



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

Evaluación nutritiva, nutracéutica y funcional *in vitro* de la vaina de cacao (*Theobroma cacao* L.)

**TESIS**

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

Presenta:

I.B.Q. Karen Haydeé Nieto Figueroa

Dirigido por:

Rocio Campos Vega

Dra. Rocio Campos Vega  
Presidente

Dr. Abraham Wall Medrano  
Secretario

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Vocal

Dr. Ulises Moreno Celis  
Suplente

Dra. Marcela Gaytán Martínez  
Suplente

## Resumen

La vaina de cacao (VC) es el principal subproducto de la industria del cacao; contiene compuestos bioactivos como polifenoles, teobromina y fibra dietaria. Esta última, al no ser digerida por enzimas humanas, alcanza el colon, donde es fermentada generándose ácidos grasos de cadena corta, que junto con los polifenoles pueden ejercer un efecto quimioprotector en los colonocitos. La VC no tiene aplicaciones alimenticias, pero podría tener beneficios para la salud, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos nutracéuticos de la VC durante la digestión gastrointestinal *in vitro* y el efecto del extracto de fermentación colónica (EFC) en la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano. La VC se sometió a tres procesamientos de secado (V-Microondas, secado por microondas; V-Flujo, secado por flujo de aire seco, VF-Extrusión, secado por flujo de aire seco y extruido). El procesamiento tuvo efectos limitados sobre la composición química de la VC; sin embargo, se observó una influencia en la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos, taninos condensados y flavonoides durante la digestión *in vitro*. En general, la bioaccesibilidad fue baja (1-14% en la etapa oral), con los valores mayores para V-Flujo y VF-Extrusión durante la etapa intestinal. V-Microondas mostró mayor capacidad antioxidante en la etapa oral, gástrica y colónica, mientras que V-Flujo en la etapa intestinal. A partir de la etapa oral, la capacidad antioxidante disminuye desde un 43% hasta un 70% en la etapa intestinal, de acuerdo a la técnica (ABTS o DPPH) y la muestra evaluada. El EFC de VF-Extrusión (EF-VFE) mostró la mayor producción de ácido butírico después de 4 h de fermentación colónica *in vitro*. Este extracto fue evaluado en células de cáncer de colon humano HT-29, obteniendo una concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de 19.81%. De este porcentaje, el 37% está mediado por necrosis. Además, EF-VFE inhibió a la enzima histona deacetilasa en un 92.4% respecto al control, relacionado con la inducción de apoptosis, por lo que los resultados sugieren un perfil citotóxico ejercido por necroptosis, que debe evaluarse en futuros trabajos. Dado que la bioaccesibilidad y la fermentabilidad en colon fue baja, y la CL<sub>50</sub> sobre las células HT-29 obtenida es alta, es necesario estudiar otros procesamientos para mejorar la funcionalidad de la VC.

**Palabras clave:** Vaina de cacao, digestión gastrointestinal *in vitro*, cáncer de colon, bioaccesibilidad, compuestos fenólicos, ácidos grasos de cadena corta.

## Abstract

The cocoa pod husk (CPH) is the main by-product of the cocoa industry; it contains bioactive compounds such as polyphenols, theobromine and dietary fiber. The latter, not being digested by human enzymes, reaches the colon, where it is fermented generating short chain fatty acids, which together with the polyphenols can exert a chemoprotective effect on the colonocytes. The CPH has no food applications, but it could have health benefits, so the objective of this work was to evaluate the bioavailability of the CPH nutraceutical compounds during *in vitro* gastrointestinal digestion and the effect of colonic fermentation extract (EFC) in the survival of human colon cancer cells. The CPH underwent three drying processes (V-Microwave, microwave drying; V-Flow, drying by air flow, VF-Extrusion, drying by air flow and extruded). The processing had limited effects on the chemical composition of the CPH; however, an influence on the bioaccessibility of phenolic compounds, condensed tannins and flavonoids was observed during *in vitro* digestion. In general, the bioaccessibility was low (1-14% in the oral stage), with the highest values for V-Flow and VF-Extrusion during the intestinal stage. V-Microwave showed greater antioxidant capacity in the oral, gastric and colonic stage, while V-Flow in the intestinal stage. From the oral stage, the antioxidant capacity decreases from 43% to 70% in the intestinal stage, according to the technique (ABTS or DPPH) and the sample evaluated. VF-Extrusion EFC (EF-VFE) showed the highest production of butyric acid after 4 h of *in vitro* colonic fermentation. This extract was evaluated in HT-29 human colon cancer cells, obtaining a lethal concentration 50 (CL<sub>50</sub>) of 19.81%. Of this percentage, 37% is mediated by necrosis. In addition, EF-VFE inhibited the enzyme histone deacetylase by 92.4% with respect to the control, related to the induction of apoptosis, so the results suggest a cytotoxic profile exerted by necroptosis, which should be evaluated in future studies. Since the bioaccessibility and fermentability in the colon was low, and the CL<sub>50</sub> on the HT-29 cells obtained is high, it is necessary to study other processes to improve the functionality of the CPH.

**Keywords:** Cocoa pod husk, colon cancer, *in vitro* gastrointestinal digestion, bioaccessibility, phenolic compounds, short chain fatty acids.

## DEDICATORIA

*A mis padres, Francisco Javier Nieto Flores y Rosa María Figueroa García  
mi infinito amor y gratitud.*

*En memoria de Joaquín Gallegos Nieto.*

## AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios, por siempre creer en mí e impulsarme a ser cada día mejor.

A mis amigos dentro y fuera del laboratorio, por brindarme un hombro, una mano o un abrazo sincero cada vez que lo necesité.

A mi asesora, Dra. Rocio Campos Vega, por compartir conmigo su conocimiento, y ser un gran ejemplo de constancia, dedicación y entrega.

A todos los miembros de mi comité. Dr. Abraham Wall Medrano, Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña, Dr. Ulises Moreno Celis, Dra. Marcela Gaytán Martínez por su valiosa contribución y sus conocimientos para la realización y mejora del proyecto.

A todas las personas que en una u otra forma fueron parte de la realización de este trabajo.

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

## Índice general

Pág.

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Índice general .....	v
Índice de tablas.....	x
Índice de figuras.....	xi
I. Introducción .....	1
II. Antecedentes.....	3
II.1 El cacao.....	3
II.1.1 Producción y comercio.....	5
II.1.2 Procesamiento del cacao.....	7
II.1.3 Subproductos.....	9
II.1.4 Composición de la vaina de cacao.....	10
II.1.5 Compuestos bioactivos en la vaina.....	13
II.1.5.1 Pectinas.....	13
II.1.5.2 Fibra dietética.....	14
II.1.5.3 Compuestos antioxidantes.....	14
II.1.6 Potenciales beneficios a la salud.....	16
II.1.6.1 Pectinas.....	16
II.1.6.2 Minerales.....	17
II.1.6.3 Fibra dietética.....	18
II.1.6.3.1 Ácidos grasos de cadena corta.....	20
II.1.6.4 Compuestos antioxidantes.....	21
II.1.7 Proceso de digestión gastrointestinal.....	22
II.1.7.1 Modelos in vitro para la evaluación del proceso gastrointestinal.....	23

II.1.8	Cáncer de colon.....	24
II.1.8.1	Carcinogénesis .....	25
II.1.8.2	Mecanismos de muerte celular en cáncer.....	27
II.1.8.2.1	Autofagia .....	28
II.1.8.2.2	Necrosis.....	28
II.1.8.2.3	Apoptosis.....	28
II.1.8.3	Inhibidores de enzima histona deacetilasa y muerte celular .....	31
II.1.8.4	Técnicas para identificar necrosis .....	32
II.1.9	Modelos celulares utilizados en estudios <i>in vitro</i> .....	33
II.1.9.1	Línea celular HT-29.....	34
III.	Justificación.....	35
IV.	Objetivos .....	37
IV.1	Objetivo general .....	37
IV.2	Objetivos particulares.....	37
V.	Materiales y métodos.....	38
V.1	Materiales.....	38
V.1.1	Materia prima.....	38
V.1.1.1	Procesamiento de cáscara de vaina de cacao.....	38
V.1.1.1.1	Secado en microondas .....	38
V.1.1.1.2	Secado por flujo de aire.....	38
V.1.1.1.2	Flujo de aire extruido .....	39
V.1.2	Compuestos químicos y animales .....	39
V.2	Métodos .....	39
V.2.1	Análisis proximal.....	39
V.2.1.1	Determinación de cenizas.....	40

V.2.1.2 Determinación de humedad .....	40
V.2.1.3 Determinación de lípidos.....	41
V.2.1.4 Determinación de proteína .....	41
V.2.2. Composición nutracéutica.....	42
V.2.2.1 Fibra dietaria .....	42
V.2.2.1.1 Fibra insoluble .....	42
V.2.2.1.2 Fibra soluble .....	43
V.2.2.2 Extracción de compuestos antioxidantes .....	43
V.2.2.2.1 Determinación de fenoles totales.....	43
V.2.2.2.2 Determinación de flavonoides totales .....	44
V.2.2.2.3 Determinación de taninos condensados.....	44
V.2.2.2.4 Determinación de compuestos fenólicos por HPLC.....	44
V.2.2.2.5 Determinación de capacidad antioxidante, método ABTS.....	45
V.2.2.2.6 Determinación de capacidad antioxidante, método DPPH .....	45
V.2.2.3 Determinación de teobromina .....	46
V.2.3 Digestión gastrointestinal in vitro .....	47
V.2.3.1 Simulación de las condiciones de la boca.....	47
V.2.3.2 Simulación de las condiciones del estómago.....	47
V.2.3.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado .....	48
V.2.3.4 Técnica del saco intestinal invertido.....	48
V.2.3.4.1 Manejo de los animales .....	48
V.2.3.4.2 Eutanasia de los animales y preparación del saco intestinal invertido .....	48
V.2.3.4.3 Manejo de los animales después de la etuanasia. ....	49
V.2.4 Fermentación colónica in vitro de la FND .....	49

V.2.4.1 Cuantificación de los AGCC por HPLC .....	50
V.2.4.1.1 Curva de calibración .....	50
V.2.4.1.2 Extracción líquido-líquido.....	51
V.2.4.1.3 Cuantificación en HPLC-UV .....	51
V.2.5 Cultivo celular HT-29 .....	52
V.2.5.1 Elaboración de la curva dosis-respuesta.....	52
V.2.5.3 Cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....	53
V.2.5.4 Actividad de histona deacetilasa (HDAC).....	53
Análisis estadístico.....	54
VI Resultados y discusión .....	55
VI.1 Composición proximal de la vaina de cacao .....	55
VI.2 Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en la vaina de cacao procesada. ....	59
VI.3 Bioaccesibilidad y permeabilidad de compuestos fenólicos de la vaina de cacao procesada.....	62
VI.4 Bioaccesibilidad y permeabilidad de taninos condensados en la vaina de cacao procesada.....	65
VI.5 Bioaccesibilidad y permeabilidad de flavonoides en la vaina de cacao procesada. ....	69
VI.6 Capacidad antioxidante de la vaina de cacao procesada durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> . ....	71
VI.7 Contenido, bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad <i>in vitro</i> (boca-colon) de compuestos fenólicos y teobromina de la vaina de cacao determinados por HPLC .....	74
VI.8 Efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible de la vaina de cacao sobre el pH del medio de incubación .....	80

VI.9 Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la vaina de cacao procesada.....	82
VI.10 Efecto del extracto de fermentación colónica <i>in vitro</i> sobre la sobrevivencia celular. ....	86
VI.11 Efecto sobre la sobrevivencia de las células HT-29 del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la VF-Extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC a la CL <sub>50</sub> . ....	87
VI.12 Efecto citotóxico del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la VF-Extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC a la CL <sub>50</sub> sobre las células HT-29 mediante la cuantificación de lactato deshidrogenasa. ....	89
VI.13 Efecto del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la VF-Extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC a la CL <sub>50</sub> sobre la actividad de la enzima histona deacetilasa en células HT-29.....	91
Conclusiones.....	94
Referencias.....	96

## Índice de tablas

Tabla	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición proximal y fracciones de fibra de la harina de vaina de cacao (HVC) cruda y procesada.....	11
<b>Tabla 2.</b> Composición mineral de harina de vaina de cacao cruda y procesada. ....	12
<b>Tabla 3.</b> Composición de aminoácidos en la vaina de cacao. ....	12
<b>Tabla 4.</b> Perfil fenólico de la vaina de cacao ( $\mu\text{g/g}$ ). ....	15
<b>Tabla 5</b> Efecto del proceso de secado sobre la capacidad antioxidante de la vaina de cacao.....	16
<b>Tabla 6.</b> Funciones y beneficios de la fibra dietaria en la salud humana. ....	19
<b>Tabla 7</b> Composición química, en porcentaje, de la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado. ....	56
<b>Tabla 8</b> Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado. ....	59
<b>Tabla 9</b> Capacidad antioxidante de la vaina de cacao sometida a diferentes métodos de secado durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal in vitro (boca-colon). ....	72
<b>Tabla 10</b> Contenido y bioaccesibilidad gastrointestinal in vitro (boca-colon) de compuestos fenólicos y teobromina de la vaina de cacao determinados por HPLC. ....	75
<b>Tabla 11.</b> Efecto de la fermentación colónica in vitro de la fracción no digerible de la vaina de cacao sobre el pH del medio de incubación. ....	80
<b>Tabla 12</b> Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el extracto de la fermentación colónica in vitro.....	82

## Índice de figuras

Figura	Pág.
<b>Figura 1</b> Estructura y subproductos del cacao .....	4
<b>Figura 2.</b> Ecotipos de <i>Theobroma cacao</i> L.....	5
<b>Figura 3</b> Múltiples vías genéticas en la patogénesis del cáncer colorrectal .....	27
<b>Figura 4</b> Vías de señalización de apoptosis. ....	31
<b>Figura 5</b> Bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad in vitro (boca-colon) de compuestos fenólicos totales en la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado.....	63
<b>Figura 6</b> Bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad in vitro (boca-colon) de taninos condensados en la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado. ....	66
<b>Figura 7</b> Bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad in vitro (boca-colon) de flavonoides totales en la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado... 69	
<b>Figura 8</b> Curva dosis-respuesta (Log) y concentración letal 50 (CL <sub>50</sub> ) del extracto de la fermentación colónica in vitro de la VF-Extrusión (EF-VFE) sobre células de cáncer de colon humano HT-29.....	86
<b>Figura 9</b> Inhibición de la sobrevivencia de células de adenocarcinoma de colon HT-29 a la CL <sub>50</sub> (EF-VFE e Inulina) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC a la CL <sub>50</sub> (EF-VFE e Inulina). ....	88
<b>Figura 10</b> Cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa en células HT-29 tratadas con la CL <sub>50</sub> VF-Extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC. ....	90
<b>Figura 11</b> Actividad de la enzima histona deacetilasa (HDAC) en células HT-29 tratadas con la CL <sub>50</sub> del extracto de la fermentación in vitro de la VF-extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC.....	92

## I. Introducción

El cacao (*Theobroma cacao*) es un pequeño árbol (4-8 m de alto) de hoja perenne en la familia Malvaceae, nativo de las profundas regiones tropicales de América Central y del Sur ("FAOSTAT", 2017). Es un cultivo económicamente importante en varios países tropicales. Sus granos comercialmente valiosos constituyen aproximadamente el 20% del peso fresco de la fruta de cacao. Los granos de cacao se utilizan principalmente en la fabricación de chocolate, pero también tienen importancia farmacéutica y cosmética (Kalvathev *et al.*, 1998).

En la economía agraria, las temporadas de cosecha a menudo van acompañadas de grandes cantidades de residuos que constituyen, en la mayoría de los casos, amenaza ambiental. Muchos de estos residuos agrícolas son de naturaleza fibrosa y también son naturalmente polimérico; los países en desarrollo se enfrentan a numerosos desafíos económicos que requieren enfoques innovadores en la utilización de recursos fácilmente disponibles, en el desarrollo de nuevos materiales de ingeniería que se pueden comparar favorablemente con los materiales existentes para diversas aplicaciones (Babatope, 2005).

Por cada tonelada de granos secos producidos, se generan 10 toneladas de vainas de cacao húmedo, lo que representa un grave problema de desechos (Figueira *et al.*, 1993; Kalvathev *et al.*, 1998). En la actualidad, los aumentos en la producción y el procesamiento de los granos de cacao han generado un mayor desperdicio, lo que ha provocado el desecho de millones de toneladas de vainas de cacao cada año (Vriesmann *et al.*, 2011).

Vriesmann (2011) reportó que las vainas contienen 45.6-46.4 mg equivalentes de ácido gálico equivalente de fenoles solubles; 32.3% de carbohidratos, 21.44% de lignina, 19.2% de azúcares, 8.6% de proteínas y 27.7% de minerales. Además, son una fuente potencial de fibra dietética (Martín-Cabrejas *et al.*, 1994) debido a su contenido de mono y oligosacáridos, almidón, pentosanos

y celulosa. Se ha estudiado el contenido de grasa, proteína, azúcar neutro, lignina, polifenol, ácido urónico, minerales y compuestos alcaloides de las vainas de cacao, para una utilización efectiva en la alimentación del ganado, los alimentos y las industrias farmacéuticas (Martín-Cabrejas *et al.*, 1994; Sotelo & Alvarez, 2002).

Por otra parte, la evaluación de la digestibilidad de nutrientes y fitoquímicos es de suma importancia para predecir la calidad nutricional y valor nutracéutico de los alimentos. Sin embargo, las determinaciones *in vivo* consumen mucho tiempo y son costosas, por lo que se han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo de procedimientos *in vitro* (Boisen & Eggum, 1991). Los ensayos de digestión *in vitro* simulan las condiciones fisiológicas de la digestión *in vivo* y son herramientas útiles para estudiar y comprender los cambios, las interacciones, así como la bioaccesibilidad de nutrientes, fármacos y compuestos no nutritivos (Lucas-González *et al.*, 2018). Por otra parte, la microbiota colónica desempeña un papel importante en la fisiología digestiva humana y contribuye significativamente a la homeostasis en el intestino grueso (Payne *et al.*, 2012). La microbiota colónica constituye a la mayoría de la población bacteriana en humanos y ejerce efectos sistémicos. Es susceptible a modulación por factores ambientales, como la dieta. Los prebióticos, compuestos no digeribles, pueden modular la composición y/o actividad de la microbiota colónica, por lo tanto, conferirán beneficios fisiológicos al huésped (Campos-Vega *et al.*, 2016). Harinas de fuente naturales pueden ser utilizadas en el desarrollo de una variedad de productos alimenticios potencialmente prebióticos, ya que han demostrado modulación positiva en la composición de la microbiota y su actividad metabólica (Campos-Vega *et al.*, 2016).

Por tal motivo el presente trabajo pretende evaluar la vaina de cacao a través de un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*, y de esta forma estudiar los compuestos que son bioaccesibles durante cada etapa, así como el efecto de los metabolitos de su fermentación colónica en un modelo celular de cáncer de colon.

## II. Antecedentes

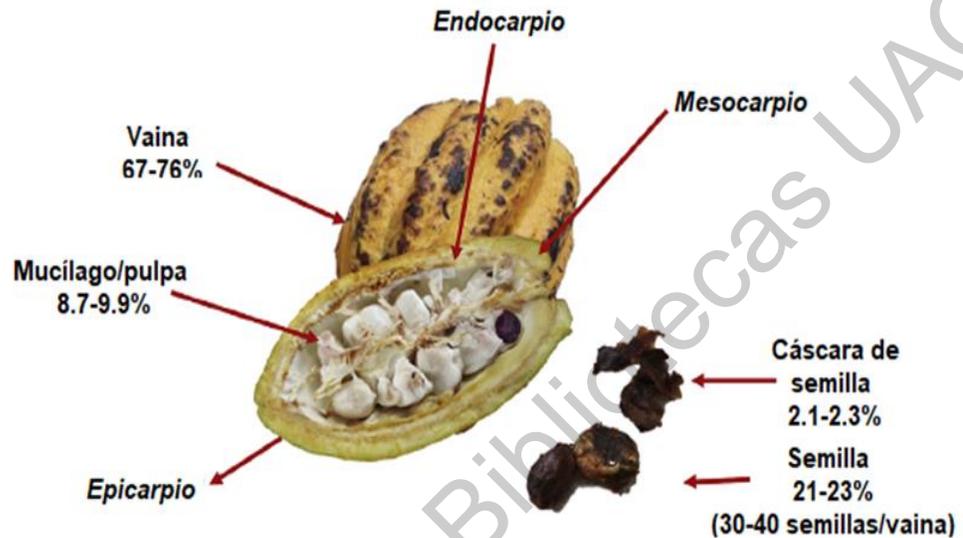
### II.1 El cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) pertenece al género *Theobroma*; vocablo griego que significa "alimento de los dioses". La palabra cacao deriva del maya cacau; cac (rojo) y cau (fuerza y fuego). Los mercaderes mayas, en sus múltiples viajes, dieron a conocer el cacao al pueblo azteca, el cual a su vez adoptó su cultivo y empezó a consumirlo en forma de una bebida hecha con cacao molido, agua y miel; a la que se llamó xocolatl, que en náhuatl significa "agua espumosa". Por sus múltiples nutrientes y delicioso sabor, el xocolatl era considerado por los aztecas como la bebida de los dioses (Avendaño Arrazate *et al.*, 2011).

*Theobroma cacao* L. pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Malvales, familia Malvaceae, género *Theobroma*, y consta de 20 a 22 especies (Avendaño Arrazate *et al.*, 2011). El fruto es una vaina grande comúnmente denominada "mazorca", carnosa, oblonga a ovada, amarilla o purpúrea, de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso, puntiaguda y con camellones longitudinales; cada vaina contiene en general entre 30 y 40 semillas dispuestas en placentación axial e incrustadas en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa (CONABIO, 2018).

La vaina es un material naturalmente laminado que tiene tres capas claramente diferentes (Figura 1). La capa interior es un tejido blanquecino que protege los muy suaves granos de cacao en una cámara interna bien lubricada. La siguiente capa externa es una estructura compuesta muy dura que posee la dureza necesaria para mantener los granos de cacao en su lugar incluso bajo un alto impacto. La capa más externa relativamente más suave (en comparación con la capa intermedia) es la cubierta que está directamente expuesta a la luz del sol, después de lo cual se vuelve negra (Babatope, 2005). Las semillas son del tamaño de una almendra, color chocolate o purpúreo, de 2 a 3 cm de largo y de sabor amargo. No tiene albumen y están recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco y de sabor dulce y acidulado. Todo el volumen de la semilla en el interior

está prácticamente ocupado por los 2 cotiledones del embrión. Se les llama vulgarmente "habas" o "granos" de cacao. Ricas en almidón, en proteínas, en materia grasa, lo cual les confiere valor nutritivo ("CONABIO", 2018).



**Figura 1** Estructura y subproductos del cacao

Imagen obtenida de (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018)

Han evolucionado tres tipos de cacao: el Criollo, desarrollado en el norte de Sudamérica y Centro América; el Forastero, proveniente de la Cuenca Amazónica; y el Trinitario, localizado en Trinidad (Figura 2). El tipo Criollo es caracterizado por un fruto con frecuencia alargado, con punta pronunciada, doblada y aguda; la superficie es generalmente rugosa, delgada, de color verde frecuentemente con salpicaduras de rojo a púrpura oscuro y marcada por 10 surcos muy profundos; los granos son grandes, gruesos, de sección casi redonda con los cotiledones blancos o muy ligeramente pigmentados. De este tipo se obtiene el chocolate de más alta calidad, tiene baja producción y es muy susceptible a enfermedades. Tipo Forastero; el fruto es generalmente de forma ovalada y corta, de color verde o amarilla cuando maduro, con una superficie lisa. Pericarpio espeso y difícil de cortar a causa de un mesocarpio fuertemente lignificado; granos pequeños y más o menos aplastados y tienen un color entre púrpura claro y oscuro. Este tipo forma un grupo

complejo tanto en sus formas silvestres como cultivadas. Dada su alta producción, el tipo forastero domina la producción mundial. El tipo Trinitario es altamente variable dado su origen híbrido. Fue clasificado como un tipo de Forastero, es de origen reciente y puede ser reproducido artificialmente. Es probable que se trate de una población segregante que se originó de una cruce entre Forastero (amelonado) y Criollo. En el comercio es conocido como "cacao fino", y su sabor de excelencia puede deberse en parte a su germoplasma criollo ("CONABIO", 2018).



**Figura 2.** Ecotipos de *Theobroma cacao* L.

Imagen obtenida de: <https://cacaohermanos.wordpress.com/2017/05/28/ecotipos-de-theobroma-cacao/>

### **II.1.1 Producción y comercio**

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un importante producto de exportación agrícola en el mundo y forma la columna de la economía de algunos países. Es la principal fuente de divisas e ingresos de muchas familias en la mayoría de los países en desarrollo del mundo. La fundación mundial de cacao estima que el número de productores a nivel mundial es actualmente de 5-6 millones y el número de personas que dependen del cacao para su sustento, a nivel mundial, es de 40-50 millones (Afoakwa, 2014). La producción mundial de cacao en el 2016-2017 fue de 4748 mil

toneladas y se estima que para el periodo de 2017-2018 sea de 4638 mil toneladas ("Latest News From The ICCO", 2018) .

La región africana representa aproximadamente el 75% de la exportación neta del cacao mundial, y es por mucho el mayor proveedor de cacao a los mercados mundiales, seguido de Asia y Oceanía (16%) y América (6%). Costa de Marfil es el líder mundial exportador de cacao, representando el 37% de las exportaciones netas mundiales, seguido de Ghana (22%) e Indonesia (15%) (Afoakwa, 2014). México ocupa el onceavo lugar en producción a nivel mundial, participando con menos del 2% de la producción mundial. Datos preliminares estiman que la producción es de 22 mil toneladas (ciclo 2011-2012). El cacao es producido principalmente por el estado de Tabasco, representando el 66% de la producción nacional, seguido por Chiapas (33%), sumando el 99% de la producción total, el resto se produce entre Oaxaca, Guerrero y Veracruz ("Cacao México", 2018).

Actualmente, se satisface 41.22% de los requerimientos nacionales con producción interna, lo que establece una dependencia de importaciones provenientes de Ecuador, Costa de Marfil, República Dominicana, Colombia y Ghana ("SAGARPA", 2017).

Si bien el cacao se puede producir esencialmente en los países en desarrollo, sus productos se consumen principalmente en los países industrializados, siendo los principales compradores la industria de procesamiento y confitería de chocolate. Algunos países productores también procesan parte de su producción de semilla de cacao. Los productos obtenidos (masa de cacao, polvo y manteca) se exportan o se utilizan a nivel nacional para abastecer a la industria del chocolate ("OECD", 2007).

El cacao se comercializa principalmente en los mercados bursátiles de Londres y Nueva York. Muy sensible a los rumores o la anticipación del agotamiento de las existencias, las malas cosechas y los eventos políticos o relacionados con el

clima, el mercado es extremadamente inestable y especulativo. Las variaciones de precio pueden ser considerables. Sin embargo, los precios de mercado han mostrado una tendencia a la baja desde principios de los años ochenta, debido al doble impacto del excedente de oferta y las considerables reservas de los países consumidores. En la década de 1980, los países consumidores aprovecharon la caída de los precios para acumular considerables reservas, que utilizan para regular el mercado en su beneficio. Los países productores no están en condiciones de construir reservas en su propio interés, razón por la cual siguen estando sujetos al mercado mundial ("OECD", 2007).

### **II.1.2 Procesamiento del cacao**

La pulpa del grano de cacao es el sustrato de la fermentación. La pulpa es un medio rico para el crecimiento microbiano y contiene 82 -87 % de agua, 10-15 % de azúcares (principalmente glucosa, fructosa y sacarosa), 2-3 % de pentosanos, 1-3 % de ácido cítrico y 10-15 % de pectina. La alta concentración de pectina y la presencia de otros polisacáridos (1-2 %) hacen que la pulpa sea viscosa. La relación glucosa / fructosa a sacarosa cambia con el grado de madurez, con las vainas inmaduras contienen una mayor proporción de sacarosa y las vainas maduras contienen principalmente glucosa y fructosa. Las proteínas, aminoácidos y vitaminas (principalmente vitamina C) también están presentes en la pulpa. Cada semilla consiste en dos cotiledones y un embrión, que está contenido en un recubrimiento de semilla, y las semillas dentro del fruto de cacao maduro; sin daños están casi libres de gérmenes. El cacao crudo tiene un sabor astringente desagradable y necesita ser fermentado, secado y tostado para obtener el sabor característico.

Los pasos principales de procesamiento en la producción de cacao incluyen la cosecha, la rotura de la vaina, la fermentación y el secado.

Durante la cosecha, los frutos de cacao se retiran cuidadosamente del tallo del árbol y luego se rompen, se abren con un martillo de madera, y los granos son

removidos manualmente (Tamang & Kailasapathy, 2010). Después de abrir las vainas, las semillas de cacao se contaminan espontáneamente, a través del contacto con el recubrimiento externo de la vaina, cuchillos, manos de los trabajadores, suelo y superficies de cestas, con una gran variedad de microorganismos (Tamang & Kailasapathy, 2010). En muchas áreas productoras de cacao, es una práctica común cosechar las vainas durante algunos días antes de que las frutas recolectadas sean transportadas a las instalaciones de fermentación. Esto se considera benéfico, ya que da como resultado un aumento más rápido de la temperatura y, en consecuencia, una fermentación más rápida. Probablemente, esto se debe a que la sacarosa se convierte en glucosa y fructosa durante el período de almacenamiento. Los pasos de fermentación y secado a menudo se denominan simplemente "curado" (Tamang & Kailasapathy, 2010).

La fermentación se puede dividir en dos eventos importantes: primero, se generan ácidos orgánicos, etanol y calor como resultado de actividades microbianas, y segundo, reacciones bioquímicas complejas se inician por la difusión de productos de metabolismo microbiano dentro de los cotiledones. Por lo tanto, la fermentación tiene como objetivo eliminar la pulpa residual, matar el embrión y mejorar el aroma, el sabor y el color del grano (Tamang & Kailasapathy, 2010). En la instalación de fermentación, se fermentan en montones sobre hojas de plátano, en bandejas planas, pero relativamente profundas, o en cajas (Tamang & Kailasapathy, 2010). La eliminación de la pulpa mucilaginosa durante la fermentación es muy importante, ya que la pulpa remanente inhibiría el secado del contenido de agua microbiológicamente estable. Durante la fermentación (de 3 a 13 días) es necesario girar (mezclar) los montones una o dos veces al día para obtener una fermentación uniforme, proporcionar aireación suficiente y mantener las temperaturas por debajo de 45-50 ° C. Los tiempos de fermentación varían ampliamente de un país a otro e incluso de una granja a otra. No se ha formulado una definición estricta de cuándo finalizar la fermentación, pero el agricultor experimentado sabe cuándo dejar de fermentar y cuándo comenzar a secar. Esto

se basa en sus observaciones sobre el olor de la masa de fermentación (es decir, el desarrollo de un olor a ácido acético a partir de la actividad de las bacterias del ácido acético), la apariencia interna y externa de los granos y la temperatura decreciente de la masa en fermentación (Tamang & Kailasapathy, 2010).

