



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina

Digestión, bioaccesibilidad gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* de
garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*).

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta
Biól. Edelmira Sánchez Recillas

Dirigida por:
Dra. en C. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Querétaro, Qro., a 29 de octubre de 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Digestión, bioaccesibilidad gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*).

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta

Biól. Edelmira Sánchez Recillas

Dirigida por:

Dra. en C. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda
Presidente

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez
Secretaria

Dra. Rocio Campos Vega
Vocal

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusié
Suplente

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre, 2021
México

RESUMEN

El garambullo es un fruto endémico de México de consumo local y poco estudiado, se sabe que cuenta con una serie de compuestos bioactivos y fibra antioxidante. En otras matrices alimentarias, se ha demostrado que diversos compuestos bioactivos son absorbidos en intestino delgado y que la fibra antioxidante alcanza el colon en donde es sometida al proceso fermentativo anaeróbico de la microbiota intestinal, originando ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Dichos productos se han visto involucrados en mecanismos fisiológicos que intervienen en la salud del huésped. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los metabolitos generados por el proceso de digestión intestinal y fermentación colónica *in vitro*, así como determinar su bioaccesibilidad en intestino. Mediante un modelo de digestión y fermentación colónica *in vitro* se simularon las condiciones de la boca, estómago, intestino delgado y colon. Por medio del cromatógrafo líquido de alta resolución se identificaron 9 familias de compuestos bioactivos en el extracto de garambullo, algunos descritos por primera vez en garambullo. La bioaccesibilidad de los compuestos del garambullo fue disminuyendo a lo largo del tracto gastrointestinal. Las familias de compuestos mostraron una alta permeabilidad en intestino delgado siendo absorbidos por un mecanismo de transporte pasivo. La capacidad antioxidante (CA) por el método ABTS, DPPH, ORAC y FRAP fue mayor en el extracto de garambullo seguido de boca, estómago y en colon respecto a intestino delgado. Mediante el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas se identificó la presencia de ácido acético, propiónico y butírico del extracto de fermentación de garambullo a las 6, 12 y 24h, en donde el ácido butírico mostró una tendencia a incrementar conforme al tiempo de incubación. En conclusión, el fruto de garambullo cuenta con un variado contenido de compuestos bioactivos que son modificados en su bioaccesibilidad y CA bajo condiciones simuladas de digestión y fermentación colónica *in vitro*, generando metabolitos con potencial acción biológica en colon a través del metabolismo anaeróbico de la microbiota intestinal.

Palabras clave: garambullo, digestión *in vitro*, fermentación colónica, AGCC.

ABSTRACT

The garambullo is an endemic fruit of Mexico of local consumption and little studied, it is known that it has a series of bioactive compounds and antioxidant fiber. In other food matrices, it has been shown that various bioactive compounds are absorbed in the small intestine and that the antioxidant fiber reaches the colon where it is subjected to the anaerobic fermentation process of the intestinal microbiota, originating short-chain fatty acids (SCFA). These products have been involved in physiological mechanisms that intervene in the health of the host. The objective of this work was to characterize the metabolites generated by the intestinal digestion and colonic fermentation process *in vitro*, as well as to determine their bioaccessibility in the intestine. Using an *in vitro* colonic digestion and fermentation model, the conditions of the mouth, stomach, small intestine and colon were simulated. Using the high-resolution liquid chromatograph, 9 families of bioactive compounds were identified in the extract of garambullo, some described for the first time in garambullo. The bioaccessibility of garambullo compounds decreased throughout the gastrointestinal tract. The families of compounds showed high permeability in the small intestine, being absorbed by a passive transport mechanism. The antioxidant capacity (AC) by the ABTS, DPPH, ORAC and FRAP method was higher in the garambullo extract followed by mouth, stomach and colon compared to the small intestine. Using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, the presence of acetic, propionic and butyric acid from the garambullo fermentation extract was identified at 6, 12 and 24h, where butyric acid had a tendency to increase during the incubation. In conclusion, the garambullo fruit has a varied content of bioactive compounds that are modified in their bioaccessibility and AC under simulated conditions of digestion and colonic fermentation *in vitro*, generating metabolites with potential biological action in the colon through the anaerobic metabolism of the microbiota intestinal.

Key words: Garambullo, *in vitro* digestion, colonic fermentation, SCFA.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina y en el laboratorio de Bioquímica toxicológica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección de la Dra. Haydé A. Vergara Castañeda a quien agradezco el gran apoyo brindado, paciencia, tiempo, dedicación, amistad, así como la oportunidad y experiencia que he adquirido.

A mis padres Guadalupe y Abraham por siempre darme su conocimiento, apoyo, paciencia, y mucho amor, por siempre confiar en mí y alentarme cada día a ser mejor ser humano, hija, hermana, y profesional. Les agradezco enormemente por permitirme llevar a cabo todos mis proyectos y siempre decirme que, si se puede.

A Victor por siempre apoyarme y estar cuando más te necesito, gracias por alentarme y permitirme ser parte de tu vida, por darme siempre conocimiento, risas y amor.

A mis hermanas Belem y Amanda por siempre darme conocimiento, su cariño, y su apoyo, por siempre demostrarme lo valiosa que soy para ustedes y dejarme ver que pase lo que pase siempre estarán para mí.

A mi familia ya que esta etapa de mi vida y este proyecto no habrían sido posible sin su ayuda y sin su apoyo, siempre estaré agradecida y este logro es tanto mío como de ustedes, los AMO.

A Alonso por siempre estar junto a mí en cada momento, por alentarme y confiar en mí, por siempre darme apoyo, amor y por tu paciencia, por compartir cada etapa y crecimiento, te amo y vamos por más.

A mis suegros Lupita y Ariel por brindarme siempre su apoyo, por confiar en mí, por permitirme ser parte de su familia y por darme siempre enseñanzas los quiero mucho.

A mis amigos y compañeros Eli, Mónica, Lupita, Cristian y Daniel que me apoyaron y me permitieron disfrutar de esta etapa, así como a cada una de las personas que me apoyo compartiendo su conocimiento.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1. Garambullo (<i>Myrtillocactus geometrizans</i>).....	13
2.1.1. Descripción	13
2.1.2. Contenido nutrimental y compuestos bioactivos	14
2.2. Compuestos fenólicos	15
2.2.1. Capacidad antioxidante de compuestos fenólicos.....	17
2.2.2. Absorción y metabolismo de compuestos fenólicos	18
2.2.3. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos.....	20
2.3. Fibra dietaria.....	21
2.4. Fibra antioxidante	22
2.5. Fermentación colónica	22
2.6 Modelos <i>in vitro</i>	24
2.7 Antecedentes de digestión <i>in vitro</i> de garambullo	25
3. Justificación.....	26
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivo general.....	27
5.1 Objetivos específicos.....	27
6. METODOLOGÍA.....	28
6.1. Bioética y seguridad	28

6.2. Recolección y tratamiento del garambullo	28
6.3 Extracto de garambullo.....	28
6.4 Diseño experimental	29
6.5. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	29
6.5.1 Simulación de las condiciones de la boca	30
6.5.2. Simulación de las condiciones del estómago.....	30
6.5.3. Simulación de las condiciones del intestino delgado.....	30
6.5.4. Técnica de saco invertido de rata (fase <i>ex vivo</i>).....	31
6.6. Fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND.....	31
6.7. Identificación y cuantificación de metabolitos	32
6.7.1. Compuestos fenólicos	32
6.7.2. Bioaccesibilidad.....	33
6.7.3. Coeficiente de permeabilidad	33
6.7.4. Ácidos grasos de cadena corta.....	34
6.8. Evaluación de capacidad antioxidante.....	35
6.8.1. Método 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)	35
6.8.2. Método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)	35
6.8.3. Método de capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC).....	36
6.8.4. Método de capacidad de reducción del ion fierro (FRAP)	37
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
10.1 Identificación de compuestos bioactivos mediante UPLC-ESI-QTOF MS	38

10.2. Bioaccesibilidad y cuantificación de compuestos bioactivos del garambullo a través del tracto gastrointestinal.....	43
10.3 Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) y radio de eflujo (ER) durante la digestión <i>in vitro</i> del garambullo	54
10.4 Fermentación colónica	57
10.4.1 Identificación y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta ...	58
10.5 Capacidad antioxidante	60
11. CONCLUSIONES	62
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
13. ANEXO	76
13.1. Formato de Consentimiento informado donante de heces.	76
13.2. Formato de Consentimiento informado donante de saliva.	80
13.3. Curvas de calibración de capacidad antioxidante.....	84
13.3.1. ABTS	84
13.3.2. DPPH.....	84
13.3.3. FRAP	85
13.3.4. ORAC	85
13.4. Curvas de calibración de ácidos grasos de cadena corta.....	86
13.4.1. Ácido acético	86
13.4.2. Ácido propiónico	86
13.4.3. Ácido butírico.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de flavonoides y no flavonoides junto con su estructura química.

Tabla 2. Parámetros de identificación de compuestos bioactivos mediante UPLC-ESI-QTOF MS.

Tabla 3. Cuantificación de compuestos bioactivos liberados de garambullo, boca, estómago, FD y FND del proceso digestivo (15,30 y 60 min) por UPLC-ESI-QTOF-MS.

Tabla 4. Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) y radio de eflujo (ER) de algunas familias de polifenoles durante la digestión gastrointestinal *in vitro* del garambullo.

Tabla 5. Valores del pH durante los tiempos de fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible fermentada de garambullo (FNDFG).

Tabla 6. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC, mmol/L) durante los tiempos de fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible fermentada de garambullo (FNDFG).

Tabla 7. Capacidad antioxidante de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* del garambullo mediante cuatro métodos (ABTS, DPPH, ORAC y FRAP).

Tabla 8. Coeficiente de correlación entre familias de polifenoles respecto a la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP y ORAC) en cada fase de la digestión gastrointestinal *in vitro* del garambullo.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Apariencia externa e interna de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*).

