas técnicas L2 presenta diferencias significativas con respecto a L1 y L3, sin embargo, por la

técnica DPPH el L2 presenta la mayor capacidad antioxidante (menor TEAC), mientras que por la técnica de ABTS, presenta menor capacidad (mayor TEAC). Así como la concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀) en equivalentes de trolox (Figura 14).

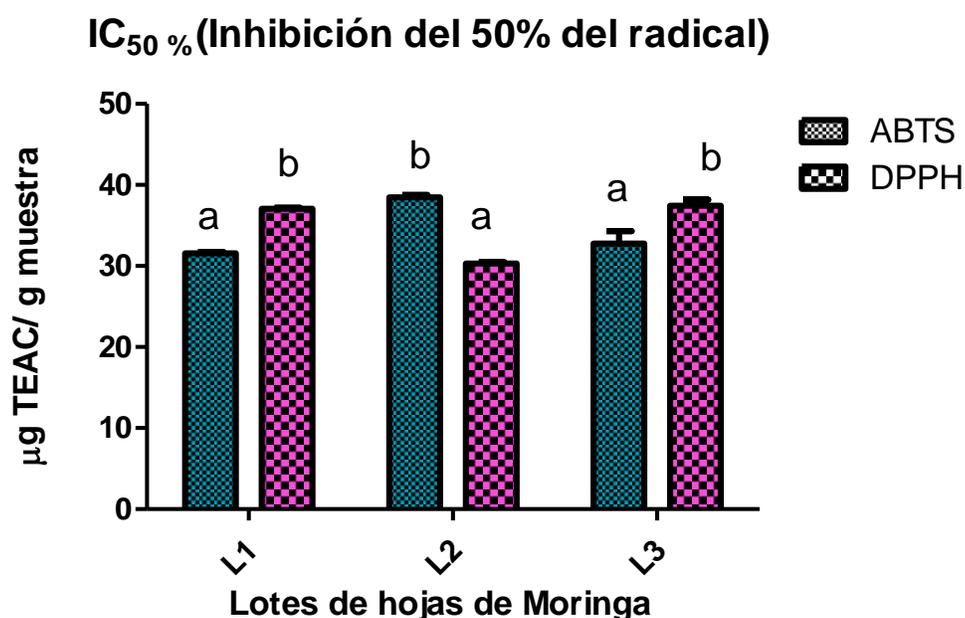


Figura 14. Capacidad antioxidante del extracto acuoso de hojas de *Moringa oleífera*

L1, L2, L3: Muestras de Moringa de lotes cosechados en diferentes estaciones del año. Los resultados representan la media de tres réplicas \pm desviación estándar ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. 1Capacidad antioxidante expresada en % de inhibición del radical. La barra azul (ABTS) y la barra púrpura (DPPH).

Biológicamente, el potencial antioxidante puede representar una alternativa de modulación en condiciones de estrés oxidativo. En otros casos, puede representar potencial para la pro oxidación como blanco terapéutico en células transformadas, promoviendo la generación de radical hidroxilo mediante reacciones de tipo fenton, ya que los iones metálicos de transición están mayormente en células de cáncer que en las células normales (Alhosin *et al.*, 2015).

En ambas técnicas se presentan diferencias estadísticas significativas únicamente en L2 (92%) con respecto a los demás. En ABTS el porcentaje de inhibición es

menor en éste lote (94%), mientras que por DPPH éste lote presentó mayor porcentaje de inhibición, siendo relevante que dicho lote presenta mayor potencial antioxidante que los demás.

Lo anteriormente descrito se explica debido a que el tipo de ensayo y la composición del solvente utilizado, tienen influencias similares sobre la reactividad de un antioxidante particular, ya sea puro o como parte de una matriz compleja, por lo que la capacidad antioxidante en los diferentes ensayos depende fuertemente del tiempo de la concentración, pH y tiempos de incubación (características de la técnica) (Abramovič *et al.*, 2017).

Autores como Shih *et al.*, (2011) reportaron la comparación del efecto de la estación sobre la capacidad antioxidante de las hojas de Moringa (*Moringa oleifera*) provenientes de Taiwán y recolectadas en invierno y verano, reportando resultados equivalentes de ácido ascórbico (Vitamina C) con un IC₅₀ de 200 µg/mL y 387 µg/mL respectivamente.

También Vongsak *et al.*, (2013) midieron la actividad antioxidante utilizando diversos métodos de extracción en hojas de *Moringa oleifera* proveniente de Tailandia, reportando que el extracto seco obtenido por maceración y disuelto en etanol al 70% exhibió una elevada actividad de eliminación del radical DPPH, con un IC₅₀ = 62,94 g / mL, el cual es similar al resultado de los lotes 1 y 2, con 67.3 y 54.8 µg equivalentes de trolox (TEAC) por gramo de muestra, sugiriendo que la variabilidad podría estar afectada por la eficiencia de los métodos de extracción.

Igualmente, autores como Charoensin y Wongpoomchai (2012) demostraron que el extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* contenía polifenoles a los que les compete la actividad de eliminación de radicales DPPH, como también, la actividad antioxidante reportada por Mansour *et al.*, (2014).

La técnica DPPH ha sido ampliamente utilizado para evaluar las actividades de liberación de radicales libres de diversas sustancias antioxidantes (Mandade *et al.*, 2011), sin embargo, el uso de solventes y la variabilidad en los métodos de extracción, influyen considerablemente los resultados de las determinaciones.

De acuerdo a la determinación preliminar de fenoles totales, flavonoides y taninos, como de capacidad antioxidante, se continuaron posteriores ensayos biológicos descritos a continuación.

VIII. 3 Ensayo Biológico: Digestión gástrica y fermentación colonica *in vitro*

Las pruebas iniciales consistieron en evaluar la permeabilidad en el comportamiento del flujo de agua y el transporte de glucosa, a fin de garantizar la viabilidad del tejido escindido en la técnica del saco intestinal invertido.

VIII.3.1 Flujo de agua y viabilidad del saco intestinal invertido durante el ensayo de permeabilidad *in vitro*

En el Cuadro 6 se presenta el flujo de agua durante la absorción en el yeyuno de la digestión gastrointestinal *in vitro* de hojas de *Moringa oleifera*

Cuadro 6. Cambios en el flujo de agua durante la absorción en el yeyuno de la digestión gastrointestinal *in vitro* de hojas de *Moringa oleifera*.

Tiempo de Incubación	Blanco ¹	HM
15 min	0.35 ± 0.09 ^a	0.21 ± 0.17 ^b
30 min	0.63 ± 0.10 ^a	0.24 ± 0.10 ^{ab}
60 min	0.37 ± 0.16 ^a	0.26 ± 0.13 ^b
120 min	0.46 ± 0.21 ^a	0.35 ± 0.18 ^a

HM: Hojas de Moringa; El blanco corresponde a fluido salival sometido a digestión colonica *in vitro*. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca). Diferentes letras (minúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey.

En ésta prueba no se aprecian diferencias significativas entre los diferentes tiempos de incubación en el blanco, mientras que la muestra presenta diferencias significativas en los tiempos de 30 y 120 minutos y esto corresponde al tiempo que dura la absorción de una matriz alimentaria en el jejunio. De ésta manera, el flujo de agua que tiende a ocurrir entre las células intestinales está dado en función de un gradiente de presión osmótica y es facilitado por proteínas cuya función es la activación de canales que facilitan el transporte de agua, lo cual explica la variación del flujo en las muestras (Gisolfick, 2012; Ming *et al.*, 2011).

Los resultados sugieren que a los 120 minutos de incubación se ha transportado una mayor cantidad de compuestos, ya que se ha establecido que los movimientos de agua ocurren pasivamente y son generalmente dependientes de la absorción de solutos, es decir, si la absorción de solutos es cero, la absorción de agua es cero y si es mayor a cero, el valor representa una mayor permeabilización de compuestos a través del epitelio intestinal (Gisolfi, 2012; Loike *et al.*, 2003; Leiper y Maughan, 1986).

La medición de glucosa permite validar que existe un fenómeno de transporte activo en el tejido utilizado durante el ensayo *ex vivo-in vitro*, relacionando la permeabilidad con la absorción de compuestos como los polifenoles, que se encuentran asociados a moléculas de azúcar (Amaglo *et al.*, 2012; Farrel *et al.*, 2011). Para simular el transporte y/o bioaccesibilidad en intestino delgado, se midió el transporte del lado apical al lado basolateral (Cuadro 7).

Cuadro 7. Transporte de glucosa en prueba de viabilidad del saco intestinal invertido.

Tiempo (min)	Lado Apical	Lado Basolateral	Relación Basolateral/ Apical
15	53.49 ± 3.90 ^a	65.37 ± 3.96 ^c	1.22 ^b
30	55.30 ± 7.16 ^{ab}	98.92 ± 1.86 ^a	1.81 ^a
60	49.03 ± 4.97 ^b	93.80 ± 19.01 ^{ab}	1.93 ^a
120	69.96 ± 11.77 ^b	76.87 ± 6.15 ^{bc}	1.14 ^b

Los resultados de los lados apical y basolateral son expresados en μg de glucosa / mL. Apical / Basolateral representan la relación de flujo entre ambos lados. Datos expresados como la media de tres réplicas \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey.

La concentración de glucosa incrementó durante los tiempos de 15 a 30 minutos, con una relación basolateral/apical de 1.22 a 1.81 presentando diferencias significativas entre los dos tiempos. Finalmente se presentó una disminución al tiempo de 120 minutos de 1.93 a 1.14. El transporte máximo de glucosa se dio a los 60 minutos con una relación basolateral/apical de 1.93 (la más alta de la incubación).

De manera general, no se presentaron diferencias significativas entre los tiempos de 15 y 120 minutos, aunque hubo diferencias significativas de los 30 y 60 minutos.

Esto podría indicar que a los tiempos 30 y 60 hay una mayor actividad metabólica y fisiológica del tejido. También, el aumento de 1.22 a 1.81 μg de glucosa en el transcurso de los 15 a los 30 minutos demuestran la viabilidad del tejido y sus respectivos transportadores de glucosa (GLUT) y (SGLUT) en el saco intestinal, seguido de la disminución en la relación basolateral/apical de 1.93 a 1.14 μg de glucosa en los minutos de incubación 60 y 120 respectivamente, lo que indica una saturación del sistema y en consecuencia la disminución del transporte de la glucosa (Ming *et al.*, 2011).

La ruta de absorción puede ser a través del estómago y del intestino delgado, mediada por las enzimas LPH y CBG o puede darse a nivel de colon después de la modificación química por la microbiota colonica. Durante éste proceso los polifenoles se modifican por varias reacciones catabólicas y de conjugación, apareciendo en la sangre para luego ser excretados en la orina o a través de la bilis. Algunos sustratos y catabolitos no absorbidos son excretados en las heces (Williamson y Clifford., 2017; Day *et al.*, 2001).

Por lo anterior, se realizó la cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides libres en las etapas gastrointestinales y colonicas, descartando la etapa de boca puesto que en condiciones fisiológicas se consume las hojas en forma de cápsulas (500mg) y no interacciona un tiempo prolongado en boca como otras matrices alimentarias.

VIII.3.2 Contenido de compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) libres durante la digestión gastrointestinal y fermentación colonica *in vitro* de hojas de Moringa (*Moringa oleifera*) por HPLC-DAD.

Se cuantificaron los compuestos fenólicos libres en diferentes etapas de la digestión como se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Bioaccesibilidad de flavonoides libres durante la digestión gastrointestinal y fermentación colonica *in vitro* de hojas de Moringa (*Moringa oleifera*).

ETAPA	FLAVONOIDES				
	Catequina	Rutina	Morin	Quercetina	Kaempferol
Hojas	619.51 ± 2.50 ^d	589.40 ± 4.74 ^a	2.60 ± 0.21 ^{bc}	231.42 ± 4.18 ^c	94.56 ± 7.73 ^c
Estómago	4999.68 ± 189.9 ^a	1640.7 ± 164.71 ^b	4.34 ± 0.09 ^b	1013 ± 14.88 ^a	1013.15 ± 14.88 ^d
Intestino delgado					
120 min	5.16 ± 0.23 ^e	0.43 ± 0.05 ^d	ND	ND	ND
Fracción resistente a la digestión					
15 min	22.30 ± 1.35 ^e	1.28 ± 0.10 ^d	0.66 ± 0.33 ^{cd}	18.82 ± 1.56 ^e	ND
30 min	11.70 ± 0.02 ^e	0.47 ± 0.01 ^d	0.17 ± 0.01 ^d	17.43 ± 0.24 ^e	ND
60 min	13.12 ± 0.18 ^e	0.40 ± 0.10 ^d	0.47 ± 0.10 ^d	ND	ND
120 min	14.24 ± 0.60 ^e	0.41 ± 0.14 ^d	ND	3.22 ± 0.06 ^e	ND
Metabolitos en colon					
6h	915.30 ± 18.28 ^c	124.61 ± 0.09 ^c	ND	3.03 ± 1.57 ^e	196.55 ± 0.75 ^a
12 h	151.42 ± 5.71 ^e	273.66 ± 0.26 ^b	41.97 ± 1.18 ^a	489.07 ± 7.50 ^b	177.62 ± 0.04 ^b
24h	463.67 ± 5.88 ^d	ND	ND	78.17 ± 0.00 ^d	194.62 ± 0.36 ^a

HM: Extracto metanólico de hojas de Moringa (*Moringa oleifera*); FDM: Fracción digerible de Moringa (lado apical), FNDMM: fracción no digerible de hojas de moringa (lado basolateral); EFNDM: Extracto de la fermentación colonica de la fracción no digerible de hojas de Moringa. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. ND: No Detectado. 1Contenido de flavonoides en μg compuesto/g de muestra.

El comportamiento los flavonoides durante la digestión y la fermentación colonica, presentó diferencias significativas entre la materia prima y las etapas de digestión (hojas, etapa gástrica, intestinal y colonica). Sin embargo, no presentaron diferencias significativas en los tiempos de incubación de la fracción digerible y la fracción no digerible (de 0 a 120 minutos).

Inicialmente las (HM) fueron sometidas a una extracción para optimizar la cuantificación de sus compuestos, permitiendo identificar la catequina como flavonoide libre mayoritario con 619.51 ± 2.50 , seguida por rutina con 589.40 ± 4.74 $\mu\text{g/g}$, Quercetina 231.42 ± 4.18 $\mu\text{g/g}$, Kaempferol 94.56 ± 7.73 , Morin 2.60 ± 0.21 $\mu\text{g/g}$. Estos resultados difieren con otros reportes que han identificado a quercetina y kaempferol como los principales flavonoides encontrados en las hojas de Moringa (Coppin *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2009).

Las cantidades iniciales de compuestos detectados en las hojas, se ven afectados por enzimas digestivas, cambios de pH y tiempos de incubación características de la digestión, lo cual se evidencia en la variación de sus contenidos durante la simulación digestiva.

La literatura sugiere que de manera general a la absorción de flavonoides en el aparato digestivo comienza en el íleon, dónde las estructuras complejas (ésteres, glicósidos o polímeros) que no pueden ser absorbidos en su forma nativa, que no pueden ser absorbidas en su forma nativa, son hidrolizados por enzimas intestinales (colon) (Manach *et al.*, 2004).

Durante la absorción, los flavonoides se conjugan en el intestino delgado y luego en hígado mediante procesos de metilación, sulfatación y glucoronidación (Ulrichová *et al.*, 2010; Sude y Sykes, 2007).

El compuesto fenólico que presentó mayor variación, corresponde al incremento de catequina, flavonoide detectado en las hojas y drásticamente incrementado en la

etapa gástrica y de fermentación colonica a los tiempos de 6, 12 y 24 horas. A diferencia de rutina y Morin, flavonoides que pasan de 589.40 ± 4.74 y 2.60 ± 0.2 $\mu\text{g/g}$ a valores no detectados a las 24 de fermentación.

En la etapa gástrica se presentó un aumento del contenido en todos los flavonoides. En las hojas los compuestos se encuentran glicosilados en forma de moléculas complejas, donde diversas moléculas de azúcares se pueden unir a la estructura de éstos sobre sus grupos hidroxilo haciendo su estructura más compleja e incluso más solubles en agua (Migélez *et al.*, 2015; Lidija, 2014).