Después, el contenido de humedad de los granos debe ser llevado del 40-60 % inicial al 6 -7 % para evitar el crecimiento de moho. Además, las reacciones bioquímicas importantes para el sabor y el desarrollo del color deben tener lugar durante el secado. Desde el punto de evitar el crecimiento de hongos, el secado debe ser lo más rápido posible, desde el punto de vista del sabor y el aroma, el secado no debe ser demasiado rápido. Por lo tanto, se ha establecido que el secado debe tomar al menos 48 h para permitir el desarrollo del sabor adecuado (Tamang & Kailasapathy, 2010).

### **II.1.3 Subproductos**

La industria alimentaria está experimentando una demanda en constante crecimiento de nuevos ingredientes a partir de fuentes naturales. Esta demanda, por lo tanto, ha atraído a los investigadores hacia estos ingredientes obtenidos a partir de subproductos agroindustriales (Martínez *et al.*, 2012). Dependiendo de la disponibilidad de una tecnología adecuada, los subproductos pueden ser convertidos en productos comerciales, ya sea como materias primas para procesos secundarios (ingredientes de alimentos intermedios) o como ingredientes de nuevos productos, ganando cada vez más interés debido a que estos son productos de alto valor y su recuperación puede ser económicamente atractiva ( Sotelo *et al.*, 2015).

Para el caso que nos ocupa, una vez que se ha obtenido el grano seco de cacao, los subproductos que quedan se componen principalmente de tres fracciones: (i) vaina de cacao (VC), (ii) cáscaras de granos de cacao y (iii) mucílago de cacao. En la mayoría de los casos, estos subproductos están subexplotados y se consideran un "desperdicio" indeseable de la industria del cacao / chocolate.

Normalmente, se dejan pudrir en la plantación de cacao, que puede causar problemas ambientales. Además de producir malos olores, pueden propagar enfermedades, como la pudrición de la vaina negra, porque no están compostados. Sin embargo, su composición les da el potencial de ser utilizados para otro fin, por ejemplo, obtener compuestos bioactivos y fibra dietética que podrían usarse como ingrediente en el procesamiento de alimentos (Martínez *et al.*, 2012).

Actualmente, a nivel mundial se producen 3.5 millones de toneladas de cacao, de los cuales las VC representan 65%, son desechadas como residuos cada año, una convincente razón para llegar a una mayor utilidad y salida rentable para este subproducto de la industria de chocolate (Sotelo *et al.*, 2015).

#### **II.1.4 Composición de la vaina de cacao**

Ozung, Kennedy Oko y Agiang (2016) reportan la composición proximal y las fracciones de fibra de los tratamientos de la harina de vaina de cacao (HVC) cruda, fermentada y tratada con agua caliente, (**Tabla 1**). Los valores de proteína cruda fueron 9.37, 7.70 y 8.94 % para la HVC cruda, fermentada y tratada con agua caliente, respectivamente. La porción cruda registró el más alto contenido de fibra cruda (61.80%), seguido de la porción fermentada (57.42%) y el valor mínimo registrado fue la porción tratada con agua caliente (53.37%). Sin embargo, la tendencia se revirtió para los contenidos de extracto de etéreo (EE), ceniza y extracto libre de nitrógeno ya que los valores más altos se registraron en la porción tratada con agua caliente, seguido de la porción fermentada y el más bajo en la porción cruda. Los valores de EE fueron 8.83, 9.52 y 11.68%, mientras que los valores de contenido de cenizas fueron 9.30, 10.80 y 10.85% y los valores de extracto libre de nitrógeno fueron 10.70, 14.56 y 15.16%, respectivamente, para los grupos de HVC cruda, fermentada y agua caliente. Los valores de fibra detergente ácida y fibra detergente neutra fueron más altos en la porción fermentada (73.09 y 79.45%, respectivamente), seguidos por la porción cruda (68.64 y 75.08%,

respectivamente) y finalmente la harina de vaina de cacao tratada con agua caliente (64.60 y 71.09%, respectivamente)

Los valores de composición mineral de los diferentes tratamientos de HVC presentan en la **Tabla 2**. La porción cruda registró los valores más altos de calcio (11.16 g / kg), magnesio (2.79 g / kg), fósforo 0.51 g / kg y potasio (1.98 g / kg) y el menor contenido de sodio (0.35 g / kg). La porción tratada con agua caliente fue el siguiente en contenido de calcio (7.23 g / kg) y el menor valor se registró en la HVC fermentada (5.65 g / kg). Muestras fermentadas registraron los siguientes valores para (2.44, 0.30, 1.07 y 0.48 g / kg) magnesio, fósforo, potasio y sodio, respectivamente. HVC tratada con agua caliente tuvo magnesio (1.53 g / kg), fósforo (0.47 g / kg), potasio (1.15 g / kg) y sodio (0.74 g / kg), respectivamente (Ozung *et al.*, 2016).

**Tabla 1.** Composición proximal y fracciones de fibra de la harina de vaina de cacao (HVC) cruda y procesada.

Parámetro (%)	HVC			
	C	F	AC	EE
<i>Materia seca</i>	94.60	84.4	85.28	3.27
<i>Proteína Cruda</i>	9.37	7.7	8.94	0.5
<i>Fibra Cruda</i>	61.80	57.42	53.37	2.44
<i>Extracto Etéreo</i>	8.83	9.52	11.58	0.86
<i>Cenizas</i>	9.3	10.8	10.85	0.51
<i>Extracto libre de Nitrógeno</i>	10.7	14.56	15.16	1.40
<i>Fibra detergente ácida</i>	68.64	73.09	64.6	2.46
<i>Fibra detergente neutra</i>	75.08	79.45	71.09	2.42
<i>Total de nutrientes digeribles</i>	1.52	1.28	1.43	0.07

HVC, harina de vaina de cacao. Cruda (C), fermentada (F), tratada con agua caliente (AC), error estándar (EE) E.E, error estándar (Ozung *et al.*, 2016)

**Tabla 2.** Composición mineral de harina de vaina de cacao cruda y procesada.

Mineral(g/kg)	C	F	AC	EE
Calcio (Ca)	11.16	5.65	7.23	1.64
Magnesio (Mg)	2.79	2.44	1.53	0.38
Fósforo (P)	0.51	0.30	0.47	0.06
Potasio (K)	1.98	1.07	1.15	0.29
Sodio (Na)	0.35	0.48	0.74	0.11

HVC, harina de vaina de cacao. Cruda (C), fermentada (F), tratada con agua caliente (AC), error estándar (EE) E.E, error estándar. (Ozung *et al.*, 2016)

La composición de aminoácidos de VC se muestra en la **Tabla 3**. Los datos limitados disponibles sobre la composición de las VC (Okai *et al.*, 1984) tienden a confirmar los resultados obtenidos en el estudio de Donkoh *et al.*, (1991).

**Tabla 3.** Composición de aminoácidos en la vaina de cacao.

Componente (%DM)	Donkoh <i>et al.</i> , (1991)	Okai <i>et al.</i> , (1984)
Ácido aspártico	0.80	0.74
Alanina	0.44	0.35
Arginina	0.22	0.26
Cisteína	0.09	-
Glicina	0.29	0.34
Ácido Glutámico	0.77	0.81
Histidina	0.21	0.18
Isoleucina	0.24	0.29
Leucina	0.43	0.49
Lisina	0.40	0.35
Metionina	0.05	0.04
Fenilalanina	0.37	0.30
Prolina	0.38	0.40
Serina	0.41	0.35
Treonina	0.30	0.34

<i>Triptófano</i>	0.04	-
<i>Tirosina</i>	0.21	0.18
<i>Valina</i>	0.44	0.40

## II.1.5 Compuestos bioactivos en la vaina

### II.1.5.1 Pectinas

Diversos autores han evaluado los efectos de las condiciones de extracción de pectinas, principalmente pH, temperatura y tiempo, así como el uso de diferentes extractantes ácidos. Dependiendo de la materia prima y las condiciones, se obtienen diferentes respuestas. Vriesmann *et al.*, (2011) obtuvieron las pectinas de la HVC con extracción acuosa caliente. La muestra obtenida a 50 °C se denominó 50W (agua a 50 °C) y la muestra obtenida a temperatura de ebullición (100 °C) se denominó BW (agua hirviendo), las pectinas se extrajeron con alto rendimiento, usando extracción acuosa caliente. La fracción 50W tuvo un rendimiento del 7.5% y BW tuvo un rendimiento del 12.6% de HVC seco. El aumento en el rendimiento estuvo directamente relacionado con el aumento en la temperatura de extracción.

Por otro lado, Yapo y Koffi (2013) reportan un rendimiento en extracción de pectinas de la vaina de cacao de 3.7 a 8.6%, bajo diferentes resistencias ácidas y el valor más alto está de acuerdo con los rendimientos de pectina reportados en diversas condiciones optimizadas: 8-11% para ácido acético-pH 2.8 / 95-100 °C / 20 min (Adomako, 1972); 9.7% para SHMP-ácido cítrico-pH 3.5-4.5 / 75 °C / 60 min (Mohamed & Hasan, 1995); 8 - 9% para HCl - pH 2.5 / 95 °C / 60 min (Mollea *et al.*, 2008); 8.0-9.8% para HNO<sub>3</sub>-pH 1.5 / 100 °C / 30 min (Vriesmann *et al.*, 2011) y 7.6% para ácido cítrico-pH 2.5 / 95 °C / 180 min (Chan & Choo, 2013). Sin embargo, este rango de rendimiento de pectina es menor que el informado por Ramli y Asmawati (2011) (10.44-17.30%) en condiciones que usan ácido oxalato-crítico de amonio-pH 1.6-4.6 / 85 °C / 60-120 min, probablemente debido a diferencias en los extractantes y/o en el origen del cacao (Yapo & Koffi, 2013).

### *II.1.5.2 Fibra dietética*

El contenido relativamente alto de polisacáridos sin almidón (42.0%) de la VC presagia buen potencial de fibra dietética. La cantidad de fibra dietética total en la VC es del 59.0%, incluyendo 11.0 y 48.0% de fibra dietética soluble e insoluble, respectivamente (Yapo *et al.*, 2013). En comparación con otras fuentes de fibra dietética, el contenido de fibra dietaria total de la VC es más alto que los subproductos de cítricos (35.40-36.9%), manzana (51.11%) y banano (32.9-51.9%) pero más bajos que los subproductos de fibra de coco (63.24%), cáscara de guisante (75.12%) y corteza de fruta de la pasión amarilla (73.5-81.9%) (Yapo *et al.*, 2013).

Dentro de los residuos glucosilados, la glucosa (~ 15.0%) y el ácido galacturónico (~ 10.0%) son los dos residuos principales de monosacáridos, lo que indica que la celulosa y las sustancias pécticas son los polisacáridos sin almidón predominantes en la VC (Yapo *et al.*, 2013).

### *II.1.5.3 Compuestos antioxidantes*

Valadez Carmona *et al.*, (2017) obtuvo un contenido fenólico de VC fresca de  $323.7 \pm 26.5$  mg equivalentes de ácido gálico (GAE, por sus siglas en inglés), por 100 g en materia seca (d.m.; por sus siglas en inglés), que es comparable a los contenidos informados por (Martínez *et al.*, 2012) para VC ecuatorianos (206.67 y 365.33 mg GAE / 100 g). Los contenidos de flavonoides y flavanoides de la VC fresca fueron de 97 mg EE / 100 g d.m. y 34 mg EE / 100 g d.m.

El contenido de compuestos fenólicos aumenta en la VC seca, a través del tiempo de secado. Las muestras de VC secadas por microondas y secado en frío muestran mayores incrementos en el contenido fenólico en comparación con la muestra secado por aire caliente. El contenido fenólico total cambia en la VC usando secado por frío, de  $323.7 \pm 26.5$  mg GAE / 100 g d.m. a  $1893 \pm 139$  mg GAE / 100 g d.m., seguido por secado por microondas y secado por aire caliente. En contenido

flavonoide total, el secado por frío y secado por microondas inducen aumentos desde 97 mg EE / 100 g d.m. a 601 mg EE / 100 g d.m., mientras que el secado por aire caliente muestra solo un aumento de 3 veces en comparación con la muestra fresca. El contenido flavonol total muestra un cambio similar al del contenido flavonoide total, excepto que el aumento es 6 veces para secado por microondas y secado por aire frío (de 34 mg EE / 100 g dm a 214 mg EE / 100 g d.m.) y 2.5 veces para el secado por aire caliente en comparación con la muestra fresca de la VC (Valadez-Carmona *et al.*, 2017).

Valadez-Carmona *et al.*, (2017) también cuantificó catequina, quercetina, (-) - epicatequina y ácido gálico, cumárico y protocatechuico en la VC. (Tabla 4).

**Tabla 4.** Perfil fenólico de la vaina de cacao ( $\mu\text{g/g}$ ).

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Cruda	Secado por aire caliente	Secado por microondas	Secado por Frío
<i>Catequina</i>	14.62	1024.7 $\pm$ 10.6	867.9 $\pm$ 28.7	2288.8 $\pm$ 16.9	844.0 $\pm$ 6.6
<i>Quercetina</i>	38.24	601.8 $\pm$ 11.2	190.3 $\pm$ 1.2	442.2 $\pm$ 33.6	535.1 $\pm$ 59.4
<i>(-)-Epicatequina</i>	10.70	594.4 $\pm$ 55.3	1589.5 $\pm$ 54.4	1986.6 $\pm$ 62.9	3699.2 $\pm$ 64.7
<i>Ácido gálico</i>	6.77	324.7 $\pm$ 19.6	973.4 $\pm$ 34	1224 $\pm$ 46.7	1347.4 $\pm$ 56.5
<i>Ácido Cumárico</i>	25.25	186.9 $\pm$ 19.6	504.9 $\pm$ 0.8	914.4 $\pm$ 10.8	3170.3 $\pm$ 45.8
<i>Ácido protocatechuico</i>	28.04	129.7 $\pm$ 0.6	120.8 $\pm$ 1.8	758.5 $\pm$ 58.9	479 $\pm$ 47.4
<i>Total</i>		2862.21	4246.8	7614.52	10075.83

(Valadez-Carmona *et al.*, 2017)

Ahora bien, de acuerdo a la **Tabla 5**, La capacidad antioxidante de extracto de VC es de 30.6  $\mu\text{M}$  equivalentes trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) por g, determinado con el ensayo ABTS, y 15.1  $\mu\text{M}$  TEAC / g, determinado con el ensayo DPPH (Tabla 5) (Valadez-Carmona *et al.*, 2017).

**Tabla 5** Efecto del proceso de secado sobre la capacidad antioxidante de la vaina de cacao.

Muestra	ABTS ( $\mu\text{M TE/g}$ )	DPPH ( $\mu\text{M TE/g}$ )
Cruda	30.6 $\pm$ 1.24	15.1 $\pm$ 1.5
Secado por aire caliente	64.5 $\pm$ 7.70	35.8 $\pm$ 2.3
Secado por microondas	89.38 $\pm$ 6	59.3 $\pm$ 6
Secado por frío	112.4 $\pm$ 24.5	70.8 $\pm$ 14

(Valadez-Carmona *et al.*, 2017)

## II.1.6 Potenciales beneficios a la salud

### II.1.6.1 Pectinas

Debido a que las VC están fácilmente disponibles, podrían usarse para recuperar compuestos de valor agregado como las pectinas. Las pectinas extraídas de varios subproductos vegetales (Sriamornsak, 2001).

Se usan ampliamente como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes y tienen varios efectos positivos en la salud humana, que incluyen la reducción del colesterol y los niveles de glucosa en suero, la reducción del cáncer y la estimulación de la respuesta inmune (Vriesmann *et al.*, 2011).

La pectina influye favorablemente en los niveles de colesterol en la sangre. Se ha informado que ayuda a reducir el colesterol en la sangre en una amplia variedad de sujetos y condiciones experimentales como se revisó exhaustivamente (Sriamornsak, 2001). El consumo de al menos 6 g / día de pectina es necesario para tener un efecto significativo en la reducción del colesterol. Las cantidades inferiores a 6 g / día de pectina no son efectivas (Ginter *et al.*, 1979). La pectina actúa como una sustancia profiláctica natural contra el envenenamiento con cationes tóxicos. Se ha demostrado que es eficaz para eliminar el plomo y el mercurio del tracto gastrointestinal y los órganos respiratorios (Kohn, 1982). Debido a su gran capacidad de unión de agua, la pectina da una sensación de saciedad, lo que reduce el consumo de alimentos. Los experimentos muestran una prolongación del

tiempo medio de vaciado gástrico de 23 a 50 min de una comida fortificada con pectina (Holt, Carter *et al.*, 1979). Estos atributos de la pectina se usan en el tratamiento de trastornos relacionados con la ingesta excesiva (Di Lorenzo *et al.*, 1988).

La pectina es un candidato interesante para uso farmacéutico, ej. como portador de una variedad de medicamentos de liberación controlada. Se han utilizado muchas técnicas para fabricar sistemas de liberación controlada basados en pectina, especialmente gelificación ionotrópica y recubrimiento de gel. Estas técnicas simples, junto con el perfil de toxicidad seguro, hacen que la pectina sea un excipiente prometedor para la industria farmacéutica para aplicaciones presentes y futuras (Sriamornsak, 2003).

#### *II.1.6.2 Minerales*

Varios minerales elementales se detectan en la VC, cuatro de los cuales (K, P, Ca y Mg) fueron cuantitativamente importantes (0.5-6.0%). La presencia de esos minerales necesarios para mantener las funciones vitales en las células humanas vivas la convierte en una fuente potencial de esos elementos (Yapo *et al.*, 2013).

Los minerales son constituyentes esenciales de estructuras esqueléticas tales como huesos y dientes; juegan un papel clave en el mantenimiento de la presión osmótica y, por lo tanto, regulan el intercambio de agua y solutos dentro del cuerpo del animal; sirven como constituyentes estructurales de los tejidos blandos; son esenciales para la transmisión de impulsos nerviosos y la contracción muscular; los minerales juegan un papel vital en el equilibrio ácido-base del cuerpo, y así regulan el pH de la sangre y otros fluidos corporales; también sirven como componentes esenciales de muchas enzimas, vitaminas, hormonas y pigmentos respiratorios, o como cofactores del metabolismo, catalizadores y activadores enzimáticos ("FAOSTAT", 2017).

### II.1.6.3 Fibra dietética

La Comisión del Codex Alimentarius, define la fibra dietética como "polisacáridos con diez o más unidades monoméricas, que no son hidrolizados por las enzimas endógenas en el intestino delgado de los seres humanos y que se fermentan en el intestino grueso por la acción de la microbiota intestinal" (Dhingra *et al.*, 2012). Se recomienda una ingesta diaria mínima de fibra dietética de 25 g (equivalente a 12.5 g de fibra dietética por cada 1000 calorías consumidas) (Yapo *et al.*, 2013). Con una mayor ingesta de fibra dietética, el peso de las deposiciones tiende a ser mayor y aumenta el tiempo de tránsito, lo que puede contribuir a la prevención de trastornos del intestino grueso como estreñimiento, diverticulitis y cáncer de intestino grueso (Elleuch *et al.*, 2011). La mayoría de los carbohidratos no absorbidos tienen efectos laxantes, tanto al aumentar la masa bacteriana o los efectos osmóticos, como al unirse al agua con la fibra no fermentada restante. La etiología del cáncer involucra factores heredados y ambientales (dietéticos) (Mudgil & Barak, 2013).

Estudios observacionales muestran consistentemente una asociación inversa entre la ingesta de fibra dietética y el riesgo de enfermedad coronaria (Mudgil & Barak, 2013). Los mecanismos postulados para niveles más bajos de colesterol total y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) incluyen alteraciones en la absorción del colesterol y la reabsorción de ácidos biliares, y alteraciones en el metabolismo hepático y eliminación de lipoproteínas en plasma (Theuwissen & Mensink, 2008). En algunos países, la evidencia de las propiedades reductoras del colesterol de ciertas fibras viscosas, especialmente los glucanos de la avena, se considera suficiente para los reclamos sobre la reducción del riesgo de enfermedad coronaria (**Tabla 6**) (Mudgil & Barak, 2013).

**Tabla 6.** Funciones y beneficios de la fibra dietaria en la salud humana.

Funciones	Beneficios
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Agrega volumen a la dieta, haciendo que se sienta lleno más rápido</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede disminuir el apetito</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Atrae agua y se convierte en gel durante la digestión, atrapando carbohidratos y disminuyendo la absorción de glucosa</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminuye la varianza de los niveles de azúcar en sangre</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Reduce el colesterol total y LDL</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce el riesgo de enfermedades de corazón</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Regula la presión sanguínea</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede reducir el riesgo de inicio o los síntomas del síndrome metabólico y la diabetes</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acelera el paso de alimentos a través del sistema digestivo</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilita regularidad</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Aumenta el volumen de las deposiciones</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alivia la constipación</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Balancea el pH intestinal y estimula la fermentación intestinal, produciendo ácidos grasos de cadena corta</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede reducir el riesgo de cáncer colorrectal</li> </ul>

(Dhingra *et al.*, 2012)

Algunos estudios de cohortes muestran una asociación inversa entre la ingesta de fibra dietética y el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Chandalia *et al.*, 2000). Hay algunas indicaciones de que las fibras viscosas como las pectinas y la goma guar retrasan el vaciamiento gástrico, y que el almidón digerido lentamente y el almidón resistente aumentan la saciedad (Mudgil & Barak, 2013). Posiblemente otras sustancias, aún no identificadas, en tales alimentos pueden explicar esto; quizás es la combinación general de la fibra dietética, los nutrientes y las sustancias bioactivas, que actúan sinérgicamente, lo que es fundamental para la salud. Sin embargo, también hay tipos aislados de fibra dietética, como almidón resistente, oligosacáridos no digeribles y polidextrosa que ayudan a prevenir y aliviar los

trastornos intestinales, y disminuyen los factores de riesgo de enfermedad coronaria y diabetes tipo 2 (Kaczmarczyk *et al.*, 2012).

#### *II.1.6.3.1 Ácidos grasos de cadena corta*

El sitio principal de producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el cuerpo humano es el colon, y requiere la presencia de bacterias fermentativas específicas. Los prebióticos ingeridos permanecen intactos a lo largo del tracto digestivo, hasta llegar al colon. Ahí, estos polímeros son una fuente de carbono perfecta utilizada por las bacterias probióticas del intestino, como las bacterias ácido-lácticas del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, que generan grandes cantidades de AGCC (junto con etanol y dióxido de carbono) (Fernández *et al.*, 2016).

El butirato se considera uno de los metabolitos del colon más importantes, ya que sirve como fuente principal de energía de los colonocitos, tiene propiedades antiinflamatorias y regula la expresión, diferenciación y apoptosis de los genes en las células huésped. El butirato se metaboliza de manera diferente en las células normales en comparación con las células de cáncer colorrectal (CCR), donde los AGCC bloquean su crecimiento y promueven su diferenciación y apoptosis. Las poblaciones con un menor consumo de grasas saturadas y carnes rojas, y niveles más altos de frutas y verduras (buenas fuentes de fibras prebióticas que conducen a AGCC) muestran menores incidencias de CCR. Los otros dos AGCC principales producidos por la microbiota del colon, acetato y propionato, no tienen un fuerte efecto antitumoral como el butirato. Los prebióticos podrían tener una actividad antiinflamatoria del colon basada en su capacidad de modular la microbiota intestinal, promoviendo la presencia de bacterias del ácido-lácticas y bifidobacterias, que son bacterias beneficiosas; mientras que reduce *Clostridium spp.* Debido a la producción de AGCC en el colon. Además, AGCC mejoran la función de barrera de la mucosa, reduce los niveles de mediadores proinflamatorios y estimula la producción de citoquinas inmunosupresoras (Fernández *et al.*, 2016).

#### II.1.6.4 Compuestos antioxidantes

Los polifenoles se encuentran entre los compuestos bioactivos de la VC. Generalmente se acumulan en las partes externas de las plantas, como conchas, pieles y cáscaras (Vriesmann *et al.*, 2011). La VC es una fuente potencial de material alimenticio rico en fibra dietética antioxidante, que puede usarse para compensar su escasez o falta total en dietas modernas refinadas actualmente asociadas a diversos trastornos inducidos por radicales libres (Yapo *et al.*, 2013).

Los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un papel bioquímico en el desarrollo del cáncer, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, las enfermedades reumáticas y las inflamatorias. Las enfermedades metabólicas y los contaminantes ambientales pueden aumentar las ROS en los tejidos, lo que lleva a un mayor estrés oxidativo en las células. Sin embargo; los antioxidantes pueden "eliminar" los radicales libres del cuerpo, reduciendo el estrés oxidativo y el posible desarrollo o progresión de muchos estados de enfermedad (Zumbé, 1998).

La capacidad antioxidante adicional de los polifenoles se ha demostrado *in vitro* por su capacidad para prevenir la peroxidación de lípidos, un tipo de lesión celular inducida por ROS y su capacidad para prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Zumbé, 1998). Con un alto nivel continuo de lípidos oxidados, el daño de los vasos sanguíneos puede conducir a la generación de células espumosas y placa, síntomas de la aterosclerosis. Además, la LDL oxidada es citotóxica y puede dañar directamente las células endoteliales (Lobo *et al.*, 2010).

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el óxido nítrico y sus metabolitos biológicos, desempeñan un papel importante en la carcinogénesis. Los antioxidantes pueden disminuir la carcinogénesis inducida por el estrés oxidativo mediante una eliminación directa de ROS y/o mediante la inhibición de la proliferación celular secundaria a la fosforilación de la proteína (Lobo *et al.*, 2010).

El efecto antígenotóxico de catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina se ha demostrado *in vitro*, proporcionando protección a organismos tales como *S.typheriurn* y *E. coli* contra la mutación después de la exposición a una amplia gama de carcinógenos conocidos. El efecto protector, antígenotóxico de los polifenoles también se ha demostrado en estudios *in vitro* de células de mamíferos después de la exposición a inductores de cáncer tales como nitrosamina, benzo [a] pireno, aflatoxina BI, humo de tabaco y extractos de carne ahumada. Además, se ha encontrado que los polifenoles previenen el daño del ADN *in vitro* e *in vivo* después de la exposición a estos tipos de compuestos (Agarwal & Mukhtar, 1996).

Investigaciones sugieren que los radicales libres tienen una influencia significativa en el envejecimiento, que el daño de los radicales libres se puede controlar con una defensa antioxidante adecuada, y que la ingesta óptima de nutrientes antioxidantes puede contribuir a una mejor calidad de vida, incluso que los antioxidantes pueden influir positivamente en la duración de la vida (Lobo *et al.*, 2010).

### **II.1.7 Proceso de digestión gastrointestinal**

La digestión es un proceso complejo que es esencial para la salud donde los alimentos ingeridos se descomponen en nutrientes que el cuerpo humano puede usar para el crecimiento, el mantenimiento y la energía. Durante la digestión humana, los dos procesos principales que ocurren simultáneamente son las transformaciones mecánicas que reducen el tamaño de los componentes de los alimentos y las transformaciones enzimáticas donde las macromoléculas se hidrolizan en elementos más pequeños que se absorben en el torrente sanguíneo. La desintegración de los alimentos ocurre comúnmente en la boca y el estómago, mientras que la digestión enzimática y la absorción de nutrientes tienen lugar en el intestino delgado. Los materiales no absorbidos viajan al intestino grueso para la absorción de agua y electrolitos, la reabsorción de sales biliares, la formación, el

almacenamiento y la eliminación de heces, y la fermentación de polisacáridos y fitoquímicos por la microbiota intestinal (Moon *et al.*, 2016).

#### *II.1.7.1 Modelos in vitro para la evaluación del proceso gastrointestinal*

Los modelos de digestión *in vitro* proporcionan una alternativa útil a los modelos animales y humanos mediante el examen rápido de ingredientes alimentarios. El método ideal de digestión *in vitro* proporciona resultados precisos en poco tiempo y podría servir como una herramienta para el análisis de alimentos o sistemas de liberación con diferentes composiciones y estructuras (Hur *et al.*, 2011).

Campos-Vega *et al.*, (2016) reportan que durante el proceso de fermentación *in vitro*, los lactobacilos contribuyen a la liberación de sustancias promotoras de salud (como flavonoides) de las estructuras de las plantas. Además, que los *Bacteroides* están positivamente correlacionados con la producción del propionato, mientras que los *Ruminococcaceae* y *Faecalibacterium* están correlacionados con la producción de butirato.

Las condiciones *in vivo* no simulan por completo en condiciones *in vitro*. La aplicabilidad de los resultados depende de una alta correlación con los valores *in vivo* obtenidos en condiciones estandarizadas usando material idéntico (Boisen & Eggum, 1991). Las características de los alimentos, tipo de enzima y concentraciones de enzimas son factores clave que controlan la digestión de los alimentos durante la digestión *in vitro*. El tiempo de digestión para cada paso (por ejemplo, boca, estómago e intestino delgado) es otro factor importante para establecer al diseñar un modelo de digestión *in vitro* apropiado (Hur *et al.*, 2011).

Varios investigadores han utilizado métodos de digestión *in vitro* para analizar los cambios estructurales, la biodisponibilidad y la digestibilidad de los alimentos, lo que indica que estos sistemas de digestión son herramientas comunes y útiles para el análisis de alimentos y drogas (Hur *et al.*, 2011).

### II.1.8 Cáncer de colon

Una neoplasia o tumor es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento y proliferación excesivos e incontrolados de células anormalmente diferenciadas estructural y biológicamente, que pueden originarse en cualquier tejido del cuerpo. Los tumores benignos no se infiltran a través de los tejidos locales y no hacen metástasis. Pueden dejar de crecer y retroceder; raramente son fatales. Por el contrario, las neoplasias malignas, incluido el cáncer, no son similares a sus tejidos parentales y se componen de células cada vez más anormales en términos de su forma y función celular/estructural. La mayoría de los tumores malignos crecen rápidamente, se diseminan progresivamente a través de tejidos adyacentes y hacen metástasis a sitios distantes (Tanaka, 2009).

El CCR es el cuarto cáncer más común en hombres y el tercer cáncer más frecuente en mujeres en todo el mundo. Se ha observado una disminución de las tasas de mortalidad por CCR, probablemente debido a la detección y/o al tratamiento apropiado, sin embargo, existe un aumento en las tasas de mortalidad en países con recursos limitados, como México y Brasil en América del Sur, Rumania y Rusia en Europa del Este (Center *et al.*, 2009).

El CCR comienza en el revestimiento interno del colon y/o recto como un crecimiento de tejido llamado pólipo que crece lentamente a través de algunas o todas sus capas. Un tipo particular de pólipo llamado pólipo adenomatoso o adenoma es un tumor benigno que puede sufrir una transformación maligna al cáncer. Esta transformación maligna es el resultado de la mutación o delección de genes reguladores principales, lo que resulta primero en una hiperplasia que se mueve de adenoma a carcinoma y luego metástasis (Mundade *et al.*, 2014).