Figura 2. Estructura química de un fenol, conformado por un grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo aromático

Figura 3. Esquema del metabolismo de los compuestos fenólicos

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

FA	Fibra antioxidante
FD	Fibra dietaria
CF	Compuestos fenólicos
g	Gramos
h	Horas
s	Segundos
µL	Microlitros
mmol	Milimol
-OH	Hidroxilo
CAT	Catalasa
SOD	Superóxido dismutasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
TE	Transferencia de un solo electrón
TAH	Transferencia de un átomo de hidrogeno
FRAP	Poder antioxidante de la reducción del ion hierro
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
K-R	Krebs-Ringer
ABTS	ácido 2, 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
ORAC	Capacidad de absorbancia del radical oxígeno
SGLT1	Cotransportador de sodio/glucosa 1
LPH	lactasa-florizina-hidrolasa
CFE	Compuestos fenólicos extraíbles
CFNE	Compuestos fenólicos no extraíbles
FDI	Fibra dietaria insoluble
FDS	Fibra dietaria soluble
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ml	Mililitros
HCL	Ácido clorhídrico
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
KCl	Cloruro de potasio
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
KH ₂ PO ₄	Hidrógeno fosfato dipotásico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
cm	Centímetros
mg/Kg	Miligramo por kilogramo

°C	Grados centígrados
CO ₂	Dióxido de carbono
min	Minutos
FD	Fracción digerible
FND	Fracción no digerible
UHPLC	Cromatógrafo líquido de alta resolución
DAD	Detector de matriz de diodos
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectro de masas
nm	Nanómetros
mm	Milímetros
mg/L	Miligramo por litro
cm/s	Centímetros por segundo
ER	Radio de eflujo
Papp	Coefficiente de permeabilidad aparente
BL	Basolateral
AP	Apical
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potasio
Na ₂ H ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Fosfato de sodio monohidratado
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio dibásico
AAPH	2,2'-azobis (2-metilpropionamida) diclorhidrato
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
µg/g	Microgramo por gramo
CA	Capacidad antioxidante
P-gp	P-glicoproteínas
MDRP	Proteínas de resistencia a múltiples fármacos
FNDFG	Fracción no digerible fermentada de garambullo
mmol/L	Milimol por litro

1. INTRODUCCIÓN

El garambullo es un fruto endémico de México presente en regiones áridas y semiáridas y en un estado maduro presenta un color morado intenso característico. Su consumo se da de forma local, ya sea como fruto fresco o en productos como nieves y mermeladas, entre otros (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010). A pesar de que el garambullo es un fruto poco estudiado, se sabe que cuenta con la presencia de una alta cantidad de fibra dietaria, compuestos bioactivos, así como de fibra antioxidante, lo que le confiere características funcionales al presentar una alta capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante del garambullo es debida a la presencia de diversos compuestos fenólicos (CF) (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020), los cuales participan en una serie de mecanismo antioxidantes asociados a la prevención de enfermedades inflamatorias como diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Huang *et al.*, 2005).

Debido a que los CF son adquiridos por medio del consumo de frutas y verduras al formar interacciones con la matriz alimentaria, es importante conocer cuántos y cuáles de ellos llegan a ser bioaccesibles a lo largo del tracto gastrointestinal, debido a que forman interacciones no-covalentes con la fibra dietaria conformando así la fibra antioxidante (FA). Una característica importante de la FA es su alta resistencia a las enzimas digestivas del intestino delgado donde se sabe que entre el 5 y 10% de los CF son liberados (Swallah *et al.*, 2020). Por lo que hasta el 95% de ellos llegan al colon unidos a la fibra dietaria, la cual es sometida a un proceso de fermentación bacteriana generando así metabolitos secundarios. Entre ellos se encuentran los AGCC, principalmente el ácido butírico, acético y propiónico, los cuales son fácilmente absorbidos por el colon y están involucrados en una serie de mecanismos celulares que promueven la salud humana (Saura-Calixto *et al.*, 2007; Quirós-Sauceda *et al.*, 2014). De tal manera que es de gran importancia el conocer cuáles son los metabolitos producidos durante el proceso de digestión y bioaccesibilidad, así como del proceso de fermentación colónica del garambullo, mediante el uso de un modelo *in vitro*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)

2.1.1. Descripción

El garambullo es una especie endémica de México que pertenece a la familia de las cactáceas, adaptado a regiones áridas y semiáridas de estados como Hidalgo, San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro. Cuenta con un fruto comestible conocido comúnmente como garambullo, el cual presenta una coloración que va de rojo a morado intenso, su forma es globular, tiene una altura de 1.2 cm y un diámetro en promedio de 1.5 cm. Su piel (cascara) es muy delgada y fina, mientras que su pulpa tiene una consistencia gelatinosa, la cual a su vez contiene numerosas semillas negras inferiores a un milímetro de tamaño (Fig. 1) (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010).



Figura 1. Apariencia externa e interna de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Tomado de Hernández-López *et al.*, 2008

La época de cosecha del fruto de garambullo se da en el periodo de junio a septiembre, siendo su consumo de forma local y principalmente en zonas rurales, ya que puede encontrarse a la venta como fruto fresco en mercados públicos dentro de los estados donde crece o ya sea en forma procesada como helado, mermelada y en algunas ocasiones en forma de pasas secadas al sol (Hernández-López *et al.*, 2008).

2.1.2. Contenido nutrimental y compuestos bioactivos

El garambullo es considerado un fruto con gran potencial nutricional debido a que es una fuente importante de vitaminas C y niacina, además de minerales tales como potasio, calcio, magnesio, hierro y cobre. Dentro de su contenido nutrimental se ha descrito que 100g de garambullo fresco aportan 10.4g de carbohidratos, 2.1g de proteínas y 3.54g de fibra, siendo ésta última mayor en comparación a frutos similares como arándanos y zarzamoras y por lo tanto son una excelente fuente de fibra dietaria (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020).

Por otra parte, se sabe que el garambullo cuenta con la presencia de diversos fitoquímicos los cuales son compuestos bioactivos de origen natural. Entre éstos se encuentran las betalainas (29.5-36.9 mg/kg), fenoles solubles (9.21-10.46 g/kg), taninos condensados (1.20-2.94 g/kg) y ácidos fenólicos como ácido cafeico, gálico y vanílico (33.57-39.77 mg/kg) (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020). Dichos compuestos fenólicos están relacionados con mecanismos antioxidantes intracelulares, de tal manera que la presencia de ellos le confieren al garambullo una alta capacidad antioxidante, la cual además se ha reportado que es mayor en comparación a frutos comúnmente consumidos y de características similares como la cereza, frambuesa y arándano. Por lo que el garambullo puede ser considerado como una fruta alternativa en el control de enfermedades crónicas derivadas de estrés oxidativo (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2011).

2.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (CF) son considerados una de las clases más abundantes de fitoquímicos presentes en frutas y verduras, y a pesar de que no aportan ningún valor nutricional esencial, estos compuestos están asociados con mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios involucrados en enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer. Por lo que su consumo puede contribuir a la prevención de dichas enfermedades y por lo tanto inducir efectos benéficos en la salud humana. Dentro de su estructura química, los CF se caracterizan por contar con más de un grupo hidroxilo (-OH) hidrófilo, el cual se encuentra unido a un anillo aromático hidrofóbico (Fig. 2). Se pueden encontrar de forma glucosilada, ya sea con uno o más residuos de azúcar conjugados al grupo hidroxilo o al anillo aromático. Su clasificación puede estar dada en base a su función biológica o por su estructura química, y de forma general se encuentran dos grupos principales: los flavonoides y los no-flavonoides. Dentro de los flavonoides, se sabe que comparten una estructura básica formada por dos anillos de benceno (A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico de pirona (C), por lo que existen subclases como los flavonoles, flavonas, flavana-3-oles/antocianinas, flavononas e isoflavonas. Mientras que dentro de los no-flavonoides se encuentran los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y taninos (Tabla 1). El 60% de los CF está representado por los flavonoides y solo el 30 % por los ácidos fenólicos (Mocanu *et al.*,2015).

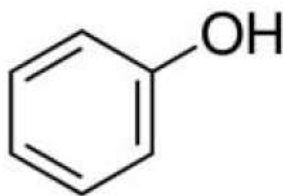
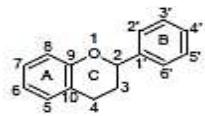
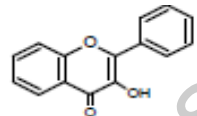
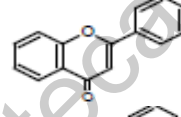
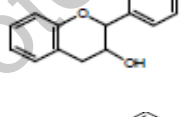
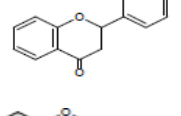
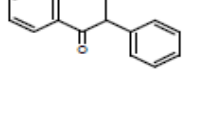

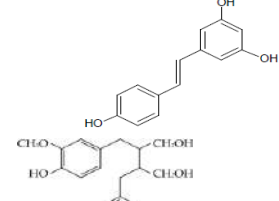
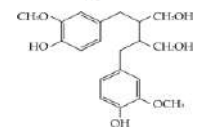
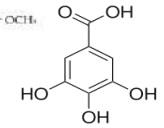


Figura 2. Estructura química de un fenol, conformado por un grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo aromático. Tomado de De Souza y cols. 2018.

Tabla 1. Clasificación de flavonoides y no flavonoides junto con su estructura química.

<i>Clase de flavonoide</i>	<i>Estructura química</i>
Flavonoides C ₆ -C ₃ -C ₆ estructura general	
Flavonoles	
Flavonas	
Flavana-3-oles/ antocianinas	
Flavononas	
Isoflavonas	
No flavonoides	
Ácidos fenólicos	
Estilbenos	
Lignanós	
Taninos	

Modificado de Mocanu y cols. 2015

2.2.1. Capacidad antioxidante de compuestos fenólicos

Los CF son considerados compuestos naturales con una alta capacidad antioxidante, debido a que pueden neutralizar los radicales libres por medio de la donación de un electrón o un átomo de hidrógeno a una amplia gama de especies reactivas de oxígeno. Su capacidad antioxidante llega a depender del número y posición de los grupos hidroxilo presentes en la molécula, como por ejemplo la quercetina, la cual ha mostrado tener una mayor capacidad antioxidante a causa de la presencia de un grupo 3-hidroxi, en comparación a otros flavonoides que no lo presentan. La fracción catecol en el anillo B, el grupo 4-oxo conjugado y con enlace doble 2,3 en el anillo C, así como la fracción 5-hidroxilo presente en los flavonoides, se ha asociado con una alta actividad antioxidante. Así mismo, se sabe que los CF son capaces de mejorar las actividades de las enzimas antioxidantes que forman el sistema redox celular enzimático, conformado por la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (Zhang y Tsao, 2016).

Existen diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante de los CF, siendo los ensayos químicos los más utilizados. De forma general los ensayos pueden ser de dos formas: mediante la transferencia de un solo electrón (TE) o mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH). Ambos ensayos permiten evaluar la capacidad de eliminación de radicales en lugar de la capacidad antioxidante preventiva de una muestra. En el caso de los ensayos TE, estos se enfocan en evaluar la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un oxidante como los compuestos carbonilos, metales y radicales. Al reducirse estos compuestos, el ensayo genera un cambio de coloración donde el grado de cambio medido por absorbancia, se correlaciona con las concentraciones de antioxidantes de la muestra, siendo comúnmente utilizado el ensayo para conocer el poder antioxidante de la reducción del ion fierro (FRAP, por sus siglas en inglés), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) y ácido 2, 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS). Por otra parte, los ensayos TAH se basan en un método que mide la capacidad de un antioxidante para eliminar radicales libres mediante la donación de

protones al haber una reacción competitiva entre el sustrato y el antioxidante utilizando un generador de radicales libres sintético, llevándose a cabo la cuantificación a partir del área bajo la curva cinética, siendo el ensayo comúnmente utilizado el de capacidad de absorbanza del radical oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) .Por lo tanto, debido a que los compuestos antioxidantes presentes en un fruto llegan a actuar dentro del organismo por medio de diversos mecanismos, es importante el uso de diferentes ensayos espectrofotométricos que permitan evaluar la capacidad antioxidante total *in vitro* con el fin de semejar el proceso *in vivo* (Huang *et al.*, 2005).