En la fracción digerible se sugiere que la disminución de flavonoides se debe a un acomplejamiento con otras moléculas de la matriz alimentaria y a una tendencia no lineal, previamente reportada por Farrel *et al.*, (2011). Por último, se considera el aumento en la cuantificación durante la etapa colonica a las 12 y 24 horas, corresponde a la liberación que resulta del metabolismo de la microbiota colonica al usar la FNDM como sustrato (Vijaraya *et al.*, 2016; Walle, 2004).

Lo anterior se explica debido a que los compuestos metabolizados pueden transformados por las enzimas de la microbiota intestinal (esterasa, glucosidasa) que realizan actividades enzimáticas como: desmetilación, deshidroxilación y descarboxilación) (Jacobs *et al.*, 2009).

En cuanto a los ácidos fenólicos, sus variaciones se presentan a continuación en el cuadro 9.

Cuadro 9. Bioaccesibilidad de ácidos fenólicos libres durante la digestión gastrointestinal y fermentación colonica *in vitro* de hojas de Moringa (*Moringa oleifera*).

ÁCIDOS FENÓLICOS ¹					
	Ácido gálico	Ácido clorogénico	Acido cafeico	Acido elágico	Acido cumárico
HM	77.22 ± 1.00 ^a	967.31 ± 9.41 ^b	626.34 ± 5.56 ^a	2470.3 ± 40.33 ^b	45780 ± 30.77 ^b
ESTOMAGO	52.85 ± 1.54 ^b	7844.77 ± 15.22 ^a	57702.1 ± 616.6 ^b	18419.1 ± 174.08 ^a	108214 ± 307.2 ^a
120 min	7.11 ± 0.07 ^d	10.39 ± 0.16 ^e	1.23 ± 0.04 ^e	ND	ND
15 min	0.45 ± 0.11 ^g	25.86 ± 0.35 ^{fgh}	7.93 ± 0.13 ^{de}	95.5 ± 4.48 ^c	824 ± 3.64 ^c
30 min	0.70 ± 0.14 ^g	40.01 ± 0.31 ^{ef}	7.87 ± 0.16 ^{de}	123.2 ± 3.20 ^c	551 ± 21.59 ^c
60 min	1.05 ± 1.60 ^{fg}	12.97 ± 0.16 ^{gh}	3.32 ± 0.44 ^e	77.5 ± 4.08 ^c	464 ± 3.44 ^c
120 min	4.47 ± 0.10 ^e	35.99 ± 4.22 ^{efg}	6.69 ± 0.18 ^e	52.4 ± 8.62 ^c	418 ± 31.76 ^c
6h	0.44 ± 0.10 ^g	330.37 ± 11.97 ^c	74.82 ± 12.82 ^c	463.2 ± 19.78 ^c	ND
12 h	38.25 ± 0.10 ^c	98.86 ± 0.38 ^d	26.59 ± 0.72 ^d	376.3 ± 8.62 ^c	ND
24h	ND	59.95 ± 14.19 ^e	ND	264.6 ± 9.53 ^c	ND

HM: Extracto metanólico de hojas de Moringa (*Moringa oleifera*); FDM: Fracción digerible de Moringa (lado apical), FNDMM: fracción no digerible de hojas de Moringa (lado basolateral); EFNDM: Extracto de la fermentación colonica de la fracción no digerible de hojas de Moringa. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. ND: No Detectado. ¹Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides en μg compuesto/g de muestra.

En las hojas, como en las diferentes etapas de digestión de éstas, los compuestos fenólicos libres varían, siendo el mayoritario el ácido p-cumárico ($45780 \pm 30.77 \mu\text{g/g}$), seguido por el de ácido elálgico ($2470.3 \pm 40.3 \mu\text{g/g}$), ácido clorogénico ($967.31 \pm 9.41 \mu\text{g/g}$), ácido cafeico $626.34 \pm 5.56 \mu\text{g/g}$ y por último el ácido gálico ($77.22 \pm 1.00 \mu\text{g/g}$).

Los modelos *in vitro* son empleados como herramienta para evaluar diversidad de factores que intervienen en la digestión, con determinadas restricciones, por lo que es posible aproximar un comportamiento o tendencia, por ejemplo: en la etapa intestinal (considerando la sumatoria de todos los tiempos), sólo presentaron absorción de tres ácidos. El ácido gálico con el 44%, el ácido clorogénico con un 22% y el ácido cafeico con un 11%. Esto coincide con reportes que estiman que el 48% de polifenoles son digeridos en el intestino delgado y 42% en el intestino grueso y solamente el 10% no son digeridos y permanecen intactos en la matriz alimentaria debido a su acomplejamiento y baja biodisponibilidad (Marín *et al.*, 2015; Saura-Calixto *et al.*, 2007).

Debido a que los compuestos fenólicos se encuentran como glúcidos mayoritariamente y el efecto mecánico que se ejerce al masticar un alimento es incrementar el área de contacto, mientras las enzimas digestivas en la saliva actúan con mayor eficiencia rompiendo enlaces entre los compuestos fenólicos y azúcares, provocando su liberación. De acuerdo a su diversidad funcional y estructural de conjugación y pueden ser hidroxilados y metoxilados en varias posiciones (Velderrain *et al.*, 2014).

Los compuestos que por su estructura son más solubles, presentaron una mayor detección, siendo el ácido p-cumárico, principalmente detectado e identificado, representando el 88% con respecto a los demás. Este ácido es el tercero más común en la naturaleza y en cuanto a su actividad biológica, Pei *et al.*, (2016) reportaron una concentración letal media de 1500 mM para células de cáncer de colon (HT29).

Se destaca que durante la digestión y fermentación colonica simulada, se detectaron cantidades importantes de compuestos en la matriz sin biotransformar y la etapa colonica, en su mayoría a las 12 h de fermentación, como lo son el ácido elágico, clorogénico, gálico y cafeico con 376.3, 98.86, 38.25 y 26.59 $\mu\text{g/g}$ respectivamente.

El valor de ácido clorogénico, se presenta en cantidades de 967.31 $\mu\text{g/g}$ aproximadamente 2 veces mayores que otras reportadas por autores como Valdez-Solana *et al.*, (2015) con valores de $479.53 \pm 16.24 \mu\text{g/g}$ para Moringa también cultivada y crecida en México. De éste compuesto hace varias décadas se reconoce su actividad antioxidante debido a sus propiedades de quelación de cationes (Robertson y Eastwood, 1981). Éste ácido también es conocido como el ácido 5-cafeonilquínico (Macheix *et al.*, 1990). Un estudio de éste compuestos presentó una absorción en intestino delgado del 8% en un modelo de perfusión total *in situ*, una tasa 2.4 veces menor que el ácido cafeico (Lafay *et al.*, 2006a).

Se ha reportado que el ácido gálico en la etapa intestinal presenta una alta tasa de liberación, atribuida al medio alcalino Liu *et al.*, (2012). Dicho incremento en se debe a la generación del mismo como un producto monomérico de taninos hidrolizables (Mosele *et al.*, 2015). En éstos resultados, se detectó un comportamiento similar durante las etapas intestinales, sugiriendo que las diferencias presentadas podrían estar descritas por la inestabilidad del compuesto en condiciones alcalinas muy altas (Mosele *et al.*, 2015), o por la formación de ácido elágico a partir de derivados monogálicos (Tuominen y Sundman, 2013).

Otro factor considerado en los fenómenos descritos, corresponde a la permeabilidad de moléculas a nivel intestinal, las cuales se asocian a la biodisponibilidad de algunos compuestos, entre ellos los medicamentos y se relacionan directamente con su absorción (Ma *et al.*, 2014). Teniendo de cuenta los valores cuantificados por HPLC de compuestos fenólicos en cada etapa de la digestión gastrointestinal *in*

vitro, el Cuadro 10 muestra el cálculo de los coeficientes de permeabilidad aparente, permeabilidad neta y la relación de flujo de salida.

Cuadro 10. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}), permeabilidad neta (P_{app} Neta) y relación de flujo de salida de los compuestos fenólicos en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* de hojas de *Moringa oleifera*.

Compuesto Fenólicos	Tiempo de Incubación ¹	AP → BL ² P_{app} ($\times 10^{-3}$)	BL → AP ² P_{app} ($\times 10^{-3}$)	P_{app} neta ² ($\times 10^{-3}$)	Relación de Flujo
Ácido gálico	15	1.43 ^a	0.91 ^b	1.51	15.58 ^a
	30	0.42 ^a	0.07 ^b	0.48	5.88 ^a
	60	0.36 ^a	0.05 ^b	0.42	6.77 ^a
	120	0.08 ^a	0.11 ^b	0.19	0.70 ^a
Ácido clorogénico	15	1.77 ^a	3.66 ^a	5.44	0.48 ^b
	30	0.80 ^a	2.84 ^a	3.63	0.28 ^b
	60	0.21 ^a	0.46 ^a	0.67	0.45 ^b
	120	0.18 ^a	0.64 ^a	0.82	0.28 ^b
Catequina	15	0.31 ^a	1.34 ^b	1.65	0.23 ^b
	30	0.15 ^a	0.35 ^b	0.51	0.44 ^b
	60	ND	0.20 ^b	0.20	ND
	120	0.03 ^a	0.11 ^b	0.14	0.29 ^b
Ácido cafeico	15	0.36 ^a	2.57 ^b	2.93	0.13 ^b
	30	0.20 ^a	1.28 ^{ab}	1.47	0.15 ^b
	60	ND	0.27 ^{ab}	0.27	ND
	120	0.03 ^a	0.27 ^{ab}	0.30	0.13 ^b
Rutina	15	0.07 ^a	0.97 ^{ab}	1.04	0.07 ^b
	30	ND	0.59 ^{ab}	0.59	ND
	60	ND	0.20 ^{ab}	0.20	ND
	120	ND	0.11 ^{ab}	0.11	ND

Los resultados representan la media de tres réplicas \pm desviación estándar. BL: Basolateral; AP: Apical. Diferentes letras (minúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. ND: valores que no fueron detectados o que por las características de la fórmula utilizada no pudieron ser utilizados. ¹ Tiempo de incubación en minutos; ² Coeficientes de permeabilidad aparente y neta calculados en cm/s.

Los resultados corresponden a la permeabilidad de los compuestos fenólicos que pudieron ser detectados y cuantificados en el lado apical y basolateral. Aunque el ácido gálico fue el único que presentó mayor relación de flujo en el coeficiente de

permeabilidad y diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás compuestos en los diferentes tiempos de digestión, también catequina, clorogénico y cafeico presentaron permeabilidad durante las incubaciones de la etapa intestinal *ex vivo*. Entre los efectos biológicos reportados del ácido gálico, está la inducción de apoptosis en células mutantes de cáncer de pulmón (Boas *et al.*, 2016). Además, se ha atribuido a éste compuesto un efecto antidiabético natural debido a la inhibición de la actividad de la α -glucosidasa (Ganiyu *et al.*, 2016).

En cuanto a la permeabilidad del lado apical hacia el lado basolateral, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los compuestos. No obstante, el ácido clorogénico, seguido del ácido cafeico presentaron mayor permeabilidad de apical/basolateral. De igual manera, la permeabilidad de lado basolateral/Apical fue mayor en el ácido clorogénico, aunque si se presentaron diferencias significativas de éste con respecto al ácido gálico y el flavonoide catequina. El tiempo de mayor transporte en los compuestos corresponde al minuto 15, seguido del 30, 60 y 120, siendo éste último el de menor transporte en ambas direcciones del flujo.

Con respecto a la permeabilidad neta, el tiempo de mayor transporte son los 15 y 30 minutos (sin diferencias estadísticas significativas) entre los compuestos, a la vez, los tiempos de menor transporte son los de 30 y 60 minutos, presentando diferencias significativas entre los primeros y los segundos. Éste comportamiento es similar en todos los compuestos detectados.

En cuanto a la relación de flujo, el compuesto con mayor proporción fue el ácido gálico, presentando diferencias estadísticamente significativas en comparación con los demás compuestos. Adicionalmente, la mayor relación correspondió a los tiempos de 15 y 60 minutos. Éste fenómeno puede explicarse debido a que los compuestos menos polares, también presentan baja estabilidad gastrointestinal, llevada a cabo por difusión pasiva y flujo activo de los compuestos fenólicos en el tracto gastrointestinal, por lo que resultan en una baja absorción (Li *et al.*, 2015).

De acuerdo a la estructura química del compuesto, las relaciones de flujo y transporte entre los lados apical y basolateral es dinámica, presentando disminución de los coeficientes de permeabilidad, mientras que se incrementa el tiempo de incubación intestinal, para diferentes compuestos. La permeabilidad aparente (P_{app}) es la tasa de acumulación de un compuesto al interior del intestino extraído de ratas de manera similar a los coeficientes de absorción en humanos (*ex vivo*) (Palumbo *et al.*, 2008; Volpe, 2012). Algunos mecanismos de transporte son los transportadores flujo, los cuales unen moléculas en el fluido intestinal en el lado apical y los transportan al lado basolateral de los enterocitos: por ejemplo, el cotransportador H^+ / oligopéptido (PEPT1) funciona como un transportador de captación de fármacos peptidomiméticos, incluyendo la conversión de angiotensina, Inhibidores enzimáticos, antibióticos β -lactámicos e inhibidores de renina (Yamashita *et al.*, 1986; Bai Jp *et al.*, 1992).

Se ha reportado la relación que existe entre la medición de la permeabilidad aparente (P_{app} , por sus siglas en ingles) y la fracción que se absorbe de un compuesto en el intestino (Bueters *et al.*, 2013). Esta variable es relevante debido a que una pequeña proporción de moléculas administradas oralmente se absorben, debido al corto tiempo que permanecen en la etapa gástrica, baja permeabilidad y / o baja solubilidad, limitando la actividad y los beneficios potenciales para la salud de los polifenoles. Desafortunadamente, se oxidan rápidamente perdiendo considerablemente su actividad (Munin y Edwars-Lévy *et al.*, 2011).

El cálculo no fue realizado para monosacáridos y oligosacáridos considerando que no pudo determinarse la concentración en la fracción digerible durante los tiempos de la digestión intestinal. Posteriormente, se realizó la identificación y cuantificación parcial de monosacáridos y oligosacáridos presentes en las hojas de Moringa, considerando que los carbohidratos pueden clasificarse por su estructura, complejidad y efecto fisiológico. Debido a éste último, pueden ser hidratos de carbono glucémicos (o disponibles) e hidratos de carbono no digestibles (o no disponibles).

VIII.3.3 Bioaccesibilidad de monosacáridos y oligosacáridos de las hojas de *Moringa oleifera*

El Cuadro 11 muestra la bioaccesibilidad de oligosacáridos y productos en la digestión gastrointestinal fermentación colonica *in vitro* de las hojas de *Moringa oleifera*, cuantificados por HPLC-IR.

Cuadro 11. Bioaccesibilidad de oligosacáridos y sus productos en la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colonica *in vitro* de hojas de *Moringa oleifera*.