Varios factores de riesgo están asociados con la incidencia del CCR. Aquellos que un individuo no puede controlar incluyen edad y factores hereditarios. Además, como una cantidad sustancial de factores de riesgo ambientales y de estilo de vida pueden jugar un papel importante en su desarrollo (Hagggar & Boushey,

2009). La dieta influye en el riesgo de CCR, y los cambios en los hábitos alimenticios lo pueden reducir hasta el 70% (Willett, 2005). La implicación de la grasa, como posible factor etiológico, está relacionada con el concepto de la dieta occidental típica, que favorece el desarrollo de una flora bacteriana capaz de degradar sales biliares a compuestos N-nitrosos potencialmente cancerígenos. El alto consumo de carne también se ha visto implicado en el desarrollo de este cáncer (Larsson & Wolk, 2006); algunas carnes se cocinan a altas temperaturas, lo que resulta en la producción de aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos, ambos de los cuales se cree que tienen propiedades carcinogénicas (Santarelli *et al.*, 2008). Estudios sugieren que las personas que consumen una dieta baja en frutas y verduras pueden tener un mayor riesgo de CCR; sobre la base de que el aumento de la ingesta de fibra dietética puede diluir el contenido fecal, aumentar el volumen fecal y reducir el tiempo de tránsito (American Institute for Cancer Research & World Cancer Research Fund, 2007).

#### *II.1.8.1 Carcinogénesis*

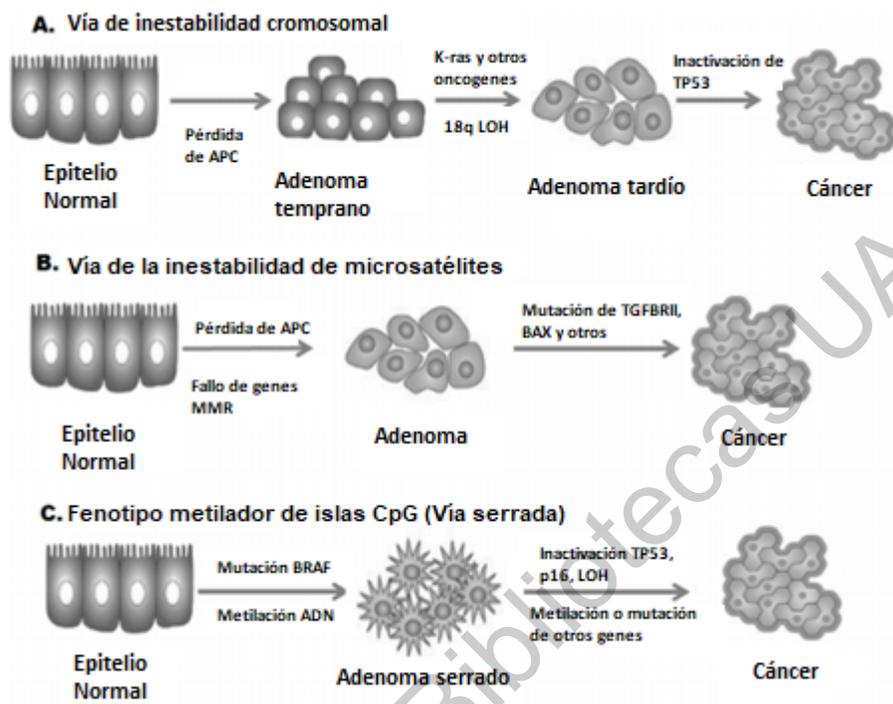
La mayoría de los CCR son esporádicos y no hereditarios, lo que hace la detección temprana tan importante. Los CCR esporádicos se desarrollan a través de alteraciones multi-paso y multigenéticas. Los cánceres se caracterizan por alternancias en ciertas vías de señalización, por lo que la identificación de la vía aberrante permite la terapia dirigida hacia vías específicas (Tanaka, 2009). Hay tres mecanismos genéticos principales responsables del CCR esporádico; la vía de la inestabilidad cromosómica (CIN, por sus siglas en inglés); vía de la inestabilidad de microsatélites (MSI, por sus siglas en inglés) y el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, por sus siglas en inglés). La mayoría de los CCR esporádicos se deben a eventos que resultan de aberraciones en la vía CIN.

La ruta CIN (**Figura 3A**) es un modelo de secuencia de adenoma-carcinoma que sugiere que un patrón gradual de activación mutacional de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores (Vogelstein *et al.*, 1988). Los cambios

genómicos incluyen la activación de los proto-oncogenes KRAS, c-Src, c-Myc y la inactivación de al menos tres genes supresores de tumores, como la pérdida del gen poliposis coli adenomatoso (APC, por sus siglas en inglés), el gen supresor tumoral p53 (TP53) y heterocigosidad para el brazo largo del cromosoma 18 (18q LOH) (Vogelstein & Kinzler, 1993; Willett, 2005).

MSI es la condición de hipermutabilidad genética de los genes de reparación de falta de concordancia (MMR, por sus siglas en inglés) de ADN dañado (**Figura 3B**). En otras palabras, MSI es la evidencia fenotípica de que la MMR no está funcionando normalmente. Las proteínas involucradas en MMR forman un complejo que se une al desajuste, identifica la cadena correcta de ADN, luego elimina el error y repara el desajuste. Las células con MMR anormalmente funcional tienden a acumular mutaciones (inserciones o deleciones) en microsatélites localizados en regiones que codifican ADN, generando mutaciones de desplazamiento del marco de lectura y conduciendo posteriormente a CCR esporádicos (Geiersbach & Samowitz, 2011).

El nombre de la vía serrada es atribuible a la apariencia de lesiones precursoras morfológicamente serradas o dentadas (**Figura 3C**). El fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) y la mutación del oncogén BRAF (proteína quinasa B-Raf) se pueden rastrear desde cánceres hasta sus precursores dentados (Leggett & Whitehall, 2010). A diferencia de las rutas CIN y MSI, en las que los CCR esporádicos se inician principalmente a través de mutaciones clásicas de APC, los CCR iniciados por la ruta serrada se destacan por la presencia de la mutación BRAF y el silenciamiento epigenético de los genes implicados en diferenciación celular, reparación del ADN y control del ciclo celular (Jass *et al.*, 2002).



**Figura 3** Múltiples vías genéticas en la patogénesis del cáncer colorrectal

Imagen obtenida de: (Mundade et al., 2014)

### II.1.8.2 Mecanismos de muerte celular en cáncer

El equilibrio entre la división celular y la muerte celular es de suma importancia para el desarrollo y mantenimiento de organismos multicelulares. Los trastornos de cualquiera de los procesos tienen consecuencias patológicas y pueden provocar una embriogénesis alterada, enfermedades neurodegenerativas o el desarrollo de cáncer. Por lo tanto, el equilibrio entre la vida y la muerte está estrechamente controlado y los elementos defectuosos se pueden eliminar de manera efectiva mediante un proceso llamado "muerte celular programada" (Danial & Korsmeyer, 2004). Es de destacar que la apoptosis, la autofagia y la necrosis son las tres formas principales de muerte celular programada, que se distinguen fácilmente por sus diferencias morfológicas (Bialik et al., 2010; Tan et al., 2009).

#### *II.1.8.2.1 Autofagia*

Se caracteriza por el secuestro de citoplasma y organelos, en vesículas autofágicas de doble o multimembrana y su subsecuente degradación por el sistema lisosómico de la célula (la autofagia significa auto digestión en griego). Sirve para eliminar proteínas de larga vida y componentes de organelos; tiene una función importante en la remodelación celular debido a la diferenciación, el estrés o el daño inducido por las citoquinas. Las células que se someten a autofagia excesiva desencadenan una muerte no apoptótica, sin activación de caspasas (Gozuacik & Kimchi, 2004).

#### *II.1.8.2.2 Necrosis*

Siempre se ha considerado como muerte celular "accidental", un proceso aleatorio e incontrolado. Cuando las células se someten a la muerte celular de esta manera, se rompe la integridad de la membrana celular de modo que el material intracelular se libera hacia el medio extracelular, lo que lleva a la respuesta inflamatoria del sistema inmune (Agostinis *et al.*, 2004; Zong *et al.*, 2004).

#### *II.1.8.2.3 Apoptosis*

Se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos específicos de las células terminales, que incluyen contracción celular, condensación y fragmentación nuclear, protuberancias dinámicas de la membrana y pérdida de adhesión a células vecinas o a la matriz extracelular (Nishida *et al.*, 2008). Los cambios bioquímicos incluyen la escisión del ADN a fragmentos internucleosomales, externalización de la fosfatidilserina y una serie de escisiones de sustrato intracelular por proteólisis específica (Cohen *et al.*, 1994; Martin & Green, 1995). Existen dos vías principales para inducir la apoptosis, la vía del receptor de muerte (extrínseca) y la vía mitocondrial (intrínseca) (**Figura 4**) (Eum & Lee, 2011).

Actualmente se cree que la cascada de cisteína proteasa específica de aspartato (caspasa) es la vía principal por la cual se orquesta la apoptosis (Alnemri *et al.*, 1996; Martin & Green, 1995). Varias caspasas se expresan constitutivamente

en células y residen en el citosol en una forma inactiva (Wolf & Green, 1999). La más prevalente es caspasa-3, que cuenta con el respaldo de caspasa-6 y caspasa-7. Estas 3 caspasas a menudo se conocen como las "caspasas ejecutoras" debido a su papel en la coordinación de la muerte de la célula. En general, la activación de caspasas requiere su escisión, preferentemente después de un residuo de aspartato (Stennicke & Salvesen, 1998). que conduce a la formación de la enzima activa a partir de la preforma inactiva. La caspasa activa es un tetrámero de 2 subunidades grandes y 2 pequeñas, con 2 sitios activos (Wolf & Green, 1999). Dado que la escisión proteolítica genera las caspasas, una forma en que se activan estas enzimas es a través de la acción de las proteasas, incluidas otras caspasas. Por lo tanto, las caspasas pueden funcionar en una cascada de activación. Las caspasas "río arriba", como la caspasa-8 y la caspasa-9, se denominan caspasas iniciadoras, lo que indica su papel en el desencadenamiento de la apoptosis activando a las ejecutoras (Zimmermann & Green, 2001).

#### Vía extrínseca

La familia del receptor de muerte que incluye el receptor del factor de necrosis tumoral TNF-R1, Fas, DR3, TRAIL-R1 / 2 (DR4 / 5) y DR6 puede iniciar la ruta extrínseca que conduce a la apoptosis (Sayers, 2011). La similitud entre los miembros de esta familia se basa principalmente en las regiones citoplásmicas de los receptores, es decir, los dominios de muerte, que cuando se unen a sus ligandos apropiados reclutan el dominio de muerte asociado a Fas (FADD, por sus siglas en inglés). Cuando pro-caspasa-8 se hidroliza en caspasa-8 activa (proteína que contiene el dominio efector de la muerte), la proteína adaptadora reclutada que contiene el dominio efector de muerte puede interactuar con el dominio efector de muerte de pro-caspasas-8-10, agregándose así como complejo de señalización inductor de muerte (DISC, por sus siglas en inglés) (Mannick *et al.*, 1999). Se producen estímulos cuando la proteína Fas se combina con el ligando Fas-L, el complejo de muerte recluta FADD y procaspasa-8, se inicia la formación del DISC para activar la caspasa-8 (Bell *et al.*, 2008; Sun, 2011).

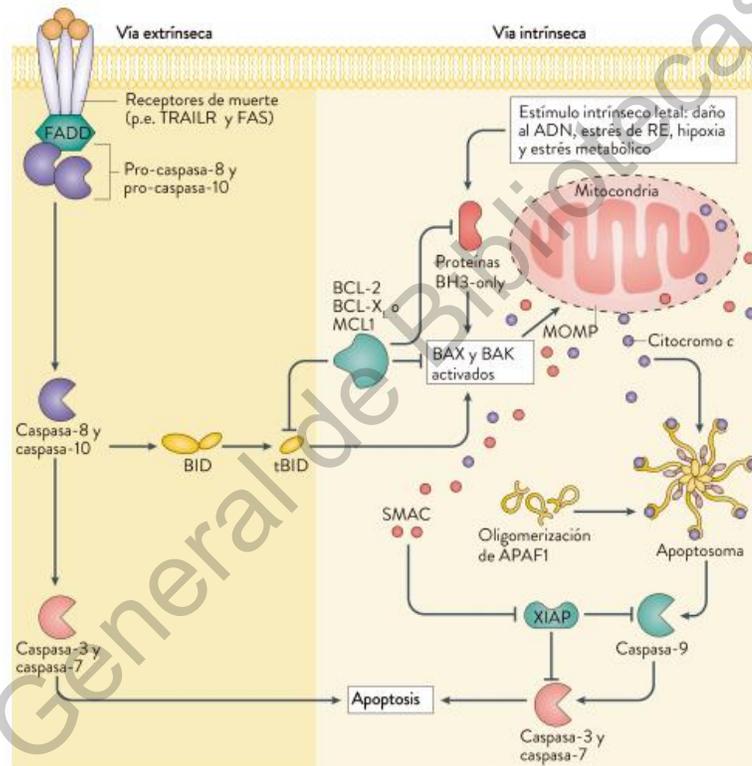
En algunas células, la activación de la caspasa 8 puede ser el único requerimiento para ejecutar la muerte, mientras en otras células, la caspasa 8 interactúa con la vía apoptótica intrínseca mediante la escisión de Bid (un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) llevando a la subsecuente liberación de citocromo C (Wajant, 2002).

#### Vía intrínseca

Uno de los reguladores más importantes de esta vía es la familia de proteínas Bcl-2, que incluye miembros proapoptóticos tales como Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim e Hrk, y miembros antiapoptóticos tales como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1 (Reed, 1994). Los miembros antiapoptóticos Bcl-2 actúan como represores de la apoptosis bloqueando la liberación de citocromo-c, mientras que los miembros proapoptóticos actúan como promotores (Reed, 1997). En respuesta a los estímulos apoptóticos, la membrana mitocondrial externa se vuelve permeable, lo que lleva a la liberación del citocromo-c y del segundo activador de la caspasa derivado de las mitocondrias (Reed, 1997).

Ocurre la formación de un "apoptosoma" (que consiste en citocromo c, factor de activación de proteasa apoptótica -1 [Apaf-1] y procaspasa-9) y depende tanto del citocromo c de la mitocondria como del ATP o dATP en la célula (Zou *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1999). Apaf-1 es una proteína contenida en el citosol, y el citocromo c se une e induce su oligomerización. Esto luego recluta una caspasa de iniciadora, procaspase-9 (Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1999). A diferencia de otras caspasas, procaspasa-9 no parece activarse simplemente por escisión, sino que debe estar unido a Apaf-1 para estar activa (Rodriguez & Lazebnik, 1999; Stennicke *et al.*, 1999). Estas proteínas interactúan a través de dominios de reclutamiento de caspasa (CARD, por sus siglas en inglés). El apoptosoma, recluta a procaspasa-3, que se escinde y activa por la caspasa-9 activa y se libera para mediar la apoptosis. Se descubrió una nueva proteína con el nombre dual SMAC / DIABLO (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000), que también se libera de las mitocondrias junto con el citocromo c durante la apoptosis. Esta proteína promueve la activación de las

caspasas al asociarse con el apoptosoma e inhibir las proteínas inhibidoras de apoptosis. Se ha demostrado que el citocromo c y SMAC / DIABLO se liberan de forma coordinada. Mientras que el citocromo c activa Apaf-1, SMAC / DIABLO mitiga la inhibición en las caspasas por proteínas inhibidoras de apoptosis, y la apoptosis puede proceder (De Laurenz & Melino, 2000; Deshmukh & Johnson Jr, 1998). Las caspasas activas conducen a la escisión de la lámina nuclear y la descomposición del núcleo a través de la caspasa-3 (Reed, 1997).



**Figura 4** Vías de señalización de apoptosis.

Imagen obtenida de: (Soto Krarup, 2018)

### II.1.8.3 Inhibidores de enzima histona deacetilasa y muerte celular

La alteración epigenética, que se refiere a la regulación de la expresión génica mediante la modificación postraduccional de la estructura de la cromatina sin cambios en la secuencia de ADN subyacente, desempeña funciones cruciales en diversos procesos celulares fisiológicos y patológicos ((Jaenisch & Bird, 2003). En particular, la acetilación, una de las modificaciones más comunes en epigenética,

sirve como un mecanismo regulador clave para la estructura de la cromatina y la expresión génica (Sternier & Berger, 2000). La acetilación está estrechamente gobernada por acciones opuestas de dos grandes familias de enzimas: las acetiltransferasas de histonas (HAT) y las histonas deacetilasas (HDAC): la hiperecetilación del extremo N de las colas de histonas inducida por HAT produce una cromatina abierta que se correlaciona frecuentemente con la activación génica, mientras que se ha demostrado que la desacetilación por HDAC media una confirmación de cromatina cerrada y supresión transcripcional. Se ha reconocido ampliamente en los últimos años que las HDAC son objetivos prometedores para intervenciones terapéuticas destinadas a revertir los estados de acetilación aberrantes (Zhang & Zhong, 2014). El tratamiento de las células tumorales con inhibidores de HDAC (HDACi) puede conducir a la acetilación de histonas y la represión de la expresión génica, lo que aumenta la susceptibilidad de las células tumorales a la apoptosis (Frew, Johnstone, & Bolden, 2009). La inducción de apoptosis parece ser la ruta predominante de muerte celular inducida por HDACi (Zhang & Zhong, 2014). Varios estudios han demostrado que los HDACi inducen selectivamente la expresión de miembros proapoptóticos como Bax, Bak, Noxa, Bim y Puma e inhiben los antiapoptóticos Mcl-1, Bcl-XL y expresión de Bcl-2 (Shankar & Srivastava, 2008). Si bien la inducción de apoptosis parece ser el mecanismo predominante de la muerte celular mediada por HDACi, los mecanismos alternativos de muerte celular como la autofagia pueden ser estimulados cuando las proteínas o vías apoptóticas están desactivadas, aunque los eventos moleculares necesarios para la autofagia mediada por HDACi no han sido elucidados (Frew *et al.*, 2009).

#### *II.1.8.4 Técnicas para identificar necrosis*

Históricamente, la muerte celular necrótica se evalúa determinando el daño de la membrana plasmática. Los ensayos de citotoxicidad para medir la necrosis se dividen principalmente en dos categorías: aquellos que se basan en la absorción diferencial de tintes de unión al ADN que no atraviesan la membrana plasmática de las células vivas, como el yoduro de propidio; y aquellos que se basan en la filtración

de moléculas intracelulares a través de la membrana plasmática afectada. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplásmica soluble que está presente en casi todas las células y se libera en el espacio extracelular cuando la membrana plasmática está dañada (Burd & Usategui-Gomez, 1973). Para detectar la fuga de LDH en el medio de cultivo celular, se usa una sal de tetrazolio. En el primer paso, la LDH produce nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) reducido cuando cataliza la oxidación de lactato a piruvato. En el segundo paso, una sal de tetrazolio se convierte en un producto de formazan coloreado usando NADH recién sintetizado en presencia de un aceptor de electrones (Korzeniewski & Callewaert, 1983). La cantidad de formazan puede cuantificarse colorimétricamente por espectroscopía estándar. Debido a la linealidad del ensayo, se puede usar para enumerar el porcentaje de células necróticas en una muestra (Chan *et al.*, 2013)

### **II.1.9 Modelos celulares utilizados en estudios *in vitro***

La tecnología de cultivo de células y tejidos tiene una posición central en la investigación biomédica moderna. Las células en cultivo son sistemas modelo útiles para estudiar los procesos fisiológicos y bioquímicos normales en las células e incluso se pueden usar con fines de diagnóstico. La principal ventaja de utilizar sistemas de cultivo celular es la consistencia y la reproducibilidad obtenidas. En la mayoría de las situaciones, las células o los tejidos deben cultivarse durante periodos más largos para obtener un número suficiente de células para el análisis. Alternativamente, las mismas células pueden propagarse continuamente en el laboratorio para su uso en experimentos repetidos. Las células normales (células primarias) suelen dividirse solo un número limitado de veces antes de entrar en la senescencia. Sin embargo, las células se pueden immortalizar mediante la transformación, un proceso que puede ocurrir espontáneamente o tratando las células con productos químicos o virus. El cultivo de células a largo plazo requiere técnicas asépticas bien establecidas para evitar la contaminación con bacterias,

levaduras, mohos o virus. La contaminación puede causar resultados erróneos y, finalmente, la pérdida de material celular valioso (Verhoeckx *et al.*, 2015).

#### *II.1.9.1 Línea celular HT-29*

La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 no solo se usa para estudiar la biología del cáncer de colon humano, sino que está recibiendo especial interés en estudios centrados en la digestión y biodisponibilidad de alimentos. Fue aislada de un tumor primario de una mujer caucásica de 44 años en 1964. Estas células han llamado la atención debido a que pueden expresar características de células intestinales maduras, como enterocitos o células productoras de moco. Cuando estas células se cultivan en condiciones apropiadas o después del tratamiento con diferentes inductores, se pueden modular para expresar diferentes vías de diferenciación de enterocitos. Por esta razón, HT-29 se considera una línea celular intestinal pluripotente, utilizada para el estudio de los eventos estructurales y moleculares implicados en la diferenciación celular (Verhoeckx *et al.*, 2015). El uso de HT-29 como modelo *in vitro* de células intestinales tiene algunas ventajas y limitaciones. Esta línea celular en su fenotipo diferenciado es similar a los enterocitos del intestino delgado con respecto a su estructura, y la presencia de hidrolasas asociadas al borde en cepillo y el tiempo del proceso de diferenciación es también comparable con intestino delgado. Son células malignas con un alto índice de consumo de glucosa y un deterioro del metabolismo de la glucosa; aunque imitan algunas características de los enterocitos del intestino delgado, son células colónicas; no se pueden comparar con los enterocitos del colon normal ya que expresan hidrolasas asociadas al borde en cepillo; no se pueden comparar con los enterocitos absorbentes porque no están presentes todas las hidrolasas (por ejemplo, lactasa y maltasa-glucoamilasa están ausentes) y las propiedades de transporte iónico son diferentes. En conjunto, es una herramienta complementaria a las estrategias *in vivo* y *ex vivo* para estudiar la digestión de los alimentos y el efecto de los componentes de los alimentos en el intestino (Verhoeckx *et al.*, 2015).

### III. Justificación

La industria del cacao ha tenido gran prosperidad debido a la demanda de chocolate y sus derivados, principalmente por los países europeos; por lo que, en México, la producción de cacao se ha convertido en una importante actividad. Sin embargo, a la vez que la fabricación mundial va en aumento, también lo hacen los residuos generados a partir de este oficio, que son una importante fuente de contaminación en las regiones de producción. En la búsqueda de una solución a este problema, se ha investigado el aprovechamiento de sus subproductos, de los cuales la VC representa el mayor desperdicio, pudiendo originar beneficios al medio ambiente y un valor agregado a dicho material.

Considerando que dentro de los componentes bioactivos en la VC, se encuentran minerales, antioxidantes, pectinas, entre otros; estos pueden presentar un efecto positivo sobre la salud humana. Además, mediante el alto contenido de fibra dietaria y los metabolitos obtenidos a partir de la fermentación colónica de dicha fibra (como los AGCC) se pueden predecir beneficios gracias a su actividad protectora y preventiva sobre enfermedades gastrointestinales como el cáncer de colon, que es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en México.

En condiciones *in vivo*, los nutrientes de los alimentos consumidos en la dieta se absorben en el intestino delgado, habiendo muchos factores involucrados en este proceso, tales como la matriz del alimento, el pH, enzimas etc. Por ello, el uso de la digestión *in vitro* y modelos de fermentación colónica puede proporcionar información sobre la bioaccesibilidad de los compuestos contenidos en la VC ya que no existe evidencia al respecto.

La información sobre la probable actividad prebiótica y capacidad antioxidante de la VC representa un importante aporte para su utilización como un agente bioactivo en productos e ingredientes alimenticios, proveniente de un subproducto del cacao. Por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar la bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* (boca, estómago, intestino delgado y colon)

de los compuestos nutraceuticos de la vaina de cacao, así como el efecto de los productos de su fermentación *in vitro* por microbiota colónica sobre la viabilidad de células de cáncer de colon humano.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## IV. Objetivos

### IV.1 Objetivo general

Evaluar el potencial nutracéutico y funcional *in vitro* de la vaina de cacao (*Theobroma cacao* L.).

### IV.2 Objetivos particulares

1. Analizar la composición nutritiva y nutracéutica de la vaina de cacao.
2. Determinar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de la vaina de cacao, así como su capacidad antioxidante, mediante un sistema *in vitro* de digestión gastrointestinal y obtener la fracción no digerible.
3. Determinar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de la fracción no digerible durante la fermentación colónica *in vitro*, y su capacidad antioxidante.
4. Evaluar el efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible de la vaina de cacao sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano.

## V. Materiales y métodos

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Materia prima

Se adquirieron vainas de cacao criollo, de la zona de Jalpa de Méndez, Tabasco. Se separó el mucílago y las semillas de cacao de las vainas. Las vainas fueron lavadas y desinfectadas manualmente en una solución de hipoclorito de sodio (2%) de acuerdo a lo descrito por Yapó *et al.*, (2013); se trituraron en molino hasta obtener una pasta, la cual se congeló a 4 °C hasta su utilización.

#### V.1.1.1 Procesamiento de cáscara de vaina de cacao

##### V.1.1.1.1 Secado en microondas

La pasta se extendió uniformemente, manteniendo un grosor de 1-3 mm en una placa giratoria, donde se secó, usando un horno de microondas (105 min; LG MS-1145KYL), hasta obtener una humedad de entre 4-8% (Thermobalance Liberty JN100MW) (Valadez-Carmona *et al.*, 2017); posteriormente se molió y se tamizó a través de una malla de 0.595  $\mu\text{m}$ , y se almacenó en un desecador hasta el análisis. Se obtuvo la muestra identificada como V-Microondas.

##### V.1.1.1.2 Secado por flujo de aire

La pasta se secó bajo un flujo de aire constante (45 °C / 24 h) usando un deshidratador (Excalibur, CA, EE. UU.). La muestra seca se molió y se tamizó a través de una malla de 0.595  $\mu\text{m}$ , y se almacenó en un desecador hasta el análisis. Se obtuvo la muestra identificada como V-Flujo.

#### V.1.1.1.2 Flujo de aire extruido

La muestra obtenida después del secado con flujo de aire, se dejó hidratar durante 12 h con agua (1: 0.5). Después de eso, la muestra se extruyó en un prototipo de un tornillo (45 cm) y dos camisas (15 y 10 cm). La extrusión se realizó según lo descrito por (Salazar Lopez *et al.*, 2016) con ligeras modificaciones. Brevemente, la temperatura de la primera camisa se controló a 60°C, mientras que la de la segunda camisa se ajustó a 160°C. La velocidad del tornillo fue de 15 rpm, y el diámetro del dado fue de 1.1 mm. Los extruidos se secaron en un horno a 40 ° C durante 24 h. Los productos secos se molieron y tamizaron con una malla de 0.595 µm y se almacenaron en un desecador hasta su análisis. Se obtuvo la muestra identificada como VF-Extrusión.

#### V.1.2 Compuestos químicos y animales

Los reactivos y solventes que se emplearon para la determinación de la composición química, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y la digestión gastrointestinal, fueron adquiridos de las marcas J. T. Baker y Sigma Aldrich. La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29, se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EUA).

Se emplearon por experimento 4 ratas macho Wistar (UNAM, Campus Juriquilla) de entre 250 – 300 g de peso, las que fueron sometidas a un ayuno de 16 h con agua *ad libitum*, con el fin de obtener el intestino delgado para llevar a cabo la técnica de saco intestinal invertido.

### V.2 Métodos

#### V.2.1 Análisis proximal

Se determinó la composición proximal de la VC, siguiendo la metodología descrita en la AOAC (2002). El contenido de carbohidratos (%) se obtuvo por diferencia de los componentes.

### V.2.1.1 Determinación de cenizas

Se determinó el contenido de cenizas de acuerdo con el método 945.46 descrito en la AOAC (2002). Se colocó a peso constante los crisoles necesarios en la estufa a 80 °C por 12 h o en la mufla a 550 °C por 2 h. Transcurrido el tiempo se sacó y se dejó en el desecador durante 40 min, para atemperarse. Se pesó cada uno de los crisoles y se registró su peso. Se pesó 4 g de muestra en los crisoles a peso constante, registrando su peso exacto y se calcinó en la mufla a 550 °C durante 5-6 h hasta obtener las cenizas blancas. Se bajó la temperatura de la mufla gradualmente y posteriormente se sacaron los crisoles y fueron colocados en el desecador durante 40 min. Finalmente se registró su peso y se realizaron los cálculos con la siguiente fórmula:

$$\%cenizas = \frac{W_{final} - W_{crisol}}{W_{muestra}} * 100$$

W = peso

### V.2.1.2 Determinación de humedad

La humedad se determinó de acuerdo con el método 925.23 descrito en la AOAC (2002). Se colocó a peso constante los crisoles necesarios en la estufa a 80 °C durante 12 h o por 3 h a 105 °C, transcurrido el tiempo se sacaron y se dejaron en el desecador durante 40 min. Se pesaron los crisoles registrando su peso. Se pesó 3 g de muestra en los crisoles, registrando su peso exacto. Posteriormente, se colocó el crisol con la muestra en la estufa a 130 °C durante 3 h. Se dejó enfriar los crisoles durante 40 min en el desecador y finalmente se registró el peso y se realizaron los cálculos con la siguiente fórmula:

$$\%humedad = \frac{(W_{crisol} + W_{muestra}) - W_{final}}{W_{muestra}} * 100$$

W = peso

### V.2.1.3 Determinación de lípidos

Los lípidos se determinaron de acuerdo con el método 920.39 descrito en la AOAC (2002). Primero, se colocó los matraces a peso constante en la estufa a 80 °C durante 12 h. Se colocaron 3 g de muestra en papel filtro del No. 1 y se registró el peso exacto; se metieron en los cartuchos y se tapó con algodón. Se vertió en los vasos de precipitado o matraz 2/3 partes de su volumen de éter de petróleo como solvente y se calentó manteniendo 10 reflujos/hr durante 4-5 h; el tiempo comienza a contar a partir del primer reflujo. Transcurrido el tiempo de extracción se recuperó el solvente, se secó el extracto en estufa a 100 °C por 12 h a peso constante. Se enfrió en el desecador por 40 min. Finalmente se pesó el matraz o vaso y se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ lípidos} = \frac{W \text{ Final} - W \text{ vaso o matraz}}{W \text{ muestra}} * 100$$

W=peso

### V.2.1.4 Determinación de proteína

Se determinó la proteína total de acuerdo con el método 920.15 descrito en la AOAC (2002). Se colocó en matraces de digestión tipo Kjeldhal, 1 g de muestra desgrasada, 3.5 g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 0.4 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) y se adicionaron 15 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Los tubos se colocaron en el digestor durante 3 h o hasta el cambio de color de la muestra a verde claro. Para la destilación se enfrió y se añadieron 100 mL de agua destilada, se agregaron 50 mL de NaOH al 40 %. Se recibió el destilado en un matraz con 25 mL de ácido bórico y se empleó como indicador rojo de metilo. Se tituló con NaOH 0.2 N previamente valorado. Finalmente se registraron los mililitros gastados de NaOH 0.2 N y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{(V H_2SO_4)(N) - (V NaOH)(N)(0.014)(100)}{\text{Peso de muestra}}$$

%P= (%N) (Factor)

\*El factor a utilizar es 6.25

### V.2.2. Composición nutracéutica

#### V.2.2.1 Fibra dietaria

##### V.2.2.1.1 Fibra insoluble

Se siguió la metodología de acuerdo con lo sugerido por Shiga *et al.*, (2003). Se pesó 1 g de muestra pulverizada y desgrasada; se adicionaron 50 mL de buffer de fosfato 0.08 mM a pH 6, así como 100 µL de α-amilasa, protegiendo el matraz de la luz. La muestra se incubó en baño maría a 95 °C por 30 min, agitando cada 5 min y se ajustó a pH 7.5 con la muestra atemperada. Se adicionó 100 µL de proteasa (5 mg/mL) y se incubó en baño María a 60 °C por 30 min con agitación continua, se ajustó pH a 4 con la muestra atemperada. Posteriormente se adicionó 300 µL de amiloglucosidasa y se incubó por 30 min a 60 °C con agitación continua. Se atemperó y se filtró en papel Whatman no.4 previamente pesado. Se realizaron 2 lavados con 15 mL de agua destilada a 60 °C, 2 lavados con 15 mL de etanol al 80 %. Se llevó a peso constante el filtro a 60 °C por 24 h, finalmente se registró el peso. La fibra insoluble se consideró como lo que queda en el filtro.