2.2.2. Absorción y metabolismo de compuestos fenólicos

La estructura química de los CF juega un papel fundamental en la velocidad y grado de absorción en el tracto gastrointestinal. La mayoría de los flavonoides se encuentran en forma de glucósidos, es decir se encuentran conjugados con azúcares (a excepción de las flavononas). Esto provoca que su absorción sea muy baja en el estómago debido a que resisten la hidrólisis ácida del estómago, de tal manera que llegan intactos al intestino delgado, donde tan solo del 5 al 10 % son absorbidos. Para que pueda llevarse a cabo la absorción, es necesario eliminar los azúcares (glucósidos) que se encuentran unidos al esqueleto del flavonoide, por lo que son transportados a través del epitelio por medio del contrantransportador de sodio/glucosa 1 (SGLT1), donde posteriormente en las células epiteliales los glucósidos serán hidrolizados por acción de la β -glucosidasa citosólica, lo que genera la liberación del esqueleto del flavonoide, es decir la aglicona de su azúcar. La formación de la aglicona también se puede dar en el lumen por acción de la lactasa-florizina-hidrolasa (LPH) unida a la membrana, para posteriormente ser absorbidos pasivamente a través del epitelio. Por otra parte, del 90 al 95% de los CF que no son absorbidos en el intestino delgado llegan al intestino grueso, donde los glucósidos son hidrolizados por la microbiota colónica permitiendo la formación de agliconas. Posteriormente las metaboliza generando la formación de metabolitos

secundarios de ácidos aromáticos como el ácido hidroxifenilacético, hidroxifenilpropiónico e hidroxifenilbutírico (Manach *et al.*, 2015). Estos resultan ser metabolitos activos fácilmente absorbibles y de gran importancia fisiológica, además de contribuir a la formación de un ambiente antioxidante al eliminar los radicales libres y contrarrestar los efectos prooxidantes de la dieta (Fig. 3) (Saura-Calixto *et al.*, 2007 y 2011). Durante el proceso de absorción y posterior a éste, los CF son sometidos a un proceso de conjugación entre los que se incluyen la metilación, sulfatación y glucuronidación. Este último representa un proceso de detoxificación metabólica común para muchos xenobióticos con el objetivo de disminuir su citotoxicidad, aumentar su hidrofobicidad y por último, facilitar su eliminación ya sea por vía urinaria o biliar. En primera instancia, los CF son metabolizados por enzimas de fase I (oxidación, reducción e hidrólisis) y por enzimas de fase II (conjugación) en los enterocitos, y posteriormente son metabolizados en los hepatocitos antes de que ingresen a la circulación sanguínea para su posterior distribución a los órganos y excreción (Manach *et al.*, 2015; Mojzer *et al.*, 2016).

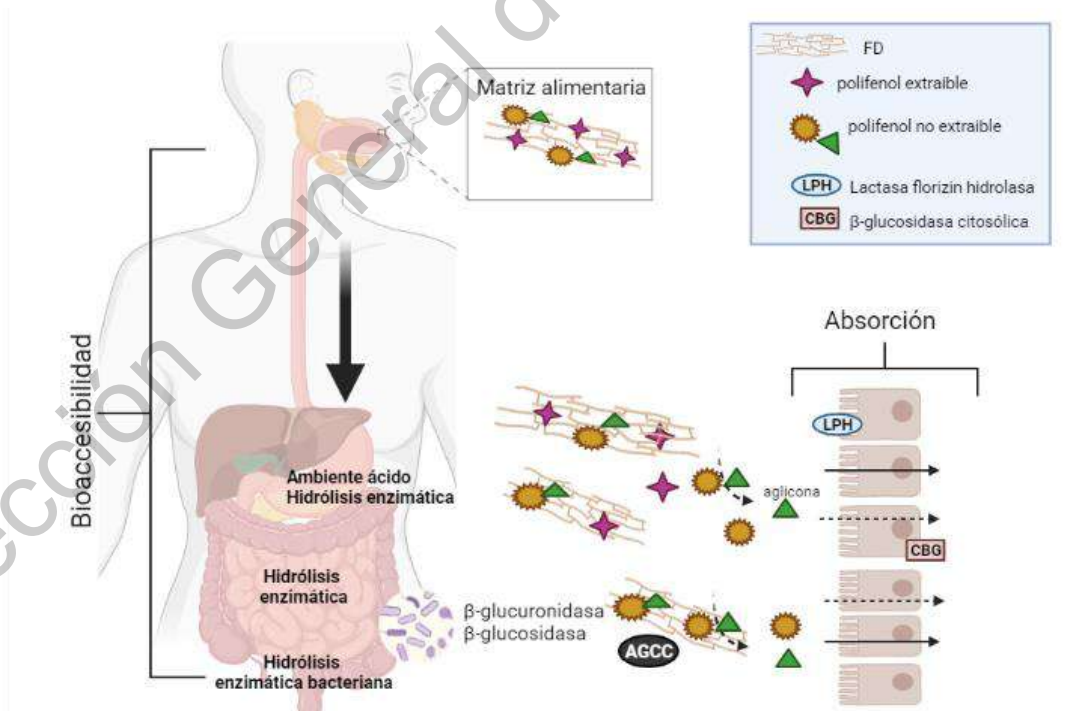


Figura 3. Esquema del metabolismo de los compuestos fenólicos

2.2.3. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos

La bioaccesibilidad es definida como “la cantidad de un constituyente alimentario que está presente en el intestino como consecuencia de la liberación de este constituyente de la matriz sólida del alimento, y puede atravesar la barrera intestinal” (Saura-Calixto *et al.*, 2007). En un inicio, la acción mecánica de la masticación permite la degradación de las células de las frutas junto con la liberación de los CF asociados a la pared celular; sin embargo, algunos CF siguen unidos a la matriz del fruto, los cuales pueden ser bioaccesibles por medio de una hidrólisis enzimática en el intestino delgado o por bacterias que conforman la microbiota colónica en el intestino grueso. Es por esto que una característica importante de los CF presentes en un fruto es su clasificación, la que los divide en compuestos fenólicos extraíbles (CFE) como los ácidos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides y quinonas, y compuestos fenólicos no extraíbles (CFNE) como los taninos condensados y ligninas, los cuales no son solubles debido a que forman interacciones químicas con la matriz de la fibra dietaria (puentes de hidrógeno, enlaces covalentes o interacciones hidrofóbicas) (Swallah *et al.*, 2020). De tal manera que la bioaccesibilidad de los CFE, puede estar dada por su liberación de la matriz alimentaria en el intestino delgado mediante la solubilización directa de fluidos intestinales en condiciones fisiológicas (37°C, pH 1-7.5) o por acción de enzimas digestivas (hidrólisis enzimática de proteínas, carbohidratos y lípidos), permitiendo una absorción parcial a través de la mucosa del intestino delgado. Los CFNE no son bioaccesibles en el intestino delgado ya que pasan sin disolverse debido a que permanecen unidos a la FD, por lo que llegan al intestino grueso donde son fermentados por la acción de enzimas bacterianas lo que aumenta su bioaccesibilidad. Así pues, la FD juega un papel fundamental en la bioaccesibilidad de los CF presentes en los frutos, así como en su actividad antioxidante dentro del huésped (Saura-Calixto *et al.*, 2007; Quirós- Saucedo *et al.*, 2014).

2.3. Fibra dietaria

La FD es la parte comestible de los alimentos vegetales que es resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación total o parcial en el intestino grueso (Jones, 2014). Dentro de los componentes que la conforman se incluyen materiales de la pared celular como polisacáridos intracelulares, los cuales a su vez son clasificados en cuanto a su solubilidad dentro de fluidos digestivos humanos. La fibra dietaria insoluble (FDI) está compuesta de celulosa, hemicelulosa, lignina y cutina; mientras que la fibra dietaria soluble (FDS) está conformada por pectinas, β -glucanos, arabinosilanos, galactomananos y otros polisacáridos y sacáridos no-digeribles (Saura-Calixto, 2011). De forma general, el consumo de FD en la dieta por parte del huésped se ha asociado con una disminución del riesgo a desarrollar cáncer de colon, síndrome de intestino irritable y enfermedad de Crohn. Todo esto a través de diversos mecanismos como el aumento en el volumen fecal, disminución del tránsito intestinal, reducción en el tiempo de fermentación proteolítica, disminución en el pH del colon y proporcionando sustrato para el proceso de fermentación por parte de la microbiota. Este es uno de los principales factores atribuibles a la modificación del perfil de la microbiota intestinal, así como en la producción de sus metabolitos secundarios entre los que se encuentran los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el ácido acético, propiónico y butírico principalmente (Vilcanqui-Pérez y Vélchez-Perales, 2017; Zeng *et al.*, 2014). Por otra parte, la FD juega un papel fundamental en la digestión de antioxidantes debido a que puede atrapar físicamente los CF dentro de ensamblajes estructurados como los polisacáridos no-digeribles de la pared celular que conforman el fruto, lo que influye en el proceso de digestión y absorción en el intestino delgado de los CF, provocando que lleguen al intestino grueso donde al ser expuestos a la hidrólisis enzimática bacteriana darán origen a la generación de AGCC hidroxilados. De tal manera que entre los beneficios bioactivos a los cuales se asocia la FD, se encuentran algunos compuestos fenólicos ligados a su estructura (Saura-Calixto, 2011; Quirós-Sauceda *et al.*, 2014).

2.4. Fibra antioxidante

La fibra antioxidante (FA) es el término utilizado para la asociación entre la fibra dietaria y los compuestos fenólicos que forman parte de un fruto, mediante la formación de interacciones químicas tales como puentes de hidrógeno, enlaces covalentes o interacciones hidrofóbicas entre el grupo hidroxilo del CF y los grupos polares de las moléculas de polisacáridos. Dicha característica le confiere una alta capacidad antioxidante, además de una fisiología similar a la de la FD ya que es resistente a las enzimas digestivas presentes en el intestino delgado. Esta resistencia les permite llegar hasta el colon donde los compuestos fenólicos son liberados y metabolizados por la microbiota junto con la FD, lo que da como resultado la formación de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios al ser absorbidos ejercen efectos sistémicos como la participación de mecanismos moleculares asociados a la protección celular, el aumento de señales antiinflamatorias, actividad antioxidante y la modulación de la microbiota intestinal (Saura-Calixto *et al.*, 2010).