Etapa	Manosa ¹	Arabinosa ¹	Xilosa ¹	Rafinosa ¹	Estaquiosa ¹
HM	1.70 ± 0.02 ^d	888.19 ± 33.41 ^b	96.52 ± 8.47 ^a	9.30 ± 2.53 ^a	1.85 ± 0.05 ^{bcd}
Estómago	9.02 ± 3.81 ^c	32.00 ± 7.32 ^c	44.42 ± 1.09 ^b	6.20 ± 1.00 ^{ab}	2.27 ± 0.93 ^{bc}
Fracción No digerible de Moringa					
15 min	7.70 ± 0.92 ^{cd}	2864.55 ± 282.50 ^a	10.20 ± 0.13 ^c	2.42 ± 0.04 ^c	1.29 ± 0.19 ^{bc}
30 min	43.95 ± 1.33 ^a	2577.80 ± 12.332 ^c	10.43 ± 0.56 ^c	2.43 ± 0.08 ^c	3.13 ± 0.05 ^{ab}
60 min	35.85 ± 0.19 ^b	307.28 ± 17.82 ^a	7.64 ± 0.02 ^c	1.91 ± 0.42 ^c	4.18 ± 0.23 ^a
120 min	ND	270.51 ± 2.82 ^c	6.08 ± 1.18 ^c	3.72 ± 0.3 ^{bc}	3.72 ± 0.37 ^a
EFCM					
T0	1.33 ± 0.34 ^d	37.56 ± 63.87 ^c	0.19 ± 0.07 ^c	0.17 ± 0.06 ^c	0.03 ± 0.00 ^e
6h	35.81 ± 0.14 ^b	87.45 ± 5.70 ^c	1.22 ± 0.25 ^c	0.37 ± 0.00 ^c	0.23 ± 0.01 ^e
12h	32.37 ± 0.09 ^b	21.20 ± 0.65 ^c	1.19 ± 0.01 ^c	ND	0.84 ± 0.02 ^{de}
24h	34.73 ± 2.66 ^b	21.05 ± 7.25 ^c	ND	0.12 ± 0.00 ^c	0.03 ± 0.0 ^e

HM: Extracto de carbohidratos en las hojas de *Moringa oleifera*. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca). Diferentes letras (minúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. ND= No Detectado. Contenido de carbohidratos y oligosacáridos en mg Compuesto/g de muestra.

La arabinosa fue el monosacárido de mayor contenido en forma libre las hojas de moringa (888.19 $\mu\text{g/g}$), seguido de Xilosa (96.52 $\mu\text{g/g}$), mientras que oligosacáridos como rafinosa y estaquiosa presentaron cantidades de 9.30 y 1.85 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. En la etapa intestinal apical, se presentó un incremento significativo en la cuantificación de los carbohidratos manosa y arabinosa (7.70, 2864.55 $\mu\text{g/g}$) como también, la disminución significativa de los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa (2.42 y 1.29 $\mu\text{g/g}$) respectivamente.

El comportamiento general que se muestra en el cuadro 11 (aumento de monosacáridos en la fracción no digerible en los tiempos 15, 30 y 60 minutos y la correspondiente disminución de oligosacáridos en los mismos tiempos, podría estar explicado por la transformación de moléculas complejas, entre ellos polisacáridos y oligosacáridos, a moléculas más pequeñas como lo son los monosacáridos. En la fermentación colonica, se muestra una pérdida o disminución significativa de oligosacáridos en los tiempos 6, 12 y 24. Mientras que los monosacáridos presentan un incremento significativo a las 6 h y una tendencia de disminución en posteriores tiempos de 12 y 24 h de fermentación.

Un aspecto relevante de dichas azúcares es la reportada glicosilación que presenta con glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa o arabinosa es común en una cantidad importante de flavonoides (Macheix *et al.*, 1990).

En cuanto a las hexosas como la arabinosa, no se conocen funciones fisiológicas específicas, ni tampoco se encuentra libre en la naturaleza, ya que es un producto derivado de la goma arábica (polisacárido de origen natural). Al igual que la xilosa, tampoco se han establecido funciones fisiológicas, aunque se identifica por la dificultad que presenta para ser digerida y estar mayoritariamente presente en la composición de hierbas y compuestos leñosos (Calvo Bruzos *et al.*, 2011).

La manosa es una hexosa característica de polisacáridos constituyentes de albúminas, globulinas y mucoides. La importancia de éstos monosacáridos está en

su estructura que conforma pectinas de la fibra soluble y al absorber agua, forman una preparación espesante del contenido gástrico y regulador del tránsito intestinal. Adicionalmente, fermentan de manera acelerada promoviendo el crecimiento de una microbiota saprofita apropiada y el aumento del volumen fecal (Gil, 2010).

Los monosacáridos (manosa, arabinosa y xilosa) corresponden a hidratos de carbono que se digieren y absorben en el intestino delgado aumentando la glucosa en sangre, mientras que los hidratos de carbono no digestibles (rafinosa y estaquiosa: oligosacáridos), no son digeridos en el intestino delgado, sin producir un aumento de glucosa en sangre y se conoce como fibra dietética, incluyendo a los polisacáridos no amiláceos, almidón resistente, oligosacáridos resistentes con 3 o más unidades monoméricas y otros componentes no digeribles, pero cuantitativamente menores que están asociados con los polisacáridos no digestibles, especialmente lignina. (EFSA, 2010; Gray, 2005).

El proceso de la digestión es la degradación enzimática de las moléculas complejas que componen las matrices alimentarias, para transformarlas en compuestos más sencillos. Para el caso de algunos polisacáridos y oligosacáridos, su transformación inicia con la amilasa salival, aunque esta es inactivada por pH gástrico. En el estómago los carbohidratos no sufren ninguna transformación química, es en el intestino delgado donde tiene lugar la mayor parte de la digestión de los carbohidratos, debido a la secreción de fluidos producidos por el páncreas y células de las paredes del intestino, con enzimas específicas para hidrolizar carbohidratos (amilasa pancreática, disacaridasas, entre otras (Olagnero *et al.*, 2007; Brody, 1998).

Debido a la actividad de dichas enzimas, en el intestino delgado queda una mezcla de monosacáridos provenientes de los carbohidratos complejos. Lo que representa particular interés en la identificación parcial de monosacáridos y oligosacáridos libres como estimar la cantidad de éstos que es metabolizada y transformada en las

hojas de Moringa, a medida que pasa por cada etapa de gástrica, intestinal y colonica *in vitro*, como se muestra a continuación.

Finalmente, los productos de la digestión que se metabolizan por la microbiota en el colon, se monitorearon de manera indirecta utilizando el pH como indicador de la generación de ácidos durante la fermentación colonica simulada, como se muestra en el cuadro 12.

VIII.3.4 Efecto de la fermentación colonica sobre el pH

Se realizó la medición del pH durante los tiempos de 6, 12 y 24 horas durante la fermentación colonica *in vitro* (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efecto de la fermentación colonica *in vitro* de la fracción no digerible de hojas de Moringa (*Moringa oleifera*) sobre el pH.

Muestra	pH			
	0h	6h	12h	24h
EFCM	7.42 ± 0.36 ^a	7.07 ± 0.20 ^a	6.88 ± 0.10 ^a	7.07 ± 0.16 ^a
Control (+)	7.43 ± 0.30 ^a	4.36 ± 0.33 ^b	3.76 ± 0.25 ^b	3.76 ± 0.32 ^b
Control (-)	7.3 ± 0.31 ^a	6.95 ± 0.04 ^a	7.02 ± 0.03 ^a	7.17 ± 0.07 ^a

EFCM: Extracto de fermentación colonica de la fracción no digerible de Moringa. Control (+) igual a 100g de Rafinosa, Control (-) representa el medio e inóculo de fermentación simulada sin sustrato. Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de experimentos independientes.

La mayor disminución de pH para el control positivo (rafinosa) fue a las 12 horas, de forma similar a resultados en diferentes matrices obtenidos mediante la aplicación de la misma técnica y éstos resultados concuerdan con lo reportado para la fracción no digerible de frijol común (*Phaseolus vulgaris L*) por Campos-Vega *et al.*, (2012a) y aislados de agave (*Agave tequilana Weber var. Azul*) por Zamora-

Gasca *et al.*, (2015) quienes identificaron leves incrementos en los valores de pH asociados a los cambios en la producción de ácidos grasos de cadena corta.

El pH fecal es un biomarcador de las reacciones metabólicas que se llevan cabo durante la fermentación colonica y corresponde a la producción de compuestos responsables de la acidificación del medio, en su mayoría los AGCC, que en seres humanos corresponden al 90 - 95% cantidades de acético, propiónico y butírico, los cuales son plurifuncionales y contribuyen al mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal como también, propiedades anticancerígenas (Farmer *et al.*, 2014).

Los valores de pH disminuyeron a medida que se incrementó el tiempo de fermentación de la fracción no digerible de hojas de Moringa (FNDM), aunque no se presentaron diferencias significativas entre la reducción del tiempo de 6 h y 12 horas. Inicialmente se presenta una disminución de 0.35 unidades de pH a las 6 horas de fermentación, seguido de 0.19 unidades a las 12 horas, lo cual suma una reducción total de 0.54 unidades de pH.

La acidificación del medio o reducción del pH, se ha relacionado con la actividad metabólica de los microorganismos fecales, como lo son bacterias ácido lácticas (mayor prevalencia) y la producción de ácidos grasos de cadena corta (Pallin *et al.*, 2016; Vanhoutvin *et al.*, 2009; Dass *et al.*, 2007). Aunque también se ha reportado que todas las fibras presentan un perfil de fermentación diferente (Redondo, 2002).

Por lo anterior, se cuantificó la producción de AGCC por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS), con el propósito de identificar parcialmente el perfil de fermentación colonica de la fracción no digerible de Moringa (FNDMM) como se muestra a continuación.

VIII.3.5 Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante la fermentación colonica *in vitro* de la FNDM

Se cuantificó la cantidad de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos durante fermentación colonica *in vitro* como se muestra en el cuadro 13.

Cuadro 13. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en los diferentes tiempos de fermentación colonica *in vitro* de la fracción no digerible de las hojas de Moringa (*Moringa oleifera*) deshidratada

FNDM	Ác. Acético ¹	Ác. Propiónico ¹	Ác. Butírico ¹	AGCC Totales mMol/g	Relaciones Molares de AGCC ³
6h	9.31 ± 2.21 ^a	ND	ND	9.31	100:0:0
12h	1.83 ± 0.16 ^b	1.76 ± 0.06 ^a	1.11 ± 0.11 ^a	4.70	39:37:24
24h	2.1 ± 0.21 ^b	1.79 ± 0.04 ^a	1.14 ± 0.01 ^a	5.07	42:36:22
RAFINOSA					
6h	2.78 ± 0.81 ^a	0.69 ± 0.27 ^a	0.32 ± 0.13 ^a	2.79	64:25:11
12h	5.64 ± 1.33 ^b	0.65 ± 0.57 ^a	0.57 ± 0.13 ^a	6.86	82:9:08
24h	5.74 ± 1.60 ^b	0.64 ± 0.19 ^a	0.25 ± 0.14 ^a	6.63	87:10:04

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de experimentos independientes. Los resultados se presentan normalizados en mMol/g de fracción no digerible de las hojas de Moringa (*Moringa oleifera*) (FNDM) sometidas a digestión *in vitro*. El control (+) corresponde a medio de fermentación con Rafinosa (100 mg) e inóculo fecal humano (1 mL de inóculo fecal); el control (-) corresponde a medio de fermentación con inóculo fecal humano (1 mL de inóculo fecal).

La FNDM fermentada a partir de microbiota colonica (inóculo fecal humano), presentó valores de ácidos grasos de cadena corta con diferencias estadísticamente significativas en los diferentes tiempos de fermentación de 6, 12 y 24 horas. En el primer tiempo de fermentación, se produjo una cantidad equivalente a 9.31 mMol de ácido acético, mayor al control positivo con un valor de 2.78 ± 0.81, aunque el control positivo presentó producción de ácido propiónico y butírico de 0.69 ± 0.27 y 0.32 ± 0.13 respectivamente, mientras que la muestra de FNDM no

presentó la producción de ninguno de éstos ácidos al primer tiempo de fermentación (6h).

En el segundo tiempo de fermentación (12 h), los valores cuantificados para los tres principales AGCC (acético, propiónico y butírico) mostraron una relación molar en porcentaje de 39:37:24 con valores de 1.83, 1.76 y 1.11 mMol/g de FNDM respectivamente. Se destaca que no hubo diferencia estadística significativa en la producción de AGCC entre las 12 y 24 h de fermentación.

Los resultados obtenidos presentan una proporción y producción de AGCC característica de la FNDM. No obstante, pueden compararse con otras matrices alimentarias en fermentación colonica *in vitro*, como: hojuelas de avena con diferentes tamaños de partícula y controles de oligofructosa y celulosa al tiempo de 5 horas en fermentación para oligofructosa y a 10 horas para celulosa, cuyas producciones de AGCC son de (0.8, 0.2 y 0.2) seguido de (2.1, 0.5 y 0.4) mMol/mL de los ácidos acético, propiónico y butírico respectivamente (Connolly *et al.*, 2010).

Del mismo modo, López-Barrera *et al.*, (2016) cuantificaron la cantidad de AGCC producidos por café usado, encontrando una mayor producción de ácido butírico (7.9 mMol/L) a las 24 horas de fermentación, superiores a los producidos por FNDM, lo cual puede explicarse por la diferencia en contenidos de fibra de las dos matrices (café usado y hojas de Moringa).

Los resultados indican que los diferentes tiempos de fermentación colonica, el ácido acético presenta mayor proporción en la fermentación de FNDM, como se ha sido descrito previamente en la literatura para otro tipo de matrices. En general, el ácido acético, propiónico y butírico son los productos finales de mayor proporción (90%) y relevancia biológica en los procesos de fermentación por la microbiota colonica (Ríos-Covián *et al.*, 2016).

Generalmente los sustratos de la microbiota corresponden a estructuras resistentes a la digestión como: polisacáridos, oligosacáridos y proteínas. En éste sentido, tanto

el almidón resistente como los polisacáridos de la pared celular vegetal (celulosas y polisacáridos no celulósicos como arabinogalactanos, xilanos, pectinas, gomas y mucílagos) funcionan como fracciones fermentativas (Macfarlane *et al.*, 2008).

Además, los AGCC tienen propiedades anticancerígenas que incluyen la promoción de la detención del ciclo celular del cáncer, apoptosis, y la inhibición del proceso inflamatorio crónico y la migración del cáncer / invasión celular en el colon (Zeng *et al.*, 2015).

En cuanto a su efecto anticancerígeno, se ha reportado que tanto el propionato como el butirato, modulan la proliferación celular vía apoptosis y otro tipo de muerte celular denominado "autofagia" en células humanas de cáncer de colon (HCT116 y SW480) sometidas a concentraciones de (1-3 mM) valores cercanos a los producidos por las hojas de Moringa (Tang *et al.*, 2011). Los niveles fecales de ácido butírico están reportados para individuos en valores que van desde 3.5 - 32.6 mMol/kg, siendo éstas diferencias inter-individuo, explicadas por la relación entre el índice de masa corporal, consumo dietario de fibra, proteínas y grasas (McOrist *et al.*, 2011).

Se puede observar que los valores de ácido acético, son los valores más altos, tanto al inicio como al finalizar la fermentación colonica simulada. Esto se explica considerando que el acetato es un producto neto de fermentación para la mayoría de los microorganismos intestinales, específicamente por acetogénesis reductiva y por tal razón, logra las concentraciones más altas de AGCC en el intestino (Louis y Flint, 2016).

Estudios *in vivo* han reportado diferencias en la producción de AGCC a partir de varios tipos de fuentes dietarias (Henningsson *et al.*, 2002). La velocidad, cantidad y el tipo de AGCC producidos se determinan por factores como: composición de la fracción no digerible), pH del colon, la abundancia y composición de los microorganismos intestinales, además del tiempo de tránsito intestinal (Wong *et al.*, 2006).

Considerando que tanto compuestos fenólicos como ácidos grasos de cadena corta tienen un efecto antioxidante debido a la naturaleza estructural de sus compuestos, se realizó la medición de dicha actividad en las diferentes etapas por las técnicas ABTS y DPPH.

VIII.3.6 Capacidad antioxidante durante la digestión y fermentación colonica *in vitro*

La capacidad antioxidante ejercida por los compuestos identificados anteriormente, se muestra a continuación en el cuadro 14.

Cuadro 14. Capacidad antioxidante de las hojas de Moringa (*Moringa oleifera*) durante la digestión gastrointestinal y fermentación colonica *in vitro*.