El cálculo se realizó en base seca y de acuerdo con el porcentaje de hidratos de carbono de la muestra.

$$\text{Cálculo de la fracción insoluble(\%)} = \frac{W_{\text{papel con muestra}} - W_{\text{papel solo}}}{W_{\text{muestra}}} * 100$$

#### V.2.2.1.2 Fibra soluble

De la prueba anterior, al líquido de filtración recuperado se le adicionó un volumen igual de etanol al 80 % y se dejó reposar por 12 h. Se filtró en papel Whatman No. 4 previamente pesado, se realizaron 2 lavados con 15 mL de etanol al 80 % y 2 con 15 mL de acetona. El papel filtro se dejó secar por 24 h a 60 °C. Se registró el peso. Los cálculos se realizaron con la siguiente fórmula:

$$\text{Cálculo de la fracción soluble (\%)} = \frac{W_{\text{papel con muestra}} - W_{\text{papel solo}}}{W_{\text{muestra}}} * 100$$

Fibra dietaria total (FDT)= Fibra dietaria insoluble + fibra dietaria soluble.

#### V.2.2.2 Extracción de compuestos antioxidantes

Se siguió la metodología de Valadez-Carmona *et al.*, (2017). Se pesó en un matraz 500 mg de VC, que fueron producidos a partir del secado por microondas, flujo de aire y flujo de aire y extrusión. Se agregaron 20 mL de acetona-agua-ácido acético (70:29.5:0.5). Los matraces se colocaron en una placa de agitación y se agitaron a 400 rpm por 60 min, a temperatura ambiente, en la obscuridad. Posteriormente, las muestras se centrifugaron por 30 min a 10,000 rpm, a 4 °C. Los sobrenadantes fueron colectados en viales individuales y almacenados a -20 °C hasta su uso.

##### V.2.2.2.1 Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales del sobrenadante de la VC se determinaron por triplicado utilizando el método de Folin-Ciocalteu, según lo descrito por Martínez *et al.*, (2012). La absorbancia se midió a 760 nm usando un lector de microplaca. Se construyó una curva de calibración usando ácido gálico como estándar en concentraciones que van de 10 a 70 µg / mL. Los resultados se expresaron en µg de equivalentes de ácido gálico (GAE) /g de masa seca de muestra (d.m.).

#### V.2.2.2.2 Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides totales en el sobrenadante de la VC se determinaron por triplicado de acuerdo con el método descrito por Maleyki & Ismail, (2010). La absorbancia se midió a 510 nm usando un lector de microplaca. Se construyó una curva de calibración usando (-) - epicatequina como el estándar con concentraciones que van de 8 a 80 µg / ml. Los resultados se expresaron en µg de equivalentes de rutina (ER) /g de muestra d.m.

#### V.2.2.2.3 Determinación de taninos condensados

Los taninos condensados se cuantificaron de acuerdo a la metodología de (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008). Se adicionaron 200 µL del reactivo de vainillina 1% - HCL 4% (en proporción 1:1) de manera dosificada (50 µL) a 50 µL de muestra; posteriormente la microplaca se leyó a una longitud de onda de 540 nm. Se preparó un blanco de 50 µL de solvente usado en la muestra. La curva de calibración se realizó con el estándar (+) catequina en un intervalo de concentración de 0.02 a 0.6 µg de (+) catequina / ml, la cual se preparó en metanol. La concentración de taninos condensados se expresó como µg de equivalentes de (+) catequina / g muestra.

#### V.2.2.2.4 Determinación de compuestos fenólicos por HPLC

Esta determinación se realizó a partir del extracto de compuestos antioxidantes descrito anteriormente. Dos mililitros de sobrenadante fueron ser filtrados a través de un filtro para jeringa de 0.45 µm e inyectados en el HPLC. Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) el análisis se llevó a cabo en un sistema HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C8 (Agilent Technologies, 4, 6 x 250 mm, 5,0 micras). Se usaron veinte microlitros de cada sobrenadante de extracto de VC filtrado, para separar y cuantificar los compuestos fenólicos. Se utilizaron los siguientes dos disolventes de

fase móvil: ácido fórmico al 3% en H<sub>2</sub>O (A) y metanol (B). La elución se realizó con un gradiente que comenzó en el 98% de la fase A y el 2% de la fase B, y después de 20 minutos, se alcanzó el 68% de la fase A y el 32% de la fase B. Después de 30 minutos, se alcanzó el 60% de la fase A y el 40% de la fase B y, finalmente, después de 40 minutos, se alcanzó el 5% de la fase A y el 95% de la fase B. Se mantuvo un flujo isocrático durante 5 minutos en la última fase. El detector de UV se ajustó a 278 nm (Belščak *et al.*, 2009).

#### V.2.2.2.5 Determinación de capacidad antioxidante, método ABTS

La determinación por el método ABTS 2,2- azinobis(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Nenadis *et al.*, (2004), adaptada a microplaca. Se preparó una solución acuosa 7mM de ABTS y una solución de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 140 mM, se mezclaron 5 mL y 88 µL respectivamente. Es importante tomar en cuenta que tardará 12 h en generar el radical y que deberá de protegerse de la luz. Pasado el tiempo, se realizó una dilución, mezclando 500 µL de la solución y se le agregó de 20-25 mL de etanol. La solución se leyó a una longitud de onda de 734 nm, esperando valores entre 0.7 y 1 de absorbancia. Se adicionó a una microplaca de 96 pozos, 20 µL del extracto etanólico y un control con solo 20 µL metanol, así como 230 µL de ABTS a cada pozo, realizando la muestra por triplicado. La lectura de la placa se realizó en un lector de Elisa. La placa se mantuvo cubierta en la obscuridad y a 27 °C. Los valores se compararon con una curva de calibración de trolox y los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como µM equivalentes de trolox/g de muestra.

#### V.2.2.2.6 Determinación de capacidad antioxidante, método DPPH

La capacidad antioxidante también se midió mediante el ensayo de decoloración 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), por la técnica propuesta por Fukumoto & Mazza, (2000) adaptado a microplaca. Se añadieron 20 µL de extracto

etanólico y 200  $\mu$ L de solución DPPH en una microplaca de 96 pozos. Se preparó un control de 20  $\mu$ L de metanol y 200  $\mu$ L de DPPH. Las muestras se prepararon por triplicado y fueron leídas cada 10 min durante 90 min a una longitud de onda de 540 nm en un lector de Elisa. La placa se debe mantener cubierta en la oscuridad y a temperatura ambiente entre lecturas. Se elaboró una curva de calibración de trolox (0-800 Mm). Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalentes de trolox (TEAC) en  $\mu$ M equivalentes de trolox /g de muestra.

#### *V.2.2.3 Determinación de teobromina*

Los extractos de la VC se prepararon de acuerdo con los métodos de Nguyen & Nguyen, (2017). Se pesaron 10 g de VC seca y se mezcló con 270 mL de etanol 70% durante 90 min a 80 ° C utilizando un baño termostático (cubierto por una tapa para evitar la evaporación del agua durante la extracción). Luego, las muestras se filtraron a través de un papel filtro Whatman No. ° 1. Se añadió una solución de acetato de plomo al 10% a 10% en volumen de los extractos crudos. La mezcla se dejó a temperatura ambiente (32  $\pm$  2 ° C) durante 15 min. Después del tratamiento con solución de acetato de plomo al 10%, el acetato de plomo residual en los extractos se eliminó completamente usando solución de sulfato de sodio al 10% (basado en la formación de precipitado blanco llamado sulfato de plomo) y luego se filtró a través de un papel filtro Whatman No.1. para obtener los extractos puros El contenido de teobromina en los extractos de la VC se analizaron mediante HPLC. Los extractos y la solución estándar de teobromina (100  $\mu$ g / ml en metanol) se filtraron a través de membranas de nylon de 0,45  $\mu$ m, y luego se inyectaron 20  $\mu$ L individualmente mediante un inyector automático en una columna C<sub>18</sub>, que se mantuvo a 35 ° C. La elución isocrática consistió en 0.05% de ácido fosfórico en agua destilada (A) y 100% de acetonitrilo (B) (85:15). La velocidad de flujo se estableció a 1 mL / min. El compuesto de teobromina se detectó a 272 nm usando un detector UV-VIS. El contenido de teobromina en los extractos de la VC se cuantificó en función de la curva estándar de calibración de la teobromina al

comparar el tiempo de retención y el área pico del estándar de la teobromina contra los extractos de la VC.

### *V.2.3 Digestión gastrointestinal in vitro*

La digestión gastrointestinal consiste en una simulación *in vitro* de todo el proceso digestivo, desde la boca hasta la fermentación en el colón, empleando muestras de VC. Se empleó la metodología sugerida por Campos-Vega *et al.*, (2015), para simular las condiciones fisiológicas. Se contó con la participación de sujetos sanos y se utilizaron intestinos de rata, por lo que el protocolo fué aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la UAQ (No. De oficio CBQ18/032) y los participantes firmaron un consentimiento informado.

#### *V.2.3.1 Simulación de las condiciones de la boca*

Se reunieron 4 individuos voluntarios sanos, quienes consumieron su último alimento al menos 90 min antes del ensayo. Se enjuagaron la boca antes de iniciar la masticación de la muestra. Los voluntarios masticaron 1 g de la muestra VC, durante 15 veces por 15 s, y posteriormente vaciaron el contenido en un vaso que contendrá 5 mL de agua destilada. Inmediatamente, los voluntarios se enjuagaron la boca por 60 segundos con 5 mL de agua destilada para después depositarla en el mismo vaso. Posteriormente se mezclaron las suspensiones de cada muestra en un solo vaso. Es necesario preparar un blanco, el cual contenía agua destilada en lugar de la muestra, y se realizó el mismo procedimiento.

#### *V.2.3.2 Simulación de las condiciones del estómago*

A 10 mL de la suspensión anterior, se le añadió una solución HCl 2 N con el objetivo de bajar el pH a 2.0. También, se añadió 0.055 g pepsina, misma que se disolvió en 0.94 mL de HCl 20 mM. Finalmente, las muestras se incubaron con agitación durante 2 h a 37 °C.

### V.2.3.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado

Se preparó un extracto intestinal por disolución de 3 mg de hiel de buey y 2.6 mg de pancreatina, los cuales se disolvieron en 5 ml de solución tampón de Krebs-Ringer [la cual contiene 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glucosa y 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.8 (preparar 30 min antes de utilizarse)]. Esta solución se añadió a cada muestra y al blanco; la suspensión se transfirió a un recipiente que contenía un saco intestinal invertido.

### V.2.3.4 Técnica del saco intestinal invertido

#### V.2.3.4.1 Manejo de los animales

Se emplearon 4 ratas macho de la cepa Wistar (UNAM, Campus Juriquilla) con un peso entre 250 y 300 gr, clínicamente sanas, a las cuales se les verificó el sexo, peso y estado de salud. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad ( $50 \pm 10$  %), ciclos día/noche de 12/12 h, temperatura adecuada ( $23 \pm 2$  °C) y con condiciones aceptables de limpieza y ventilación constante (NOM-062-200-199) . Fueron alimentadas con alimento comercial Rodent Lab Chow 5001 (Nupec, Querétaro) y agua potable. El alimento se retiró 16 h antes del sacrificio, sólo se les permitió consumir agua *ad libitum*.

#### V.2.3.4.2 Eutanasia de los animales y preparación del saco intestinal invertido

Para el sacrificio, las ratas fueron anestesiadas con CO<sub>2</sub>. Después, se cortó la aorta para que tuvieran una muerte instantánea, se realizó una incisión abdominal en la línea media para la obtención de un segmento del intestino de alrededor de 20-25 cm, el cual se segmentó con una longitud de 6 cm. Se colocó en una solución tampón de Krebs-Ringer, gasificado con CO<sub>2</sub> a 37 °C. El segmento de intestino removido se lavó con la misma solución tampón para retirar residuos, y

posteriormente se voltearon suavemente sobre una varilla metálica, ligándolos por un extremo; es recomendable realizar este proceso en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer para evitar la pérdida de viabilidad del tejido. El intestino se llenó con 2 mL de la solución amortiguadora de Krebs-Ringer, posteriormente se ligó el otro extremo del intestino para obtener un saco el cuál es 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 min) y en atmósfera anaerobia (CO<sub>2</sub>). Después del periodo de incubación, los sacos se retiraron para obtener la muestra contendida fuera del saco, a la cual se le denominó fracción no digerible (FND), que será sometida a fermentación colónica *in vitro*. Los experimentos se realizaron por duplicado.

#### V.2.3.4.3 Manejo de los animales después de la etuanasia.

Los restos de los animales fueron almacenados en bolsas y colocados en un congelador (temperatura máxima 4 °C). La bolsa marcada con la leyenda “desechos patológicos” se almacenó hasta su debido transporte e incineración (NOM-087- ECOL-SSA1-2002). El material quirúrgico que se utilizó se dejó remojar con cloro 12 h, posteriormente se lavó y esterilizó para su posterior almacenamiento.

#### V.2.4 Fermentación colónica *in vitro* de la FND

Este método de fermentación se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Campos-Vega *et al.*, (2009). Se emplearon 100 mg de inulina como control positivo de carbohidrato fermentable bajo las mismas condiciones. Se utilizó inóculo fecal humano como fuente de la microbiota representativa del colon, obtenida a partir de 2 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 muestra; se registró su peso, edad y talla. Se prepararon tubos estériles (15 mL) con 9 mL de medio de cultivo basal que

contienen (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). Los tubos se sellaron y se mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia que contiene una mezcla de gases (H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>: 10:10:80, volumen) durante 24 h. 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 que contenían el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 mL de homogeneizado fecal y se adicionó la FND proveniente de muestra (0.5 g del precipitado sólido y 0.5 mL del sobrenadante líquido), del blanco (1 mL) e inulina (100 mg). Se agitaron los tubos con vórtex durante 30 s y se incubó 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 se determinó el pH y los AGCC a las 0, 6, 12 y 24 h. La fermentación se detuvo mediante centrifugación, las muestras obtenidas se almacenaron a – 70 °C hasta su análisis.

#### V.2.4.1 Cuantificación de los AGCC por HPLC

Esta metodología se llevó a cabo para las muestras obtenidas en la fermentación *in vitro* de acuerdo con lo sugerido por (De Baere *et al.*, 2013). Se prepararon soluciones stock (SS) 0.5 M y 0.05 M de ácido acético (AA), ácido propiónico (AP), y ácido butírico (AB) en agua de HPLC y se almacenaron de 2–8 °C durante 3 meses.

##### V.2.4.1.1 Curva de calibración

Las muestras y los puntos de la curva de calibración se extrajeron el día de la cuantificación como se describe a continuación: se pipetearon 950 µl de medio de fermentación tubo de pyrex. Se agregaron volúmenes apropiados de las SS (0.5 y 0.05 M) para obtener las siguientes concentraciones teóricas de ácido orgánico

individual: 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM y 50 mM. Posteriormente, las muestras se mezclaron en vórtex durante 15 s, seguido de la adición de agua de HPLC hasta un volumen final de 1000  $\mu$ L finalmente se volvieron a mezclar en vórtex.

#### V.2.4.1.2 Extracción líquido-líquido

Tanto para los puntos de calibración como para las muestras se pipetearon 1000  $\mu$ L del sobrenadante del medio de fermentación. Posteriormente se añadieron 100  $\mu$ L de HCl concentrado, seguido de una etapa de mezcla en vórtex por 15 s. Se agregaron 5 mL de éter dietílico y se mantuvieron en agitación suave durante 20 min. Después se centrifugaron (5 min, 3500 rpm), y el sobrenadante se transfirió a otro tubo de pyrex, donde se añadieron 500  $\mu$ L de una solución 1 M de NaOH. Las muestras se agitaron nuevamente durante 20 min, seguido de una centrifugación. La fase acuosa se transfirió a un vial y se añadieron 100  $\mu$ L de HCl concentrado. Finalmente se mezclaron en vórtex y se inyectó un volumen de 20  $\mu$ L.

#### V.2.4.1.3 Cuantificación en HPLC-UV

El análisis se llevó a cabo en un sistema HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (Agilent Technologies, 4, 6 x 250 mm, 5,0 micras) bajo las siguientes condiciones: temperatura: 30 ° C, fase móvil: 20 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en agua de HPLC (pH ajustado a 2.2 usando ácido fosfórico) (A) y acetonitrilo (B). La elución se realizó con un gradiente que comenzó en el 100% de la fase A, después de 8.5 minutos, se alcanzó el 80% de la fase A y el 20% de la fase B. Después de 13.5 minutos, se alcanzó el 100% de la fase A. Se mantuvo un flujo isocrático durante 4.5 minutos en la última fase. El detector UV se ajustó a una longitud de onda de 210 nm.

El radio molar (%) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Radio molar} = \frac{AGCC_i}{AGCC_t}$$

Donde  $AGCC_i$  representa la concentración individual de AGCC (en mM/l) y  $AGCC_t$  la cantidad total de AGCC (en mM/l) por cada tiempo de fermentación.

El índice de fermentabilidad (IF) se calculó de la siguiente manera:

$$IF = \frac{AGCC_t}{AGCC_{inulina}} \times 100$$

Para cada tiempo de fermentación.

#### *V.2.5 Cultivo celular HT-29*

Las células HT-29 se manejaron en una cámara de bioseguridad donde se cultivaron en medio base Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10 %, Gibco, Grand Island, NY), antibióticos y antimicóticos (1 %). El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada tercer día hasta alcanzar la confluencia. Las células se mantuvieron bajo una atmósfera humidificada de 10 %  $CO_2$  a 37 °C en una incubadora con cámaras de gasificación automática.

##### *V.2.5.1 Elaboración de la curva dosis-respuesta*

Las células HT-29 se sembraron en cajas de 96 pozos ( $3 \times 10^4$  células/pozo) en medio de cultivo DMEM (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10 %), antibióticos y antimicóticos (1 %). A las 24 h de incubación, el medio fué sustituido por medio DMEM al 0.5 % de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd), conteniendo varias concentraciones del extracto de la fermentación colónica (EFC) de la fracción no digerible (FND) de la VC (5 - 50 % v/v), previamente esterilizada por filtración; después será incubado por otras 24 h. Pasadas las 24 h de incubación

se volvieron a aplicar las concentraciones de extracto de la fermentación colónica estéril por otras 24 h. La citotoxicidad se analizó usando el ensayo de metiltiazoliltetrazolio (MTT). Se añadió una solución de MTT filtrada en medio de cultivo DMEM libre de suero a cada pocillo (0.5 mg MTT / ml), antes de la incubación celular (37 °C, 2 h) y se retiró el colorante que no reaccionó. Los cristales de formazan de MTT insolubles se dejaron disolver en DMSO a temperatura ambiente durante 15 min, y se midió la absorbancia de cada muestra a 570 nm.

La viabilidad de las celdas se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\%Viabilidad = \frac{\text{absorbancia de muestra}}{\text{absorbancia control}} * 100$$

#### V.2.5.3 Cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

El porcentaje de LDH se determinó mediante un kit de citotoxicidad-LDH (BioVision), basado en una reacción enzimática que resulta en la conversión de la sal de tetrazolium en un producto de formazán (rojo). El incremento en la cantidad de formazán en el medio de cultivo correlaciona directamente con el incremento en el número de células lisadas. Se empleó tritón al 1 % como control de daño celular. La concentración de formazán se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 495 nm.

El porcentaje de citotoxicidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%Citotoxicidad = \frac{Abs_{tratamiento} - Abs_{CONTROLES CON 0.1\% ASB}}{Abs_{control alto} - Abs_{controles con 0.1\% ASB}} * 100$$

#### V.2.5.4 Actividad de histona deacetilasa (HDAC)

La actividad de la enzima HDAC se determinó mediante un kit fluorométrico (Sigma Aldrich) que mide la cantidad de enzima que genera un nanomol (1000 pmol) de sustrato deacetilado por min. Para ello, las células son incubadas con un sustrato permeable (que contiene una cadena de lisina acetilada). Este sustrato será

deacetilado por la enzima intracelular. Posteriormente se agregó una solución reveladora, la cual se adhiere al sustrato deacetilado y lisa la célula, liberando un fluoróforo. La cantidad de enzima se cuantifica fluorométricamente a una longitud de  $E_x/E_m = 368/442$  nm.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos en general se realizará una comparación de medias  $\pm$  el error estándar, seguido de la prueba de Tukey, empleando el programa estadístico JMP 8.1. Para determinar el efecto del extracto de la fermentación sobre la sobrevivencia celular se usará un diseño al azar y se realizará un análisis de regresión lineal de los datos para el cálculo de la concentración letal cincuenta.

## VI Resultados y discusión

V-Microondas fue la primera muestra sometida a todas las evaluaciones. Sin embargo, a pesar de que en la composición química y nutracéutica se obtuvieron resultados que indicaban su potencial funcional, al ser sometida a la digestión gastrointestinal, la bioaccesibilidad de los compuestos evaluados fue baja. Además, la generación de ácidos grasos de cadena corta a nivel del colon también fue limitada. Aunado a esto, se observó un limitado efecto sobre la inhibición de la sobrevivencia de células de cáncer de colon, lo que no permitió alcanzar una concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>); es decir, el extracto de la fermentación de la vaina no indujo la muerte del 50% de las células sometidas a tratamiento.

Por lo anterior, se propuso someter la vaina a diferentes procesamientos. Así, la VC se secó por flujo de aire y una porción del material seco se sometió a extrusión.

### VI.1 Composición proximal de la vaina de cacao

En la **Tabla 7** se presenta el contenido de carbohidratos, proteínas, lípidos y cenizas de las muestras de vaina de cacao secas por microondas, flujo de aire y flujo de aire-extrusión.

El componente principal en todas las muestras son los carbohidratos, en donde estadísticamente V-Microondas tiene un menor contenido. Cross, Fung, & Decareau (1982) afirman que los efectos nutricionales del secado por microondas son mínimos en proteínas, lípidos y minerales y que además no hay ningún informe sobre los efectos en la fracción de carbohidratos en los alimentos

**Tabla 7** Composición química, en porcentaje, de la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado.

<b>Parámetro (%)</b>	<b>V-Microondas</b>	<b>V-Flujo</b>	<b>VF-Extrusión</b>
<b>Carbohidratos</b>	74.7 ± 0.7 <sup>b</sup>	78.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	78.7 ± 0.6 <sup>a</sup>
<b>Fibra total</b>	55.3 ± 10.5 <sup>a</sup>	66.5 ± 2.6 <sup>a</sup>	59.6 ± 0.2 <sup>a</sup>
Fibra soluble	6.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	9.7 ± 3.4 <sup>a</sup>	7.2 ± 1.0 <sup>a</sup>
Fibra insoluble	48.5 ± 9.7 <sup>a</sup>	56.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	52.3 ± 1.2 <sup>a</sup>
<b>Proteínas</b>	7.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b>Lípidos</b>	0.2 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.5 <sup>a</sup>
<b>Cenizas</b>	9.4 ± 0.5 <sup>b</sup>	7.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	7.4 ± 0.5 <sup>a</sup>

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes por triplicado ± DE y son expresadas como porcentaje en base seca. Letras diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre muestras ( $\alpha=0.05$ , por prueba de Tukey). VM, vaina seca por microondas. VF, vaina seca por flujo de aire. VFE, vaina seca por flujo de aire y extrudida.

Sin embargo, Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah (2018) informan que la composición química de la VC depende del pretratamiento utilizado en su procesamiento. De esta manera, los valores obtenidos para V-Microondas (19.35%), V-Flujo (12.38) y VF-Extrusión (19.09) difieren de los reportados por (Chun, Husseinsyah, & Yeng, 2016) (17.5%) aplicando un secado con flujo de aire a 80 °C por un día, mientras que Vriesmann *et al.*, (2011) (32.3%) no especifican el método de secado.

En cuanto al contenido de fibra, no hay diferencia significativa entre muestras, pero se observa una relación de incremento de carbohidratos asociado al aumento de fibra y sus fracciones en la muestra V-Flujo y VF-Extrusión. Valadez-Carmona *et al.*, (2017) reportaron que el secado con flujo de aire genera cambios más severos en la microestructura de la VC en comparación con el secado por microondas, Aguilera & Stanley, (1999) lo atribuyen a la repentina evaporación del agua superficial que se produce cuando se usa calor convectivo para secar el material vegetal, lo que provoca el colapso celular debido al estrés interno y la formación de costras. Valadez-Carmona *et al.*, (2017) también reportan que la VC que se seca con microondas presenta microestructuras similares a las de la VC

fresca. Esto nos sugiere que el secado con flujo de aire y flujo de aire y extrusión favorece la disponibilidad de la fibra, aumentando así la cuantificación de carbohidratos totales.

El contenido de fibra dietaria total de las muestras se encuentra en el intervalo de 55.35% y 66.56% siendo la V-Flujo la de mayor contenido. El intervalo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2018) para fibra dietaria total va de 18.3% al 59%. En este estudio, el contenido de fibra insoluble es mayor al de fibra soluble, lo que concuerda con autores como Yapó *et al.*, (2013) que estudiaron la variedad forastero y reportó un contenido de fibra soluble del 11% y 48% de fibra insoluble. Martínez *et al.*, (2012) por su parte, estudiaron la VC variedad trinitario, obteniendo un contenido de 2.88% de fibra soluble y 53.11% fibra insoluble (localidad Taura) y de 4.12% fibra soluble y 51.98 fibra insoluble (localidad Cone). A pesar de esto, los valores para cada fracción difieren entre autores, lo cual es atribuible a la variedad estudiada.

Es importante destacar que cada fracción de fibra tiene propiedades específicas. Roberfroid, (1993) las describe mencionando que la fibra dietética soluble es fermentada en gran medida por una amplia variedad de bacterias anaerobias que resultan en un aumento de la biomasa bacteriana, un aumento en la masa fecal, un cambio en el pH intracolónico y la producción de ácidos grasos de cadena corta y varios gases como productos finales metabólicos; mientras que la fibra insoluble se fermenta marginalmente; sirve casi exclusivamente como agente de carga que resulta en un tiempo de tránsito más corto y una mayor masa fecal.

Para la cuantificación de proteínas no se presentaron diferencias significativas entre muestras, mostrando el valor mínimo VF-Extruida (6.28%) y el valor máximo para V-Microondas (7.24%). Estos datos son cercanos a los reportados por Esong, Etchu, Bayemi, & Tan, (2015) quien reporta un 8% de proteína. Mientras que Ozung *et al.*, (2016) por su parte, cuantificaron un 9.3% y Vriesmann *et al.*, (2011) reportan 8.6%. Sin embargo, son mayores a los reportados por Nguyen & Nguyen, (2017) (2.42%). Martínez *et al.*, (2012) reportan 4.21% y Sa & Abike, (2017) quien estudia todas las variedades del cacao, obteniendo 4.83%,

4.35% y 3.21% para Trinitario, Forastero y Criollo respectivamente. Aun así, se concuerda que la VC tiene un bajo contenido de proteínas.

En lo referente al estudio de los lípidos, se obtuvieron valores menores al 1% sin diferencia significativa entre muestras, lo cual concuerda con lo reportado por Esong *et al.*, (2015) (0.6%) y por Nguyen & Nguyen, (2017) (0.93%) pero difiere de Ozung *et al.*, (2016) (8.83%), Vriesmann *et al.*, (2011) (8.6%) y de Sa & Abike, (2017) (7.7%).

En el análisis de minerales, V-Microondas tiene una cantidad mayor (9.4%) a V-Flujo y VF-Extrudida (7.44, 7.41%). Este intervalo está dentro de lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2018) que va del 5.9% al 13%. Yapo *et al.*, (2013) destacaron que cuatro minerales (K, P, Ca y Mg) en VC son cuantitativamente importantes (0.5-6.0%). La presencia de estos minerales que se requieren para mantener funciones vitales en las células humanas vivas hace que sea una fuente potencial de esos elementos. FAOSTAT, (2018) nos dice que los minerales son componentes esenciales de las estructuras esqueléticas, como los huesos y los dientes; desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la presión osmótica y, por lo tanto, regulan el intercambio de agua y solutos dentro del cuerpo; sirven como componentes estructurales de tejidos blandos; son esenciales para la transmisión de los impulsos nerviosos y la contracción muscular; los minerales juegan un papel vital en el equilibrio ácido-base del cuerpo y, por lo tanto, regulan el pH de la sangre y otros fluidos corporales; También sirve como componentes esenciales de muchas enzimas, vitaminas, hormonas y pigmentos respiratorios, o como cofactores en el metabolismo, catalizadores y activadores enzimáticos.

Por otro lado, Martínez *et al.*, (2012) mencionan que el alto contenido de cenizas podría ser un problema en la aplicación potencial de estos subproductos en alimentos, ya que las cantidades de iones metálicos aumentarían considerablemente y podría facilitar la oxidación del producto en el que se encuentran incorporados.

## VI.2 Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en la vaina de cacao procesada.

En la **Tabla 8** se muestra el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado.