2.5. Fermentación colónica

La etapa final del proceso de digestión está mediada por la fermentación colónica, la cual se lleva a cabo por medio de la microbiota anaerobia presente en colon, conformada por diversas especies de bacterias dentro de los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacterias*. La mayoría de las especies que conforman la microbiota colónica son sacarolíticas, por lo que obtienen su energía mediante la descomposición de polisacáridos dietéticos que no son digeridos ni absorbidos en el intestino delgado, es decir aquellos que conforman la FD. El proceso de fermentación colónica da como resultado la formación de gases como dióxido de carbono, metano e hidrógeno, así como la generación de AGCC, entre los que se encuentran el ácido acético, propiónico y butírico. Éstos AGCC son absorbidos con facilidad por la mucosa intestinal e intervienen de forma positiva en diferentes funciones dentro del huésped como fuentes de energía y como moléculas de

señalización reconocidas por receptores específicos (Macfarlane y Macfarlan, 2012).

Por otra parte, los CF también son transformados por parte de las bacterias debido a que éstas pueden hidrolizar glucósidos, glucurónidos, sulfatos, amidas, ésteres y lactonas. Además, pueden llevar a cabo reacciones de descarboxilación, desmetilación, deshidroxilación, reducción y escisión, dando como resultado la formación de metabolitos secundarios potencialmente más activos que los CF originales. De tal manera que una vez que los CF son desconjugados por parte de enzimas microbianas fecales como la β -glucosidasa y la β -glucuronidasa, dan como resultado la formación de una aglicona la cual es sometida a diversas reacciones o escisiones de grupos funcionales (descarboxilación, desmetilación, deshidroxilación), así como a procesos que involucran la fisión de anillos. La mayoría de los flavonoides presenta una ruptura del anillo C, lo que genera la formación de compuestos aromáticos hidroxilados a partir del anillo A y la formación de ácidos fenólicos del anillo B, donde de acuerdo con la posición de ruptura del anillo C se van a originar diferentes CF simples (Aura, 2008). Un ejemplo de esto son los compuestos simples derivados de la quercetina, entre los que se encuentran el ácido 2-(3,4-dihidroxifenil), ácido 2-(3-hidroxifenil) acético y ácido 3,4-dihidroxibenzoico correspondientes del anillo B; mientras que del anillo A se forma el floroglucinol, ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico y el ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico (Selma *et al.*, 2009). La formación de ácidos fenilacéticos hidroxilados es producto del metabolismo microbiano de flavonoides como la quercetina y miricetina, y flavonoides como la catequina (flavanol), naringenina (flavanona) y apigenina (flavonas). Al haber una ruptura del anillo C en la misma posición para los tres compuestos antes mencionados, se ha visto que se generan derivados del ácido fenilpropiónico. De acuerdo con la literatura, la generación de estos compuestos simples por parte de los flavonoides es la misma tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* mediante el uso de incubaciones fecales (Aura, 2008; Serra *et al.*, 2012). De tal manera que el uso de modelos *in vitro* que involucran microbiota fecal,

llegan a ser de gran utilidad para el estudio de procesos de fermentación colónica en condiciones controladas (Macfarlane y Macfarlane 2012).

2.6 Modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro* han permitido el estudio cuantitativo de la bioaccesibilidad, así como los posibles mecanismos de absorción y la transformación de compuestos bioactivos presentes en un alimento (Dima *et al.*,2020). A pesar de que un modelo *in vitro* no refleja por completo los procesos fisiológicos que ocurren en el organismo humano o en un modelo *in vivo*, cuenta con una serie de ventajas como el permitir que la investigación se lleve a cabo en un periodo más corto, el ser modelos tecnológicamente simples, baratos, sin restricciones éticas y altamente reproducibles, permiten realizar un muestreo y análisis de varias muestras, además hacen posible desarrollar un estudio completo o de segmento del proceso de digestión gastrointestinal; de igual forma son una herramienta con la que se pueden conocer las interacciones entre varios componentes de la matriz alimentaria y controlar factores que influyen en el organismo humano como pH, temperatura y la presencia de enzimas (Carbonell-Capella *et al.*,2014). De forma general, los modelos *in vitro* cuentan con una serie de componentes en común, que incluye las fases que conforman el sistema gastrointestinal como lo son la boca, estómago, intestino delgado y colon. La composición química de los fluidos utilizados en cada etapa que incluye a las enzimas, tampones, electrolitos o ya sea el uso de saliva obtenida de voluntarios, el uso de fuerzas mecánicas que permiten imitar los procesos de motilidad que ocurren de forma fisiológica en el tracto gastrointestinal humano, así como el proceso de masticación, el uso de membranas naturales las cuales pueden ser fragmentos de intestino de animales o alguna línea celular epitelial que permita conocer algunos de los posibles mecanismos de transporte que pueden ocurrir en la fase intestinal (Dima *et al.*,2020). Respecto a la fase colónica con la que cuentan los modelos *in vitro* es posible controlar condiciones como el pH, temperatura y llevar a cabo estudios metabólicos mediante el uso de incubaciones fecales obtenida de voluntarios humanos, lo que proporciona una fuente de microbiota colónica necesaria para conocer algunos metabolitos

secundarios generados del proceso de fermentación principalmente AGCC. Sin embargo, el uso de inóculo fecal no representa en su totalidad a la microbiota colónica con la que cuenta una población o la que puede estar en la luz intestinal y en la mucosa del colon lo que refleja una limitación en el modelo (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020). A pesar de las limitaciones con las que puede contar el uso de un modelo *in vitro* es importante mencionar que su uso permite contrarrestar algunas de las desventajas con las que cuentan el usar modelos *in vivo*, permitiendo a su vez conocer la biotransformación, posibles mecanismos de absorción y bioaccesibilidad de algunos compuestos bioactivos que puedan proporcionar un beneficio a la salud humana.

2.7 Antecedentes de digestión *in vitro* de garambullo

La simulación del proceso digestivo en garambullo solo se ha realizado hasta el momento por Montiel-Sánchez y cols. (2020), quienes caracterizaron los extractos obtenidos de la digestión gastrointestinal *in vitro*, bioaccesibilidad y capacidad antioxidante medida por ABTS y ORAC. Dentro de sus resultados mencionan la identificación de 48 metabolitos, respecto a la capacidad antioxidante esta fue evaluada en el extracto de piel (cáscara), pulpa y fruto entero, habiendo una mayor capacidad antioxidante en el extracto de pulpa evaluada mediante el método de ORAC. En cuanto al porcentaje de bioaccesibilidad las betalaínas presentaron valores en un intervalo de 15-26%, mientras que el glucósido flavonoide más bioaccesible fue el kaempferol-7-O- neohesperidósido con un 26%. Sin embargo, es importante señalar que la determinación de los metabolitos presentes en el garambullo resultado del proceso de digestión *in vitro* fue de manera parcial y no se realizó una clasificación de los compuestos generados en la fracción digerible y la fracción no digerible. Además, el estudio no contempla el metabolismo colónico por lo que no se determinaron los metabolitos generados de los compuestos bioactivos durante el proceso de fermentación *in vitro*, ni su capacidad antioxidante. De tal manera que resulta importante un estudio más exhaustivo que involucre todo el tracto gastrointestinal para poder sugerir un potencial biológico del consumo del garambullo.

3. Justificación

El garambullo es un fruto endémico de México consumido de forma local y muy poco estudiado, sin embargo, se sabe que es una fuente importante de minerales, carbohidratos, proteínas y fibra dietaria. Además, presenta diversos compuestos bioactivos como taninos, ácidos fenólicos, betalaínas y fenoles solubles, así como fibra antioxidante lo que lo hace un fruto con alta capacidad antioxidante.

El metabolismo de los compuestos fenólicos conlleva una serie de transformaciones por parte del microbiota intestinal a lo largo del tracto gastrointestinal, donde por medio de una serie de conjugaciones por enzimas bacterianas, los compuestos fenólicos son transformados en metabolitos secundarios como los ácidos grasos de cadena corta hidroxilados. Por otra parte, la formación de ácidos grasos de cadena corta como el ácido propiónico, acético y butírico se lleva a cabo por el proceso de fermentación colónica en donde existe una interacción entre los compuestos fenólicos y la fibra dietaria con la microbiota residente. Los metabolitos secundarios son fácilmente absorbibles por el epitelio intestinal y están involucrados en funciones fisiológicas cruciales en la salud del huésped.

De tal manera que un modelo gastrointestinal *in vitro*, permitirá caracterizar los compuestos bioactivos generados por los procesos de digestión y fermentación colónica del garambullo, así como su bioaccesibilidad gastrointestinal.

4. Hipótesis

Los procesos de digestión y bioaccesibilidad en intestino delgado, así como la fermentación colónica *in vitro* del fruto de garambullo generan compuestos con capacidad nutracéutica.

5. Objetivo general

Caracterizar los metabolitos generados durante la digestión y bioaccesibilidad gastrointestinal y de la fermentación colónica *in vitro* del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), así como su capacidad antioxidante.

5.1 Objetivos específicos

- Identificar y cuantificar los metabolitos derivados de compuestos fenólicos, betalaínas, fitoesteroles y carotenoides producidos a través de la simulación *in vitro* de la digestión y bioaccesibilidad gastrointestinal del garambullo.
- Identificar y cuantificar los metabolitos derivados de compuestos fenólicos, betalaínas, fitoesteroles y carotenoides producidos a través de la fermentación colónica *in vitro* del garambullo.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos generados en los procesos de digestión y fermentación colónica.

6. METODOLOGÍA

6.1. Bioética y seguridad

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la NOM-062-Z00-1999 y el protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, UAQ. Las ratas de la cepa Wistar fueron obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla. A su arribo se verificó su peso y sexo. Se mantuvieron por un periodo de 24h en el Bioterio de posgrado de la Facultad de Química de la UAQ bajo condiciones de temperatura ambiente de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclos de luz-oscuridad de 12/12 h, con alimento y agua *ad libitum*, en condiciones de limpieza y ventilación constante. Al faltar 16h para el sacrificio, se retiró el alimento dejando solo agua debido a que la técnica de saco invertido requiere que los animales tengan un ayuno de 16 h. Por último, se hizo uso de una bolsa roja para depositar los residuos biológicos, y así mismo, se utilizaron guantes y bata, y se mantuvieron las medidas generales de seguridad que procedieron en todo momento en la fase experimental.