ENSAYO	DPPH		ABTS	
	Muestra	% ARA	TEAC	% ARA
EM	88.50 ± 1.09 ^a	78.95 ± 1.11 ^a	88.23 ± 1.08 ^a	59.49 ± 1.01 ^a
EAM	56.38 ± 1.07 ^b	49.27 ± 1.15 ^b	55.35 ± 3.96 ^b	34.72 ± 2.74 ^b
Estómago	48.54 ± 0.16 ^{de}	23.28 ± 0.09 ^e	48.77 ± 0.58 ^{cd}	30.60 ± 0.58 ^c
FNDMM				
15 min	55.76 ± 1.11 ^{bc}	39.70 ± 0.72 ^c	53.68 ± 0.30 ^{bc}	26.86 ± 0.08 ^d
30 min	55.18 ± 3.30 ^{bc}	40.09 ± 2.75 ^c	52.90 ± 3.22 ^{bc}	28.01 ± 2.38 ^{cd}
60 min	46.53 ± 1.98 ^e	32.83 ± 1.60 ^d	45.03 ± 1.40 ^d	21.96 ± 1.09 ^e
120 min	51.44 ± 1.16 ^{cd}	37.08 ± 1.00 ^c	50.00 ± 1.12 ^{cd}	25.86 ± 0.90 ^d
EFCM				
6h	11.98 ± 2.09 ^{fg}	10.70 ± 1.75 ^f	10.71 ± 1.81 ^e	7.60 ± 1.05 ^f
12h	16.24 ± 0.94 ^f	13.36 ± 0.76 ^f	9.01 ± 0.91 ^e	5.49 ± 0.49 ^f
24h	7.86 ± 0.86 ^g	6.82 ± 0.67 ^g	8.92 ± 0.55 ^e	5.31 ± 0.24 ^f

EM: Extracto metanólico de hojas de Moringa, EAM: Extracto 50/50 de hojas de Moringa FNDMM: Fracción no digerible de Moringa; EFCM: Extracto fermentación colonica de la fracción no digerible de Moringa. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar. Diferentes letras (minúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. ¹ Capacidad antioxidante expresada en % de inhibición del radical (ARA) y como μmol equivalentes de trolox/g de muestra.

De manera general, la capacidad antioxidante (CA) en las hojas de Moringa y en las diferentes etapas de la digestión y fermentación colonica presenta diferencias significativas. Principalmente, la actividad que corresponde a las hojas sin ser sometidas a tratamientos enzimáticos similares a las condiciones fisiológicas, corresponde a 88.75 y 88.2 en % de inhibición del radical para el extracto metanólico (EM) por las técnicas DPPH y ABTS respectivamente. En cuanto a la CA que presenta el extracto acuoso (EAM), corresponde a un 33% menor al encontrado en el extracto metanólico, lo cual se ha reportado por otros autores, teniendo en cuenta que dicho extracto permite una extracción más eficiente de compuestos presentes en las hojas (Makita *et al.*, 2016)

El ensayo de digestión tuvo como propósito simular condiciones de consumo comercial (cápsula), por lo que no se cuantificó la etapa de boca como una solución de saliva con hojas de moringa (masticadas). Sin embargo, si se determinó la CA de la saliva, como vehículo de la matriz a analizar y no se detectó CA en la misma. Después del consumo, el proceso de digestión gastrointestinal puede afectar al potencial antioxidante nativo de la mezcla compleja y los compuestos bioactivos presentes en la matriz alimentaria antes de llegar al intestino proximal.

Aunque debe considerarse relevante que ningún ensayo *in vitro* determina el comportamiento de la CA de un producto nutricional *in vivo* debido a la complejidad de interacciones fisiológicas (Stevenson y Hurst, 2007).

Los resultados de éste trabajo, mostraron que, en la etapa gástrica, se pueden presentar valores aproximados de 48 % en la inhibición del radical, tanto para la técnica de ABTS como DPPH, lo que permite elucidar de manera *in vitro* posibles mecanismos y potencial antioxidante en dicha etapa de la digestión, coincidiendo con los resultados reportados en otras digestiones *in vitro*, como la reportada por Bouayed *et al.*, (2011) para compuestos fenólicos en manzanas de diferentes variedades.

Después del consumo, el alimento se somete a un proceso de digestión gastrointestinal que puede afectar al potencial antioxidante nativo de la mezcla compleja de compuestos bioactivos presentes en la matriz, antes de llegar al intestino proximal (Finley., *et al.*, 2011).

En cuanto al interés en la fracción no digerible de las hojas de Moringa (FNDM), se presentó una AA de 55 y 53 % por DPPH y ABTS respectivamente, en los tiempos de 15 y 30 minutos de incubación, simulación de la etapa intestinal (intestino proximal), aunque se presenta una disminución de la CA en el tiempo de 60 minutos hasta un 46 y 45% por las mismas técnicas.

De manera particular, se observa un incremento estadísticamente significativo al finalizar la incubación, alcanzando un 51 y 50% de la CA. La FNDM puede llegar al colon y ahí puede ejercer efectos biológicos de interés en éste órgano, debido a que los compuestos fenólicos que no son absorbidos y quedan atrapados en la matriz pueden ser fermentados por la microbiota colonica y producir metabolitos con potencial actividad antioxidante (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

Los métodos *in vitro* que aplican modelos de digestión simulados por humanos (incluyendo o no la fermentación del colon) se consideran útiles para estimar los eventos de pre- absorción como: estabilidad y bioaccesibilidad de diferentes componentes de la matriz, además de establecer el efecto que dicha biotransformación puede tener sobre la biodisponibilidad de los componentes alimentarios (Hur *et al.*, 2011).

La etapa de fermentación colonica, presentó una AA del 11.9 y 10.7 % a las 6 horas, 16 y 9 % a las 12 horas y 7.8 y 8.9% a las 24 horas de fermentación colonica en los ensayos DPPH y ABTS, respectivamente. Estos valores presentaron una disminución estadísticamente significativa comparados con la CA de la FNDM, sugiriendo una pérdida de la capacidad de inhibición del radical en el colon, posiblemente asociada a la producción de metabolitos que interaccionan en dicha

reacción. Sin embargo, desde una perspectiva fisiológica, alimentos ricos en polifenoles y con AA, podrían ejercer funciones biológicas benéficas. Por ejemplo, en células cancerosas podría ejercer un efecto antioxidante directo, de anti proliferación, detención del ciclo celular, inducción de apoptosis e inhibición de angiogénesis y metástasis (Ramos, 2008).

Finalmente, debido a que se ha reportado la afinidad que presentan los compuestos fenólicos a estar asociados con moléculas proteicas y así mismo, ejercer efectos biológicos derivados de la transformación de sus estructuras, se cuantificaron los contenidos proteicos en la fracción no digerible y las diferentes etapas de fermentación colonica como se muestra adelante.

VIII.3.7 Contenido de proteína en la fracción no digerible de las hojas de Moringa (FNDM) y su transformación durante la fermentación colonica *in vitro*

En cuanto a la transformación del contenido de proteína durante la última etapa de la digestión, se consideró la cuantificación de ésta en la fracción no digerible y sus cambios durante la fermentación colonica, como se muestra en el cuadro 15.

Cuadro 15. Contenido de proteína de la fracción no digerible durante la digestión y fermentación colonica

Muestra	Concentración de proteínas totales
FNDM 120	44.78 ± 17.94 ^a
EFCM	
0h	14.77 ± 1.08 ^b
6h	16.26 ± 3.88 ^b
12h	19.59 ± 0.22 ^b
24h	14.94 ± 1.01 ^b

FNDM120: Fracción no digerible de hojas de Moringa a los 120 minutos de incubación en etapa intestinal; EFCM: Extracto fermentación colonica de la fracción no digerible de Moringa. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar. Datos expresados como ug de proteína/mL.

Inicialmente el tiempo cero (inóculo fecal), presenta una carga proteica con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los tiempos 6, 12 y 24 h que contienen FNDMM. Aunque no hay diferencias estadísticas entre los diferentes tiempos de fermentación, se observa un incremento del contenido proteico en la interacción de la FNDMM con el inóculo, manteniendo esta tendencia de aumento desde las 6 hasta las 12 horas y finalmente disminuye en la última etapa.

El contenido total de proteína de la FNDM en el último tiempo de digestión, presenta un contenido de 44.17 ug de proteína /mL que al pasar a la última etapa de la digestión (fermentación colonica), podría tener un efecto sobre el contenido de la misma, ejerciendo como sustrato para las bacterias fermentativas características del intestino grueso.

Las variaciones descritas podrían explicarse debido a que el comportamiento de los aminoácidos en soluciones acuosas es anfótero y dependiente del pH, éstos pueden ionizarse, como ácido carboxílico, liberando protones y quedando el radical ($-\text{COO}^-$), o como base por los grupos $-\text{NH}_2$ que captan protones ($-\text{NH}_3^+$), o como ácido y base a la vez, apareciendo una forma dipolar iónica que se identifica como zwitterion (Horton, 2008). Además, podría darse una liberación de péptidos e incluso aminoácidos gracias a la acción metabólica de la microbiota.

VIII.4 Supervivencia en células de cáncer de colon sometidas a tratamiento de hojas de Moringa (HM) y el extracto de fermentación colonica de hojas de Moringa (EFCM).

La supervivencia de células de cáncer de colon (HT29) sometidas a tratamiento con hojas de Moringa (polvo disuelto en medio de cultivo / extracto acuoso) se muestra en los gráficos a y b de la Figura 15.

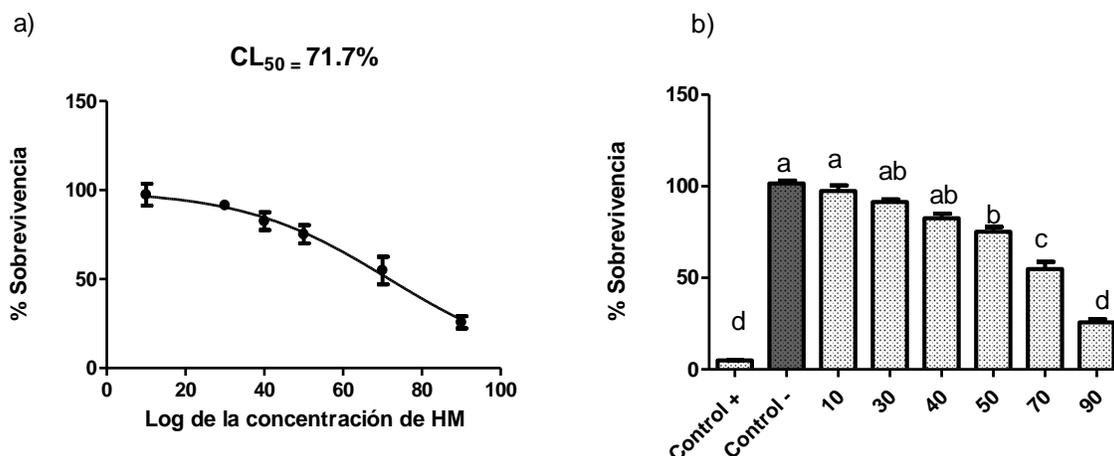


Figura 15. Efecto de las hojas de (*Moringa oleifera*) en la supervivencia de células de cáncer de colon HT29.

El gráfico muestra el efecto después de 24 h de tratamiento. El eje x del gráfico b): Control (-): células sin tratamiento. Control (+): células tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO). Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm DE. Letras diferentes por barra expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey. El gráfico a) corresponde al logaritmo de la concentración para modelar la ecuación y el b), el porcentaje del contenido de mg hojas en polvo.

De acuerdo a los resultados presentados se muestra que a diferentes concentraciones el porcentaje equivalente a $\mu\text{g/mL}$ de polvo de Moringa, existe un efecto dosis-dependiente en la supervivencia celular. En concentraciones de 10 a 40% no existe diferencias significativas en el efecto de dichas dosis, sin embargo, se presentan diferencias significativas en las concentraciones de 50 %, 70 % y 90%. Así mismo, la concentración del 70% presenta letalidad para el 50% de la población celular (CL_{50}) Algunos mecanismos reportados para las hojas de Moringa, son: inducción de apoptosis, el cambio de morfología, la fragmentación del ADN

internucleosomal y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Sreelatha *et al.*, 2011).

La actividad antiproliferativa coincide otros autores como Tiloke *et al.*, (2013) quienes utilizaron extractos acuosos de hojas de Moringa en células cancerígenas pulmonares A549. Del mismo modo, Berkovich *et al.*, (2013), también reportaron el efecto del extracto acuoso sobre células cancerígenas de páncreas humano Panc-1, p34, y COLO 357, encontrado una inhibición significativa en el crecimiento tras la exposición a 0.75 mg/ml del extracto en las líneas celulares pancreáticas, similar al resultado encontrado para la concentración letal media (CL₅₀) de HT29 en ésta investigación.

Jung *et al.*, (2014) reportaron la inducción de apoptosis, inhibición del crecimiento tumoral, disminución del nivel de especies reactivas de oxígeno intracelulares en diferentes líneas celulares (tipos de cáncer), además de la modulación de genes específicos de células tumorales, demostrando la actividad terapéutica de extractos acuosos de las hojas de Moringa, además de toxicidad específica para células transformadas. Resultados similares a los reportados por Al-Asmari *et al.*, (2015), en líneas celulares MDA-MB-231 y HCT-8 de cáncer de colon.

Finalmente, después de identificar los cambios en los compuestos de las hojas durante la biotransformación gastrointestinal y colonica, resulta de interés evaluar el efecto de ésta última etapa, ya que estaría fisiológicamente disponible en el colon.

VIII.4.1 Efecto del extracto de fermentación colonica de hojas de Moringa (EFCM) en la sobrevivencia de células de cáncer de colon sometidas a tratamiento con el extracto de fermentación colonica de Moringa

En la Figura 16 se presenta el efecto del tratamiento con el EFCM en la línea celular HT29.

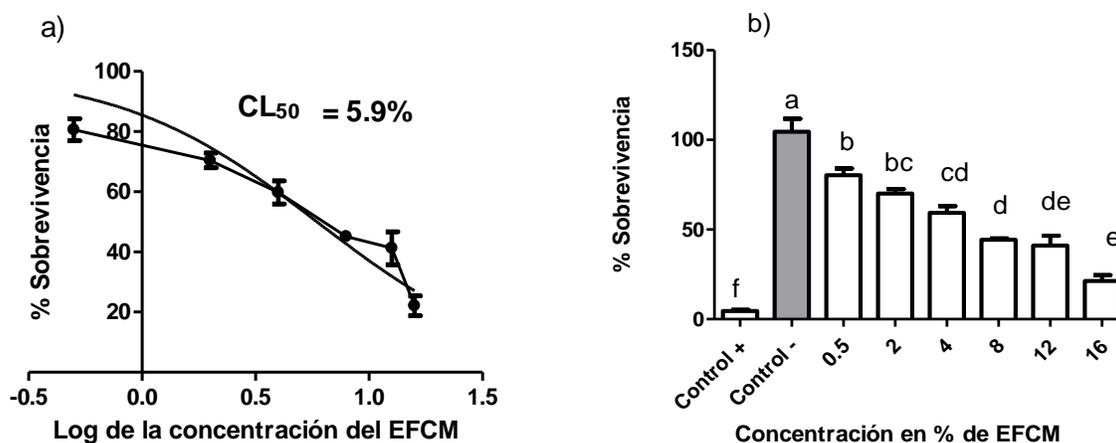


Figura 16. Efecto de la fermentación colonica de hojas de (*Moringa oleifera*) sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon HT29.

El gráfico muestra el efecto después de 24 h de tratamiento (EFCM). En a) El eje x muestra el logaritmo de la concentración del tratamiento, en b) la concentración del tratamiento en porcentaje. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm DE. Letras diferentes por barra expresan diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Se muestra que a diferentes concentraciones existe un efecto en la sobrevivencia celular. En concentraciones del 2 a 4% no existe diferencias significativas en el efecto de dichas dosis, sin embargo, se presentan diferencias significativas en las concentraciones mayores al 4 %, 8 % y 16%. El EFCM inhibió el crecimiento de las células HT29 de manera dosis dependiente de la concentración.

El valor de la concentración letal media (CL_{50}) después de 24 horas de tratamiento fue del 5.9%, que será CL_{50} -EFCM, el cual comprende una mezcla compleja de productos, identificándose tanto compuestos fenólicos (CF) como ácidos grasos de

cadena corta (AGCC), resultantes de la biotransformación de las hojas durante la digestión y fermentación colonica *in vitro*. Se consideró el cálculo de la cantidad de AGCC y CF equivalentes al 5.9% del EFCM.