**Tabla 8** Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado.

<b>Muestra</b>	<b>V-Microondas</b>	<b>V-Flujo</b>	<b>VF-Extrusión</b>
<i>Fenoles</i> $\mu\text{g GAE/g}$	25592.1 $\pm$ 6362.9 <sup>a</sup>	26743.4 $\pm$ 1654 <sup>a</sup>	24301.4 $\pm$ 2951.7 <sup>a</sup>
<i>Taninos</i> $\mu\text{g (+)catequina/g}$	23172.1 $\pm$ 1427.3 <sup>a</sup>	16532.5 $\pm$ 673.9 <sup>b</sup>	15884.6 $\pm$ 345.9 <sup>b</sup>
<i>Flavonoides</i> $\mu\text{g rutina/g}$	1360.1 $\pm$ 69.3 <sup>a</sup>	1425.9 $\pm$ 471 <sup>a</sup>	1235.9 $\pm$ 396.6 <sup>a</sup>
<b>Capacidad Antioxidante</b>			
ABTS $\mu\text{M Trolox/g}$	227.7 $\pm$ 20.1 <sup>a</sup>	161.7 $\pm$ 31.2 <sup>b</sup>	147 $\pm$ 15.1 <sup>b</sup>
DPPH $\mu\text{M Trolox/g}$	87.1 $\pm$ 11.5 <sup>a</sup>	54.5 $\pm$ 6.6 <sup>b</sup>	49.4 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresadas como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico, (+) catequina, rutina por g de muestra para fenoles, taninos y flavonoides respectivamente. La capacidad antioxidante es expresada como como  $\mu\text{M}$  eq. Trolox/g de muestra. Letras minúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre muestras.

No se encontraron diferencias estadísticas entre muestras iniciales en cuanto a compuestos fenólicos, y fue V-Flujo la cual obtuvo el valor mayor (26743.4  $\mu\text{g GAE/g}$ ). En este estudio solamente se cuantificaron los fenoles libres. Estos resultados son ligeramente mayores a los reportados por Sotelo *et al.*, (2015) quien mediante extracción con ultrasonido usando etanol: agua como solventes obtienen un contenido de 20500-23005  $\mu\text{g GAE/g}$ . A su vez, los resultados son menores a lo reportado por Vriesmann *et al.*, (2011) (45600-46400  $\mu\text{g GAE/g}$ ) quienes utilizan etanol como solvente. Karim, Azlan, Ismail, Hashim, & Abdullah, (2014) por su parte, reportan 49540  $\mu\text{g GAE/g}$  y además, Yapo *et al.*, (2013) lograron cuantificar 68930  $\mu\text{g GAE/g}$ , cabe destacar que este último autor cuantifica las fracciones fenólicas libres y ligadas. Siendo tan amplio el intervalo reportado, Naczki & Shahidi, (2006)

menciona que la recuperación de los polifenoles de materiales vegetales está influenciada por la solubilidad de los compuestos fenólicos en el disolvente utilizado para el proceso de extracción. Además, la polaridad del disolvente desempeñará un papel clave en el aumento de la solubilidad fenólica.

Otro factor a considerar es el mencionado por Yapo *et al.*, (2013), quien recalca que la mayoría de los estudios de compuestos fenólicos se determinan a partir de fracciones solubles en solventes orgánicos, como consecuencia una cantidad considerable que permanece en residuos insolubles es ignorado y sin embargo, estos antioxidantes no extraídos en matrices alimentarias son parcialmente liberados durante la digestión gastrointestinal y pueden producir efectos biológicos significativos. Valadez-Carmona *et al.*, (2017) cuantificaron el contenido de fenoles totales en la VC fresca obteniendo 3230 µg GAE/g, posteriormente sometieron la muestra a tres distintos métodos de secado y reportan un incremento de hasta 17 veces.

En este estudio también se analizó el contenido de taninos condensados y flavonoides totales, y se observa una tendencia de mayor cuantificación de los primeros atribuible al solvente utilizado (acetona-agua-ácido acético (70:29.5:0.5)), ya que la acetona está especialmente indicada para la extracción de proantocianidinas poliméricas (Cheynier, Souquet, Le Roux, Guyot, & Rigaud, 1999; Prior & Gu, 2005).

Estadísticamente V-Microondas tuvo el mayor valor de taninos condensados (23172.1 µg (+) catequina/g) observándose así que hubo un efecto atribuido al método de secado. Se ha reportado un incremento el contenido de taninos argumentando que la energía de irradiación de microondas puede mejorar la penetración del solvente en la matriz y aumentar la interacción molecular mediante el campo electromagnético, transfiriendo rápidamente energía al solvente y la matriz, permitiendo la extracción de componentes.(Gasmalla, Yang, Amadou, & Hua, 2014; Jin, Wang, & Chen, 2010). Los valores aquí obtenidos se encuentran por debajo de lo reportado para la VC por Mensah, Adamafo, Amaning-Kwarteng,

& Rodrigues, (2012) (51000  $\mu\text{g/g}$ ) y por Yapo *et al.*, (2013) (52160  $\mu\text{g/g}$ ), estas diferencias pueden ser atribuidas a los distintas metodologías de extracción.

El contenido de flavonoides no muestra diferencias significativas entre procesamientos, encontrando valores de 1360.1  $\mu\text{g rutina/g}$ , 1425.9  $\mu\text{g rutina/g}$  y 1235.9  $\mu\text{g rutina/g}$  para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extruida respectivamente. Sin embargo los valores reportados en la literatura se encuentran por encima de los aquí cuantificados, por ejemplo Karim *et al.*, (2014) mediante un secado al sol obtuvieron un intervalo de 4000-22000  $\mu\text{g/g}$  dependiendo de los clones estudiados, mientras que Valadez-Carmona *et al.*, (2017) cuantifican 970  $\mu\text{g/g}$  para la VC fresca; posteriormente al secado por microondas y flujo de aire, alcanza 5626  $\mu\text{g/g}$  y 2910  $\mu\text{g/g}$  respectivamente. Las condiciones de secado aplicadas (Flujo de aire 60 ° C, 24 h; Microondas 595 W, 11.5 min) difieren de las de este estudio (Flujo de aire 45°C, 24 h; Microondas 220 W, 105 min)

Debido a que la capacidad antioxidante de un material complejo generalmente resulta de una mezcla de varios compuestos antioxidantes con diferentes mecanismos de acción, puede haber interacciones sinérgicas o antagonistas. Por lo tanto, se recomienda la combinación de al menos dos métodos diferentes para su determinación *in vitro* (Carocho & Ferreira, 2013). En la **Tabla 8** se muestra la capacidad antioxidante de la vaina sometida a los distintos métodos de secado.

Los valores obtenidos para ABTS son mayores de los reportados por otros autores para la VC. Martínez *et al.*, (2012) reportaron 24.1  $\mu\text{M TE/g}$  para extracciones con etanol y 42.9  $\mu\text{M TE/g}$  para extracciones metanol: acetona. En este estudio se encontraron valores superiores: 227.7  $\mu\text{M TE/g}$ , 161.7  $\mu\text{M TE/g}$  y 147.1  $\mu\text{M TE/g}$  para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extrusión, respectivamente, pero similares a los encontrados por Sotelo, Alvis, & Arrázola, (2015) (116 - 230  $\mu\text{M TE/g}$ ). Estas diferencias se atribuyen tanto al procesamiento del material como el método de extracción de polifenoles utilizado por cada autor.

Para el ensayo de DPPH, Martínez *et al.*, (2012) reportan 21.3  $\mu\text{M TE/g}$  para extracciones con etanol y 33.9  $\mu\text{M TE/g}$  para extracciones metanol:acetona. Valadez-Carmona *et al.*, (2017) reportan un intervalo de 15.1- 70.8  $\mu\text{M TE/g}$  dependiendo del método de secado. Los resultados de este trabajo se encuentran por encima del intervalo reportado, siendo 87.1  $\mu\text{M TE/g}$ , 54.5  $\mu\text{M TE/g}$  y 49.4  $\mu\text{M TE/g}$  para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extrusión, respectivamente.

V-Microondas es estadísticamente mayor en la cuantificación de capacidad antioxidante para ambas técnicas; Valadez-Carmona *et al.*, (2017) afirman que el secado de VC por microondas puede liberar compuestos fenólicos y que su capacidad antioxidante se ve mejorada gracias a la inactivación de la enzima polifenol oxidasa.

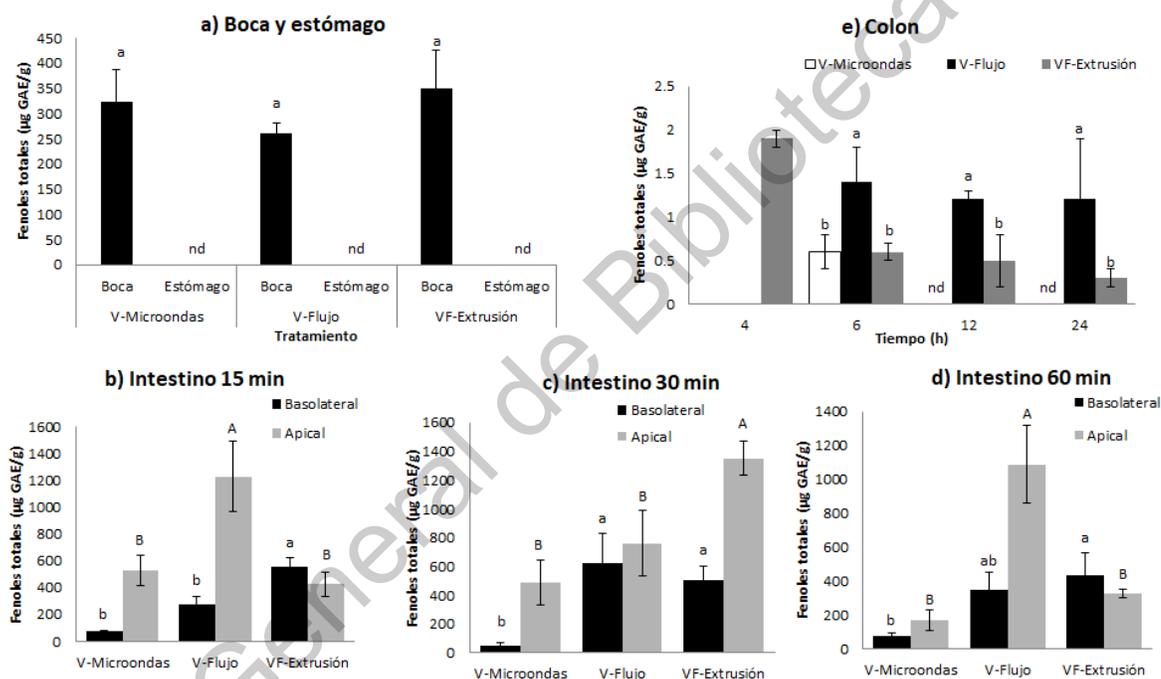
### **VI.3 Bioaccesibilidad y permeabilidad de compuestos fenólicos de la vaina de cacao procesada.**

La bioaccesibilidad es la eficiencia de digestión y absorción de un determinado componente alimenticio o fármaco ingerido por administración oral (Blancas-Benitez *et al.*, 2015). El material estudiado en este trabajo, hasta la fecha no se ha reportado su digestión a través del tracto gastrointestinal, por lo que se carece de fuentes para la comparación de la bioaccesibilidad de sus compuestos, sin embargo, existen reportes sobre otras matrices alimentarias. Los resultados de la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos se muestran en la **Figura 5**.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas y generalmente están involucradas en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión de los patógenos. Estos pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de los anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que unen estos anillos entre sí. De este modo, se hacen distinciones

entre los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004)

En la **Figura 5a** se observa que la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de las muestras en la etapa de la boca no presentan diferencias estadísticas, pero se comprobó es bioaccesible aproximadamente el 1% del contenido inicial (presentado en la **Tabla 8**) de la VC bajo condiciones fisiológicas.



**Figura 5** Bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad *in vitro* (boca-colon) de compuestos fenólicos totales en la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado.

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresadas como  $\mu\text{g GAE/g}$  de muestra. Letras diferentes expresan diferencia significativa por tiempos, entre muestras ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey). nd, debajo del límite de detección.

La digestión comienza en la cavidad oral, siendo la amilasa la enzima predominante. Debido al corto tiempo de interacción, se sugiere que el impacto de la digestión enzimática en la liberación de polifenoles es bajo. Por otro lado, la

reducción del tamaño de partícula también tiene lugar, permitiendo un mejor acceso a las enzimas durante las siguientes etapas de la digestión a través del agrandamiento del área de superficie (Bohn, 2014).

La razón de la baja biodisponibilidad de ciertos fitoquímicos, se basa en su reconocimiento y manejo por parte del cuerpo como xenobióticos, reconociendo únicamente entre nutrientes y compuestos que no son nutrientes (Holst & Williamson, 2008).

En la fracción estomacal (**Figura 5a**), no se lograron detectar compuestos fenólicos. Cabe recordar que el mayor constituyente en la matriz es la fibra (soluble e insoluble). Experimentalmente el material se tornó altamente viscoso y difícil de manejar, por lo que relacionado con los resultados Palafox-Carlos, Ayala-Zavala, & González-Aguilar, (2011) explica que la fibra dietética puede reducir las tasas de absorción de antioxidantes principalmente atrapando físicamente los antioxidantes dentro de la matriz de fibra.

En la etapa intestinal (**Figura 5b, 5c y 5d**) (lado apical, luz del intestino) se obtuvieron porcentajes de bioaccesibilidad de 1.5%, 3.8% y 2.9% para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extruida, respectivamente, en base a los extractos iniciales. Asami, Hong, Barrett, & Mitchell, (2003) explica que compuestos fenólicos están unidos a las paredes celulares de frutas y verduras, en donde la deshidratación (térmica o no térmica) puede contribuir a la liberación de compuestos fenólicos unidos al romper las estructuras celulares. Cabe destacar que de acuerdo a Mosele, Macià, Romero, & Motilva, (2016) las condiciones alcalinas leves en etapa intestinal pueden favorecer el desprendimiento de ácidos fenólicos de la matriz alimentaria, aumentando su concentración intestinal debido a la generación de formas monoméricas.

En todas las muestras estudiadas, los compuestos fenólicos logran permear la barrera intestinal (lado basolateral) (**Figura 5b, 5c y 5d**), sin embargo, V-Microondas muestra una diferencia significativa con respecto de las demás. Las muestras tuvieron una permeabilidad de 0.3%, 1.5% y 2.1% para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extruida, respectivamente, en base a los extractos iniciales. Valadez-

Carmona *et al.*, (2017) mencionan que la temperatura de secado puede afectar el contenido, la actividad y la biodisponibilidad de los fitoquímicos. Por lo tanto, las condiciones y método de secado juegan un papel crucial en la determinación de la retención de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. Es de suma importancia conocer la absorción de compuestos fenólicos en una simulación de la digestión *in vitro* ya que para ejercer un beneficio para la salud, el compuesto de interés deberá atravesar un largo proceso, desde resistir pretratamientos, liberarse de la matriz alimentaria después de la ingestión y ser bioaccesibles en el tracto gastrointestinal, ser absorbido y posteriormente metabolizado el tejido objetivo (Rein *et al.*, 2013). En este estudio se confirma que los compuestos fenólicos de la VC están disponibles para su posible interacción química con los tejidos del organismo y ejercer su actividad biológica.

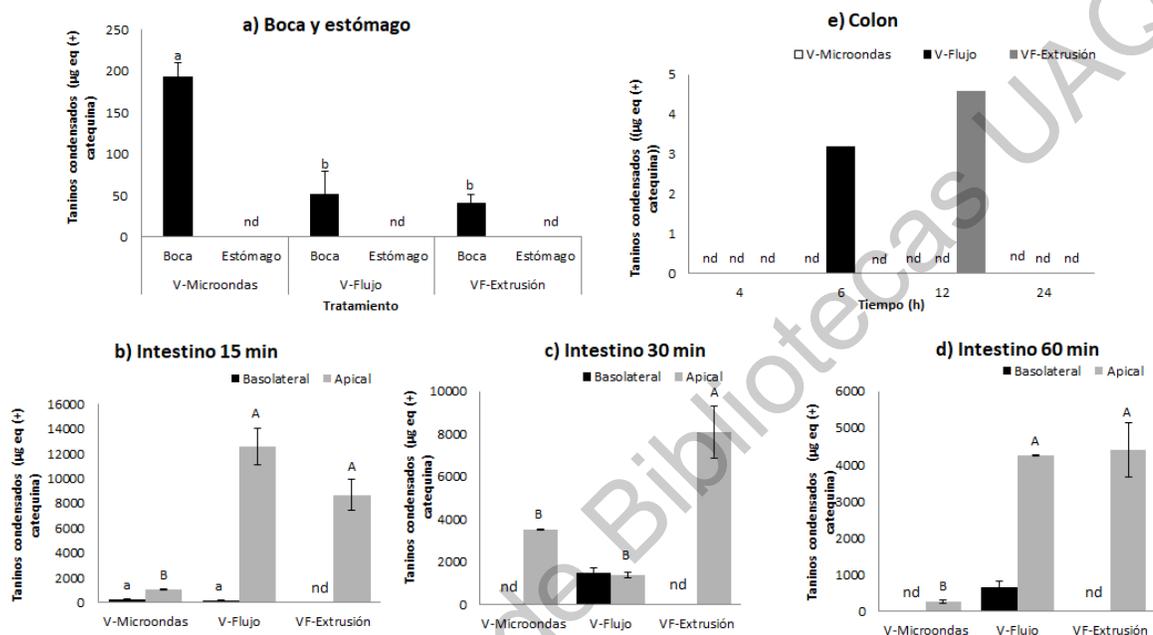
La bioaccesibilidad se ve drásticamente disminuida en la etapa del colon (**Figura 5e**). En general, V-Flujo obtuvo valores significativamente mayores a V-Microondas y VF-Extrusión, sin embargo VF-Extrusión fermentada 4 h muestra el mayor valor cuantificado. Además, en todas las muestras se observó una tendencia de disminución de compuestos fenólicos relacionado al tiempo de incubación. Herrera-Cazares *et al.*, (2017) en el estudio de bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de un confite de bagazo de mango, sugieren que los compuestos fenólicos pueden ser metabolizadas por la microbiota colónica. Lo que nos lleva a suponer que la disminución con respecto al tiempo se relaciona con la progresiva utilización de estos compuestos.

#### **VI.4 Bioaccesibilidad y permeabilidad de taninos condensados en la vaina de cacao procesada.**

En la **Figura 6** se muestran los resultados de la bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad *in vitro* de taninos condensados.

Los taninos condensados son estructuras poliméricas compuestas por la unión de flavanoles. Se encuentran en abundancia en la naturaleza formando mezclas

complejas y son responsables en gran medida de la textura, color y sabor astringente y amargo de algunos alimentos como el té, café o el chocolate (Lea & Arnold, 1978).



**Figura 6** Bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad in vitro (boca-colon) de taninos condensados en la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado.

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresadas como  $\mu\text{g eq (+)}$  catequina/g de muestra. Letras diferentes expresan diferencia significativa por tiempos, entre muestras ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey). nd, debajo del límite de detección.

Los taninos condensados o proantocianidinas se han descrito como compuestos antimicrobianos, antioxidantes, anticancerígenos y antiinflamatorios, además de ser benéficos en la prevención de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico (Bladé, Arola, & Salvadó, 2010; Castell-Auví *et al.*, 2012; Cos *et al.*, 2004; Serrano, Puupponen-Pimiä, Dauer, Aura, & Saura-Calixto, 2009)

Para la etapa de la boca (**Figura 6a**) es apreciable que menos del 1% del contenido inicial (presentado en la **Tabla 8**) es liberado. Está reportado que los compuestos poliméricos como las proantocianidinas no son bioaccesibles como tales (Manach *et al.*, 2004), además de que el grado de polimerización de taninos

puede tener un gran impacto en su bioaccesibilidad y destino en el organismo (Gonthier *et al.*, 2003)

En la etapa gástrica (**Figura 6a**) no se lograron detectar taninos condensados. Rios *et al.*, (2002) observaron *in vivo* que no hay una despolimerización significativa de las procianidinas de cacao en el estómago y sugirió que la secreción de ácido en el estómago está amortiguada por el bolo alimenticio, de modo que las proantocianidinas están expuestas a condiciones mucho menos ácidas. Tsang *et al.*, (2005) respaldan la opinión de que las proantocianidinas oligoméricas no se despolimerizan en flavan-3-ols monoméricos en ningún grado durante el paso a través del estómago.

En la etapa intestinal (**Figura 6b, 6c, 6d**) se observa una influencia asociada al pretratamiento sobre la bioaccesibilidad y permeabilidad de taninos condensados. Para el lado apical, se cuantificó un 6.9%, 36.6 % y 44.6 % para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extruida, respectivamente, en base a los extractos iniciales. V-Flujo fue la única muestra que es consistente en el lado basolateral, obteniendo un 4.7% de permeabilidad, lo que nos indica que los cambios producidos en esta muestra durante su paso al estómago logran que los taninos condensados sean absorbidos en la etapa intestinal. Para todas las muestras se cuantificó bioaccesibilidad de taninos en el lado apical, sugiriendo una acción enzimática favorable sobre la matriz, pero aun siendo bioaccesibles, dependiendo del pretratamiento, solo una porción logra ser permeado, se sugiere que este comportamiento es debido a que no han sido despolimerizados. Butler & Rogler, (1992) reporta que las proantocianidinas de molécula pequeña como dímeros y trímeros presentan una actividad de formación menos compleja y pueden absorberse más fácilmente. Probablemente los taninos cuantificados en el lado apical son moléculas más complejas.

En la etapa colónica (**Figura 6e**) hay una reducción de taninos. Serrano *et al.*, (2009) explican este comportamiento, mencionando que la mayoría de los taninos ingeridos llegan al colon, donde se convierten en sustrato fermentable para la microbiota junto con otros constituyentes no digeribles. Una vez que los taninos alcanzan el colon hay dos rutas posibles: la descomposición de la estructura original

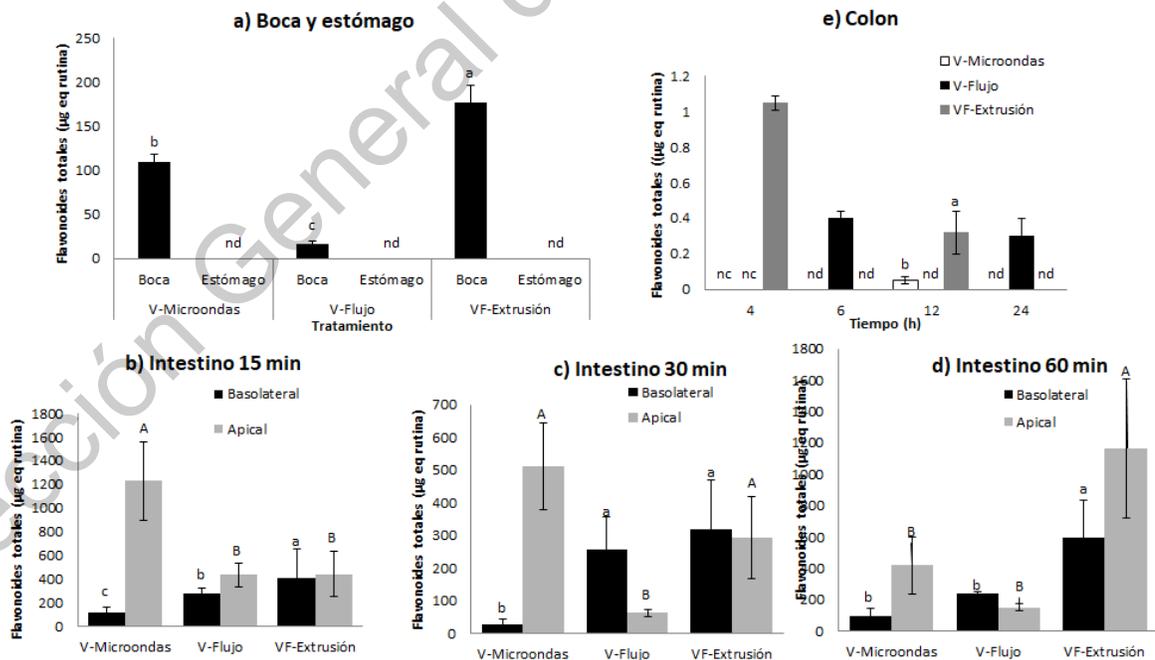
del tanino en metabolitos absorbibles Williamson & Manach, (2005) o la descomposición en metabolitos no absorbibles (probablemente taninos de peso molecular medio) que permanecen en la luz del colon, donde pueden contrarrestar los efectos de los prooxidantes de la dieta producidos durante el metabolismo microbiano Serrano *et al.*, (2009). Para corroborar esta teoría se deben estudiar los principales metabolitos colónicos de las proantocianidinas que son los ácidos fenilacético, fenilpropiónico y fenilbutírico (Déprez *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que la atención prestada a los taninos no solo se basa en el impacto benéfico sobre la salud, Chung, Wei, & Johnson, (1998) afirman que las proantocianidinas pueden formar complejos con proteínas, almidón y enzimas digestivas, incluyendo pectinasa, amilasa, lipasa, proteasa y b-galactosidasa, lo que resulta en la formación de complejos menos digeribles asociado a enzimas digestivas. Cuatro tipos de enlaces (puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, enlaces electrostáticos y covalentes) se encuentran en los complejos de proantocianidina-proteína, que son menos solubles y menos accesibles a las enzimas (Goel, Puniya, Aguilar, & Singh, 2005). En consecuencia, los taninos pueden ocasionar una disminución en la absorción de proteínas y carbohidratos, ambos efectos ocasionados por su habilidad de formar complejos con macromoléculas. Otra desventaja de la ingesta de taninos es su interacción con minerales divalentes como el hierro no hemático, inhibiendo la absorción de los metales (Perron & Brumaghim, 2009). Además, se reporta la actividad prooxidante de estos compuestos, que se refiere a que los polifenoles administrados pueden tener, algunas veces, un efecto contradictorio al esperado, es decir, pueden dañar tejidos cuando se ingieren concentraciones altas (Galati & O'Brien, 2004). Autores señalan que el efecto benéfico o nocivo de los compuestos polifenólicos es dependiente de la cantidad en que son ingeridos por el consumidor.

## VI.5 Bioaccesibilidad y permeabilidad de flavonoides en la vaina de cacao procesada.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran ubicuamente en alimentos de origen vegetal. Están compuestos por un esqueleto carbonado C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (A, B y C), las variaciones en el anillo heterocíclico C dan lugar a flavonoles, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides. Además, la estructura básica de los flavonoides permite una multitud de patrones de sustitución en los anillos de benceno A y B dentro de cada clase de flavonoides: hidroxilos fenólicos, azúcares-O, grupos metoxi, sulfatos y glucurónidos (Hollman & Katan, 1999). Los flavonoides dietarios existen en las plantas predominantemente como conjugados de glucósidos, con la notable excepción de los flavan-3-ols y las proantocianidinas (Crozier, Del Rio, & Clifford, 2010).

En la **Figura 7** se muestra la bioaccesibilidad y permeabilidad de estos compuestos durante la digestión gastrointestinal.



**Figura 7** Bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad *in vitro* (boca-colon) de flavonoides totales en la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado.

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresadas como  $\mu\text{g Eq rutina/g}$  de muestra. Letras diferentes expresan diferencia significativa por tiempos, entre muestras ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey). nd, debajo del límite de detección; nc, no cuantificado.

La bioaccesibilidad de flavonoides durante la etapa oral (**Figura 7a**) a partir de la muestra inicial (presentada en la **Tabla 8**) es del 8, 1 y 14% para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extrusión respectivamente. Es notorio que el procesamiento influye de manera importante en su liberación.

Posteriormente, no se lograron cuantificar flavonoides en la etapa gástrica (**Figura 7a**). Gee, DuPont, Rhodes, & Johnson, (1998) estudió la absorción glucósidos de quercetina de cebolla en un modelo de sacos invertidos de yeyuno de rata y propone que la mayoría de los glucósidos resisten la hidrólisis ácida en el estómago y llegan intactos al duodeno.

La digestión en el intestino delgado de flavonoides se presenta en la **Figura 7b, 7c y 7d**. Los valores de bioaccesibilidad en el lado apical son de 52.8%, 15.2% y 51.2% para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extruida, respectivamente, en base a los extractos iniciales. Y para la permeabilidad en el lado basolateral se obtuvo 5.8%, 18% y 35.6% para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extruida, respectivamente. Es importante mencionar que en esta etapa se observa una influencia relacionada con el procesamiento de la muestra, afirmando que este no solamente influye en la liberación de compuestos de la matriz si no en la estructura y composición, los cuales hacen posibles la permeabilidad hacia el lado basolateral. Crozier *et al.*, (2010) afirman que la absorción en este sitio está asociada con la hidrólisis, y la liberación de la aglicona como resultado de la acción de la lactasa floridina hidrolasa (LPH) en el borde en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado. LPH exhibe una amplia especificidad de sustrato para flavonoides-O-b-D-glucósidos y la aglicona liberada puede ingresar a las células epiteliales por difusión pasiva. Solo los aglicones y algunos glucósidos pueden absorberse en el intestino delgado, mientras que los polifenoles unidos a un resto ramnosa deben llegar al colon e

hidrolizarse por las ramnosidasas de la microbiota antes de la absorción (Manach *et al.*, 2004).

La **Figura 7e** muestra que la bioaccesibilidad en la etapa colónica es mínima o nula. La mayor cuantificación se logró en VF-Extrusión a las 4 h de fermentación (1.05  $\mu\text{g}$  rutina/g). Manach *et al.*, (2004) explican que la microbiota degradan los flavonoides no absorbidos, dividiendo las agliconas por la apertura del heterociclo en diferentes puntos según su estructura química: los flavonoles producen principalmente ácidos hidroxifenilacéticos, las flavonas y flavanonas producen principalmente ácidos hidroxifenilpropiónicos, y los flavanoles producen principalmente fenilvalerolactonas y ácidos hidroxifenilpropiónicos. Estos ácidos se metabolizan más a derivados del ácido benzoico. Los metabolitos microbianos se absorben y se conjugan con glicina, ácido glucurónico o sulfato.

#### **VI.6 Capacidad antioxidante de la vaina de cacao procesada durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.**

Las propiedades biológicas de los antioxidantes pueden depender de su liberación de la matriz alimentaria durante el proceso de digestión (bioaccesibilidad) y pueden diferir cuantitativa y cualitativamente por la extracción empleada y su procesamiento (Huang, Ou, & Prior, 2005).

En la **Tabla 9** observamos que la primer etapa de la digestión (boca) es el sitio donde se da la mayor capacidad antioxidante en ambos métodos, siendo DPPH la de mayor cuantificación en todas las muestras (103.4  $\mu\text{M}$  TE/g, 94.8  $\mu\text{M}$  TE/g y 91.6  $\mu\text{M}$  TE/g para V-Microondas, V-Flujo y VF-Extrusión, respectivamente) y mostrando diferencia significativa contra los resultados para ABTS. Existen varios estudios que indican que el incremento en la biodisponibilidad de varios compuestos fenólicos podría relacionarse con el incremento en la capacidad antioxidante (Campos-Vega *et al.*, 2015)

**Tabla 9** Capacidad antioxidante de la vaina de cacao sometida a diferentes métodos de secado durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro* (boca-colon).