6.2. Recolección y tratamiento del garambullo

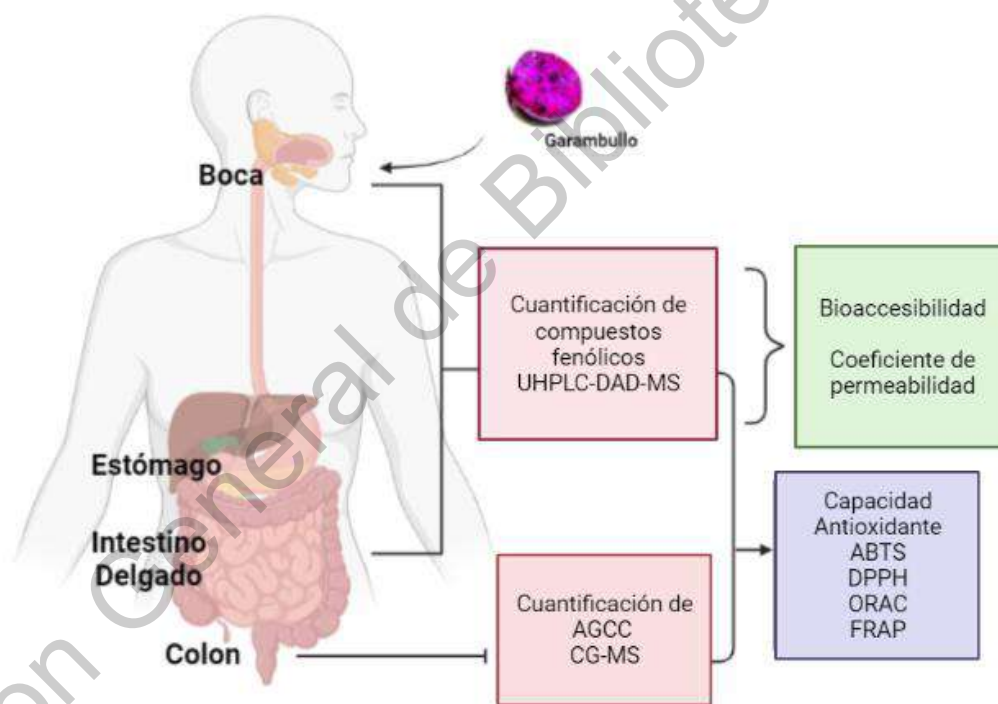
El garambullo fue recolectado en la comunidad de Garabatillo, Celaya, en el estado de Guanajuato en el mes de junio del 2020. Una vez recolectado, el garambullo fue lavado con agua corriente sin tallar. En seguida se liofilizó y se molió, obteniendo el fruto en polvo que se almacenó en bolsas selladas al vacío a una temperatura de -80°C .

6.3 Extracto de garambullo

La extracción de compuestos bioactivos del garambullo sin digerir se llevó a cabo por el método descrito por Van den Berg y cols. (1999) con ligeras modificaciones. Se tomaron 0.2 g de garambullo liofilizado el cual se mezcló con 10 ml de acetona-agua (50:50, V:V). La solución se homogeneizó vigorosamente utilizando un vortex durante 10 min a 8000 rpm. Después se centrifugó ($5000 \times g$, 5 min a 4°C), el sobrenadante fue colectado para posteriores análisis. Respecto a la extracción de

compuestos no polares se realizó conforme a lo descrito por Reynoso-Camacho y cols. (2021) con ligeras modificaciones. Se tomó 1g de garambullo liofilizado al cual se le añadieron 10 ml de hexano, en seguida se colocó en agitación constante por 2 h, se centrifugó a 4000 x g por 10 min y el sobrenadante se colocó en tubo eppendorf, para evaporación del solvente mediante el uso del equipo speedvac durante 3 h, finalmente el volumen fue reconstituido con 200ul de metanol.

6.4 Diseño experimental



6.5. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Esta técnica permitió simular de forma *in vitro* el proceso digestivo del garambullo desde la boca, estómago, intestino delgado hasta su fermentación colónica, siguiendo las técnicas adaptadas por Campos-Vega y cols. (2009 y 2015).

6.5.1 Simulación de las condiciones de la boca

Se solicitó la participación de cuatro individuos normopeso, que no tuvieran antecedentes de enfermedades gastrointestinales ni de haber consumido antibióticos durante al menos 3 meses, así como no tener una dieta vegetariana y que el consumo de su último alimento hubiera sido al menos 90 min antes del inicio del ensayo. Una vez que aceptaron participar en el ensayo, se les pidió enjuagarse la boca con agua antes de masticar la muestra, posteriormente masticaron 1 gramo de muestra de garambullo 15 veces durante 15 s, descargando el contenido en un vaso de precipitado con 5ml de agua destilada. Enseguida cada sujeto se enjuagó la boca por 60 s con 5ml de agua destilada, depositando el contenido en el vaso anteriormente utilizado. Una vez completado el procedimiento, se mezclaron las suspensiones de cada muestra en un solo vaso. Dicho procedimiento se llevó a cabo de igual forma para el blanco utilizado, el cual fue agua destilada.

6.5.2. Simulación de las condiciones del estómago

Se tomaron 10ml de la suspensión obtenida de la fase de boca, tanto de la muestra como del blanco respectivamente. Se les agregó ácido clorhídrico (HCl 2N) en una cantidad necesaria para bajar el pH a 2.0, posteriormente se añadió 0.055 g de pepsina a cada muestra la cual fue disuelta previamente en 0.94 ml de HCl 20mM. Posteriormente, tanto la muestra como el blanco fueron incubados en un baño de agua con agitación durante 2 h a 37°C.

6.5.3. Simulación de las condiciones del intestino delgado

Se llevó a cabo la preparación de un extracto intestinal mediante la disolución de 3mg de hiel de Buey y 2.6mg de pancreatina, regulando a un pH de 7.6. Ambos compuestos fueron disueltos en 5ml de solución tampón de Krebs-Ringer (K-R) la cual estaba compuesta por NaCl (cloruro de sodio) 118 Mm, KCl (cloruro de potasio) 4.7 Mm, MgSO₄ (sulfato de magnesio) 1.2 Mm, KH₂PO₄ (hidrógeno fosfato dipotásico) 2 mM, NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) 25 mM, 11 mM de glucosa y 2.5 mM de CaCl₂ (cloruro de calcio) a un pH 6.8. Una vez obtenida la solución, ésta fue añadida a cada muestra y al blanco obteniendo una suspensión de 15ml, la cual finalmente fue transferida a un recipiente que contenía el saco invertido.

6.5.4. Técnica de saco invertido de rata (fase *ex vivo*)

Se utilizaron 4 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre 250 a 300 gr, las cuales tuvieron un ayuno de 16 h previo al ensayo. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital a una dosis de 60mg/kg por medio de una inyección peritoneal. En seguida se realizó una incisión abdominal permitiendo la exposición del intestino delgado, del cual se extrajo un segmento de 20 a 25 cm del yeyuno proximal de cada rata. Una vez obtenido el intestino delgado, este fue lavado con la solución tampón K-R gasificada con CO₂ (dióxido de carbono) a una temperatura de 37°C con el objetivo de retirar residuos. Posteriormente se voltearon de manera cuidadosa sobre una varilla de vidrio y se cortaron en segmentos de aproximadamente 5 cm de longitud, enseguida, fueron ligados por un extremo llevándose a cabo dicho procedimiento con los segmentos sumergidos en la solución tampón K-R, con el objetivo de evitar la degradación del tejido. Los fragmentos de intestino luego de ser ligados por un extremo, fueron llenados con 2 ml de solución tampón K-R y ligados por el otro extremo creando un saco, el cual fue incubado en un baño que contenía la suspensión de 15 ml obtenida de la simulación del estómago a una temperatura de 37°C durante un periodo de 2h en agitación continua y en una atmósfera anaerobia (CO₂). Los intestinos fueron removidos de la incubación a los 15, 30 y 60min tanto para el blanco (agua destilada) como para los que contienen la muestra de garmbullo. La fracción del blanco y de la muestra que permanecieron contenidas en el recipiente después de haber retirado el saco, fueron denominadas fracción no digerible (FND), la cual fue sometida al proceso de fermentación colónica *in vitro*. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

6.6. Fermentación colónica *in vitro* de la FND

Con el propósito de finalizar la simulación del proceso digestivo se realizó la técnica de fermentación colónica *in vitro* adaptada por Campos-Vega (2015). Se utilizaron tubos estériles con 9 ml de medio de cultivo basal el cual contenía (g/L): agua

peptonada 2.0g, extracto de levadura 2.0g, cloruro de sodio 1.0g, fosfato dibásico de potasio 0.04g, fosfato monobásico de potasio 0.04g, sulfato de magnesio heptahidratado 0.01g, cloruro de calcio dihidratado 0.01g, bicarbonato de sodio 2.0g, clorhidrato de cisteína 0.5g, sales biliares 0.05g, Tween-80 2ml, vitamina K1 10ul y hematina 0.05g, previamente diluida en 5ml de hidróxido de sodio (NaOH). Los tubos fueron sellados y mantenidos en una atmósfera anaerobia la cual estaba conformada por una mezcla de gases que incluyeron hidrógeno, dióxido de carbono y nitrógeno, en un volumen 10:10:80 durante un periodo de 30 min. Posteriormente se utilizó un inóculo fecal (3g de materia fresca) como fuente de microbiota colónica humana, el cual fue obtenido a partir de dos voluntarios sanos que contaron con características como el no haber consumido antibióticos durante al menos 3 meses, no presentar antecedentes de enfermedades gastrointestinales y el no tener una dieta vegetariana. La muestra fue homogenizada con 27 ml de solución de fosfato de sodio 1M a un pH de 7.0. A continuación, los tubos con medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 ml del homogenizado fecal y posteriormente se adicionó la FND. Los tubos fueron agitados en vórtex durante 30s y se incubaron en baño de agua a 37°C y pH 7.0. La fermentación se llevó cabo a tres tiempos 6h, 12h y 24h, utilizando como control de sustrato fermentable la rafinosa. Una vez finalizado el periodo de fermentación, se llevó a cabo una centrifugación para separar sólidos de líquidos siendo considerado el sobrenadante como el extracto de fermentación, el cual fue almacenado a -70°C para su posterior identificación y cuantificación.