VIII.4.2 Contenido de ácidos grasos (AGCC) y compuestos fenólicos (CF) presentes en el EFCM para tratamientos celulares.

Se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta en el CL₅₀ del extracto de fermentación colonica de Moringa (EFCM) como se muestra en los cuadros 16 y 17, respectivamente.

Cuadro 16. Ácidos grasos de cadena corta del EFCM en la CL₅₀

Ácidos grasos de cadena corta en el EFCM (mMol/L)		
Compuesto	100%	5.90%
Ácido acético	7.580	0.447
Ácido propiónico	3.916	0.231
Ácido butírico	1.330	0.078
Total	12.826	0.757

Los resultados representan la media de tres réplicas \pm desviación estándar. Los datos están expresados y normalizados en mMol/L (ácidos grasos de cadena corta).

Cuadro 17. Compuestos fenólicos libres del EFCM en la CL₅₀

Compuestos fenólicos en el EFCM de 12h (ug/mL)		
Compuesto	100%	5.9%
Gálico	0.4250	0.0251
Clorogénico	1.0984	0.0648
Catequina	1.6824	0.0993
Cafeico	0.2954	0.0174
Rutina	3.0407	0.1794
Elágico	4.1808	0.2467
Quercetina	0.8686	0.0512
Kaempferol	1.9735	0.1164
Total	13.5648	0.8003

Los resultados representan la media de tres réplicas \pm desviación estándar. Los datos están expresados y normalizados ug/g de muestra (compuestos fenólicos).

Conociendo los valores contenidos en la muestra (CL₅₀-EFCM) se utilizó una mezcla de componentes puros y comerciales para evaluar su efecto en la sobrevivencia de las células HT29 y así sugerir que porcentaje del efecto ejercido por CL₅₀-EFCM pudiese atribuirse a éstos (compuestos fenólicos, ácidos grasos de cadena corta y la mezcla de ambos) (Figura 17).

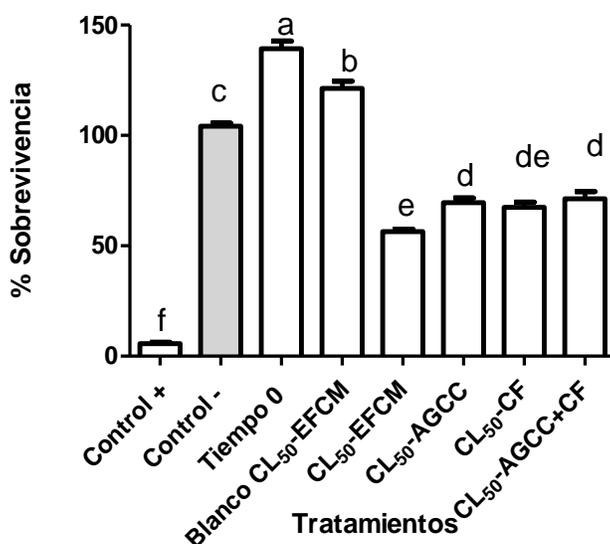


Figura 17. Efecto de los compuestos bioactivos del EFCM sobre la sobrevivencia de células HT29.

Sobrevivencia de células de adenocarcinoma humano HT29, después de 24 h de tratamiento. El eje de las y se presenta la sobrevivencia y en el eje x se muestra los diferentes tratamientos (Control +: tritón 100x; Control -: células sin tratamiento; Tiempo cero: medio + inóculo sin fermentación ni muestra; Blanco CL₅₀-EFCM: blanco de fermentación de 12 horas sin muestra; CL₅₀-AGCC: mezcla sintética de ácidos grasos de cadena corta; CL₅₀-CF: mezcla sintetiza de compuestos fenólicos; CL₅₀-AGCC+CF: mezcla de ácidos grasos de cadena corta y compuestos fenólicos. Todos equivalentes a la concentración letal media (CL₅₀) encontrada en EFCM. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado ± DE. Letras diferentes por barra expresan diferencia significativa (P < 0.05), prueba de Tukey.

El efecto de controles positivo y negativo, mostraron la sobrevivencia esperada de menos del 10% y cercana al 100% para cada uno respectivamente. En cuanto al tiempo 0 (inóculo fecal: fuente de la microbiota) que fue utilizado para la simulación colonica, tuvo un efecto estimulante en la sobrevivencia celular, lo que permite descartar que por sí solo el tiempo cero (fuente de microbiota) pueda ejercer un

efecto antagónico en la sobrevivencia estimada a partir de los tratamientos. Así mismo, tanto de las digestiones como de la fermentación colonica se obtuvieron muestras blanco, la cuales presentaron la misma tendencia del tiempo cero en cuanto al estímulo de la sobrevivencia de las células HT29, aunque los valores presentaron diferencias estadísticas significativas.

El CL₅₀-EFCM es menor al reportado en ensayos similares realizados en el grupo de trabajo para matrices alimentarias, como: frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad bayo madero también en células HT29 con una CL₅₀ del 17% por Campos-Vega *et al.*, (2013), hojas de Moringa tostado en células en células SW-480 con una CL₅₀ del 19% por García-Gutiérrez *et al.*, (2015). Las diferencias podrían atribuirse a las características intrínsecas de la matriz alimentaria.

Por otro lado, se confirmó el efecto inhibitorio de la sobrevivencia con el tratamiento CL₅₀-EFCM encontrado en la curva dosis respuesta, ilustrado en las figuras 13 y 14. Así mismo, los resultados de los compuestos bioactivos identificados en la CL₅₀-EFCM, como los son los AGGC, CF y AGCC + CF (mezclas sintéticas) mostraron tendencias inhibitorias, aunque las células tratadas con éstos tratamientos demuestran un mayor porcentaje (%) de sobrevivencia, además de no presentar diferencias significativas entre ellos. Por otra parte, en cuanto a la participación de éstos compuestos en el efecto de la sobrevivencia presentada por la CL₅₀, se identificó que éstos, pueden explicar el 30 del efecto en la sobrevivencia celular, es decir que explican aproximadamente el 70% del efecto antiproliferativo ejercido.

En cuanto a la técnica utilizada para la medición de la viabilidad debe mencionarse que Wang *et al.*,(2010) reportaron que la medición de viabilidad celular con MTT puede presentar diferencias importantes debido al principio de funcionamiento de la reacción; considerando que MTT es una sal tetrazolio que es reducida a cristales púrpuras de formazán principalmente debido a la acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial y que en teoría la intensidad del color se correlaciona con el número de células viables.

Se conocen varios tipos de muerte celular programada, entre están la apoptosis, la autofagia y la necroptosis, las cuales son desencadenadas de forma autorregulada en condiciones normales (tejido sano) y resultan por la activación de barreras naturales que restringen la supervivencia y diseminación de las células malignas (Venden Berghe *et al.*, 2014; Lamb *et al.*, 2013).

Sin embargo, las células cancerosas, específicamente de colon, poseen estrategias como: la alteración directa de la maquinaria apoptótica y necroptótica, inactivación de genes supresores de tumores y alteración de las vías de señalización de supervivencia, además de los factores autocrinos, parácrinos y exógenos dentro de un microambiente tumoral (Huang y Yu, 2015; Su *et al.*, 2015).

VIII.4.3 Efecto de la CL₅₀-EFCM sobre la producción de peróxido de hidrógeno en células HT-29.

Para identificar si la muerte celular observada puede atribuirse a la inducción de estrés oxidativo por la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), se trataron las células con el CL₅₀-EFCM y se cuantificó, como se muestra en la figura 18.

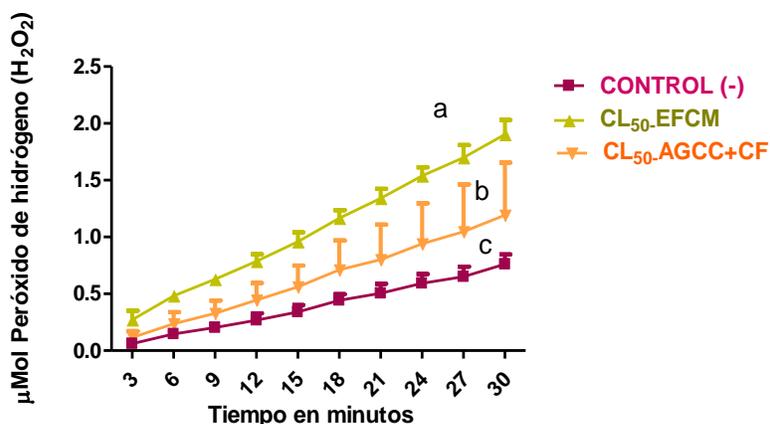


Figura 18. Efecto del CL₅₀-EFCM en la producción de H₂O₂ en células HT29.

Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en células de adenocarcinoma humano HT29, después de 24 h de tratamiento. Control (-): DMEM o medio esencial de cultivo, CL₅₀: concentración necesaria del EFCM para inhibir la supervivencia del 50% de la población celular sometida al tratamiento; AGCC: Ácidos grasos de cadena corta, CF: Compuestos fenólicos.

La cinética muestra el aumento en la producción, hasta un 150% (1.9 μMol de H_2O_2) con respecto a las concentraciones basales de las células transformadas. Éstas concentraciones basales (0.8 μMol de H_2O_2) corresponden al hipermetabolismo de las células cancerosas y la subsecuente generación abundante de EROS en mitocondrias, retículo endoplásmico, y NADPH oxidasas (Cairns y Mak, 2011).

El tratamiento con la mezcla sintética de $\text{CL}_{50}\text{-AGCC+CF}$, presentó un aumento del 74% en la producción de peróxido de hidrógeno con respecto a las condiciones basales, aunque una menor producción (1.3 μMol de H_2O_2) que las células tratadas con la $\text{CL}_{50}\text{-EFCM}$. En ambos tratamientos se identificó el desequilibrio del estado redox de las células, lo que sugiere que existen otros factores o compuestos responsables del aumento en la producción de H_2O_2 en el extracto de fermentación colonica.

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) inducido por fármacos como mediador de apoptosis ha sido aprovechado en estrategias de quimioterapia contra el cáncer. Estudios sobre los efectos de agentes anticancerígenos naturales y sintéticos en los cánceres colorrectales han demostrado que muchos de estos compuestos inducen la producción de ROS y aunque no siempre se reconoce esta vía o ruta metabólica, se sugiere como el mecanismo de acción predominante para varios fármacos utilizados en la quimioterapia en tratamientos anticancerígenos (Schieber y Chandel, 2014).

Estudios *in vitro* han demostrado que los CF pueden capturar directamente especies moleculares de oxígeno activo como el radical súper óxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el oxígeno singlete o los radicales peróxidos. En efecto, los CF poseen características estructurales ideales para su acción antioxidante, principalmente por la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT por sus siglas en inglés) o por transferencia de un electrón (SET por sus siglas en inglés) (Leopoldini *et al.*, 2011).

En particular, se ha comprobado el efecto que tiene ROS en las células de cáncer de colon (HCT-15, HCT16, HT29) para inhibir la proliferación celular, inducir arresto del ciclo celular en la fase G2/M y apoptosis; así como autofagia e incluso, necrosis por daño a componentes celulares como ADN y membranas lipídicas (Sreevalsan y Safe, 2013; Ristow *et al.*, 2011).

Por lo tanto, si el efecto biológico en las células de cáncer de colon HT29 tratadas con la CL₅₀-EFCM, es el incremento en la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), es relevante identificar el porcentaje de citotoxicidad que podría estar ejerciendo el tratamiento, como se muestra en el siguiente ensayo.

VIII.4.4 Efecto del extracto de fermentación colonica de hojas de Moringa CL₅₀-EFCM sobre la toxicidad en células HT29.

El efecto se midió en porcentaje de citotoxicidad mediante la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH), como se muestra en la figura 19.

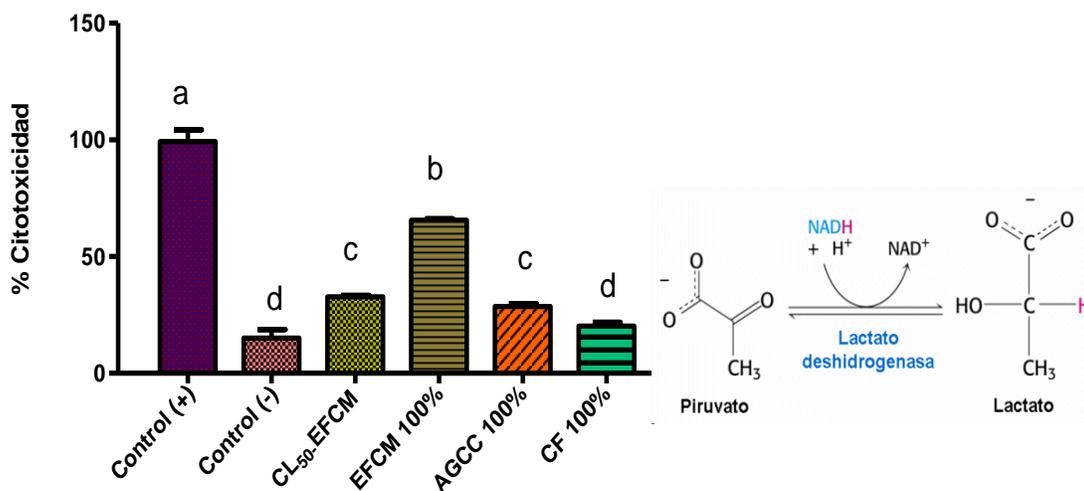


Figura 19. Efecto citotóxico del CL₅₀-EFCM en células HT29.

Producción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en células de adenocarcinoma humano HT29, después de 24 h de tratamiento. Control (+): Tritón 100x, Control (-): DMEM o medio esencial de cultivo, CL₅₀: concentración necesaria del EFCM para inhibir la sobrevivencia del 50% de la población celular sometida al tratamiento; AGCC: Ácidos grasos de cadena corta, CF: Compuestos fenólicos. Estadístico. Los tratamientos se expresan normalizados con respecto al control (-).

En cuanto al CL₅₀-EFCM, presentó un efecto citotóxico por necrosis del 32.9% en las células HT29. Por otro lado, el EFCM al 100% presentó una citotoxicidad del 67%. Además, se realizó un experimento control con los compuestos puros identificados en la CL₅₀-EFCM contemplando la mezcla de CF y AGCC, siendo responsables del 20% y 29.8% de citotoxicidad respectivamente. Éstos hallazgos sugieren que dichos compuestos son responsables de aproximadamente el 88% del efecto citotóxico (LDH) observado.

La relevancia biológica del tipo de muerte generada por necrosis, radica en que ésta vía se reconoce por no estar regulada y generalmente es inducida por traumatismos, agentes infecciosos o toxinas. Se caracteriza por hinchamiento de las células antes de la degradación del ADN y eventual lisis celular que conduce a una respuesta inflamatoria en el tejido circundante (Majno *et al.*, 1995).

Como ésta respuesta inflamatoria injustificada se considera “perjudicial” para el tejido, el mecanismo preferido para la muerte celular es por una vía de muerte celular programada, conocida como apoptosis (Vandenabeele *et al.*, 2010).

Indistintamente del tipo de muerte celular, los resultados sugieren que las hojas de Moringa al ser metabolizadas y fermentadas en el intestino grueso, podrían tener un efecto antagónico en la proliferación de células de cáncer de colon, de acuerdo a los resultados *in vitro* en el modelo de CCR con la línea HT29. No obstante, queda un porcentaje de muerte celular que no está explicado por la prueba de citotoxicidad, por lo que se realizó el ensayo de TUNEL para identificar el porcentaje de muerte que podría estar siendo explicado por apoptosis, como se muestra a continuación.

VIII.4.5 Efecto del CL₅₀-EFCM sobre la muerte por apoptosis (TUNEL) en células de cáncer de colon HT29.

La muerte celular mediada por apoptosis se identificó en porcentaje por intensidad de fluorescencia por el ensayo de TUNEL, como se muestra en la figura 20.