Muestra	V-Microondas	V-Flujo	VF-Extrusión	V-Microondas	V-Flujo	VF-Extrusión
	ABTS			DPPH		
<b>Boca</b>	75.3 ± 2.1 <sup>Ba</sup>	65.8 ± 11.5 <sup>Ba</sup>	63.5 ± 8.5 <sup>Ba</sup>	103.4 ± 0.9 <sup>Aa</sup>	94.8 ± 3.3 <sup>Aa</sup>	91.6 ± 4.8 <sup>Aa</sup>
<b>Estómago</b>	57.7 ± 7.6 <sup>Cb</sup>	57.9 ± 1.6 <sup>Ca</sup>	49.9 ± 0.5 <sup>Cb</sup>	88 ± 4.7 <sup>Ab</sup>	77.7 ± 1.3 <sup>Bb</sup>	56 ± 4 <sup>Cb</sup>
<b>Intestino Delgado</b>						
<i>Basolateral</i> 15 min	26.3 ± 2.9 <sup>Dcd</sup>	30.4 ± 1.7 <sup>CDb</sup>	21 ± 2.4 <sup>Dc</sup>	49.5 ± 1 <sup>ABc</sup>	60.2 ± 9.5 <sup>Ac</sup>	39.5 ± 6.2 <sup>BCc</sup>
<i>Basolateral</i> 30 min	26.1 ± 1.5 <sup>Dcd</sup>	36.2 ± 4.1 <sup>Cb</sup>	16.5 ± 5.4 <sup>Ec</sup>	46.7 ± 1 <sup>ABc</sup>	53.5 ± 3.9 <sup>Ac</sup>	39.6 ± 1.4 <sup>BCc</sup>
<i>Basolateral</i> 60 min	27 ± 1 <sup>CDc</sup>	35.1 ± 4.2 <sup>BCb</sup>	20.7 ± 2.7 <sup>Dc</sup>	48.5 ± 0.3 <sup>Ac</sup>	48.4 ± 7.4 <sup>Ac</sup>	39.4 ± 2.2 <sup>Bc</sup>
<i>Apical</i> 15 min	19.6 ± 2.9 <sup>Code</sup>	37.8 ± 3.1 <sup>Bb</sup>	17.6 ± 1.9 <sup>Cc</sup>	51.5 ± 4.1 <sup>Ac</sup>	55.6 ± 9.6 <sup>Ac</sup>	39.1 ± 5.8 <sup>Bc</sup>
<i>Apical</i> 30 min	16.8 ± 4.1 <sup>Ce</sup>	38.2 ± 2.2 <sup>Bb</sup>	16.2 ± 2.9 <sup>Cc</sup>	51.5 ± 3.3 <sup>Ac</sup>	56.7 ± 1 <sup>Ac</sup>	41 ± 4 <sup>Bc</sup>
<i>Apical</i> 60 min	18.9 ± 2.7 <sup>Dde</sup>	37.9 ± 5.1 <sup>BCb</sup>	22.6 ± 2.1 <sup>Dc</sup>	47.5 ± 2.6 <sup>ABc</sup>	52.5 ± 7 <sup>Ac</sup>	34.8 ± 4.5 <sup>Cc</sup>
<b>Colon</b>						
6 h	1.9 ± 0.01 <sup>Cf</sup>	1.7 ± 0.01 <sup>Dc</sup>	1.4 ± 0.04 <sup>Ed</sup>	3.5 ± 0.06 <sup>Ad</sup>	2.9 ± 0.04 <sup>Bd</sup>	1.9 ± 0.04 <sup>Cd</sup>
12 h	2.1 ± 0.3 <sup>BCf</sup>	1.6 ± 0.02 <sup>Dc</sup>	1.4 ± 0.2 <sup>Dd</sup>	3.4 ± 0.06 <sup>Ad</sup>	2.4 ± 0.08 <sup>Bd</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>CDd</sup>
24 h	1.7 ± 0.4 <sup>Bf</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>Bc</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>Bd</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>Ad</sup>	1.8 ± 0.08 <sup>Bd</sup>	1.7 ± 0.3 <sup>Bd</sup>

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes por triplicado ± desviación estándar y son expresadas como μM eq. Trolox/g de muestra. Letras mayúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre muestras. Letras minúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre etapas de la digestión de cada muestra ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey).

Durante la digestión gastrointestinal, los valores obtenidos para la técnica de DPPH son significativamente mayores que los estudiados para ABTS. Huang *et al.*, (2005) también observaron este fenómeno y afirma que la técnica de DPPH podría estar sobreestimando la capacidad antioxidante debido a su interacción con

moléculas pequeñas de estructuras coplanares que tienen un mejor acceso al radical de la molécula DPPH.

La capacidad antioxidante se ve reducida conforme avanza la digestión observándose la siguiente tendencia: boca > estómago > intestino delgado > colon.

Anteriormente se mencionó que no se lograron cuantificar fenoles totales, taninos condensados ni flavonoides totales en la etapa gástrica, sin embargo, observamos que estas muestras ejercen capacidad antioxidante, acercándonos a la teoría propuesta de que los compuestos fenólicos se encuentran atrapados en la matriz de la fibra en el quimo, lo que obstruye su cuantificación.

En la etapa intestinal, solamente para la técnica de ABTS en la muestra V-Microondas se observan diferencias significativas entre lado apical y basolateral, en el resto de las muestras y técnicas no se presenta tal diferencia. Serrano, Goñi, & Saura-Calixto, (2007) estudiaron la capacidad antioxidante total liberada durante todo el proceso de digestión de alimentos frecuentemente consumidos en la dieta española y observó que la mayoría de los antioxidantes están disponibles y ejercen su actividad en la etapa intestinal debido a la acción de las enzimas digestivas.

Al comparar la actividad antioxidante entre muestras, por etapas en el intestino delgado, observamos que VF-Extrusión es la que menores valores obtuvo para ambas técnicas y V-Flujo la que mayores valores logró. Ovaskainen *et al.*, (2008) afirman que, aunque las concentraciones de fenólicos pueden disminuir durante el procesamiento, puede mejorar la biodisponibilidad de estos compuestos. En nuestro estudio se aprecia que el procesamiento que tiene el material impacta también en su actividad biológica, durante su digestión.

La importancia de lograr cuantificar capacidad antioxidante en el lado basolateral radica en que los polifenoles extienden sus propiedades una vez que ingresan al sistema al ser capaces de modular vías de señalización celular, lo que confiere posibles propiedades anticancerígenas. La capacidad antioxidante se ha tenido en cuenta como uno de los mecanismos de acción sobresalientes para inhibir la mutagénesis e iniciación del cáncer, por medio de su capacidad para eliminar especies reactivas de oxígeno, activar enzimas antioxidantes, promover la

reparación del ADN y reducir la lesiones oxidativas (Giampieri, Alvarez-Suarez, & Battino, 2014).

Durante la etapa colónica se ejerce poca o nula capacidad antioxidante. Los valores encontrados pueden ser atribuibles a los compuestos fenólicos que no atraviesan la barrera intestinal y quedan en la FND, alcanzando el colon donde pueden producirse nuevos compuestos que ejerzan capacidad antioxidante (Saura-Calixto, Serrano, & Goñi, 2007).

#### **VI.7 Contenido, bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad *in vitro* (boca-colon) de compuestos fenólicos y teobromina de la vaina de cacao determinados por HPLC**

En la **Tabla 10** se muestra el contenido de compuestos fenólicos específicos y teobromina de las muestras iniciales, así como la bioaccesibilidad de estos metabolitos a través de la digestión gastrointestinal.

En el presente estudio solamente se pudo cuantificar el ácido gálico y teobromina en los extractos iniciales de las muestras, siendo el ácido gálico quien presenta los mayores valores. Valadez-Carmona *et al.*, (2017) cuantificaron los compuestos fenólicos de la VC sometido a distintos métodos de secado dentro de los cuales también identificó al ácido gálico, aunque no como el componente mayoritario, detectando de 324-1347  $\mu\text{g/g}$ . Estos valores se encuentran muy por debajo de los aquí reportados, las diferencias pueden ser atribuibles a la columna o incluso a la variedad y condición del fruto. Además del ácido gálico, Valadez-Carmona *et al.*, (2017) cuantifican catequina, quercetina, (-) - epicatequina, ácido gálico, ácido cumárico y ácido protocatéhuico, los cuales en este estudio no logramos identificar.

**Tabla 10** Contenido y bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* (boca-colon) de compuestos fenólicos y teobromina de la vaina de cacao determinados por HPLC.

Muestra	Ácido gálico	Ácido protocatehuico	Catequina	Ácido clorogénico	Epicatequina	Teobromina
<b>Inicial</b>						
VF-Extrusión	697120.1 ± 50692.5 <sup>abA</sup>	nd	nd	nd	nd	210.7 ± 11.9 <sup>abB</sup>
V-Flujo	644443 ± 20619.7 <sup>bA</sup>	nd	nd	nd	nd	205.8 ± 75.4 <sup>abB</sup>
V-Microondas	765414.3 ± 87500.3 <sup>aA</sup>	nd	nd	nd	nd	135.1 ± 2.01 <sup>abB</sup>
<b>Boca</b>						
VF-Extrusión	nd	722.1 ± 0.6 <sup>dB</sup>	775.2 ± 3.8 <sup>oA</sup>	553.8 ± 0.07 <sup>gC</sup>	nd	5.1 ± 0.03 <sup>bdD</sup>
V-Flujo	nd	580.1 ± 11.6 <sup>gA</sup>	nd	534.5 ± 10.6 <sup>hB</sup>	nd	4.6 ± 0.003 <sup>bcC</sup>
V-Microondas	171.2 ± 0.02 <sup>CD</sup>	nd	713.2 ± 2.1 <sup>oA</sup>	554.7 ± 1.03 <sup>gC</sup>	686.5 ± 0.5 <sup>eB</sup>	5.4 ± 0.04 <sup>beE</sup>
<b>Estómago</b>						
VF-Extrusión	nd	548.8 ± 0.5 <sup>h</sup>	nd	nd	nd	nd
V-Flujo	nd	628 ± 2.1 <sup>fA</sup>	nd	592.8 ± 0.9 <sup>iC</sup>	614.5 ± 1.9 <sup>fB</sup>	nd
V-Microondas	nd	823.7 ± 1.7 <sup>cA</sup>	nd	610.2 ± 1.1 <sup>fB</sup>	nd	8.3 ± 0.009 <sup>bcC</sup>
<b>Intestino delgado</b>						
<i>Basolateral 15 min</i>						
VF-Extrusión	2729.6 ± 59.7 <sup>CB</sup>	nc	8481.8 ± 10.1 <sup>dA</sup>	nd	nd	nd
V-Flujo	5948.9 ± 0.1 <sup>cA</sup>	549.3 ± 0.3 <sup>hC</sup>	nd	912.2 ± 0.2 <sup>eB</sup>	nd	7.6 ± 0.2 <sup>bdD</sup>
V-Microondas	1892.2 ± 19.4 <sup>CB</sup>	nc	4837.2 ± 19.7 <sup>hA</sup>	915.3 ± 0.6 <sup>eC</sup>	nd	nd
<i>Basolateral 30 min</i>						
VF-Extrusión	5691.2 ± 81.1 <sup>CB</sup>	nc	8321.5 ± 4.2 <sup>eA</sup>	nd	nd	nd
V-Flujo	2302.6 ± 105.4 <sup>cA</sup>	2000.5 ± 7.5 <sup>abB</sup>	1112 ± 55.8 <sup>mC</sup>	nd	nd	7.9 ± 0.002 <sup>bdD</sup>
V-Microondas	nc	nc	4517 ± 9.4 <sup>fA</sup>	909.2 ± 0.2 <sup>eB</sup>	nd	nd
<i>Basolateral 60 min</i>						
VF-Extrusión	nc	nc	9047.9 ± 9.6 <sup>cA</sup>	916.9 ± 0.1 <sup>eB</sup>	nd	nd
V-Flujo	nc	nc	nc	917.8 ± 1.1 <sup>eB</sup>	1043.7 ± 5.3 <sup>dA</sup>	7.6 ± 0.21 <sup>bcC</sup>
V-Microondas	1169.3 ± 3.8 <sup>CB</sup>	nd	7146.6 ± 1.6 <sup>gA</sup>	945.2 ± 0.7 <sup>dC</sup>	nd	nd
<i>Apical 15 min</i>						
VF-Extrusión	nd	680.2 ± 8.8 <sup>eC</sup>	10712.6 ± 35.1 <sup>aA</sup>	1086.2 ± 2.5 <sup>bbB</sup>	nd	nd
V-Flujo	nd	nc	1531.1 ± 6.1 <sup>dB</sup>	nd	1957.8 ± 4.8 <sup>bA</sup>	22 ± 3.9 <sup>bcC</sup>
V-Microondas	nc	262.3 ± 5.2 <sup>iC</sup>	278.4 ± 2.03 <sup>fA</sup>	1222.8 ± 2.2 <sup>abB</sup>	nd	16.6 ± 0.3 <sup>bdD</sup>
<i>Apical 30 min</i>						
VF-Extrusión	nd	1367.9 ± 13.7 <sup>bbB</sup>	135.3 ± 25.9 <sup>fA</sup>	1027.6 ± 2.05 <sup>ccC</sup>	nd	nd
V-Flujo	nd	nc	992.3 ± 0.06 <sup>nbB</sup>	nd	1758.2 ± 17.8 <sup>cA</sup>	9.0 ± 0.3 <sup>bcC</sup>
V-Microondas	nc	648.7 ± 5.01 <sup>fB</sup>	1392.7 ± 39.9 <sup>kA</sup>	nd	nd	17.8 ± 0.6 <sup>bcC</sup>
<i>Apical 60 min</i>						
VF-Extrusión	nd	nc	10447.9 ± 86.0 <sup>baA</sup>	1024.9 ± 14.6 <sup>cbB</sup>	nd	nd
V-Flujo	nd	nc	1065.3 ± 9.4 <sup>mnB</sup>	nd	2046.7 ± 2.9 <sup>aA</sup>	29.6 ± 1.09 <sup>bcC</sup>
V-Microondas	nc	nc	nc	nd	nd	13.5 ± 0.3 <sup>b</sup>
<b>Colon</b>						
<i>4 h</i>						
VF-Extrusión	2.0 ± 0.7 <sup>c</sup>	nd	nc	nd	nd	nd
<i>6 h</i>						
VF-Extrusión	0.4 ± 0.006 <sup>cbB</sup>	nd	1.9 ± 0.001 <sup>paA</sup>	nd	nd	nd
V-Flujo	3.9 ± 0.2 <sup>caA</sup>	nd	2.5 ± 0.4 <sup>paA</sup>	nd	2.6 ± 0.4 <sup>gaA</sup>	nd
V-Microondas	2.5 ± 0.01 <sup>cbB</sup>	nd	3.2 ± 0.04 <sup>paA</sup>	2.4 ± 0.007 <sup>icC</sup>	2.3 ± 0.002 <sup>gdD</sup>	nd
<i>12 h</i>						
VF-Extrusión	nd	nd	1.9 ± 0.005 <sup>p</sup>	nd	nd	nd

V-Flujo	1.2 ± 0.009 <sup>CB</sup>	nd	nc	nd	3.2 ± 0.007 <sup>9A</sup>	nd
V-Microondas	0.8 ± 0.009 <sup>CB</sup>	nd	2.5 ± 0.05 <sup>PA</sup>	nd	nd	nd
24 h						
VF-Extrusión	nd	nd	nc	nd	nd	nd
V-Flujo	1.9 ± 0.01 <sup>c</sup>	nd	nc	nd	nd	nd
V-Microondas	nd	nd	nc	nd	2.40 ± 0.007 <sup>g</sup>	nd

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado ± desviación estándar y son expresadas como µg/g. Letras minúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa por compuesto. Letras mayúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre compuestos, por muestra ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey). nd, debajo del límite de detección. nc, debajo del límite de cuantificación.

En cuanto a la teobromina, este el principal alcaloide en el fruto del cacao, y exhibe efectos estimulantes en el sistema nervioso central, gastrointestinal, cardiovascular, renal y respiratorio (Sena, Assis, & Branco, 2011). En el fruto del cacao se sintetiza tanto en el pericarpio como en los cotiledones, y en la fase de maduración, las concentraciones de en pericarpio disminuyen bruscamente, mientras que las concentraciones en el grano tienden a incrementar. Esto sugiere que el sitio principal de la síntesis de teobromina es el grano, sin excluir una migración entre el pericarpio y el grano de cacao (Zheng, Koyama, Nagai, & Ashihara, 2004). Se cuantificó teobromina en el extracto inicial con valores de 210 µg/g, 205 µg/g y 135 µg/g para VF-Extrusión, V-Flujo y V-Microondas, respectivamente. Estos valores son mayores a los reportados por Nguyen & Nguyen, (2017) quien reporta 67.9 µg/g. Sotelo *et al.*, (2015) informan un intervalo de 20 µg/g a 37.5 µg/g. Las diferencias pueden verse influenciadas por diferentes factores, como la variabilidad genética, las condiciones ambientales, la edad, el momento de la recolección o el procesamiento de la matriz (Sena *et al.*, 2011).

La digestión gastrointestinal tuvo un impacto positivo en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de la VC, ya que aun cuando se obtuvieron resultados heterogéneos de acuerdo a la muestra, el compuesto y la etapa de la digestión, las reacciones enzimáticas, condiciones de temperatura y pH lograron la liberación de compuestos que inicialmente no se lograron detectar. La absorción y el metabolismo de los compuestos fenólicos son determinado principalmente por su estructura

química, que depende de factores como el grado de glicosilación, acilación, su estructura básica (es decir, benceno o derivados de flavona), conjugación con otros compuestos fenólicos, tamaño molecular, grado de polimerización y solubilidad (Bravo, 1998)

Primeramente, para el ácido gálico se observa una tendencia en la bioaccesibilidad que va en el siguiente orden: lado basolateral > colon > boca, sin lograr cuantificación en las etapas del estómago y lado apical. Esto nos sugiere que el ácido gálico está siendo permeado en la etapa intestinal, y es liberado gracias al medio alcalino. En el lado apical no es cuantificable este metabolito, sin embargo en la etapa colónica se vuelve a identificar, lo que podría indicar la hidrólisis de elagitaninos y la liberación de ácido gálico de la matriz alimentaria a los medios de fermentación como consecuencia de la actividad microbiana (Mosele, Macià, Romero, Motilva, & Rubió, 2015).

El ácido protocatehuico tiene un comportamiento heterogéneo a través de la digestión sin lograrse identificar una tendencia en su bioaccesibilidad. En nuestro estudio, se cuantifica en la etapa oral y gástrica, y su bioaccesibilidad aumenta para V-Flujo y VF-Extrusión durante la etapa intestinal. Vitaglione *et al.*, (2007) reportan que la degradación de las agliconas de las antocianinas conduce a la formación de ácidos fenólicos y aldehídos, principalmente el ácido protocatéhuico. Lo que explica el aumento de este metabolito en la etapa intestinal, dependiendo de la muestra.

Las condiciones fisiológicas tienen un impacto benéfico sobre la bioaccesibilidad de la catequina, que no se identificó en el extracto inicial. Se logra detectar en la etapa oral y su bioaccesibilidad aumenta durante la etapa intestinal. Rein *et al.*, (2013) informan que los flavonoides unidos a los b-glucósidos, es una de las formas más predominantes en la naturaleza, pueden ser absorbidos en muy poca medida como tales y / o metabolizados por enzimas en el intestino delgado. Según Bravo, (1998) los monómeros (catequina y epicatequina) y los dímeros pueden atravesar la barrera intestinal en el intestino delgado. En este estudio se observó una alta permeabilidad de catequina. En la etapa colónica hay una reducción en la cuantificación, en algunos casos se logró detectar, pero no

cuantificar la catequina. La fracción que no se absorbe en el intestino delgado llega al colon donde ejerce su acción o es degradada por las bacterias intestinales o del colon antes de la absorción o excreción de los metabolitos resultantes. La cantidad de sustrato, la microbiota fecal y la relación de sustrato a inóculo son algunos factores cruciales en los estudios de fermentación que pueden mostrar discrepancia en los resultados (Olivé & Casado, 2013). Cabe destacar que, de manera general, entre los metabolitos estudiados, la catequina tuvo la mayor bioaccesibilidad en las etapas de la boca, intestino y colon; sin lograr ser cuantificada en la etapa gástrica.

La bioaccesibilidad del ácido clorogénico sigue la tendencia: lado apical > lado basolateral > estómago > boca. La mayor bioaccesibilidad dada en el lado apical o FND concuerda con lo reportado por Luzardo-Ocampo *et al.*, (2017) quien lo atribuyen a que el ácido clorogénico se encuentra ligado a otros componentes, y durante la digestión gastrointestinal, en la etapa intestinal logra liberarse de la matriz. Así entonces, observamos que una porción que se liberó logra ser absorbida en el lado basolateral. En la etapa colónica se observa una drástica disminución; Bouayed, Deußer, Hoffmann, & Bohn, (2012) confirmó que ácido clorogénico es hidrolizado a nivel colónico por medio de esterasas propias de la microbiota asociada.

Se ha reportado que los principales grupos de polifenoles del cacao son las catequinas o fl-3-ols (catequina y epicatequina), proantocianidinas y antocianinas en baja proporción (Olivé & Casado, 2013). Según Rein *et al.*, (2013) los flavonoides con diferente estereoquímica exhiben diferente biodisponibilidad y bioeficacia, este es el caso de (-) - epicatequina y (+) – catequina. Además, Baba *et al.*, (2000) reportan que la bioaccesibilidad de (-) - epicatequina es similar cuando se consume una bebida de cacao o una barra de chocolate. Los autores informaron que se absorbió el 29.8 5.3% y 25.3 8.1% de la ingesta inicial cuando cinco voluntarios consumieron cantidades iguales de (-) - epicatequina en forma de bebida o chocolate, respectivamente. Los resultados de este proyecto difieren de lo reportado en la literatura. Sin embargo, cabe mencionar que en este estudio los polifenoles se encuentran en una matriz mucho más compleja, por lo que su liberación se ve

condicionada por varios factores. La bioaccesibilidad de la epicatequina se vio altamente limitada, V-Flujo y en algunas etapas puntuales V-Microondas presentaron cuantificación de este metabolito, pero no VF-Extrusión, por lo que afirmamos que el procesamiento es uno de los factores limitantes.

Los estudios sobre bioaccesibilidad de teobromina son muy escasos. En la etapa oral, se logró cuantificar la teobromina en todas las muestras, cuantificando menos del 3% del contenido inicial. Posterior a la etapa oral existe un efecto sobre la bioaccesibilidad, relacionado con el procesamiento. V-Flujo tiene la mayor bioaccesibilidad y permeabilidad intestinal, para V-Microondas solo se identifica en la etapa apical; y por su parte, para VF-Extrusión no es bioaccesible en ninguna de las etapas posteriores a la oral. Este comportamiento puede ser explicado por lo reportado por Smit, (2011) que menciona que la teobromina podría unirse a proteínas o polifenoles y reducir su bioaccesibilidad. Alexander, 2008; Arnaud, 2011; Martínez-López *et al.*, (2014) afirma que la teobromina pura se absorbe rápidamente (> 90%, 45 minutos) en el tracto gastrointestinal y luego se metaboliza en el hígado en derivados de metilxantina y ácidos metilúricos por el citocromo P450 junto con la enzima xantina oxidasa. Este tiempo corresponde a la etapa gástrica, donde se pudo dar la absorción. No existen estudios sobre el comportamiento de este metabolito a través de la digestión gastrointestinal. Hay estudios que evalúan distintas matrices relacionadas con el chocolate, pero no la VC. En este contexto, el presente trabajo aporta un panorama que nos brinda información importante para ser aplicado en estudios posteriores.

Valadez-Carmona *et al.*, (2017) muestran en los resultados de su investigación que diferentes procesos de secado producen diferentes patrones de fenoles, flavonoides y flavanoles en VC (Aguilera y Stanley, 1999). Lo que sugiere que los mecanismos que afectan a los ácidos fenólicos y flavonoides están diferenciados. En este trabajo se observó que esta influencia llega a impactar también la bioaccesibilidad de estos metabolitos, presentando diferencias significativas entre procesamientos durante las etapas de la digestión gastrointestinal para la mayoría de los compuestos.

## VI.8 Efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible de la vaina de cacao sobre el pH del medio de incubación

Una vez separadas ambas fracciones intestinales (lado apical y lado basolateral) la fracción obtenida del lado apical o fracción no digerible (FND) se sometió a una fermentación colónica *in vitro*, y se registró el pH durante 24 h. Los resultados se observan en la **Tabla 11**.

De las tres muestras, solamente la VF-Extrusión se fermentó cuatro tiempos evaluados (4 h, 6 h, 12 h y 24 h) debido a que esta tecnología tiene algunas características positivas únicas en comparación con otros procesos, en donde el material está sometido a un cizallamiento mecánico. Esto es capaz de romper los enlaces covalentes en los biopolímeros, y la intensa alteración estructural y la mezcla facilitan la modificación de las propiedades funcionales de los ingredientes alimentarios (Singh *et al.*, 2007).

**Tabla 11.** Efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible de la vaina de cacao sobre el pH del medio de incubación.

Muestra	0 h	4 h	6h	12 h	24 h
V-Microondas	7.8 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	--	6.9 ± 0.06 <sup>ABc</sup>	7.1 ± 0.06 <sup>Ab</sup>	7.1 ± 0.08 <sup>Ab</sup>
V-Flujo	7.1 ± 0.03 <sup>Ca</sup>	--	6.7 ± 0.08 <sup>BCc</sup>	6.8 ± 0.04 <sup>Bbc</sup>	6.9 ± 0.09 <sup>Bb</sup>
VF-Extrusión	7.2 ± 0.1 <sup>Ca</sup>	6.58 ± 0.02 <sup>Bd</sup>	6.6 ± 0.06 <sup>Ccd</sup>	6.8 ± 0.1 <sup>Bbc</sup>	6.9 ± 0.2 <sup>Bb</sup>
Blanco (sin muestra)	7.6 ± 0.2 <sup>Ba</sup>	6.8 ± 0.03 <sup>Ac</sup>	7.07 ± 0.05 <sup>Abc</sup>	7.2 ± 0.05 <sup>Ab</sup>	7.3 ± 0.06 <sup>Aab</sup>
Control (Inulina)	7.5 ± 0.3 <sup>Ba</sup>	5.3 ± 0.06 <sup>Cb</sup>	4.9 ± 0.1 <sup>Dbc</sup>	4.6 ± 0.1 <sup>Ccd</sup>	4.4 ± 0.1 <sup>Cd</sup>

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± DE. Letras minúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fermentación por muestra ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey). Letras mayúsculas diferentes por columnas expresan diferencia significativa entre grupos bajo las mismas horas ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey).

Se utilizó como control un carbohidrato fermentable (Inulina) ya que se ha reportado que esta es fermentada en el colon casi exclusivamente por colonias de bifidobacterias y bacteroides. Una fermentación tan extensa provoca un aumento de la biomasa bacteriana fecal, y disminución del pH colónico (Roberfroid, 1993). Como blanco se usó la saliva proveniente del proceso de digestión, el cual no cuenta con carbohidratos disponibles para ser fermentado. El pH es una medida indirecta de la producción de AGCC ya que un aumento en estos provocan una disminución del pH, influyendo también indirectamente en la composición de la microbiota del colon (Wong *et al.*, 2006). El principal sustrato de la fermentación colónica es la fibra, aunque también pueden ser fermentadas algunas proteínas no digeridas. La fibra insoluble (lignina, celulosa y algunas hemicelulosas), puede llevar consigo sustrato de carbohidratos fermentables, incluidos almidones y azúcares, pero en su mayoría son resistentes a la fermentación por microbiota colónica y desempeñan un papel importante en el aumento de volumen fecal, mientras que la fibra soluble (pectina, mucílagos y algunas hemicelulosas) se fermentan casi completamente por la microbiota del colon y pueden tener poco efecto en el aumento del volumen fecal (Wong, De Souza, Kendall, Emam, & Jenkins, 2006).

En la **Tabla 11** se observa que hay una disminución del pH dependiente del tiempo, y que, además, tanto las muestras como el blanco alcanzan su menor pH antes de las 12 h para posteriormente estabilizarse. Este comportamiento no se sigue con la inulina, la cual a lo largo del tiempo disminuye su pH gradualmente, hasta alcanzar el menor valor a las 24 h (pH 4.4). VF-Extrusión fermentada por 4 h (pH 6.58) es la muestra que obtuvo el menor valor de pH, por lo que se espera una mayor producción de AGCC en dichas muestras a estos tiempos. Granito, Champ, David, Bonnet, & Guerra, (2001) informaron que muestras con el mayor contenido de  $\alpha$ -galactósidos inducen un pH más bajo durante la fermentación. Walker, Duncan, McWilliam Leitch, Child, & Flint, (2005) sugirieron que una disminución del pH de la fermentación del sustrato en el colon por la microbiota, induce la producción de butirato y las poblaciones de bacterias productoras de butirato, así como la disminución del crecimiento de bacteroides.

## VI.9 Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la vaina de cacao procesada

El principal metabolito de la fermentación anaeróbica es el piruvato, que es convertido en acetato, propionato, butirato, CO<sub>2</sub>, hidrógeno, metano y agua. Los ácidos grasos son componentes saturados e insaturados de lípidos complejos. Dentro de los más comunes se encuentran el ácido acético, propiónico, butírico y valérico, con 2, 3, 4 y 5 carbonos, respectivamente. La fermentación anaeróbica bacteriana de carbohidratos en el colon es la fuente primaria natural para la generación de grandes cantidades de AGCC en el cuerpo humano, donde se pueden alcanzar concentraciones milimolares (Miller, 2004).

En la **Tabla 12** se presenta la concentración de AGCC cuantificada por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de las muestras de cacao procesadas, así como el blanco (saliva) y control de fermentación (inulina) a lo largo de 24 h de fermentación. También se muestra el radio molar, la producción total y el índice de fermentabilidad (IF).