6.7. Identificación y cuantificación de metabolitos

6.7.1. Compuestos fenólicos

Los metabolitos de los compuestos fenólicos proveniente de la digestión y fermentación colónica fueron identificados mediante un cromatógrafo líquido de alta resolución (UHPLC) acoplado a un detector de matriz de diodos (DAD) y un espectrómetro de masas (MS). El extracto de garambullo como las muestras

provenientes de la simulación de boca, estómago, intestino delgado y de la fermentación colónica fueron filtradas con acrodiscos de 0.22 micras (muestras de digestión y extracto) y de 0.45 micras (muestras de fermentación). Una vez filtradas fueron colocadas en viales de UHPLC para su análisis. La fase estacionaria fue una columna BEH Acquity C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 mm) a 35 °C. Para la separación cromatográfica se utilizó como fase móvil agua con ácido fórmico al 0,1% (A) y acetonitrilo (B) con un flujo de 0,5 mL/min. Las condiciones de gradiente fueron 0% B / 0 min, 15% B / 2.5 min, 21% B / 10 min, 90% B / 12 min, 95% B / 13 min, 0% B / 15 min y 0% B / 17 min. Las absorbancias se midieron a 214, 280, 320 y 360, 484 y 535 nm. Se utilizaron los siguientes estándares comerciales para la cuantificación: eriocitrina (flavanonas), genisteína (isoflavonas), quercetina (flavonoles), ácido p-hidroxibenzoico (ácidos hidroxibenzoicos), ácido ferúlico (ácidos hidroxicinámicos), betanina (betalaínas), beta sitosterol (fitoesteroles) y alfa-tocoperol (tocoferoles).

6.7.2. Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos del extracto de garambullo así como de las muestras obtenidas de la digestión *in vitro*, fue calculada mediante la siguiente ecuación $B = (C_f/C_0) * 100$, donde B se refiere al valor en porcentaje (%) de la bioaccesibilidad del compuesto bioactivo, C_0 es la concentración inicial del compuesto en cada fase y tiempo de incubación determinado (15,30 y 60 min) y C_f es la concentración final del compuesto en la misma fase y tiempo de incubación (Agudelo *et al.*,2018).

6.7.3. Coeficiente de permeabilidad

Los coeficientes de permeabilidad aparente ($P_{app} \times 10^{-3}$ cm/s) se calcularon conforme a la siguiente ecuación $P_{app} = (dQ/dt)(1/AC_0)$, donde P_{app} es el coeficiente de permeabilidad aparente (cm/s), dQ/dt (mg/s) se refiere a la cantidad de compuesto bioactivo transportado a través de la membrana acorde a un tiempo determinado (15, 30 y 60 min). A (cm²) es el área de superficie intestinal total para la permeación de los compuestos y C_0 (mg/L) se refiere a la concentración inicial de los compuestos bioactivos de los sacos intestinales invertidos (Lassoued *et al.*,

2011). El radio de eflujo (ER) se calculó mediante la siguiente ecuación $ER = \frac{P_{app,BL-AP}}{P_{app,AP-BL}}$, en donde $P_{app,BL-AP}$ se refiere a la permeabilidad del lado basolateral al apical (cm/s) y la $P_{app,AP-BL}$ es la permeabilidad del lado apical al basolateral (cm/s) (Faassen *et al.*,2003).

6.7.4. Ácidos grasos de cadena corta

Mediante el análisis por CG-MS se determinaron los AGCC obtenidos del proceso de fermentación colónica, para lo cual se siguió el método descrito por Zamora-Gasca y cols. (2014) con ligeras modificaciones. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 g durante 10 min a 4°C, enseguida se pesó en viales de cristal 1g del sobrenadante correspondiente a cada muestra. El análisis de las muestras se llevó a cabo en un sistema CG Agilent 7820A equipado con un detector de masas Agilent 5977B y un muestreador automático MPS2 XL Gerstel. Se utilizó una fibra de microextracción en fase solida de polidimetilsiloxano-divinilbenceno-carboxeno de 2 cm, las condiciones de extracción utilizadas fueron 45°C como temperatura de extracción, un periodo de incubación de 5 min, velocidad del agitador 250rpm y un tiempo de extracción de 120 min. La temperatura de desorción fue de 240°C durante 10 min. Se realizaron dos extracciones replicadas independientes para cada muestra. La separación de la muestra se llevó a cabo mediante el uso de una columna capilar DB-FATWAX UI (30m, 0.25 mm, 0.25 µm); se utilizó helio como gas portador a un caudal de 1 ml/min, el inyector de gases se mantuvo a 250°C, la fuente de espectrometría de masas a 230°C y el cuadrupolo a 150°C. La temperatura del horno inició en 40°C por 5 min y se programó a 5°C/min en un rango de 40 a 200°C, posteriormente se programó a 20°C/min a 230°C y se mantuvo en 230°C por 15 min. Finalmente, la cuantificación de las muestras se realizó a través de curvas de calibración de estándares comerciales de los ácidos acético, propiónico y butírico.

6.8. Evaluación de capacidad antioxidante

6.8.1. Método 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)

Para la generación del radical se pesaron 0.01920g de ABTS y se aforó a 5 ml con agua destilada, enseguida se pesaron 0.1892g de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y se aforó a 5 ml con agua destilada. En un vial forrado con papel aluminio se mezcló 5 ml de ABTS y 88 μ L de solución de persulfato de potasio, la solución fue almacenada en oscuridad durante 12h a temperatura ambiente permitiendo la activación del radical (solución A). Una vez pasadas las 12h en un vial forrado de papel aluminio se mezclaron 500 μ L de la solución A (la cual contiene ABTS^{•+}) y 25 ml de etanol; posteriormente se verificó que la solución (solución B) tuviera una absorbancia entre 0.7 y 1 en el espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 734 nm. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 20 μ L de las muestras de digestión y fermentación junto con sus blancos correspondientes por triplicado, así como del extracto de garambullo (muestra sin digerir de garambullo liofilizado). Con una pipeta multicanal se añadió a cada pocillo que contenía las muestras 230 μ L de la solución B, una vez completada la placa se dejó reposar 6 min antes de la lectura. Las lecturas se realizaron mediante el uso del espectrofotómetro UV-VIS (SpectraMax 190) a una longitud de onda de 734nm. Los resultados fueron expresados en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca (μ mol ET/g de muestra seca), para lo cual se realizó una curva estándar de Trolox a diferentes concentraciones de Trolox (100-600 μ L de Trolox). Los blancos utilizados para este método fueron: blanco 1: 20 μ L metanol+230 μ L de etanol y blanco 2: 20 μ L de agua destilada + 230 μ L de etanol. Los controles utilizados fueron: control 1: 20 μ L de metanol + 230 μ L de ABTS y control 2: 20 μ L de agua destilada + 230 μ L de ABTS (Nenadis *et al.*, 2007).

6.8.2. Método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Para la preparación de la solución de DPPH se pesaron 0.0015g de DPPH en un matraz de 25 ml forrado de papel aluminio, enseguida se añadieron 20.5ml de metanol y agua destilada hasta completar el aforo y finalmente se sonicó por 5 min.

En una microplaca de 96 pozos por triplicado se añadieron 20 μL de las muestras de digestión y fermentación junto con sus blancos correspondientes, así como del extracto de garambullo. Con una pipeta multicanal se agregaron 200 μL de la solución del radical DPPH y las lecturas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro (SpectraMax 190) a una longitud de onda de 520nm a los 0, 4, 10, 30, 60 y 90 min. Los resultados fueron expresados en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca ($\mu\text{mol ET/g}$ muestra seca), por lo que se realizó una curva estándar de Trolox a diferentes concentraciones (50-600 μL de Trolox). El blanco utilizado en este método consistió de 200 μL de agua destilada + 20 μL de metanol. El control consistió de 200 μL de DPPH^{•+} + 20 μL de metanol (Nenadis *et al.*, 2007).

6.8.3. Método de capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC)

Se preparó un buffer de fosfatos (PBS) para el cual se pesaron 2.06985 g de fosfato de sodio monohidratado ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y se aforó a 500ml con agua HPLC. Esta solución se mezcló con 3.91905g de fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 aforado a 500ml con agua HPLC, una vez mezcladas ambas soluciones se ajustó a un pH de 7.4. Posteriormente, se pesó 0.01097 g de fluoresceína disódica y se aforó a 25 ml con el buffer PSB. Las muestras de digestión y fermentación junto con sus blancos fueron previamente diluidas en buffer PBS en una dilución 1/10. Para el extracto de garambullo se realizó una evaporación del solvente mediante el uso del equipo SpeedVac, se tomaron 200 μL del extracto a una temperatura de 65°C durante 2 horas, al término el volumen fue reconstituido con 200 μL de buffer PSB y finalmente se realizó una dilución del extracto 1:10. Una vez listas las muestras en una microplaca de 96 pozos negra se colocaron 20 μL de las muestras por triplicado, enseguida se añadió la solución de fluoresceína la cual fue preparada momentos antes de ser colocada en placa, para la cual se tomaron 100 μL de la solución madre de fluoresceína previamente preparada y se aforó a 10 ml con buffer PSB (solución A), posteriormente de la solución A se tomaron 250 μL y se aforó a 25 ml con buffer PSB (solución B). Con una micropipeta multicanal se añadieron 120 μL de la solución B a la placa que ya contenía los 20 μL de las muestras, inmediatamente la

placa fue colocada en el Varioskan Flash dando inicio al periodo de incubación por un tiempo de 10 min a 37°C. Durante ese periodo se preparó la solución 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) diclorhidrato (AAPH), para lo cual se pesó 0.1263g de APPH y se aforó a 10 ml con buffer PBS. Una vez terminado el periodo de incubación se agregaron con la pipeta multicanal 60µl de la solución AAPH previamente preparada a cada uno de los pocillos. Las lecturas se llevaron a cabo mediante una cinética de 151 lecturas cada minuto y entre cada lectura se llevó a cabo una agitación a 600rpm a una longitud de onda de 485nm y una emisión de 512nm. Los resultados fueron expresados en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca de tal manera que se utilizó una curva estándar de Trolox a diferentes concentraciones (100-800 µL de Trolox). El blanco utilizado para este experimento fueron 20 µL de buffer PSB +120 µL de fluoresceína + 60 µL de AAPH, y como control se utilizó 80 µL de buffer PSB +120 µL de fluoresceína (Dávalos *et al.*, 2004).

6.8.4. Método de capacidad de reducción del ion fierro (FRAP)

El reactivo FRAP se preparó con 10ml de buffer de acetato 300mM (pH 3.6) más 1ml de solución de 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) con una concentración de 10mM en ácido clorhídrico 40mM y 1ml de cloruro Férrico Hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20mM. Enseguida las muestras de digestión, fermentación y el extracto de garambullo fueron diluidas con metanol en una dilución 1:10, posteriormente se añadió 25 µL de cada muestra por triplicado en los pocillos de una microplaca de 96 pozos. Al término se añadieron 175 µL de la solución FRAP mediante el uso de una pipeta multicanal. Las lecturas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro (SpectraMax 190) a una longitud de onda de 593nm en los tiempos de 0, 4, 10, 30, 60 y 90 min. El blanco utilizado fue 200 µL agua destilada, y como control se utilizó 25 µL de Trolox + 175 µL de Buffer. Los resultados fueron expresados en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca, de tal manera que se utilizó una curva estándar de Trolox a diferentes concentraciones (10-350 µL de Trolox) (Huang *et al.*, 2005).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados son expresados como el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para calcular las diferencias significativas, seguida de una prueba de Tukey como *post hoc* $p < 0.05$. Los análisis se realizaron con el programa estadístico JMP versión 7.0 (SAS Institute, INC).