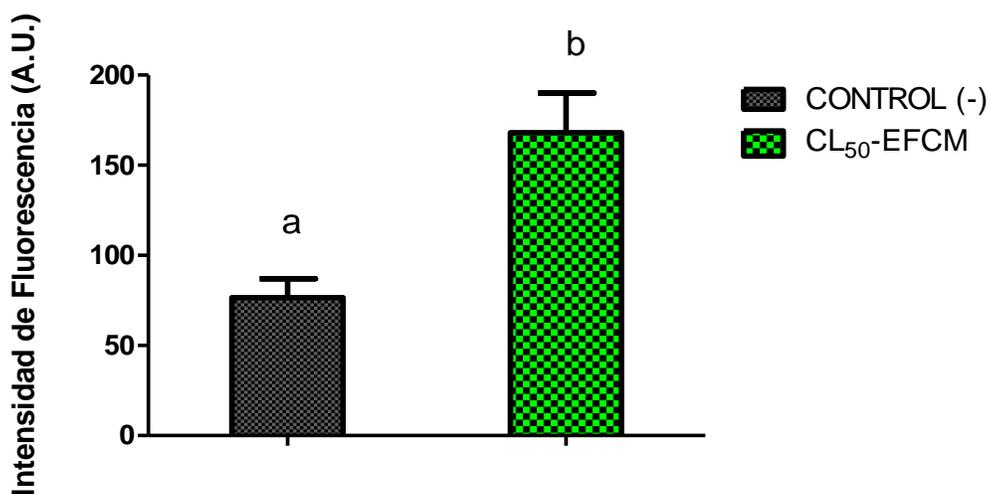


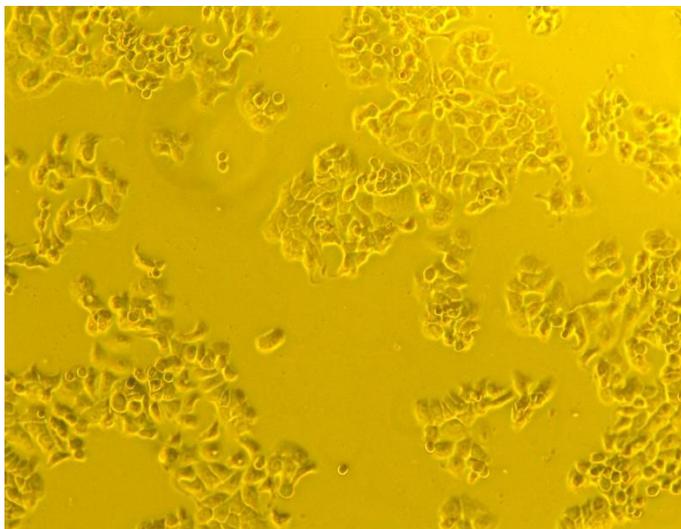
Figura 20. Efecto del CL₅₀-EFCM sobre la apoptosis en células HT29

CL₅₀-EFCM: Concentración letal media del extracto de fermentación colonica de hojas de Moringa. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar (DE). Letras diferentes por barra muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por Tukey. Resultados son expresados como unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia. (A.U.) tomando 10 campos de forma aleatoria y transformados por el programa imageJ. Los resultados están normalizados con respecto al control (células sin tratamiento).

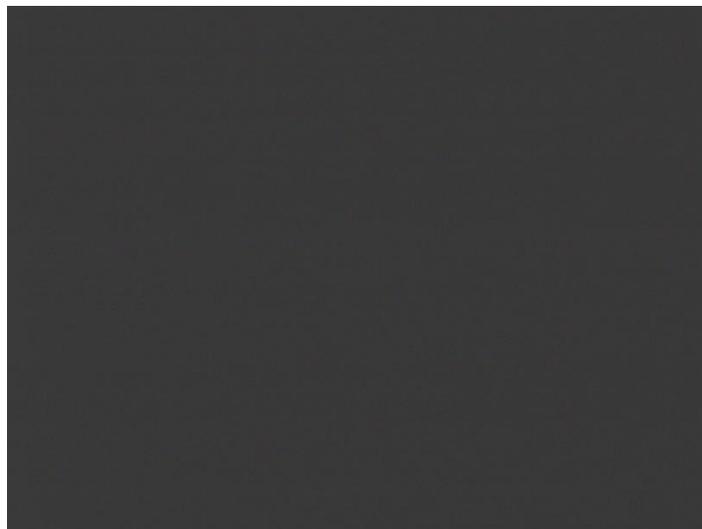
En la figura 21 se presentan imágenes fotográficas por microscopía de fluorescencia de las células en proceso de apoptosis.

Células tratadas con el CL₅₀ del EFCM

A

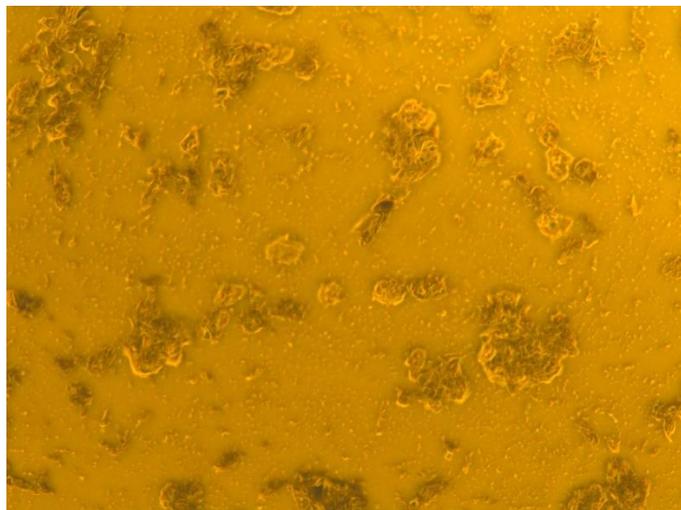


B



Células de control (-): Sin tratamiento

C



D

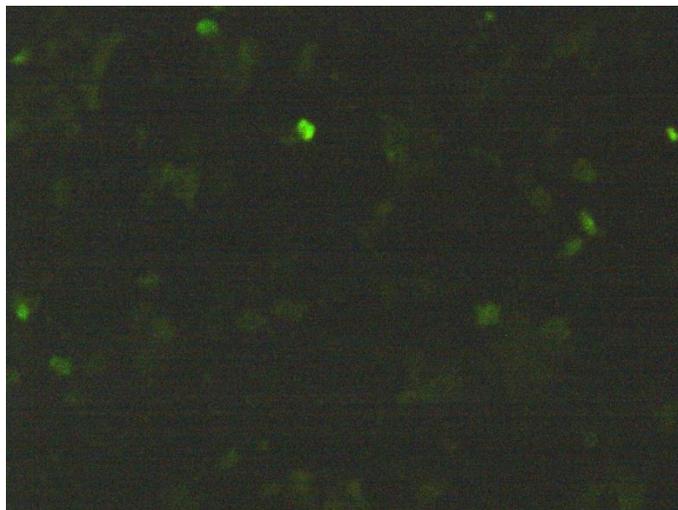


Figura 21. Fluorescencia de células en apoptosis

CL₅₀ del EFCM: concentración letal media del extracto de fermentación colonica de la fracción no digerible de las hojas de Moringa. Del lado izquierdo se presentan las imágenes sin fluorescencia, del lado derecho las mismas células con fluorescencia, marcadas con TUNEL para identificación de muerte por apoptosis. Área y enfoque de 10 campos aleatorios de (100µm).

El tratamiento con CL₅₀-EFCM presentó un porcentaje del 68% de intensidad de fluorescencia (A.U.) que correspondió a las células marcadas con TUNEL (aquellas que han muerto por apoptosis) y como se mencionó anteriormente, un 32% de citotoxicidad (LDH), sugiriendo que el CL₅₀-EFCM puede ejercer un efecto simultaneo de necrosis y apoptosis, siendo éste último mayor.

Esto se explica debido a que las moléculas como el peróxido de hidrógeno direccionan señales centrales que destinan la condición celular y además son mediadores del daño oxidativo dependiendo de su concentración, por lo que, en condiciones fisiológicas su baja concentración permite la adaptación y sobrevivencia celular, mientras que una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno puede causar daño e inducir muerte celular por apoptosis y necrosis (Azad *et al.*, 2009).

Una combinación entre los dos mecanismos de muerte celular se denomina "necroptosis", identificada como forma alternativa de muerte celular programada y particularmente relevante en el contexto del tratamiento del cáncer, ya que implica una vía altamente especializada, mediada por proteínas de señalización que incluyen el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y la proteína interactiva de receptor RIP1 y RIP3 (Vandenabeele *et al.*, 2010; Degterev *et al.*, 2009).

La necroptosis se caracteriza por una morfología de muerte celular necrótica y por activación de la autofagia, la cual ha sido reportada por diferentes autores que han establecido un posible vínculo entre la necroptosis y la supresión tumoral (Wang *et al.*, 2017; Long y Ryan, 2012). La autofagia por su parte, consiste en un proceso de degradación celular altamente conservado y se caracteriza por la abundante presencia de vacuolas de autofagias conocidas como autofagosomas, los cuales secuestran proteínas y organelos que son transportados hasta los lisosomas para ser degradados y reciclados (Rubinsztein *et al.*, 2007).

Con respecto al efecto de los tratamientos en la supervivencia celular y su posible efecto citotóxico en autofagia, se muestran los resultados del ensayo en las figuras 19 y 20.

VIII.4.6 Efecto del CL₅₀-EFCM sobre la muerte celular por autofagia en células de cáncer de colon HT29

En la figura 22 se presenta el porcentaje de autofagia, medido por absorbancia de autofagosomas marcados en células HT29

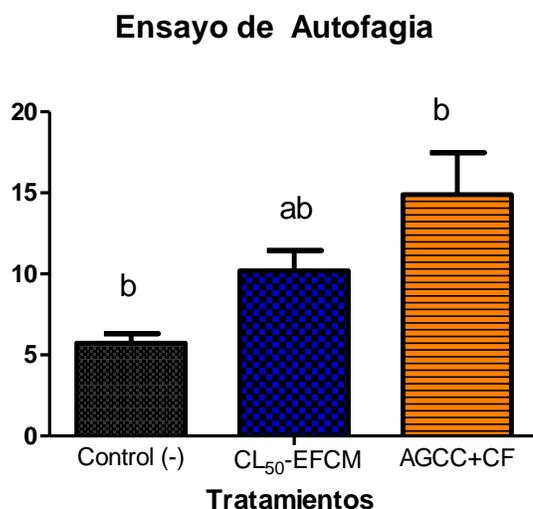


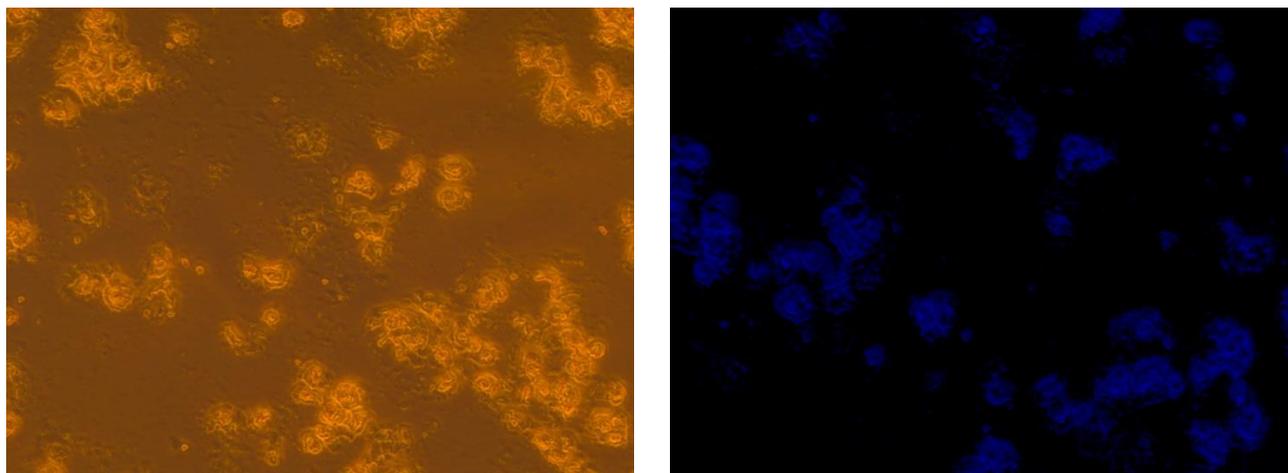
Figura 22 Porcentaje de autofagia detectado en células HT29 después de 24h de tratamiento con CL₅₀ del EFCM

CL₅₀ del EFCM: concentración letal media del extracto de fermentación colonica de la fracción no digerible de las hojas de Moringa, Control (-): DMEM sin tratamiento, AGCC+CF: Mezcla sintética de ácidos grasos de cadena corta y compuestos fenólicos. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar (DE). Letras diferentes por barra muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) por Tukey. Las unidades se expresan en porcentaje de autofagia detectada por absorbancia a 520nm y normalizada con respecto al control (-).

El ensayo mostró que el CL₅₀-EFCM y la mezcla de AGCC+CF tienen efecto en la inducción de muerte celular por activación de autofagia con un 10.2 y 14.9% respectivamente. Los tratamientos presentaron diferencias estadísticas con respecto al control (niveles basales). La relevancia biológica de éste mecanismo de muerte celular ha sido reconocida recientemente por presentarse como respuesta a terapias en varios tipos de cáncer (Jiang *et al.*, 2012).

En la figura 23 se presentan imágenes fotográficas por microscopía de fluorescencia de las células en proceso de apoptosis.

Células tratadas con el CL₅₀ del EFCM



Células de control (-): Sin tratamiento

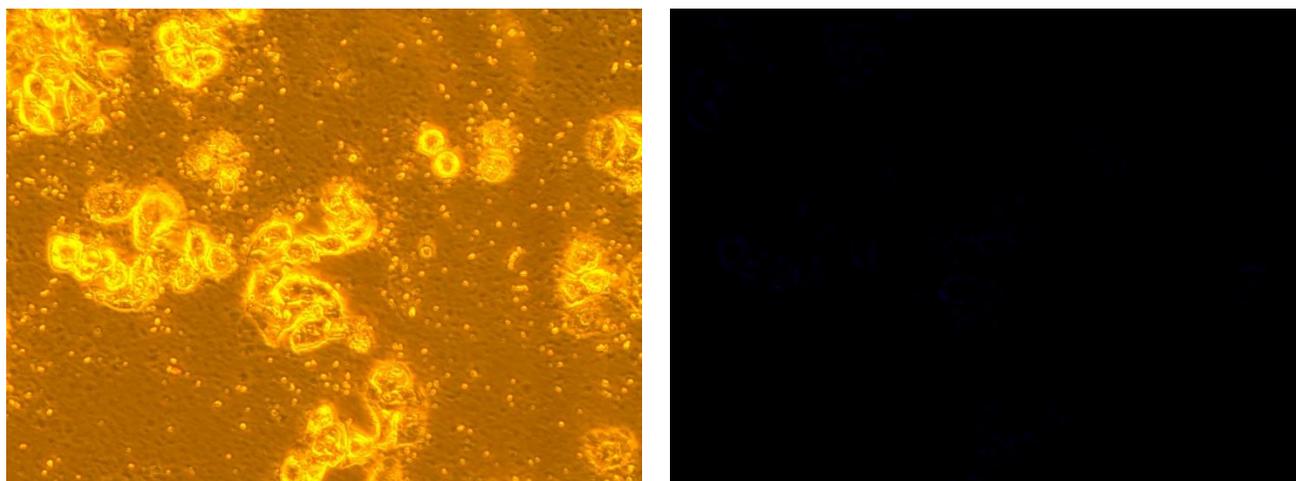


Figura 23. Fluorescencia de células activadas por autofagia (DAPI)

CL₅₀ del EFCM: concentración letal media del extracto de fermentación colonica de la fracción no digerible de las hojas de Moringa. Del lado izquierdo se presentan las imágenes sin fluorescencia, del lado derecho las mismas células con fluorescencia, marcadas con TUNEL para identificación de muerte por apoptosis. Área y enfoque de 10 campos aleatorios de (100µm).

Como se mencionó anteriormente, las células de cáncer tienen una tasa metabólica más alta que las células normales, lo que resulta en mayores concentraciones intracelulares de ROS. Así, las células cancerosas están en aumento permanente de estrés oxidativo, haciéndolas vulnerables a daños mediados por oxidación) (Shen *et al.*, 2011).