**Tabla 12** Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el extracto de la fermentación colónica *in vitro*.

Muestra	Tiempo	AGCC	Concentración (mM) <sup>1</sup>	Radio molar (%)	Ácidos grasos totales (mM)	IF (%)
V-Microondas	6h	Acético	20.5 ± 2.9 <sup>c</sup>	67.7	30.3	36.9
		Propiónico	6.3 ± 1.6 <sup>c</sup>	20.8		
		Butírico	3.5 ± 1.7 <sup>b</sup>	11.6		
	12h	Acético	25.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	76.1	33.26	38.6
		Propiónico	6.06 ± 0.1 <sup>b</sup>	18.2		
		Butírico	1.9 ± 0.01 <sup>c</sup>	5.7		
	24h	Acético	40.4 ± 2.5 <sup>c</sup>	72.4	55.8	43.1
		Propiónico	13.2 ± 1.2 <sup>c</sup>	23.7		
		Butírico	2.2 ± 0.4 <sup>c</sup>	3.9		
	6h	Acético	30.6 ± 4.1 <sup>b</sup>	75.04	40.8	49.7
		Propiónico	9.7 ± 2.8 <sup>b</sup>	23.8		

<b>V-Flujo</b>	12h	Butírico	$0.4 \pm 0.3^c$	1.05	60.4	70.2	
		Acético	$41.6 \pm 0.5^b$	68.7			
		Propiónico	$16.5 \pm 3.1^a$	27.2			
	24h	Butírico	$2.3 \pm 0.02^c$	3.9	110.6	85.4	
		Acético	$71.4 \pm 0.07^{ab}$	64.5			
		Propiónico	$36.7 \pm 1.5^a$	33.2			
<b>VF-Extrusión</b>	4h	Butírico	$2.3 \pm 0.02^c$	2.1	68.6	94.6	
		Acético	$43.1 \pm 12.6^a$	62.9			
		Propiónico	$17.7 \pm 3.3^a$	25.8			
	6h	Butírico	$7.6 \pm 2.5^a$	11.2	45.8	55.8	
		Acético	$34.8 \pm 3.2^b$	75.8			
		Propiónico	$10.7 \pm 0.3^b$	23.3			
	12h	Butírico	$0.3 \pm 0.1^c$	0.7	61.3	71.2	
		Acético	$38.9 \pm 8.08^b$	63.5			
		Propiónico	$18.2 \pm 1.9^a$	29.6			
	24h	Butírico	$4.1 \pm 0.2^b$	6.7	106.3	82.2	
		Acético	$63.6 \pm 14.9^b$	59.8			
		Propiónico	$36.1 \pm 0.3^a$	34			
	<b>Control (Inulina)</b>	4h	Butírico	$6.5 \pm 0.3^b$	6.1	72.4	
			Acético	$51.6 \pm 6.3^a$	71.1		
			Propiónico	$19.8 \pm 2.7^a$	27.3		
6h		Butírico	$1.03 \pm 0.1^b$	1.4	82.1		
		Acético	$55.7 \pm 8.3^a$	67.8			
		Propiónico	$20.01 \pm 0.03^a$	24.3			
12h		Butírico	$6.4 \pm 0.07^a$	7.7	86.1		
		Acético	$62.4 \pm 9.1^a$	72.5			
		Propiónico	$17.7 \pm 4.3^a$	20.5			
24h		Butírico	$5.8 \pm 0.7^a$	6.8	129.3		
		Acético	$91.5 \pm 12.3^a$	70.7			
		Propiónico	$8.3 \pm 3.7^b$	14.1			
		Butírico	$19.4 \pm 0.2^a$	15.05			

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE. Las letras minúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre muestras, por compuesto, por tiempo de fermentación ( $\alpha=0.05$ ) por prueba de Tukey. AGCC: ácidos grasos de cadena corta. IF (%): índice de fermentabilidad. <sup>1</sup>Contenido de AGCC expresado en mM compuesto por 0.6 mL de muestra (300 mg sólidos + 300  $\mu$ L líquido) y 100 mg de inulina, respectivamente.

Mediante la producción de AGCC se considera que la microbiota colónica fue capaz de utilizar a la vaina como sustrato. La mayor cantidad de ácido acético se da por la fermentación de la inulina a las 24 h (91.25 mM) seguido de V-Flujo fermentada por 24 h (71.4 mM). Su producción fue aumentando conforme el tiempo de fermentación en las muestras V-Microondas, V-Flujo e inulina y además es el metabolito mayormente producido. Este comportamiento concuerda con lo reportado por el grupo de trabajo en otras matrices alimenticias (Campos-Vega *et al.*, 2009; Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018). Cabe destacar las implicaciones biológicas que esto conlleva, este metabolito es fácilmente absorbido y transportado al hígado, y por lo tanto es menos metabolizado en el colon. El acetato es el sustrato primario para la síntesis de colesterol (Wong *et al.*, 2006).

En la producción del ácido propiónico destaca V-Flujo fermentada por 24 h (36.7 mM) y VF-Extrusión fermentada por 24 h (36.1 mM), su cantidad es incluso mayor que la inulina al mismo tiempo de fermentación (8.3 mM). Para la muestra V-Microondas y V-Flujo la cantidad de propionato aumenta conforme el tiempo de fermentación; tendencia que reportan Campos-Vega *et al.*, (2009). Este comportamiento no es el mismo que el observado para VF-Extrusión e inulina. Zamora-Gasga *et al.*, (2015.) mencionaron que puede deberse a diferencias estructurales entre los sustratos y la afinidad del microbiota por el sustrato disponible.

El butirato es el combustible preferido de las células epiteliales del colon, pero también desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Es el AGCC más importante en el metabolismo de los colonocitos, donde el 70% al 90% del butirato es metabolizado por el colonocito (Wong *et al.*, 2006). En la **Tabla 12** se observa que existe una influencia del procesamiento en la producción de AGCC, en cuanto al ácido butírico, que fue el metabolito con menor índice; y es inulina fermentada por 24 h (19.4 mM) y VF-Extrusión 4h (7.6 mM) las cuales muestran mayor valor. En su estudio sobre la fermentación microbiana intestinal del salvado de trigo y producción de AGCC después de la extrusión Arcila, Weier, & Rose, (2015) observó diferencias

significativas entre el salvado de trigo extruido y el no extruido durante la primera mitad de la fermentación (0-12 h), pero durante la segunda mitad (12-24 h) los aumentos fueron más prominentes en las muestras extruidas, particularmente para el butirato y lo atribuyen a que la extrusión podría haber aumentado la disponibilidad de fracciones de la FND para bacterias productoras de butirato mediante la disociación de polisacáridos con otros componentes de la pared celular y así impactar en la fermentabilidad de la matriz. Dust *et al.*, (2004) proponen que la extrusión afecta la concentración del almidón resistente como resultado de la gelatinización de los gránulos de almidón presentes. El proceso de gelatinización permite una mayor susceptibilidad del almidón a la hidrólisis enzimática y, posteriormente, una mayor digestibilidad del almidón.

Campos-Vega *et al.*, (2009) reportaron que la producción de butirato aumenta con respecto al tiempo de fermentación para frijol común obteniendo un promedio de 7, 8 y 13 mM para 6, 12 y 24 h respectivamente. Luzardo-Ocampo *et al.*, (2018) en su estudio de la FND de totopos de maíz y frijol no observaron una relación entre el tiempo de fermentación y la producción para este metabolito, reportando 0.047, 0.045 y 0.05 mM para 6, 12 y 24 h. Ya que en este estudio VF-Extruida fermentada por 4 h muestra el mayor contenido de ácido butírico, se propone que la microbiota tiene fácil acceso al sustrato, debido a la composición química, la forma física y la cantidad de sustrato, por lo que es metabolizado en menores tiempos de fermentación. Además puede influenciar el tipo y número de poblaciones bacterianas en el intestino (Macfarlane & Macfarlane, 2003). Esta propuesta es respaldada por el índice de fermentabilidad (IF) el cual expresa el porcentaje de fermentación de cada muestra en cada tiempo, tomando a inulina al mismo tiempo como referencia. De esta manera, VF-Extrusión fermentada por 4 h es la que logró mayor índice de fermentación entre las estudiadas (94.6%).

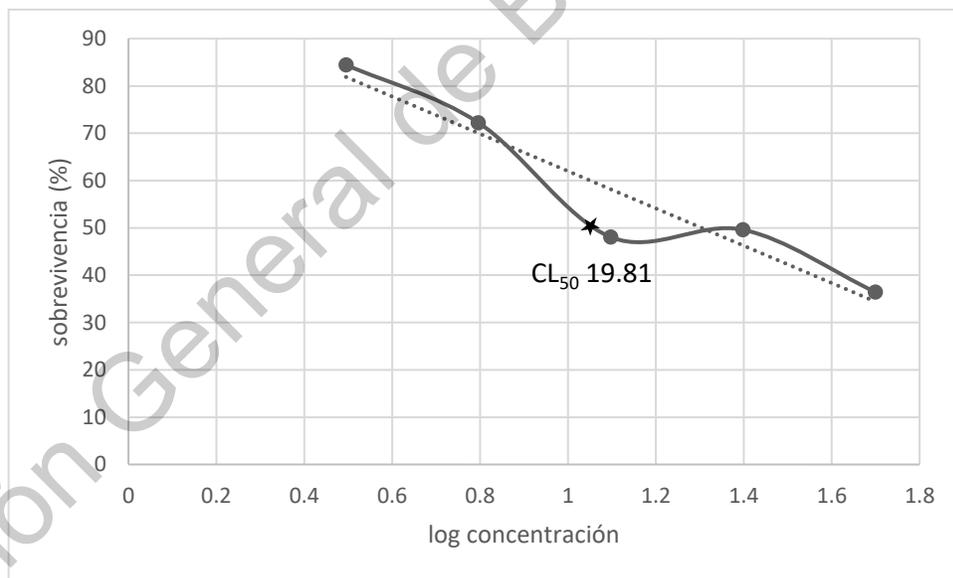
Se eligió el extracto de fermentación colónica (EFC) de VF-Extrusión fermentada por 4 h (EF-VFE) para evaluar su efecto sobre la proliferación en un modelo de células transformadas de cáncer de colon empleando la línea celular de

adenocarcinoma colorrectal humano HT-29, debido a su mayor producción de AGCC, especialmente de ácido butírico.

#### VI.10 Efecto del extracto de fermentación colónica *in vitro* sobre la sobrevivencia celular.

En la **Figura 8** se presenta que el EF-VFE inhibió el crecimiento de células HT-29 de manera dosis dependiente de la concentración. La  $CL_{50}$  obtenida después de 48 h de tratamiento fue de 19.8% equivalente a 10.1 mM, 4.14 mM, 1.79 mM para ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, respectivamente.

La  $CL_{50}$  obtenida es mayor a lo reportado para otras matrices. Campos-Vega *et al.*, (2012) reportan en productos de la fermentación de la FND del frijol bayo madero sobre células de adenocarcinoma humano HT-29 una  $CL_{50}$  del 17%.



**Figura 8** Curva dosis-respuesta (Log) y concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la VF-Extrusión (EF-VFE) sobre células de cáncer de colon humano HT-29.

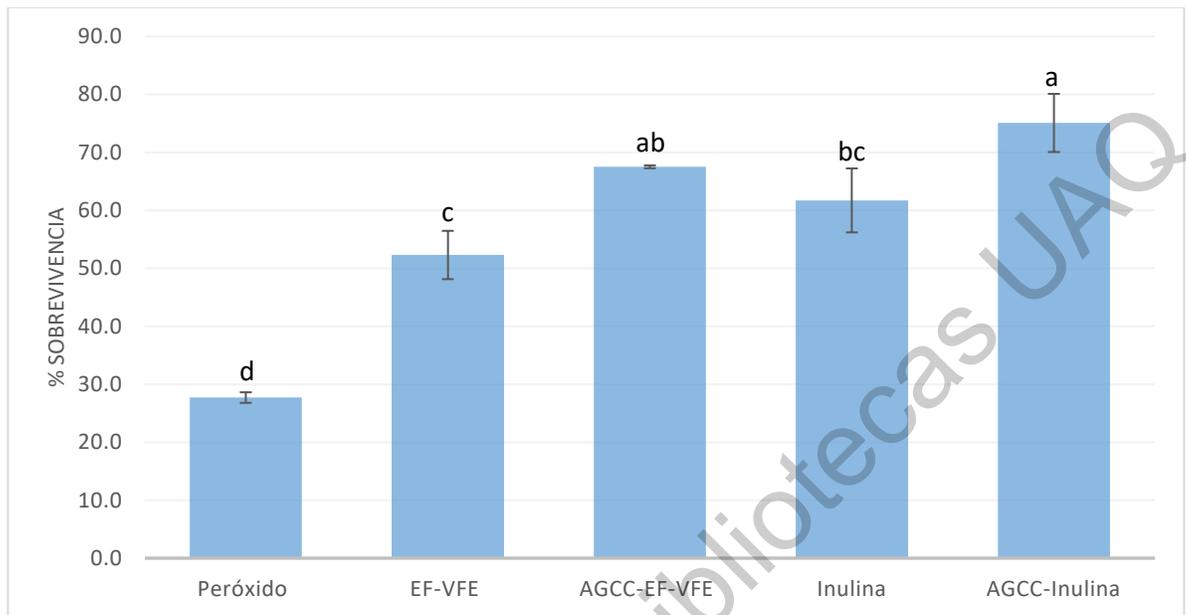
Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE.  $CL_{50}$ , concentración letal cincuenta expresada en porcentaje de EF-VFE. El extracto evaluado es el que corresponde a 4h de fermentación colónica *in vitro*. Las células fueron tratadas durante 48h.

García-Gutiérrez *et al.*, (2017) evaluaron el EFC del café usado tostado medio sobre células de cáncer de colon SW-480 obteniendo una CL<sub>50</sub> de 19%. Hernández-Arriaga, Dave Oomah, & Campos-Vega, (2017) evaluaron el efecto de la microbiota de individuos sanos y con sobrepeso de la FND de café usado sobre células HT-29 y obtuvo una CL<sub>50</sub> de 13.5% para microbiota de individuos sanos. Todos estos autores trataron las células por 24 h, mientras que en este estudio se prolongó hasta las 48h. Las diferencias se atribuyen a la complejidad de la matriz la cual presenta dificultad para ser fermentada, por lo que el efecto de sus metabolitos se ve reducido, y por supuesto también puede influir la microbiota utilizada y la línea celular.

#### **VI.11 Efecto sobre la sobrevivencia de las células HT-29 del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la VF-Extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC a la CL<sub>50</sub>.**

Se utilizó una mezcla de estándares puros de AGCC equivalentes a los cuantificados en CL<sub>50</sub> (AGCC-EF-VFE). También se evaluó el control de fermentación (Inulina 4 h) a la CL<sub>50</sub> así como una mezcla de estándares de AGCC equivalentes al valor de la CL<sub>50</sub> en el EFC de inulina (AGCC-Inulina), para evaluar su efecto en la sobrevivencia de las células HT-29 y así sugerir qué porcentaje del efecto es atribuible a éstos. Los resultados se muestran en la **Figura 9**.

Podemos observar que existe diferencia significativa entre EF-VFE y AGCC-EF-VFE, de los cuales el primero logra una sobrevivencia de 52.3% mientras que el segundo alcanza un 67.5%. Este comportamiento lo volvemos a observar en la inulina y AGCC-Inulina con sobrevivencia de 61.7 y 75.1% respectivamente. Las muestras de fermentación probablemente reflejan propiedades inhibitorias de muchos otros ingredientes y nutrientes vegetales. Esto puede atribuirse a las diferencias en la magnitud de las actividades biológicas de los diferentes compuestos, a pesar de que las células consumen los AGCC en tasas similares (Mariadason, Velcich, Wilson, Augenlicht, & Gibson, 2001).



**Figura 9** Inhibición de la sobrevivencia de células de adenocarcinoma de colon HT-29 a la CL<sub>50</sub> (EF-VFE e Inulina) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC a la CL<sub>50</sub> (EF-VFE e Inulina).

Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE. Letras diferentes expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por prueba de Tukey. EF-VFE, EFC de la vaina a la CL<sub>50</sub>; AGCC-EF-VFE, concentración de ácidos grasos de cadena corta equivalentes a la CL<sub>50</sub>; Inulina, EFC de inulina a la CL<sub>50</sub>. AGCC-Inulina, concentración de ácidos grasos de cadena corta equivalentes al valor de la CL<sub>50</sub> en el EFC de inulina. Peróxido, control positivo. El extracto evaluado es el que corresponde a 4h de fermentación colónica *in vitro*. Las células fueron tratadas durante 48h.

En su estudio del EFC de frijol común sobre células HT-29 Campos-Vega *et al.*, (2012) afirman que los productos de fermentación de la FND pueden tener diferentes fitoprotectores que mejoran las propiedades de los AGCC. Esto sugiere que la FND tiene un "valor agregado" para inhibir el crecimiento de células tumorales de colon transformadas.

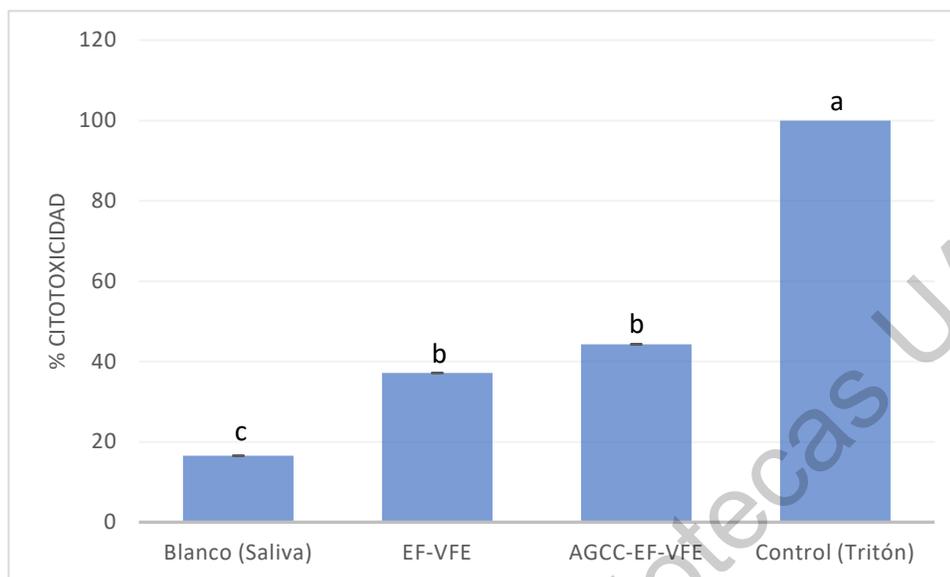
Al comparar el radio de fermentación de EF-VFE (62.9:25.8:11.2) e inulina (71.1:27.3:1.4) (ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico respectivamente) observamos que resalta la diferencia de producción del ácido butírico. El butirato tiene los efectos más potentes de cualquiera de los AGCC, y esto parece estar relacionado con su estructura de cuatro carbonos de cadena lineal. Estudios *in vitro*

han demostrado que este compuesto tiene diversos efectos como la inhibición de la proliferación, estimulación de la apoptosis y diferenciación celular (Miller, 2004). El butirato y el propionato intracelulares (pero no el acetato) inhiben la actividad de histonas deacetilasas (HDAC) en los colonocitos y las células inmunes, lo que promueve la hiperacetilación de las histonas, además de algunos factores de transcripción y proteínas que intervienen en la transducción de señales. Esto tiene múltiples consecuencias para la expresión génica y la diferenciación celular, incluida la regulación negativa de las citocinas proinflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6) y la IL-12, en macrófagos de colon (Louis, Hold, & Flint, 2014).

#### **VI.12 Efecto citotóxico del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la VF-Extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC a la CL<sub>50</sub> sobre las células HT-29 mediante la cuantificación de lactato deshidrogenasa.**

LDH es una enzima citoplasmática soluble que está presente en casi todas las células y se libera en el espacio extracelular cuando se daña la membrana plasmática. La necrosis es un tipo de muerte celular que se caracteriza morfológicamente por la hinchazón y la ruptura de los orgánulos intracelulares, lo que eventualmente conduce a la ruptura de los orgánulos intracelulares, lo que eventualmente conduce a la ruptura de la membrana plasmática. La fuga de la membrana plasmática de las células necróticas provoca la liberación de contenido intracelular en el medio extracelular. Por lo tanto, la muerte celular necrótica evoca respuestas inflamatorias y está estrechamente asociada con enfermedades inflamatorias (Chan *et al.*, 2013).

En la **Figura 10** se muestra el efecto de los EFC sobre la liberación al medio de la enzima lactato deshidrogenasa de las células HT-29.



**Figura 10** Cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa en células HT-29 tratadas con la CL<sub>50</sub> VF-Extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC.

Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE. Letras diferentes expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por prueba de Tukey. El extracto evaluado es el que corresponde a 4h de fermentación colónica *in vitro*. Las células fueron tratadas durante 48h.

Para este estudio se utilizó como control positivo de muerte (100% citotoxicidad) tritón al 1%; también se evaluó el blanco de la EFC colónica (ausencia de muestra) sometida a la digestión gastrointestinal *in vitro*, la cual indujo un 16.5% de citotoxicidad, indicando que algunos de los reactivos utilizados y/o compuestos de la microbiota colónica están ejerciendo un efecto sobre las células. La **Figura 10** nos muestra que la cuantificación de LDH para EF-VFE no presenta diferencias estadísticas con respecto de AGCC-EF-VFE donde se presentaron valores de 37.1 y 44.2% de citotoxicidad, respectivamente. Esto puede confirmar que del total de la citotoxicidad ejercida por EF-VFE (37.1%) está asociado a la muerte celular por necrosis y este efecto es debido principalmente a su contenido de AGCC.

Un porcentaje de muerte celular no está explicado por esta prueba de citotoxicidad (62.9%) y podría estar siendo explicado otro mecanismo. Elmore, (2007) menciona que la apoptosis y necrosis, son procesos que pueden ocurrir de forma independiente, secuencial y simultánea. En algunos casos, es el tipo de

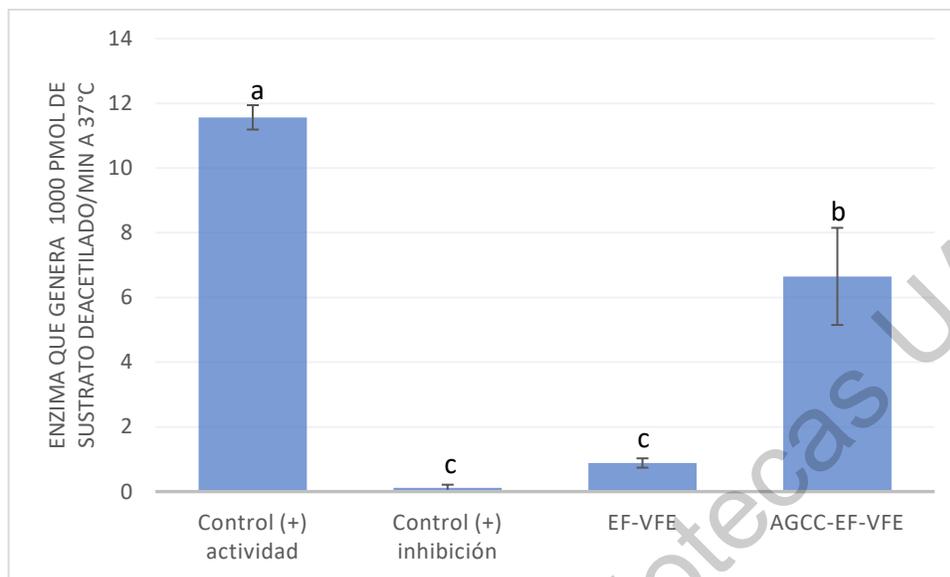
estímulo y/o el grado de estímulo que determina si las células mueren por apoptosis o necrosis. A dosis bajas, una variedad de estímulos nocivos como el calor, la radiación, la hipoxia y los fármacos anticancerosos citotóxicos pueden inducir la apoptosis, pero estos mismos estímulos pueden provocar necrosis a dosis más altas. Una combinación entre los dos mecanismos se denomina necroptosis. Su, Yang, Xu, Chen, & Yu, (2015) menciona que este mecanismo puede ser inducido por la activación de la superfamilia de receptores de TNF, receptores de células T, receptores de interferón, receptores tipo Toll (TLR), estrés celular metabólico y genotóxico, o varios agentes contra el cáncer. La formación del "necrosoma" por la proteína quinasa 1 que interactúa con el receptor (RIP1) y RIP3 es una de las características más críticas de este proceso.

#### **VI.13 Efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la VF-Extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC a la CL<sub>50</sub> sobre la actividad de la enzima histona deacetilasa en células HT-29**

En la **Figura 11** se muestra la actividad de la enzima histona deacetilasa en células HT-29 después de ser tratadas con EF-VFE y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC, así como el control positivo de actividad de la enzima y positivo de inhibición de la misma.

Uno de los principales mecanismos propuestos en la inhibición de la proliferación de células de cáncer de colon por los AGCC, especialmente butirato, es la inducción de apoptosis desencadenada por la inhibición de histona desacetilasas (HDAC), y esto se realiza a través de la vía intrínseca / mitocondrial (Heerdt & Houston, 1997).

El butirato causa una hiperacetilación de histonas unidas al ADN. Esto provoca una estructura de cromatina más relajada, lo que permite la transcripción de genes proapoptóticos como Bak, un elemento esencial en la cascada apoptótica.



**Figura 11** Actividad de la enzima histona deacetilasa (HDAC) en células HT-29 tratadas con la  $CL_{50}$  del extracto de la fermentación *in vitro* de la VF-extrusión (EF-VFE) y las concentraciones equivalentes de estándares de AGCC.

Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE. Letras diferentes expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por prueba de Tukey. Control (+) de inhibición: tricostatina A. Control (+) de actividad: HT-29 sin tratamiento. El extracto evaluado es el que corresponde a 4h de fermentación colónica *in vitro*. Las células fueron tratadas durante 48h.

También p21 está regulado al alza, bloqueando la progresión del ciclo celular en las células. BCL2A1 y otras enzimas antiapoptóticas bloquean la cascada de caspasas al interactuar con BAK (Fernández *et al.*, 2016). Estos factores antiapoptóticos también son inhibidos por el ácido butírico (Campos-Vega, Guevara-Gonzalez, Guevara-Olvera, Dave Oomah, & Loarca-Piña, 2010).

En su estudio sobre inhibidores de HDAC (HDACi) producidos en el colon, Waldecker, Kautenburger, Daumann, Busch, & Schrenk, (2008) informaron que el propionato es aproximadamente dos veces menos potente que el butirato en el estudio sobre extracto nuclear, pero casi 10 veces menos potente en los ensayos celulares de líneas de adenocarcinoma de colon (HT-29) y cérvix (HeLa Mad). Estos hallazgos sugieren que no solo la interacción del butirato con la enzima HDAC sino también su absorción y la biodisponibilidad/metabolismo intracelular juegan un papel importante. El acetato no presentó ningún efecto, como han informado otros autores (Kiefer, Beyer-Sehlmeyer, & Pool-Zobel, 2006)

En la **Figura 11** se presenta el efecto de los extractos estudiados sobre la actividad de HDAC. Como se esperaba, las células HT-29 sin tratamiento muestran la más alta actividad de HDAC, obteniéndose 11.5 pmol sustrato/min; mientras que para el control positivo de inhibición de HDAC, se obtuvo 0.11 pmol sustrato/min, el cual no tuvo diferencias significativas con EF-VFE quien obtiene un valor de 0.88 pmol sustrato/min. Esto sugiere que el EF-VFE es tan efectivo como la tricostatina A, potente inhibidor de HDAC, para inhibir la actividad de esta enzima. También se estudió el efecto AGCC-EF-VFE, encontrándose una actividad de HDAC de 6.6 pmol sustrato/min. Esto indica que AGCC-EF-VFE logró una inhibición importante (42.7%) con respecto del control positivo de actividad, sin embargo, la inhibición por el EF-VFE (92.4%) es aún mayor. Es así como se corrobora que el 42.7% del efecto de EF-VFE sobre la actividad de HDAC se relaciona con la presencia de AGCC; el efecto no explicado por estos compuestos (49.7%) puede estar relacionado con algún otro metabolito no identificado proveniente de las transformaciones a la matriz gracias al proceso digestivo. Kiefer *et al.*, (2006) reportaron que las concentraciones fisiológicas de propionato junto con butirato podrían tener actividades biológicas más profundas de lo que generalmente se supone. Juntos, estos AGCC podrían mediar procesos importantes relacionados con la activación de un gen transcripcional alterado y contribuir así a los efectos biológicos posiblemente relacionados con la progresión o prevención del cáncer.

Frew *et al.*, (2009) informan que los HDACi también tienen la capacidad de sinergizar con una gama de otros agentes anticancerígenos los cuales realzan significativamente el efecto pro-apoptótico en células tumorales cuando se combinan con diversos agentes quimioterapéuticos. Waldecker *et al.*, (2008) proponen como otra fuente nutricional putativa de los HDACi a los polifenoles, que se transforman durante el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, en derivados de AGCC aromáticos tales como fenilacetato o fenilbutirato. Estos ácidos grasos aromáticos son conocidos inhibidores de la actividad HDAC y poseen actividad anticancerígena (Shankar & Srivastava, 2008).

## Conclusiones

La vaina de cacao (VC) es una matriz compleja, de la cual el principal componente es la fibra. El procesamiento de este material no revela cambios significativos en su composición química, pero se observa una influencia en algunas de sus características nutracéuticas como el contenido de taninos condensados y capacidad antioxidante.

Hasta ahora no se ha reportado un estudio sobre el comportamiento de compuestos bioactivos de la VC durante la digestión gastrointestinal. Las evaluaciones biológicas evidenciaron que el procesamiento de la matriz impacta de manera importante en la bioaccesibilidad de sus compuestos bioactivos como los fenoles, flavonoides y taninos condensados, especialmente en la etapa intestinal. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos bioaccesibles depende del procesamiento al que la VC es sometida.

Se identificó al ácido gálico como el compuesto mayoritario en todas las muestras de VC antes de la digestión gastrointestinal. En las etapas posteriores (intestino y colon) destaca la (+)-catequina como principal metabolito.

La teobromina, de la cual no existen estudios sobre su comportamiento a través del tracto gastrointestinal, tiene una bioaccesibilidad limitada, y está influenciada por el procesamiento de la VC. Su mayor cuantificación durante la digestión se da en la etapa intestinal en el lado apical, indicando una baja permeabilidad.

La relevancia biológica de que se logre cuantificar una importante cantidad de estos metabolitos en la etapa intestinal (lado apical) radica en que estos alcanzarán el colon, donde podrán ser transformados y/o metabolizados por la microbiota colónica. Los resultados obtenidos demuestran que la digestión y fermentación en el colon de la VC, producen nuevos compuestos bioactivos, como los AGCC.

El EF-VCE (19.81%) es capaz de inhibir la proliferación de células de cáncer de colon, de acuerdo a lo estudiado en la línea celular HT-29. EL 37% de la

citotoxicidad de EF-VCE es debido al daño celular por necrosis. Sin embargo, dado que el EF-VCE inhibe la actividad de la enzima HDAC, relacionada con la inducción de apoptosis en células de cáncer de colon, la necrosis podría estar relacionada con la muerte celular, en un proceso denominado necroptosis, lo cuál debe ser confirmado. Estos efectos se deben en gran parte al contenido de AGCC, sin embargo, la totalidad del efecto está dada por la sinergia de AGCC con otros metabolitos no identificados que le confieren un valor agregado a EF-VCE.

Dado que el procesamiento tuvo efecto sobre la funcionalidad de la VC, se propone evaluar otros procesamientos que logren la transformación de la matriz, lo cual promueva un mayor aprovechamiento de compuestos bioactivos y metabolitos.