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Identificación de compuestos bioactivos mediante UPLC-ESI-QTOF MS.

Los parámetros para la identificación de los compuestos bioactivos presentes en el extracto de garambullo se observan en la Tabla 2. Los resultados obtenidos muestran la presencia de 9 familias de compuestos bioactivos que incluyen a la familia flavanona, isoflavona, flavonoides, ácido hidroxibenzoico, ácido hidroxicinámicos, betacianina, betaxantina, fitoesteroles y tocoferoles. Dentro de la familia de las flavanonas se identificó la eriocitrina con el ion molecular $[M-H]^-$ m/z 596 descrita por primera vez en garambullo. Respecto a las isoflavonas se encontraron dos compuestos en forma glucosilada, dihexósido de genisteína con el ion molecular $[M-H]^-$ m/z 593 y dihexósido de daidzeína con el ion molecular $[M-H]^-$ $[M-COOH]^-$ m/z 577. Ambos compuestos son reportados por primera vez en garambullo; sin embargo, se han descrito previamente en frutos como fresa, y maracuyá (Liggins *et al.*, 2000). Dentro de la familia de los flavonoides se identificaron 15 compuestos, la mayoría como glucósidos, ramnósidos y rutinósidos de quercetina y kaempferol, esto coincide con lo previamente reportado por Montiel-Sánchez y cols. (2020) en donde se identificaron 13 flavonoides en forma de ramnosil-glucósido en el extracto de garambullo. De igual forma se identificaron dos betacianinas incluida la betanidina β -hexósido en un tiempo de retención (TR) de 1.95, con el ion molecular $[M+H]^+$ m/z 551 y la betanidina en un TR de 2.45, ion

molecular $[M+H]^+$ m/z 309, lo cual coincide con lo previamente reportado por González-Nava (2010) y por Montiel-Sánchez y cols. (2020) en extracto de garambullo. Dentro de las betaxantinas se encontró la presencia de la Bx-prolina en el TR 1.98 y con el ion molecular $[M+H]^+$ m/z 309 la cual ha sido reportada anteriormente en garambullo por Correa-Betanzo y cols. (2011) y por Montiel-Sánchez y cols. (2020). Dentro de los ácidos hidroxicinámicos se encontró la presencia de 11 compuestos que incluían formas glucosiladas de ácido cafeico, felúrico y cumárico. El hexósido de ácido felúrico con el ion molecular $[M-H]^-$ m/z 355 y el hexósido de ácido cafeico con ion molecular $[M-H]^-$ m/z 341 coinciden con lo reportado anteriormente por Montiel-Sánchez y cols. (2020) en el garambullo. La presencia del ácido cafeoilquínico (ácido clorogénico) con el ion molecular $[M-H]^-$ m/z 353 es similar a lo reportado anteriormente por González-Nava (2010) en el garambullo y en la pitaya (*Stenocereus thurberi*) reportado por Castro-Enríquez y cols. (2020). También se identificó la presencia de ácidos hidroxibenzoicos entre los que encontramos al ácido vanílico $[M-H]^-$ m/z 167, el ácido dihidroxibenzoico con el ion molecular $[M-H]^-$ m/z 153 y 4 isómeros del ácido hidroxibenzoico en forma glucosilada. Estos compuestos han sido previamente reportados en garambullo por González-Nava (2010) así como en la tuna (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) por García-Cayuela y cols. (2019). Respecto a los compuestos lipofílicos se detectó la presencia de 4 fitoesteróles que incluye al β -sitosterol con el ion molecular $[M+H]^+$ m/z 415, colestanol $[M+H-H_2O]^+$ m/z 317, brasicasterol $[M+H]^+$ m/z 399 y schottenol $[M+H-H_2O]^+$ m/z 397, y 2 tocoferoles α -tocoferol con el ion molecular $[M]^+$ m/z 416 y β - tocoferol con el ion molecular $[M+H]^+$ m/z 431. Dichos compuestos hasta el momento no habían sido reportados en garambullo, sin embargo, se han descrito en aceite de semillas de fresa y frambuesa (Pieszka *et al.*, 2014), en la cera cuticular de diferentes variedades de berries del género *Vaccinium* (Klavins y Klavins, 2020) y en la pulpa del açai roja también conocida como la berry amazónica (Da Costa *et al.*, 2010).

Tabla 2. Parámetros de identificación de compuestos bioactivos mediante UPLC-ESI-QTOF MS.

Familia	Nombre del compuesto	TR esperado (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	m/z observado	Error masa (ppm)	Aductos	Fragmentos
Flavanona	Eriocitrina*	3.73	C27H32O15	596.1741	595.1643	-4.25	[M-H] ⁻	287.0550, 151.0025
Isoflavona	Dihexósido de Genisteína	3.45	C27H30O15	594.1585	593.1503	-1.51	[M-H] ⁻	431.1526, 160.0157, 134.0368
	Dihexósido de Daidzeína	3.89	C27H30O14	578.1636	577.1543	-3.51	[M-H] ⁻ [M-COOH] ⁻	415.1039, 223.0447
Flavonoide	Dihexósido de Kaempferol	3.80	C27H30O16	610.1534	609.1446	-2.46	[M-H] ⁻	285.0402, 151.0025
	Rutinósido de Miricetina	3.87	C27H30O17	626.1483	625.1369	-6.59	[M-H] ⁻	137.0293
	Quercetina ramnosil-ramnosil-hexósido	4.05	C33H40O20	756.2113	755.2028	-1.61	[M-H] ⁻	300.0729, 178.9978, 151.0024
	Kaempferol -ramnosil-ramnosil-hexósido	4.71	C33H40O19	740.2164	739.2073	-2.48	[M-H] ⁻	284.0324
	Rutinósido de Quercetina (rutina)*	4.88	C27H30O16	610.1534	609.1452	-1.45	[M-H] ⁻	300.0275, 151.0025
	Quercetina ramnosil-hexósido	5.15	C27H30O16	610.1534	609.1451	-1.65	[M-H] ⁻	301.0334
	Kaempferol hexósido-ramnosil-hexósido	5.24	C33H40O20	756.2113	755.2015	-3.39	[M-H] ⁻	285.0422, 151.0031
	Miricetina ramnosido	5.43	C21H20O12	464.0955	463.0880	-0.49	[M-H] ⁻	137.0234
	Quercetin ramnósido	5.75	C21H20O11	448.1006	447.0930	-0.73	[M-H] ⁻	299.0894
	Rutinósido de Kaempferol	5.86	C27H30O15	594.1585	593.1495	-2.90	[M-H] ⁻	285.039
	Kaempferol hexósido-ramnósido	6.67	C27H30O15	594.1585	593.1483	-4.87	[M-H] ⁻	284.0315
	(Iso)-ramnetina hexósido	7.14	C22H22O12	478.1111	477.1033	-1.09	[M-H] ⁻	315.0508, 300.0261, 285.0399
	Quercetina*	11.02	C15H10O7	302.0427	301.0346	-2.51	[M-H] ⁻	179.0337, 151.0023
	Kaempferol*	11.05	C15H10O6	286.0477	285.0391	-4.64	[M-H] ⁻	151.0023

	(Iso)-ramnetina	11.48	C16H12O7	316.0583	315.0509	-0.53	[M-H] ⁻	301.1068, 284.0993, 151.0009
Ácido Hidroxibenzoico	Ácido dihidroxibenzóico	1.57	C7H6O4	154.0266	153.0186	-4.54	[M-H] ⁻	137.0237
	Isómero I del ácido hidroxybenzóico hexósido	1.63	C13H16O8	300.0845	299.0773	0.07	[M-H] ⁻	137.0237, 109.0204
	Ácido vainillíco*	1.98	C8H8O4	168.0423	167.0347	-1.44	[M-H] ⁻	137.0235, 109.0278
	Isómero II del ácido hidroxybenzoico hexósido	2.33	C13H16O8	300.0845	299.0774	0.42	[M-H] ⁻	137.0237
	Isómero I del ácido hidroxibenzóico*	2.55	C7H6O3	138.0317	137.0239	-4.14	[M-H] ⁻	109.0286
	Isómero II del ácido hidroxibenzóico	3.74	C7H6O3	138.0317	137.0236	-5.91	[M-H] ⁻	109.0205
	Ácido Hidroxicinámico	Hexósido del ácido cafeico	2.75	C15H18O9	342.0951	341.0877	-0.20	[M-H] ⁻
Ácido cafeoilquínico (ácido clorogénico)*		2.81	C16H18O9	354.0951	353.0871	-1.86	[M-H] ⁻	191.01889, 179.0344, 135.0443
Hexósido de ácido Cumárico		2.94	C15H18O8	326.1002	325.0932	1.09	[M-H] ⁻	163.0393, 119.0498
Hexósido de ácido Felúrico		3.22	C16H20O9	356.1107	355.1039	1.12	[M-H] ⁻	135.04399
Hexósido de ácido sinápico		3.30	C17H22O10	386.1213	385.1135	-1.44	[M-H] ⁻	223.0514, 209.0453
Ácido cumaroilquínico		3.39	C16H18O8	338.1002	337.0931	0.53	[M-H] ⁻	191.0530, 119.0122
Ácido sinápico*		3.52	C11H12O5	224.0685	223.0603	-4.14	[M-H] ⁻	208.0367
Ácido feruloilquínico		3.82	C17H20O9	368.1107	367.1028	-1.90	[M-H] ⁻	191.051
Ácido cumárico*		4.59	C9H8O3	164.0473	163.0394	-4.32	[M-H] ⁻	119.0491
Ácido cumaroil málico		4.59	C13H12O7	280.0583	279.0502	-3.03	[M-H] ⁻	163.0388, 119.0491