Investigaciones recientes indican que las especies reactivas de oxígeno también regulan la autofagia (tipo de muerte detectada en el ensayo anterior, figura 20). Ésta es una progresión catabólica que está implicada en la homeostasis de la energía, la rotación de organelos, el desarrollo y la diferenciación de células cancerosas (Mukeshbhai, 2015)

El efecto observado podría estar explicado por el contenido de compuestos bioactivos que son producidos por la fermentación colonica de la FNDM por la microbiota en colon, de los cuales se identificó AGCC y CF. Ésta mezcla sintética mostró un efecto mayor que el tratamiento en estudio, lo cual podría deberse a que se utilizan estándares puros de referencia, mientras que el tratamiento CL₅₀-EFCM se encuentra en una mezcla compleja de compuestos.

En cuanto a los AGCC (ácido propiónico y ácido butírico) han demostrado tener efectos de inducción de autofagia e inducción de apoptosis en células de cáncer de colon (HCT116 y SW480) en concentraciones cercanas a las encontradas en éste trabajo, de 1-3 mMol (Tang *et al.*, 2010).

El mecanismo propuesto corresponde a que el ácido propiónico induce autofagia originando defectos en la mitocondria asociados a eliminación o pérdida de ATP, ocasionando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), mientras que ambos contribuyen a la activación de AMPK y consecuente inhibición de mTOR (Tang *et al.*, 2011).

IX. CONCLUSIONES

- Las hojas de Moringa (*Moringa Oleifera*) son fuente de compuestos bioactivos como (fibra, ácidos fenólicos y flavonoides) que al ser biotransformados por la digestión gástrica y colonica, producen moléculas derivadas como ácidos grasos de cadena corta (AGCC) con potencial efecto biológico.
- El EFCM *in vitro* de hojas de Moringa presentó una CL₅₀ del $\approx 6\%$ en células de cáncer de colon HT29. Se identificó que los AGCC y CF fueron responsables del 72% del efecto antiproliferativo presentado.
- La CL₅₀ del EFCM aumenta la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en células de cáncer de colon, generando un efecto de muerte celular que es mediado en un 68% por apoptosis y un 32% por necrosis con una activación del 28% de autofagia.

X. REFERENCIAS

- Abramovič, H., Grobin, B., Ulrih, N. P., & Cigić, B. (2017). The methodology applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu assays has a large influence on the determined antioxidant potential. *Acta Chimica Slovenica*.
- Alhosin, M., León-González, A. J., Dandache, I., Lelay, A., Rashid, S. K., Kevers, C., ... & Schini-Kerth, V. B. (2015). Bilberry extract (Antho 50) selectively induces redox-sensitive caspase 3-related apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by targeting the Bcl-2/Bad pathway. *Scientific reports*, 5.
- Alshehri A. Molecular and biochemical evaluation of anti-proliferative effect of (*Cichorium endivia* L.) phenolic extracts on cancer cell line HCT-116. *Academic J Cancer Res* 2012; 5:53–60.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. (2007). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21(1), 17–25. <http://doi.org/10.1002/ptr.2023>
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists (2002). *Official Methods of Analysis*. 17th ed.; Arlington, VA. Métodos: 920.39, 920.85, 920.105, 925.23, 991.43.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2016). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, gutjnl-2015.
- Asare, G. A., Gyan, B., Bugyei, K., Adjei, S., Mahama, R., Addo, P., Nyarko, A. (2012). Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), 265–272.
- Aura, A. M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 407-429.

- Azad MB, Chen Y, Gibson SB. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:777–790.
- Bai, J. P. F., Hu, M., Subramanian, P., Mosberg, H. I., & Amidon, G. L. (1992). Utilization of peptide carrier system to improve intestinal absorption: Targeting prolidase as a prodrug-converting enzyme. *Journal of pharmaceutical sciences*, 81(2), 113-116.
- Bai, L., & Wang, S. (2014). Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annual review of medicine*, 65, 139-155.
- Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S. K., & Prakash, D. (2005). Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(4), 287-291.
- Barbosa, K. B. F., Bressan, J., Zulet, M. A., & Martínez, J. A. (2008). Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. En canales del Sistema Sanitario de Navarra (Vol. 31, pp. 259–280). SciELO Espana.
- Belitz, H. -D., & Weder, J. K. P. (1990). Protein inhibitors of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Reviews International*, 6(2), 151–211.
- Berkovich, L., Earon, G., Ron, I., Rimmon, A., Vexler, A., & Lev-Ari, S. (2013). Moringa oleifera aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 212.
- Boas N, Jin K, Dong- Myung S, Jaekyoung Son (2016). Gallic acid induces apoptosis in EGFR-mutant non-small cell lung cancers by accelerating EGFR turnover. *J Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*; 26:4571-4575

- Brody, T. (1998). Nutritional biochemistry. Academic press.
- Broin, M., & de Saint Sauveur, A. (2010). Growing and processing Moringa leaves. Recuperado a partir de <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/63651> En texto 2013, revisa
- Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry* 280(7): 5636 – 5645.
- Bueters T, Juric S, Sohlenius-Sternbeck A, Hu Y, Bylund J. (2013). Rat poorly predicts the combined non-absorbed and presystemically metabolized fractions in the human. *J Xenobiotica*; 43:607–616. El año de publicación va después de los autores
- Burgués Gasió, J. P., Pontones Moreno, J. L., Vera Donoso, C. D., Jiménez Cruz, J. F., & Ozonas Moragues, M. (2005). Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas*, 29(9), 846–859.
- Butt AJ, Hague A, Paraskeva C. (1997). Butyrate- but not TGFbeta1-induced apoptosis of colorectal adenoma cells is associated with increased expression of the differentiation markers E-cadherin and alkaline phosphatase. *Cell Death Differ*: 4:725–732.
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(2), 85-95.
- Calvo Bruzos, S. C., Gómez Candela, C., Royo Bordonada, M. Á., & López Nomdedeu, C. (2011). Nutrición, salud y alimentos funcionales.

- Campos-Vega, R., Oomah, B. D., Loarca-Piña, G., & Vergara-Castañeda, H. A. (2013). Common Beans and their Non-Digestible Fraction: Cancer inhibitory Activity - An overview. *Foods J*, 2(3), 374-392.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzmán-Maldonado, S. H., Paredes-López, O., Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), 59-62.
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., Oomah, B.D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 1-6.
- Campos-Vega, R., Vergara-Castañeda, H. A., & Oomah, B. D. (2012b). Functional Food Sources: Beans in sight. En E. Popescu, I. Golubev, E. Popescu, & I. Golubev (Edits.), *Beans. Nutrition, Consumption and Health* (págs. 3-58). New York, Estados Unidos: Nova Science Publishers.
- Cancino BL, Leiva GA, Garrido G, Cossío AM, Prieto GM. 2001. VIMANG: los efectos antigenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatiónS-transferasa. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 20(1): 48 – 53.
- Castells, A., & Piqué, J. M. (2000). *Tumores intestinales. Medicina interna*. 14ª ed. Madrid: Harcourt, 261-72.
- Center, M. M., Jemal, A., & Ward, E. (2009). International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(6), 1688-1694.
- Charoensin, S. (2014). Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(7), 318-325.

- Charoensin, S., & Wongpoomchai, R. (2012). Effect of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves on quinone reductase activity. *Naresuan Phayao J*, 5(3), 101-109.
- Chen, A. Y., & Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138(4), 2099–2107. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.139>
- Cho, H. J., & Park, J. H. Y. (2013). Kaempferol induces cell cycle arrest in HT29 human colon cancer cells. *Journal of cancer prevention*, 18(3), 257-263.
- Cilla, A., Alegría, A., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2013). Foods or bioactive constituents of foods as chemopreventives in cell lines after simulated gastrointestinal digestion: a review. *JA Morales-González, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants*, 131-151.
- Coppin, J. (2008). A study of the nutritional and medicinal values of *Moringa oleifera* leaves from sub-Saharan Africa: Ghana, Rwanda Senegal and Zambia. Rutgers, The State University of New Jersey.
- Coppin, J.P.; Xu, Y.; Chen, H.; Pan, M.H.; Ho, C.T.; Juliani, R.; Simon, J.E.; Wu, Q. (2013). Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*. *J. Funct. Foods*, 5, 1892–1899.
- Córdova-Villalobos, J. Á., Barriguete-Meléndez, J. A., Lara-Esqueda, A., Barquera, S., Rosas-Peralta, M., Hernández-Ávila, M., Aguilar-Salinas, C. A. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud pública de México*, 50(5), 419–427.
- Cruz-Bravo, R. K., Guevara-González, R. G., Ramos-Gómez, M., Oomah, B. D., Wiersma, P., Campos-Vega, R., & Loarca-Piña, G. (2014). The fermented non-digestible

fraction of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) triggers cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cells. *Genes & nutrition*, 9(1), 1-12.

Dahm, C. C., Keogh, R. H., Spencer, E. A., Greenwood, D. C., Key, T. J., Fentiman, I. S., Rodwell (Bingham), S. A. (2010). Dietary Fiber and Colorectal Cancer Risk: A Nested Case-Control Study Using Food Diaries. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 614–626. <http://doi.org/10.1093/jnci/djq092>

Dass NB, John AK, Bassil AK, Crumbley CW, Shehee WR, Maurio FP, Moore GB, Taylor CM, Sanger GJ. (2007). The relationship between the effects of short-chain fatty acids on intestinal motility *in vitro* and GPR43 receptor activation. *Neurogastroenterol Motil.* 19: 66-74

Del Gobbo, L. C., Khatibzadeh, S., Imamura, F., Micha, R., Shi, P., Smith, M. ... Mozaffarian, D. (2015). Assessing global dietary habits: a comparison of national estimates from the FAO and the Global Dietary Database. *American Journal of Clinical Nutrition*, 101(5), 1038–1046.

DeVries J.W. 2004. Dietary fiber: the influence of definition on analysis and regulation. *Journal of AOAC International.* 87(3):682-706.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA); Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal* 2010; 8(3):1462[77 pp.]. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1462. Available online: www.efsa.europa.eu

FAO. (2014). Traditional Crop of the Month. Recuperado el 6 de enero de 2016, a partir de <http://www.fao.org/traditional-crops/Moringa/en/>

- Farmer, A. D., Mohammed, S. D., Dukes, G. E., Scott, S. M., & Hobson, A. R. (2014). Caecal pH is a biomarker of excessive colonic fermentation. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(17), 5000
- Faulks R.M. y S. Southon. 2005. Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1740(2):95-100.
- Feregrino-Pérez, A. A., Piñol-Felis, C., Gómez-Arbones, X., Guevara-González, R. G., Campos-Vega, R., Acosta-Gallegos, J., & Loarca-Piña, G. (2014). A Non-Digestible Fraction of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induces cell cycle Arrest and Apoptosis during early carcinogenesis. *Plants Food Human Nutrition*, 69(3), 248-254.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, (2013). *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. <http://globocan.iarc.fr>, Accesado el 1 de noviembre de
- Ferreira, P. M. P., Farias, D. F., Oliveira, J. T. de A., & Carvalho, A. de F. U. (2008). Moringa oleifera: compostos bioativos e potencialidade nutricional. *Revista de Nutrição, Campinas*, 21(4), 431–437.
- Finley, J. W., Kong, N.-A., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L., & Lei, X. G. (2011). Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *J. Agric. Food Chem*, 59, 6837-6846.
- Foidl, N., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). The potential of Moringa oleifera for agricultural and industrial uses. *The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa*, 45–76. Recuperado a partir de http://www.Moringatrees.org/Moringa-doc/the_potential_of_Moringa_oleifera_for_agricultural_and_industrial_uses.pdf

- Fuglie, L. J. (2005). *The Moringa Tree. A Local Solution to Malnutrition*. Published in Dakar, Senegal.
- García Triana, B. E., Saldaña Bernabeu, A., & Saldaña García, L. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 12(2), 187–196.
- Gil, Á. (2010). *Tratado de nutrición. Tomo II, Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*, Editorial Médica Panamericana, Capítulo, 20, 535.
- Golias, C. H; Charalabopoulos, A. and Charalabopoulos, K (2004). Cell Proliferation and Cell Cycle Control: a mini review. *Int J Clin Pract*, 58, 12:1134-1141
- González-Sarrías, A., Azorín-Ortuño, M., Yáñez-Gascón, M. J., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T., & Espín, J. C. (2009). Dissimilar *in vitro* and *in vivo* effects of ellagic acid and its microbiota-derived metabolites, urolithins, on the cytochrome P450 1A1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(12), 5623-5632.
- Gorashi, A. R. (2001). State of forest genetic resources in Sudan. En Prepared for the Sub-Regional Workshop FAO/IPGRI/ICRAF on the conservation, management, sustainable utilization and enhancement of forest genetic resources in Sahelian and North-Sudanian Africa (Ouagadougou, Burkina Faso, 22-24 September 1998).
- Gray, J. (2005). *Hidratos de carbono: Aspectos nutricionales y de salud*. ILSI EUROPE CONCISE MONOGRAPH
- Guevara, J. R., & Rovira, M. G. (2012). Caracterización de tres extractos de Moringa oleifera y evaluación de sus condiciones de infusión en sus características fisicoquímicas.
- Gupta S. (2000). Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *J Clin Immunol*; 20(4):229-239. Gupta, S.; Jyothi Lakshmi, A.; Manjunath, M.N.; Prakash,

- J. (2005). Analysis of nutrient and antinutrient content of underutilized green leafy vegetables. *LWT Food Sci. Technol.*, 38, 339–345.
- Halliwell B., & Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: ¿how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Harnly J.M., Doherty, R.F.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Bhagwat, S.; Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9966–9977.
- Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246: 629–634.
- Henningsson A. S, Bjorck I. M. E, Nyman E. M. G. L. (2002). Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. *J Nutr*; 132:3098–3104.
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H, van de Putte B. 1996. Content of potentially anticarcinogenin flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1242 – 1246
- Hicks, J. J., Torres-Ramos, Y. D., & Sierra-Vargas, M. P. (2006). Estrés oxidante. Concepto y clasificación. Jung, I. L. (2014). Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. *PloS one*, 9(4), 95492.
- Hsu, Y. F., Sheu, J. R., Lin, C. H., Yang, D. S., Hsiao, G., Ou, G., ... & Hsu, M. J. (2012). Trichostatin A and sirtinol suppressed survivin expression through AMPK and p38MAPK in HT29 colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(2), 104-115.

- Huang, C. Y., & Yu, L. C. H. (2015). Pathophysiological mechanisms of death resistance in colorectal carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 21(41), 11777.
- Huerta, G. P. (2009). Beneficio de la fibra dietética en enfermedades crónico-degenerativas, (*Rev Med UV*), 32–35. Recuperado a partir de <http://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2009/muv091e.pdf>
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & Mc Clements, D. J. (2011). *In vitro* human digestión models for food applications. *Food Chem.*, 125, 1-12.
- Iqbal S. & Bhanger M. I. (2006). Effect of season and production location on antioxidant activity of Moringa oleifera leaves grown in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 544–551. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.001>
- Jacobs, D. M., Gaudier, E., Duynhoven, J. V., & Vaughan, E. E. (2009). Non-digestible food ingredients, colonic microbiota and the impact on gut health and immunity: a role for metabolomics. *Current drug metabolism*, 10(1), 41-54.
- Jänne, P. A., & Mayer, R. J. (2000). Chemoprevention of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1960-1968.
- Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044-2058.
- Jiang Q, Li F, Shi K, Yang Y, Xu C. Sodium selenite-induced activation of DAPK promotes autophagy in human leukemia HL60 cells. *BMB Rep* 2012; 45: 194–199.
- Kasolo J. N., Bimenya G. S., Ojok L., Ochieng J., & Ogwal-Okeng J. W. (2010). Phytochemicals and uses of Moringa oleifera leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(9), 753–757.