## Referencias

- Adomako, D. (1972). Cocoa pod husk pectin. *Phytochemistry*, 11(3), 1145–1148. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88468-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88468-X)
- Afoakwa, E. O. (2014). *Cocoa Production and Processing Technology*. CRC Press.
- Agarwal, R., & Mukhtar, H. (1996). Cancer Chemoprevention by Polyphenols in Green Tea and Artichoke. En *Advances in Experimental Medicine and Biology. Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment* (pp. 35–50). [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0399-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0399-2_4)
- Agostinis, P., Buytaert, E., Breysens, H., & Hendrickx, N. (2004). Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(8), 721–729. <https://doi.org/10.1039/B315237E>
- Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1999). *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering* (2a ed.). Recuperado de <https://www.springer.com/gp/book/9780834212565>
- Alexander, J. (2008). Theobromine as undesirable substances in animal feed - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*, 6(9), 725. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.725>
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87(2), 171. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81334-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81334-3)
- American Institute for Cancer Research, & World Cancer Research Fund (Eds.). (2007). *Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective: a project of World Cancer Research Fund International*. Washington, D.C: American Institute for Cancer Research.
- Arcila, J. A., Weier, S. A., & Rose, D. J. (2015). Changes in dietary fiber fractions and gut microbial fermentation properties of wheat bran after extrusion and bread making. *Food Research International*, 74, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.005>
- Arnaud, M. J. (2011). Pharmacokinetics and Metabolism of Natural Methylxanthines in Animal and Man. En B. B. Fredholm (Ed.), *Methylxanthines* (pp. 33–91). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_3)
- Asami, D. K., Hong, Y.-J., Barrett, D. M., & Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and

Sustainable Agricultural Practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1237–1241. <https://doi.org/10.1021/jf020635c>

Avendaño Arrazate, C. H., Villarreal Fuentes, J. M., Campos Rojas, E., Gallardo Méndez, R. A., Mendoza López, A., Aguirre Medina, J. F., ... Espinosa Zaragoza, S. (2011). *Diagnóstico del cacao en México* (1a. ed). Chapingo, Estado de México: Universidad Autónoma Chapingo, Dirección de Difusión Cultural.

Baba, S., Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Takizawa, T., Nakamura, T., & Terao, J. (2000). Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radical Research*, 33(5), 635–641. <https://doi.org/10.1080/10715760000301151>

Babatope, B. (2005). Rheology of cocoa-pod husk aqueous system. Part-I: steady state flow behavior. *Rheologica Acta*, 45(1), 72–76. <https://doi.org/10.1007/s00397-005-0450-7>

Bell, B. D., Leverrier, S., Weist, B. M., Newton, R. H., Arechiga, A. F., Luhrs, K. A., ... Walsh, C. M. (2008). FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16677–16682. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808597105>

Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K. K., & Karlović, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 42(5/6), 707–716.

Bialik, S., Zalckvar, E., Ber, Y., Rubinstein, A. D., & Kimchi, A. (2010). Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10), 556–564. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.008>

Bladé, C., Arola, L., & Salvadó, M.-J. (2010). Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(1), 37–59. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900476>

Blancas-Benitez, F. J., Mercado-Mercado, G., Quirós-Sauceda, A. E., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and in vitro kinetics release of polyphenols in Mexican 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica* L.) by-products. *Food & Function*, 6(3), 859–868. <https://doi.org/10.1039/C4FO00982G>

Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429–452.

Boisen, S., & Eggum, B. O. (1991). Critical Evaluation of in Vitro Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. *Nutrition research reviews*, 4(1), 141-162.

Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131(4), 1466–1472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.030>

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

Burd, J. F., & Usategui-Gomez, M. (1973). A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 46(3), 223–227.

Butler, L. G., & Rogler, J. C. (1992). Biochemical Mechanisms of the Antinutritional Effects of Tannins. En *ACS Symposium Series: Vol. 506. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I* (Vol. 506, pp. 298–304). <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0506.ch023>

Cacao México. (2018). Recuperado el 25 de marzo de 2018, de [https://www.cacaomexico.org/?page\\_id=201](https://www.cacaomexico.org/?page_id=201)

Campos-Vega, R., Guevara-Gonzalez, R. G., Guevara-Olvera, B. L., Dave Oomah, B., & Loarca-Piña, G. (2010). Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International*, 43(4), 1057–1064. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.017>

Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-Lopez, O., ... Loarca-Piña, G. (2009). Chemical Composition and In Vitro Polysaccharide Fermentation of Different Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), T59–T65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x>

Campos-Vega R., Reynoso-Camacho R., Pedraza-Aboytes G., Acosta-Gallegos J.A., Guzman-Maldonado S.H., Paredes-Lopez O., ... Loarca-Piña G. (2009). Chemical Composition and In Vitro Polysaccharide Fermentation of Different Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), T59–T65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x>

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*, 77, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>

Campos-Vega, R., García-Gasca, T., Guevara-Gonzalez, R., Ramos-Gomez, M., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2012). Human Gut Flora-Fermented Nondigestible Fraction from Cooked Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Modifies Protein Expression Associated with Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Proliferation in Human Adenocarcinoma Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12443–12450. <https://doi.org/10.1021/jf303940r>

Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>

Campos-Vega, R., Oomah, B. D., & Vergara-Castañeda, H. A. (2016). In Vivo and In Vitro Studies on Dietary Fiber and Gut Health. *Dietary Fiber Functionality in Food and Nutraceuticals*. <https://doi.org/10.1002/9781119138105.ch6>

Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>

Castell-Auví, A., Cedó, L., Pallarès, V., Blay, M. T., Pinent, M., Motilva, M. J., ... Ardévol, A. (2012). Procyanidins modify insulinemia by affecting insulin production and degradation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(12), 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.10.010>

Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A., & Ward, E. (2009). Worldwide Variations in Colorectal Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59(6), 366–378.

Chan, F. K.M., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 979, 65–70. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7)

Chan, S.-Y., & Choo, W.-S. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. *Food Chemistry*, 141(4), 3752–3758. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.097>

Chandalia, M., Garg, A., Lutjohann, D., von Bergmann, K., Grundy, S. M., & Brinkley, L. J. (2000). Beneficial Effects of High Dietary Fiber Intake in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, 342(19), 1392–1398. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005113421903>

Chang, H. J., Xu, X. L., Li, C. B., Huang, M., Liu, D. Y., & Zhou, G. H. (2011). A Comparison of Heat-Induced Changes of Intramuscular Connective Tissue and Collagen of Beef Semitendinosus Muscle During Water Bath and Microwave Heating. *Journal of Food Process Engineering*, 34(6), 2233–2250. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00568.x>

Cheyrier, V., Souquet, J.-M., Le Roux, E., Guyot, S., & Rigaud, J. (1999). Size separation of condensed tannins by normal-phase high-performance liquid chromatography. En *Oxidants and Antioxidants Part A: Vol. 299. Methods in Enzymology* (pp. 178–184). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99018-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99018-3)

Chun, K. S., Husseinsyah, S., & Yeng, C. M. (2016). Effect of green coupling agent from waste oil fatty acid on the properties of polypropylene/cocoa pod husk composites. *Polymer Bulletin*, 73(12), 3465–3484. <https://doi.org/10.1007/s00289-016-1682-7>

Chung, K.-T., Wei, C.-I., & Johnson, M. G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 168–175. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00028-4)

Cohen, G. M., Sun, X. M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., Brown, D. G., Snowden, R. T., & Dinsdale, D. (1994). Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *The Journal of Immunology*, 153(2), 507–516.

CONABIO, 2018. (s/f). Recuperado de [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf)

Cos, P., De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D. V., & Vlietinck, A. J. (2004). Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current Medicinal Chemistry*, 11(10), 1345–1359. <https://doi.org/10.2174/0929867043365288>

Cross, G. A., Fung, D. Y. C., & Decareau, R. V. (1982). The effect of microwaves on nutrient value of foods. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 16(4), 355–381. <https://doi.org/10.1080/10408398209527340>

Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446–467. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116(2), 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7)

De Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., De Maesschalck, C., De Backer, P., Van Immerseel, F., & Croubels, S. (2013). Development of a HPLC–UV method for the

quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 80, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.032>

De Laurenz, V., & Melino, G. (2000). The little devil of death. *Nature*, 406(6792), 135.

Deng, Y., Padilla-Zakour, O., Zhao, Y., & Tao, S. (2015). Influences of High Hydrostatic Pressure, Microwave Heating, and Boiling on Chemical Compositions, Antinutritional Factors, Fatty Acids, In Vitro Protein Digestibility, and Microstructure of Buckwheat. *Food and Bioprocess Technology*, 8(11), 2235–2245. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1578-9>

Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapiere, C., & Scalbert, A. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *The Journal of Nutrition*, 130(11), 2733–2738. <https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2733>

Deshmukh, M., & Johnson Jr, E. M. (1998). Evidence of a Novel Event during Neuronal Death: Development of Competence-to-Die in Response to Cytoplasmic Cytochrome c. *Neuron*, 21(4), 695–705.

Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., & Patil, R. T. (2012). Dietary fibre in foods: a review. *Journal of food science and technology*, 49(3), 255–266.

Di Lorenzo, C., Williams, C. M., Hajnal, F., & Valenzuela, J. E. (1988). Pectin delays gastric emptying and increases satiety in obese subjects. *Gastroenterology*, 95(5), 1211–1215.

Donkoh, A., Atuahene, C. C., Wilson, B. N., & Adomako, D. (1991). Chemical composition of cocoa pod husk and its effect on growth and food efficiency in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, 35(1), 161–169. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(91\)90107-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(91)90107-4)

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell*, 102(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00008-8)

Dust, J. M., Gajda, A. M., Flickinger, E. A., Burkhalter, T. M., Merchen, N. R., & Fahey, G. C. (2004). Extrusion Conditions Affect Chemical Composition and in Vitro Digestion of Select Food Ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2989–2996. <https://doi.org/10.1021/jf049883u>

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation,

technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411–421.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Esong, R. N., Etchu, K. A., Bayemi, P. H., & Tan, P. V. (2015). Effects of the dietary replacement of maize with sun-dried cocoa pods on the performance of growing rabbits. *Tropical Animal Health and Production*, 47(7), 1411–1416. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0879-3>

Eum, K. H., & Lee, M. (2011). Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha- ras-transformed fibroblasts. *Molecular and cellular biochemistry*, 348(1–2), 61–68.

FAOSTAT. (2017). Recuperado el 25 de marzo de 2018, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

FAOSTAT. (2018). Recuperado el 13 de septiembre de 2019, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Feregrino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., García-Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, R. G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., ... Loarca-Piña, G. (2008). Composition and Chemopreventive Effect of Polysaccharides from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-Induced Colon Cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8737–8744. <https://doi.org/10.1021/jf8007162>

Fernández, J., Redondo-Blanco, S., Gutiérrez-del-Río, I., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2016). Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *Journal of Functional Foods*, 25, 511–522. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.032>

Figueira, A., Janick, J., & BeMiller, J., N. (1993). New Products from Theobroma cacao: Seed Pulp and Pod Gum. *New crops. New York: Wiley*, 475(8). Recuperado de <https://hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1993/V2-475.html>

Frew, A. J., Johnstone, R. W., & Bolden, J. E. (2009). Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Letters*, 280(2), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.042>

Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597–3604.

Galati, G., & O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(3), 287–303. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034>

García-Gutiérrez, N., Maldonado-Celis, M. E., Rojas-López, M., Loarca-Piña, G. ., & Campos-Vega, R. (2017). The fermented non-digestible fraction of spent coffee grounds induces apoptosis in human colon cancer cells (SW480). *Journal of Functional Foods*, 30, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.014>

Gasmalla, M., Yang, R., Amadou, I., & Hua, X. (2014). Nutritional Composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaf: Effect of Drying Method. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 61. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i1.9>

Gee, J. M., DuPont, M. S., Rhodes, M. J., & Johnson, I. T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology & Medicine*, 25(1), 19–25. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00020-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00020-3)

Geiersbach, K. B., & Samowitz, W. S. (2011). Microsatellite instability and colorectal cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(10), 1269–1277. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0035-RA>

Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. (2014). Strawberry and human health: effects beyond antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3867–3876. <https://doi.org/10.1021/jf405455n>

Ginter, E., Kubec, F. J., Vozár, J., & Bobek, P. (1979). Natural hypocholesterolemic agent: pectin plus ascorbic acid. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International de Vitaminologie et de Nutrition*, 49(4), 406–412.

Goel, G., Puniya, A. K., Aguilar, C. N., & Singh, K. (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Die Naturwissenschaften*, 92(11), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0040-7>

Gonthier, M.-P., Donovan, J. L., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C., & Scalbert, A. (2003). Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 35(8), 837–844. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00394-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00394-0)

Gozuacik, D., & Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16), 2891–2906. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207521>

Granito, M., Champ, M., David, A., Bonnet, C., & Guerra, M. (2001). Identification of gas-producing components in different varieties of *Phaseolus vulgaris* by in vitro fermentation - Granito - 2001 - Journal of the Science of Food and Agriculture - Wiley Online Library. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(6), 543-550.

- Haggar, F. A., & Boushey, R. P. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 22(4), 191–197. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1242458>
- Heerdt, G., & Houston, A. (1997). Cell Cycle Arrest and Cells Is Linked to. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*, 8(5), 523–532.
- Hefnawy, T. H. (2011). Effect of processing methods on nutritional composition and anti-nutritional factors in lentils (*Lens culinaris*). *Annals of Agricultural Sciences*, 56(2), 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2011.07.001>
- Hernández-Arriaga, A. M., Dave Oomah, B., & Campos-Vega, R. (2017). Microbiota source impact in vitro metabolite colonic production and anti-proliferative effect of spent coffee grounds on human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International*, 97, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.004>
- Herrera-Cazares, L. A., Hernández-Navarro, F., Ramírez-Jiménez, A. K., Campos-Vega, R., Reyes-Vega, M. de la L., Loarca-Piña, G., ... Gaytán-Martínez, M. (2017). Mango-bagasse functional-confectionery: vehicle for enhancing bioaccessibility and permeability of phenolic compounds. *Food & Function*, 8(11), 3906–3916. <https://doi.org/10.1039/C7FO00873B>
- Hollman, P. C. ., & Katan, M. . (1999). Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9–10), 937–942. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00079-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00079-4)
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.003>
- Holt, S., Carter, D., Tothill, P., Heading, R., & Prescott, L. (1979). EFFECT OF GEL FIBRE ON GASTRIC EMPTYING AND ABSORPTION OF GLUCOSE AND PARACETAMOL. *The Lancet*, 313(8117), 636–639. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(79\)91079-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(79)91079-1)
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>

Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33(3s), 245–254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>

Jass, J. R., Young, J., & Leggett, B. (2002). Evolution of colorectal cancer: Change of pace and change of direction - JASS - 2002 - Journal of Gastroenterology and Hepatology. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 17(1), 17–26.

Jin, Z., Wang, B.-Q., & Chen, Z.-J. (2010). Microwave-assisted extraction of tannins from Chinese herb *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(21), 2229–2234.

Kaczmarczyk, M. M., Miller, M. J., & Freund, G. G. (2012). The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 61(8), 1058–1066. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.01.017>

Kalvatchev, Z., Garzaro, D., & Guerra Cedezo, F. (1998). Theobroma cacao L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria*, 4(6). Recuperado de <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/17703>

Karim, A. A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., & Abdullah, N. A. (2014). ANTIOXIDANT PROPERTIES OF COCOA PODS AND SHELLS. *Malaysian Cocoa Journal*, 8, 49–56.

Kiefer, J., Beyer-Sehlmeyer, G., & Pool-Zobel, B. L. (2006). Mixtures of SCFA, composed according to physiologically available concentrations in the gut lumen, modulate histone acetylation in human HT29 colon cancer cells. *British Journal of Nutrition*, 96(5), 803–810. <https://doi.org/10.1017/BJN20061948>

Kohn, R. (1982). Binding of toxic cations to pectin, its oligomeric fragments and plant tissues. *Carbohydrate Polymers*, 2(4), 273–275.

Korzeniewski, C., & Callewaert, D. M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 64(3), 313–320.

Larsson, S. C., & Wolk, A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies. *International journal of cancer*, 119(11), 2657–2664.

Latest News From The ICCO. (2018). Recuperado el 26 de marzo de 2018, de <https://www.icco.org/home/latest-news.html>

Lea, A. G. H., & Arnold, G. M. (1978). The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(5), 478–483. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290512>

Leggett, B., & Whitehall, V. (2010). Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, 138(6), 2088–2100. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.066>

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, 91(4), 479–489. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1)

Liu, B., Li, W., Hu, L., & Zhao, J. (2013). Mild Alkaline Hydrolysis Is an Efficient and Low-Cost Method for Improving the Free Phenolic Content and Health Benefit of Pomegranate Peel Extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5), 694–700. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00684.x>

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

Louis, P., Hold, G. L., & Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), 661–672. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>

Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 107, 423–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>

Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Cuellar-Nuñez, M. L., Vázquez-Landaverde, P. A., Mojica, L., Acosta-Gallegos, J. A., & Loarca-Piña, G. (2018). Fermented non-digestible fraction from combined nixtamalized corn (*Zea mays* L.)/cooked common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips modulate anti-inflammatory markers on RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 259, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.096>

Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Preciado-Ortiz, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during in vitro gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Food Research International*, 100, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.018>

Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67–72. <https://doi.org/10.1079/PNS2002207>

- Maleyki, M. A., & Ismail, A. (2010). Antioxidant properties of cocoa powder. *Journal of Food Biochemistry*, 34(1), 111–128. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00268.x>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mannick, J. B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D. T., Zeng, M., Miao, Q. X., & Stamler, J. S. (1999). Fas-Induced Caspase Denitrosylation | Science. *Science*, 284(5214), 651–654.
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, 73, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004>
- Mariadason, J. M., Velcich, A., Wilson, A. J., Augenlicht, L. H., & Gibson, P. R. (2001). Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. *Gastroenterology*, 120(4), 889–899. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22472>
- Martin, S. J., & Green, D. R. (1995). Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell*, 82(3), 349–352. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90422-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90422-0)
- Martín-Cabrejas, M. A., Valiente, C., Esteban, R. M., Mollá, E., & Waldron, K. (1994). Cocoa hull: A potential source of dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(3), 307–311. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740660307>
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Gómez-Juaristi, M., Goya, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Research International*, 63, 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.009>
- Mensah, C. ., Adamafio, N. ., Amaning-Kwarteng, K., & Rodrigues, F. K. (2012). Reduced Tannin Content of Laccase-treated Cocoa (*Theobroma cacao*) Pod Husk. *International Journal of Biological Chemistry*, 6(1), 31–36. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2012.31.36>

Miller, S. (2004). Cellular and Physiological Effects of Short-Chain Fatty Acids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4(8), 839–845. <https://doi.org/10.2174/1389557043403288>

Mohamed, S., & Hasan, Z. (1995). Extraction and characterisation of pectin from various tropical agrowastes. *ASEAN Food Journal*, 10(2), 43–50.

Mollea, C., Chiampo, F., & Conti, R. (2008). Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. *Food Chemistry*, 107(3), 1353–1356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.006>

Moon, J. S., Li, L., Bang, J., & Han, N. S. (2016). Application of *in vitro* gut fermentation models to food components: A review. *Food Science and Biotechnology*, 25(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0091-x>

Mosele, J. I., Macià, A., Romero, M.-P., & Motilva, M.-J. (2016). Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation. *Food Chemistry*, 201, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.076>

Mosele, J. I., Macià, A., Romero, M.-P., Motilva, M.-J., & Rubió, L. (2015). Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 14, 529–540. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.026>

Mudgil, D., & Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.044>

Mumford, G. K., Benowitz, N. L., Evans, S. M., Kaminski, B. J., Preston, K. L., Sannerud, C. A., ... Griffiths, R. R. (1996). Absorption rate of methylxanthines following capsules, cola and chocolate. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 51(3–4), 319–325. <https://doi.org/10.1007/s002280050205>

Mundade, R., Imperiale, T. F., Prabhu, L., Loehrer, P. J., & Lu, T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), 400–406.

Naczek, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523–1542. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>

Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS•+ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>

Nguyen, V. T., & Nguyen, N. H. (2017). Proximate Composition, Extraction, and Purification of Theobromine from Cacao Pod Husk (*Theobroma Cacao* L.). *Technologies*, 5(2), 14. <https://doi.org/10.3390/technologies5020014>

Nishida, K., Yamaguchi, O., & Otsu, K. (2008). Crosstalk Between Autophagy and Apoptosis in Heart Disease. *Circulation Research*, 103(4), 343–351. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.175448>

OECD, 2007. (s/f). Recuperado de <https://www.oecd.org/swac/publications/39596493.pdf>

Okai, D. B., Easter, R. A., & Frank, G. R. (1984). nutritive value of some non-conventional Ghanaian feed ingredients: nutrient composition and effects on the performance of weanling rats. *World Review of Animal Production*. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302048373>

Olivé, N. O., & Casado, M.-J. M. (2013). Polyphenols in Cocoa: From In Vitro Digestion to In Vivo Bioavailability. En R. R. Watson, V. R. Preedy, & S. Zibadi (Eds.), *Chocolate in Health and Nutrition* (pp. 179–188). [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_15)

Ovaskainen, M.-L., Törrönen, R., Koponen, J. M., Sinkko, H., Hellström, J., Reinivuo, H., & Mattila, P. (2008). Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults. *The Journal of Nutrition*, 138(3), 562–566. <https://doi.org/10.1093/jn/138.3.562>

Ozung, P. O., Kennedy Oko, O. O., & Agiang, E. A. (2016). Chemical Composition of Differently Treated Forms of Cocoa POD Husk Meal (CPHM). *Asian Journal of Agricultural Sciences*, 8(2), 5–9. <https://doi.org/10.19026/ajas.8.2912>

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), R6–R15. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x>

Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C., & Lacroix, C. (2012). Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.011>

- Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>
- Prior, R. L., & Gu, L. (2005). Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 66(18), 2264–2280. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.025>
- Ramli, N., & Asmawati. (2011). Effect of ammonium oxalate and acetic acid at several extraction time and pH on some physicochemical properties of pectin from cocoa husks (*Theobroma cacao*). *African Journal of Food Science*, 5(15), 790–798. <https://doi.org/10.5897/AJFS11.107>
- Rashid, S., Rakha, A., Anjum, F. M., Ahmed, W., & Sohail, M. (2015). Effects of extrusion cooking on the dietary fibre content and Water Solubility Index of wheat bran extrudates. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(7), 1533–1537. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12798>
- Reed, J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The Journal of Cell Biology*, 124(1), 1–6.
- Reed, J. C. (1997). Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Seminars in Hematology*, 34(4 Suppl 5), 9–19.
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & Pinto, M. da S. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588–602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x>
- Rios, L. Y., Bennett, R. N., Lazarus, S. A., Rémésy, C., Scalbert, A., & Williamson, G. (2002). Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(5), 1106–1110. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.5.1106>
- Roberfroid, M. (1993). Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(2), 103–148. <https://doi.org/10.1080/10408399309527616>
- Rodriguez, J., & Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Development*, 13(24), 3179–3184.
- Sa, S., & Abike, A. (2017). Tapping in to the good use of cocoa (*Theobroma cacao*) pod husks: towards finding alternative sources of nutrients for animals in Nigeria. *Journal of Food Technology and Preservation*, 1(1). Recuperado de <http://www.alliedacademies.org/abstract/tapping-in-to-the-good-use-of-cocoa->

theobroma-cacao-pod-husks-towards-finding-alternative-sources-of-nutrients-for-animals-in-nige-7253.html

SAGARPA, 2017. (s/f). Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256425/B\\_sico-Cacao.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256425/B_sico-Cacao.pdf)

Salazar Lopez, N. J., Loarca-Piña, G., Campos-Vega, R., Gaytán Martínez, M., Morales Sánchez, E., Esquerro-Brauer, J. M., ... Robles Sánchez, M. (2016). The Extrusion Process as an Alternative for Improving the Biological Potential of Sorghum Bran: Phenolic Compounds and Antiradical and Anti-Inflammatory Capacity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2016/8387975>

Santarelli, R. L., Pierre, F., & Corpet, D. E. (2008). Processed Meat and Colorectal Cancer: A Review of Epidemiologic and Experimental Evidence. *Nutrition and cancer*, 60(2), 131–144.

Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goñi, I., & Bravo, L. (2000). In Vitro Determination of the Indigestible Fraction in Foods: An Alternative to Dietary Fiber Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3342–3347. <https://doi.org/10.1021/jf0000373>

Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>

Sayers, T. J. (2011). Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(8), 1173–1180. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1008-4>

Sena, A. R. de, Assis, S. A. D., & Branco, A. (2011). *Analysis of Theobromine and Related Compounds by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: An Update (1992–2011)*.

Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2007). Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research International*, 40(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.07.010>

Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.-M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S2), S310–S329. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900039>

Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2008). Histone Deacetylase Inhibitors: Mechanisms and Clinical Significance in Cancer: HDAC Inhibitor-Induced Apoptosis.

En R. Khosravi-Far & E. White (Eds.), *Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy* (pp. 261–298). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5_13)

Shiga, T. M., Lajolo, F. M., & Filisetti, T. M. C. C. (2003). Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology*, 23(2), 141–148. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000200007>

Singh, S., Gamlath, S., & Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(8), 916–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01309.x>

Smit, H. J. (2011). Theobromine and the Pharmacology of Cocoa. En *Methylxanthines. Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 200). Recuperado de [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-13443-2\\_7](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-13443-2_7)

Sotelo, A., & Alvarez, R. G. (2002). Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cacao bean. *J. Agric. Food Chem*, 39(11), 1940–1943. <https://doi.org/10.1021/jf00011a009>

Sotelo, L.C., Alvis, A. B., & Arrázola, G. P. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124. <https://doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3751>

Sotelo, L.C., Alvis, A. B., & Arrázola, G. P. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124–134. <https://doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3751>

Soto K., por J. B. (2018). Vías de apoptosis. Recuperado el 11 de abril de 2018, de MindMeister website: <https://www.mindmeister.com/984942981/clase-33>

Spencer, J. P., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srai, S. K., Debnam, E., & Rice-Evans, C. (2000). Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(1), 236–241. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2749>

Sriamornsak, P. (2001). Pectin: The role in health. *Journal of Silpakorn University*, 21(22), 60–77.

Sriamornsak, P. (2003). *Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review*. 3(1–2), 206–228.

Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (1998). Properties of the caspases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1387(1–2), 17–31.

Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., & Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 Can Be Activated without Proteolytic Processing. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 8359–8362. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8359>

Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>

Sun, S.Y. (2011). Understanding the Role of the Death Receptor 5/FADD/caspase-8 Death Signaling in Cancer Metastasis. *Molecular and cellular pharmacology*, 3(1), 31–34.

Tamang, J. P., & Kailasapathy, K. (2010). *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press.

Tan, M. L., Ooi, J. P., Nawfal, I., Moad, A. I. H., & Muhammad, T. S. T. (2009). Programmed Cell Death Pathways and Current Antitumor Targets. *Pharmaceutical research*, 26(7), 1547–1560.

Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 8. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.49014>

Theuwissen, E., & Mensink, R. P. (2008). Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiology & Behavior*, 94(2), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.01.001>

Tsang, C., Auger, C., Mullen, W., Bornet, A., Rouanet, J.-M., Crozier, A., & Teissedre, P.-L. (2005). The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *The British Journal of Nutrition*, 94(2), 170–181. <https://doi.org/10.1079/bjn20051480>

Valadez-Carmona, L., Plazola-Jacinto, C. P., Hernández-Ortega, M., Hernández-Navarro, M. D., Villarreal, F., Necochea-Mondragón, H., ... Ceballos-Reyes, G. (2017). Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.012>

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., ... Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell*, 102(1), 43–53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00009-X)

Verhoeckx, K., Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., ... Wichers, H. (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Recuperado de <https://link.springer.com/openurl?genre=book&isbn=978-3-319-15791-7>

Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., & Fogliano, V. (2007). Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides. *The Journal of Nutrition*, 137(9), 2043–2048. <https://doi.org/10.1093/jn/137.9.2043>

Voda, A., Homan, N., Witek, M., Duijster, A., van Dalen, G., van der Sman, R., ... van Duynhoven, J. (2012). The impact of freeze-drying on microstructure and rehydration properties of carrot. *Food Research International*, 49(2), 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.019>

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., ... Bos, J. L. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*, 9(4), 138–141. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90209-Z](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90209-Z)

Vriesmann, L. C., Amboni, R. D. D. M. C., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2011). Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1173–1181.

Wajant, H. (2002). The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science*, 296(5573), 1635-1636.

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. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.08.002>

Walker, A. W., Duncan, S. H., McWilliam Leitch, E. C., Child, M. W., & Flint, H. J. (2005). pH and Peptide Supply Can Radically Alter Bacterial Populations and Short-Chain Fatty Acid Ratios within Microbial Communities from the Human Colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3692–3700. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3692-3700.2005>

Willett, W. C. (2005). Diet and Cancer: An Evolving Picture. *JAMA*, 293(2), 233–234. <https://doi.org/10.1001/jama.293.2.233>

Williamson, G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 243S-255S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.243S>

- Wolf, B. B., & Green, D. R. (1999). Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20049–20052. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20049>
- 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.
- Xu, Y., Cartier, A., Obielodan, M., Jordan, K., Hairston, T., Shannon, A., & Sismour, E. (2016). Nutritional and anti-nutritional composition, and in vitro protein digestibility of Kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by differential processing methods. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 625–633. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9346-8>
- Yapo, B. M., Besson, V., Koubala, B. B., & Koffi, K. L. (2013). Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *American Journal of Food and Nutrition*, 1(3), 38–46.
- Yapo, B. M., & Koffi, K. L. (2013). Extraction and Characterization of Highly Gelling Low Methoxy Pectin from Cashew Apple Pomace. *Foods*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods3010001>
- Zamora-Gasga, V. M., Loarca-Piña, G., Vázquez-Landaverde, P. A., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). In vitro colonic fermentation of food ingredients isolated from Agave tequilana Weber var. azul applied on granola bars. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 766–772. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.032>
- Zhang, J., & Zhong, Q. (2014). Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 71(20), 3885–3901. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1656-6>
- Zheng, X.-Q., Koyama, Y., Nagai, C., & Ashihara, H. (2004). Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits. *Journal of Plant Physiology*, 161(4), 363–369. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01253>
- Zimmermann, K. C., & Green, D. R. (2001). How cells die: Apoptosis pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(4), S99–S103. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.117819>
- Zong, W.-X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z.-Q., & Thompson, C. B. (2004). Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & Development*, 18(11), 1272–1282. <https://doi.org/10.1101/gad.1199904>

Zou, H., JHenzel, W., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3 - ScienceDirect. *Cell*, 90(3), 405–413. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80501-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80501-2)

Zou, H., Li, Y., Liu, X., & Wang, X. (1999). An APAF-1-Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11549–11556. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11549>

Zumbé, A. (1998). Polyphenols in cocoa: are there health benefits? *Nutrition Bulletin*, 23(1), 94–102.

Dirección General de Bibliotecas UFR