- Khalafalla M M, Abdellatef E, Dafalla HM, Nassrallah AA, Aboul-Enein KM, Lightfoot DA, El-Deeb FE, El-Shemy HA (2010). Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *Afr. J. Biotech.* 9(49):8467-8471
- Kennedy, D. O., & Wightman, E. L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2(1), 32-50.
- Kühnau Joachim. (1976) "The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition.": 117-191.
- Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(12), 759.
- Leone A., Fiorillo G., Criscuoli F., Ravasenghi S., Santagostini L., Fico G., Bertoli S. (2015). Nutritional Characterization and Phenolic Profiling of *Moringa oleifera* Leaves Grown in Chad, Sahrawi Refugee Camps, and Haiti. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18923–18937. <http://doi.org/10.3390/ijms160818923>
- Leopoldini M., Russo N., Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 125, 288–306.
- Lesuffleur T., Barbat A., Dussaulx E. & Zweibaum A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Research*, 50(19), 6334-6343.
- Letan, A. (1966). The Relation of Structure to Antioxidant Activity of Quercetin and Some of Its Derivatives I. Primary Activity. *Journal of Food Science*, 31(4), 518-523.

- Li, Z., Jiang, H., Xu, C., & Gu, L. (2015). A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*, 43, 153-164.
- Libros de Consulta ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., & WATSON, J. (2004). *Biología Molecular de la Célula*. 4ta. Ed. Edic. Omega SA Barcelona, España. CAMPBELL, m. y Farrel, S. Alberts, B. & Bray D. (2006). *Introducción a la biología celular*. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- Lidija J. (2014). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *J Food Chemistry*. 175:556-567
- Liener, I. E. (1994). Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(1), 31–67. <http://doi.org/10.1080/10408399409527649>
- Lim S. S., Vos T., Flaxman A. D., Danaei G., Shibuya K., Adair-Rohani H., Ezzati M. (2012). A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2224–2260. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61766-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61766-8)
- Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *New England Journal of Medicine*, 370(5), 455-465.
- Lomanto Díaz, L. D., Ortiz Cala, Ó. L., Bretón Pinto, C. O., Gómez Lizcano, Á. I., & Mesa Cornejo, V. M. (2010). El ciclo celular. *MedUNAB*, 6(16). Long J. S., & Ryan K. M. (2012). New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene*, 31(49), 5045.

- Louis P., & Flint H. J. (2016). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*.
- Luengo, E. (2007). Alimentos funcionales y nutraceuticos. Madrid: Acción Médica. Tratamiento lipídico en la guía europea de dislipemias. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 12, 19-25. Vol. 12, p. 19-25.
- Lupton JR. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr* (2004). 134:479-482 [PMID: 14747692].
- Madi N., Dany M., Abdoun S. & Usta J. (2016). Moringa oleifera's Nutritious Aqueous Leaf Extract Has Anticancerous Effects by Compromising Mitochondrial Viability in an ROS-Dependent Manner. *Journal of the American College of Nutrition*, 35(7), 604-613
- Makita C., Chimuka L., Steenkamp P., Cukrowska, E. & Madala, E. (2016). Comparative analyses of flavonoid content in Moringa oleifera and Moringa ovalifolia with the aid of UHPLC-qTOF-MS fingerprinting. *South African Journal of Botany*, 105, 116-122.
- Makkar H.P.S., Becker K. (1997) Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the Moringa oleifera tree. *J. Agric. Sci.*, 128, 311–322.
- Makonnen E., A. Hunde, & G. Damecha. (1998). Moringa oleifera leaf meal as a hypocholesterolemic agent in laying hen diets. *Phytotherapy Research*, 11, 147–148.
- Maldonado V. S. S., Rodríguez J. D., Estrada A. A., Flores P. H., Lozano V. M. L., Jurado J. M. Y., (2013). Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes. Secretaria de salud, Gobierno Federal.

- Mallillin A. C., Trinidad T. P., Sagum R. S., de Leon M. P., Borlagdan M. P., Baquiran A. F. P. & Aviles T. F. (2014). Mineral Availability and Dietary Fiber Characteristics of *Moringa oleifera*. *Food and Public Health*, 4(5), 242-246. No está en texto
- Manach C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy and L. Jiménez. (2005). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5):727
- Mandade R, Sreenivas S, Choudhury A. Radical Scavenging and Antiox-idant Activity of *Carthamus tinctorius* Extracts. *Free Radic Antioxidants*. (2011). 1:87–93
- Manguero L. O. A. & Lemmen P. (2007). Phenolics of *Moringa oleifera* leaves. *Natural Product Research*, 21(1), 56–68. <http://doi.org/10.1080/14786410601035811>
- Martínez Fernández, A. (2014). Biomarcadores en cáncer colorrectal: metaloproteínasa 7 en pacientes intervenidos y mutaciones tras progresión a terapias anti-EGFR en enfermedad metastásica.
- Martínez-Flórez S., González-Gallegos J. & Culebras J. M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(n06).
- McOrist AL, Miller RB, Bird AR, Keogh JB, Noakes M, ToppingDL, Conlon MA. Fecal butyrate levels vary widely among individuals but are usually increased by a diet high in resistant starch. *J Nutr* 2011; 141: 883-889 [PMID: 21430242 DOI: 10.3945/jn.110.128504]
- Meisel H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8(5), 363-373. Meisel, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*, 21(1-4), 55-62. No está en texto
- Miene C., Weise A., Gleis, M. (2011). Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microbiota on expression of COX-2 and GSTT2 in human colon cells (LT97). *Nutr. Cancer* 2011, 63, 653–662.

- Mishra G., Singh P., Verma R., Kumar S., Srivastav S., Jha, K. K. & Khosa, R. L. (2011). Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Moringa oleifera* plant: An overview. *Der Pharmacia Lettre*, 3(2), 141-164.
- Montagne L., Pluske J. R. & Hampson D. J. (2003). A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal feed science and technology*, 108(1), 95-117.
- Moon Y.J. , Wang X., Morris M. E. (2006). Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in vitro* 20(2): 187 – 210.
- Morrison D. J. & Preston T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189-200. No está en texto
- Moyo B., Masika P. J., Hugo A., & Muchenje V. (2011). Nutritional characterization of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12925–12933.
- Mudyiwa S. M., Gadzirayi C. T., Mupangwa J. F., Gotosa J. & Nyamugure, T. (2013). Constraints and Opportunities for Cultivation of *Moringa oleifera* in The Zimbabwean Smallholder Growers. *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology*, 3(1), 12–19.
- Muhammad A. A., Karthivashan G., Arulselvan P. & Fakurazi S. (2015). *In vitro* antioxidant properties of bioactive fraction of *Moringa oleifera*. *Journal of Natural Products and Biomedical Research*. Volume 1; Issue 2;
- Muñoz Jáuregui A. M., Ramos-Escudero D. F., Alvarado-Ortiz Ureta C. & Castañeda Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de

compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(3), 142–149.

Napa-Valle, C.H. (2003). *Cáncer colorectal en el hospital military central*. Tesis para optar el título de Doctor en Cirugía General. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Nenadis N., Wang L., Tsimidou M, Zhang H. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS+ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15): 4669-4674.

Olagnero G., Abad A., Bendersky S., Genevois, C., Granzella L. & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), 20-33.

Olson M. E., & Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4), 1071–1082. No está en texto

Omotoso B. R., Abiodun A. A., Ijomone O. M. & Adewole S. O. (2015). Lead-Induced Damage on Hepatocytes and Hepatic Reticular Fibres in Rats; Protective Role of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Leaves (Lam). *Journal of Biosciences and Medicines*, 3(5), 27–35. <http://doi.org/10.4236/jbm.2015.35004>

OMS | Enfermedades no transmisibles. (2015). Recuperado el 7 de enero de 2016, a partir de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>

Pamok S, Saenphet S, Vinitketkumnue V, Saenphet K (2011). Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. And *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk extracts on the colon cancer cells. *Journal Medicine Plant Research* 6(1):139-145.

- Parada J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of food science*, 72(2), R21-R32.
- Pérez A., Sánchez T., Armengol N. & Reyes F. (2010). Características y potencialidades de Moringa oleifera, Lamark: Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes*, 33(4), 1–1.
- Pérez-Jiménez J., J. Serrano, M. Tabernero, S. Arranz, M.E. Díaz-Rubio, L. García-Diz, I. Goñi y F. Saura-Calixto. 2009. Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*. 64(2):102-107.
- Pietta P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. <http://doi.org/10.1021/np9904509>
- Porras A P, & A. Lopez-Malo. (2009). Importancia de los grupos fenolicos en los alimentos. Recuperado el 6 de enero de 2016, a partir de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf)
- Porrini M. & Riso P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(10), 647-650.
- Prakash D., Suri S., Upadhyay G., Singh B.N. (2007). Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 58, 18–28.

- Prakash, D.; Suri, S.; Upadhyay, G.; Singh, B.N. (2007) Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 58, 18–28. 65.
- Price M. L. (1985). *The Moringa tree*. Educational Concerns for Hunger Organization (ECHO) Technical Note.
- Qwele K., Hugo A., Oyedemi S. O., Moyo B., Masika P. J. & Muchenje V. (2013). Chemical composition, fatty acid content and antioxidant potential of meat from goats supplemented with Moringa (*Moringa oleifera*) leaves, sunflower cake and grass hay. *Meat Science*, 93(3), 455–462.
- Rasmussen S. E., Frederiksen H., Struntze Krogholm K., & Poulsen L. (2005). Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular nutrition & food research*, 49(2), 159-174.
- Richter N., Siddhuraju P. Becker, K. (2003). Evaluation of nutritional quality of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, 217, 599–611.
- Ristow M, Schmeisser S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.*; 51:327–336. [PubMed: 21619928]
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246-254. No está en texto
- Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov.* 6: 304–312.

- SAGARPA (2014). Promueve INIFAP cultivo de Moringa, especie con altas propiedades nutricionales y energéticas. (2014, marzo 23). Retrieved marzo, 2016, from <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B1018.aspx>
- Sandberg A.-S. (2002). Bioavailability of minerals in legumes. *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 3, S281-285. <http://doi.org/10.1079/BJN/2002718>
- Saura-Calixto F., Serrano J. & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- Saura-Calixto, F., & Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94(3), 442-447.
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; 26: 1749–1760
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462.
- Sharma, H., Parihar, L., & Parihar, P. (2011). Review on cancer and anticancerous properties of some medicinal plants. *J Med Plants Res*, 5(10), 1818–1835.
- Shih, M.C.; Chang, C.M.; Kang, S.M.; Tsai, M.L. Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of *Moringa oleifera*. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 6077–6088.
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(8), 2144–2155.

- Singh, B.N.; Singh, B.R.; Singh, R.L.; Prakash, D.; Dhakarey, R.; Upadhyay, G.; Singh, H.B. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47, 1109–1116.
- Sreelatha, S., & Padma, P. R. (2009). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Moringa oleifera* Leaves in Two Stages of Maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 303–311. <http://doi.org/10.1007/s11130-009-0141-0>
- Sreevalsan, S., & Safe, S. (2013). REACTIVE OXYGEN SPECIES AND COLORECTAL CANCER. *Current Colorectal Cancer Reports*, 9(4), 350–357.
- Stevenson, D. E., & Hurst, R. D. (2007). Polyphenolic phytochemicals- just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci.*, 64, 2900-2916.
- Stohs, S. J., & Hartman, M. J. (2015). Review of the Safety and Efficacy of *Moringa oleifera*: MORINGA OLEIFERA SAFETY AND EFFICACY. *Phytotherapy Research*, 29(6), 796–804. <http://doi.org/10.1002/ptr.5325>
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular cancer*, 14(1), 48.
- Tabernerero, M., Venema, K., Maathuis, A. J., & Saura-Calixto, F. D. (2011). Metabolite production during *in vitro* colonic fermentation of dietary fiber: analysis and comparison of two European diets. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(16), 8968-8975
- Tagliacruzchi D., E. Verzelloni, D. Bertolini y A. Conte. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*. 120(2):599-606.
- Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H., & Nie, D. (2011). The role of short-chain fatty acids in orchestrating two types of programmed cell death in colon cancer. *Autophagy*, 7(2), 235-237.

- Teixeira, E. M. B., Carvalho, M. R. B., Neves, V. A., Silva, M. A., & Arantes-Pereira, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chemistry*, 147, 51–54. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.09.135>
- Tiloke, C., Phulukdaree, A., & Chuturgoon, A. A. (2013). The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 226.
- Van der Beek, C. M., Dejong, C. H., Troost, F. J., Masclee, A. A., & Lenaerts, K. (2017). Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. *Nutrition reviews*.
- Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H Vandenabeele P.(2014). Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*;15: 135–47.
- Vanhoutvin SA, Troost FJ, Kilkens TO, Lindsey PJ, Hamer HM, Jonkers DM, Venema K, Brummer RJ. (2009).The effects of butyrate enemas on visceral perception in healthy volunteers.*Neurogastroenterol Motil*; 21: 952-e76
- Velderrain G, Palafox H, Medrano A, Ayala J, Chen C, Robles M, Astiazaran H, Alvarez E, Gonzales A. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *J Food Funct*; 5:189-197
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., ... & Wichers, H. (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing.
- Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S., & Rao, C. V. (2009). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2196-2201.

- Viallard, J. F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J. L., Reiffers, J.(2001). Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother*, 5: 109–129.
- Vital-Luna D. A., De Mejía, E. G., Dia, V. P., & Loarca-Piña, G. (2014). Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food chemistry*, 157, 347-355.
- Vogt JA, Wolever TM. (2003) Fecal acetate is inversely related to acetate absorption from the human rectum and distal colon. *J Nutr.*; 133:3145–3148.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566-571.
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Busch, C., & Schrenk, D. (2008). Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(9), 587-593.
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 829-837.
- Waller, G. R., & Yamasaki, K. (Eds.). (1996). Saponins used in traditional and modern medicine. New York: Plenum Press. *World Rev Nutr Diet*, 1976, 24:117-190.
- Wang, H., Khor, T. O., Shu, L., Su, Z., Fuentes, F., Lee, J.-H., & Kong, A.-N. T. (2012). Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(10), 1281–1305.

- Wang, T., Jin, Y., Yang, W., Zhang, L., Jin, X., Liu, X., ... & Li, X. (2017). Necroptosis in cancer: An angel or a demon? *Tumor Biology*, 39(6), 1010428317711539.
- Williams, G.M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 2001, 161: 3-10.
- Wolever TM, Spadafora P, Eshuis H. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am J Clin Nutr*. 1991; 53:681–687.
- Wolin, K. Y., Carson, K., & Colditz, G. A. (2010). Obesity and cancer. *The oncologist*, 15(6), 556-565.
- Wong, J. M., De Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., & Jenkins, D. J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*, 40(3), 235-243.
- YAMASHITA, S., YAMAZAKI, Y., MASADA, M., NADAI, T., KIMURA, T., & SEZAKI, H. (1986). Investigations of influx and accumulation processes of β -lactam antibiotics and their role in the transmural transfer across rat jejunum. *Journal of pharmacobio-dynamics*, 9(4), 368-374.
- Yang G, Zheng W, Xiang YB, Gao J, Li HL, Zhang XL, (2011). Green tea consumption and colorectal cancer risk: a report from the Shanghai Men's Health Study. *Carcinogenesis*;32: 1684–8.
- Yang, R.Y.; Yang, R.Y.; Lin, S.; Kuo, G. (2008). Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. *Asia Pac. J. Clin. Nutr*. 17, 275–279.
- Yeh, C.T., & Yen, G.C. (2003). Effects of Phenolic Acids on Human Phenolsulfotransferases in Relation to Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1474–1479. <http://doi.org/10.1021/jf0208132>

- Yong Tang, Yakun Chen, Hongmei Jiang & Daotai Nie (2011). The role of short-chain fatty acids in orchestrating two types of programmed cell death in colon cancer, *Autophagy*, 7:2, 235-237, DOI: 10.4161/auto.7.2.14277
- Zeng, H., Lazarova, D. L., & Bordonaro, M. (2014). Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 6(2), 41–51. <http://doi.org/10.4251/wjgo.v6.i2.41>
- Zhang, M., Hettiarachchy, S. N., Horax, R., Kannan, A., Praisoody, M. D. A., Muhundan, A., & Mallangi, C. R. (2011). Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Centella asiatica*, *Moringa oleifera* and *Murraya koenigii* leaves. *J. Med. Plants Res*, 5, 6672-6680.