	Ácido Felúrico*	5.33	C10H10O4	194.0579	193.0501	-2.87	[M-H] ⁻	178.9981, 134.0362
Betacianina	Betanidina β-hexosido (betanina)*	1.95	C24H26N2O13	550.1435	551.1509	0.24	[M+H] ⁺	389.0973
	Betanidina	2.45	C18H16N2O8	388.0907	389.0994	3.81	[M+H] ⁺	345.1095
Betaxantina	Prolina-betaxantina (indicaxantina)	1.98	C14H16N2O6	308.1008	309.1068	-4.24	[M+H] ⁺	
	Metionina-betaxantina (miraxantina)	2.47	C14H18N2O6S	342.0886	343.0926	-9.39	[M+H] ⁺	
Fitoesteroles	Beta-sitosterol*	12.23	C29H50O	414.3862	415.3941	1.63	[M+H] ⁺	
	Colestanol	12.51	C27H48O	388.3705	371.3645	-7.32	[M+H-H ₂ O] ⁺	
	Brasicasterol	12.66	C28H46O	398.3549	399.3603	-4.52	[M+H] ⁺	
	Schottenol	13.75	C29H50O	414.3862	397.3863	8.53	[M+H-H ₂ O] ⁺	
Tocoferoles	Beta-Tocoferol	12.64	C28H48O2	416.3654	416.3679	7.27	[M] ⁺	
	Alfa-Tocoferol*	13.69	C29H50O2	430.3811	431.3900	3.87	[M+H] ⁺	

Todos los iones moleculares se identificaron con el aducto [M-H]. *Identificación confirmada con estándares comerciales. TR (tiempo de retención)

10.2. Bioaccesibilidad y cuantificación de compuestos bioactivos del garambullo a través del tracto gastrointestinal

Los resultados de la cuantificación de los compuestos bioactivos en el garambullo sin digerir y su porcentaje de bioaccesibilidad en cada una de las fases de digestión, se muestran en la Tabla 3. Se puede observar que uno de los compuestos presentes en mayor concentración en el garambullo no digerido, fue la quercetina ramnosil-ramnosil-hexósido con un valor de 952.53 microgramo por gramo de materia seca ($\mu\text{g/g}$ de MS), lo cual es mayor a lo reportado por Montiel-Sánchez y col. (2020) donde mencionan un valor de 356 $\mu\text{g/g}$ MS en el fruto de garambullo. Esta diferencia puede ser debida a las diferencias geográficas donde fue obtenida la muestra debido a que el garambullo del estado de Guanajuato ha mostrado tener una mayor cantidad de compuestos bioactivos respecto a los que se encuentran en el estado de Hidalgo, San Luis Potosí y Querétaro (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010). En cuanto a su bioaccesibilidad, la quercetina ramnosil-ramnosil-hexósido mostró una disminución en la fase de boca con un 13 % y estómago un 10%; sin embargo, en la FD y la FND al min 15 presentó una mayor bioaccesibilidad con un 25.7% y 20.49%, respectivamente. Esto nos indica resistencia a la degradación ácida del estómago, que posteriormente puede ser liberado de la matriz alimentaria en el colon y estar disponible para ser metabolizado por la microbiota colónica, ya que su forma glucosilada juega un papel de protección durante el proceso de digestión (Antunes-Ricardo *et al.*, 2017).

El segundo compuesto presente en mayor cantidad fue la betanidina β -hexósido con 833.70 $\mu\text{g/g}$ MS, lo que es similar a lo reportado por Montiel-Sánchez y cols. (2020), quienes indican para la betanidina un valor de 848 $\mu\text{g/g}$ de MS. Este valor era esperado debido a que es el compuesto responsable de la coloración violeta-rojo presente en los frutos de cactáceas. Respecto a su porcentaje de bioaccesibilidad, la betanidina β -hexósido mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a cada una de las fases de digestión, en donde se puede observar que en boca y en estómago presentó un porcentaje bajo (8.21 y 4.16%, respectivamente), mientras que en la FND al min 15 presentó el mayor porcentaje

(74.14 %). Esto indica que la betanidina β -hexósido puede llegar hasta el colon al presentar su mayor bioaccesibilidad en la FND, mostrando a su vez ser resistente a las condiciones ácidas en la fase de estómago y presentando una mayor estabilidad en condiciones alcalinas. Dentro de las betaxantinas nuestros resultados muestran un valor mayor de indicaxantina de 121.74 $\mu\text{g/g}$ MS en comparación a lo reportado en garambullo por Montiel-Sánchez y cols. (2020), donde se obtuvo una concentración de 80 $\mu\text{g/g}$ de MS, lo que puede ser explicado por las diferencias geográficas de la muestra o al método de extracción utilizado. El porcentaje de bioaccesibilidad de la indicaxantina presentó diferencias estadísticamente significativas al ser mayor en boca respecto al estómago, en donde se observa 10.53% y un 2.64%, respectivamente. Mientras que existe un aumento en la FND a los 15 min mostrando 6.73% de bioaccesibilidad, que puede deberse a que las betaxantinas muestran una mayor estabilidad a un pH entre 4 y 7 (Herbach *et al.*, 2006), permitiendo identificarlo en condiciones alcalinas de la FND. Dentro de los ácidos fenólicos el isómero II del hexósido del ácido hidroxibenzoico mostró una concentración inicial en el garambullo no digerido de 45.91 $\mu\text{g/g}$ de MS y un aumento estadísticamente significativo en la fase de boca (262.05 $\mu\text{g/g}$ de MS), lo que nos podría indicar que el proceso de masticación puede contribuir a una mayor liberación del compuesto lo cual se ha visto en frutos como la uva reportado por Tagliazucchi y cols. (2010). Respecto a su bioaccesibilidad ésta fue significativamente aumentada en la FND al minuto 15 con un porcentaje de 1224.93%, siendo el mayor de todos los compuestos dentro de los ácidos hidroxibenzoicos. Esto es congruente con lo reportado en otras matrices alimentarias donde se ha observado que los ácidos fenólicos llegan a ser principalmente absorbidos en intestino delgado y el resto de ellos es modificado por la microbiota intestinal para ser posteriormente absorbidos en el colon (Crozier *et al.*, 2010), lo que a su vez concuerda con el aumento estadísticamente significativo del porcentaje de bioaccesibilidad observado en los ácidos hidroxicinámicos dentro de la fase de intestino tanto en la FD como en la FND.

Por otra parte, el compuesto dihexósido de genisteína con una concentración de 7.54 $\mu\text{g/g}$ MS y el dihexósido de daidzeína con una concentración de 0.62 $\mu\text{g/g}$ MS hasta el momento no habían sido reportados en garambullo ni en algún otro fruto considerados como berries (Liggins *et al.*, 2000). En cuanto a la bioaccesibilidad del dihexósido de daidzeína se puede observar que es principalmente en boca con un 20%, dado que en estómago e intestino delgado el compuesto no fue detectado, lo que puede ser debido a que se sabe que las isoflavonas son afectadas por cambios en el pH ocasionando modificaciones en su estructura química, permitiendo la formación de diferentes compuestos (Baú *et al.*, 2015). Por otro lado, el dihexósido de genisteína presentó una bioaccesibilidad en boca de 11.59% seguida de un 9.23% en estómago; respecto a la fase de intestino se encontró a los 15 y 30 min dentro de la FD con una bioaccesibilidad del 6.12 y 3.28% respectivamente; mientras que en la FND en el min15 se presentó la mayor bioaccesibilidad con un 23.27%. A pesar de que no existen reportes previos de la bioaccesibilidad de isoflavonas en berries, se sabe que una de las principales fuentes de su consumo es el frijol de soya. En un estudio de digestión *in vitro* realizado por Walsh y cols. (2003) mostró que la genisteína en forma glucosilada presentes en el frijol de soya llega a ser estable en boca, estómago e intestino delgado, debido a que la glucosa presente en la genisteína sirve como protección de la aglicona ante la degradación de la microbiota durante el tránsito en el intestino delgado, lo que puede explicar la presencia del hidróxido de genisteína en la FND.

Dentro de los compuestos no-polares presentes en garambullo no-digerido, los fitoesteroles mostraron concentraciones de 0.08 $\mu\text{g/g}$ MS de beta-sitosterol, 0.03 $\mu\text{g/g}$ MS de schottenol y 0.01 $\mu\text{g/g}$ MS de colestanol y brasicasterol; sin embargo, ninguno de estos compuestos fue detectado después de la digestión *in vitro*, esto pudo ser debido al buffer utilizado el cual fue de carácter polar por lo que su bioaccesibilidad se vio comprometida al ser compuestos lipofílicos. Por otra parte, dentro de los tocoferoles presentes en el garambullo se encontró el β - tocoferol en una concentración de 0.53 $\mu\text{g/g}$ MS y el α -tocoferol en una concentración de 0.28

$\mu\text{g/g}$ MS. Respecto a su bioaccesibilidad esta fue mayor en boca con un 218% para el β -tocoferol y un 127% en el α -tocoferol, mostrando una disminución en la fase de estómago en donde presentaron un 90% y 70% de bioaccesibilidad respectivamente, mientras que en la FD a los 15 min mostraron una bioaccesibilidad del 43% (β -tocoferol) y 27% (α -tocoferol). Ambos compuestos no fueron detectados a los 30 y 60 min de la FD, así como en los tres tiempos dentro de la FND. Esto fue similar a lo reportado por Sun y cols. (2019) en frutos cítricos al observar una disminución de ambos compuestos a causa del atrapamiento de los compuestos por la formación de micelas entre la matriz alimentaria y las sales biliares. De tal manera que la pérdida de los tocoferoles y fitoesteroles durante el proceso de digestión puede deberse a sus características hidrofóbicas, la exposición a enzimas digestivas y los cambios en el pH a lo largo del proceso digestivo (Hossain *et al.*,2018).

Tabla 3. Cuantificación de compuestos bioactivos liberados de garambullo, boca, estómago, FD y FND del proceso digestivo (15,30 y 60 min) por UPLC-ESI-QTOF-MS.

Familia	Nombre del compuesto	Garambullo	Boca	Estómago
Flavanona	Eriocitrina*	1.34 ^a (100) ± 0.10	0.16 ^b (11.86) ± 0.00	0.12 ^{bc} (8.90) ± 0.00
Isoflavona	Dihexósido de genisteína	7.54 ^a (100) ± 0.48	0.87 ^c (11.59) ± 0.06	0.70 ^c (9.23) ± 0.03
	Dihexósido de daidzeína	0.62 ^a (100) ± 0.01	0.12 ^b (20.04) ± 0.01	ND
	Dihexoósido de kaempferol	4.10 ^a (100) ± 0.30	0.18 ^b (4.42) ± 0.01	0.17 ^b (4.03) ± 0.01
Flavonoide	Rutinosido de miricetina	3.68 ^a (100) ± 0.06	0.49 ^b (13.33) ± 0.01	0.30 ^c (8.25) ± 0.00
	Quercetina ramnosil-ramnosil-hexósido	952.53 ^a (100) ± 43.95	125.68 ^{cd} (13.19) ± 33.79	97.81 ^d (10.27) ± 0.49
	Kaempferol -ramnosil-ramnosil-hexósido	74.25 ^a (100) ± 2.32	9.16 ^b (12.33) ± 0.41	6.71 ^{bc} (9.04) ± 0.24
	Rutinósido de quercetina (rutina)*	82.58 ^a (100) ± 2.44	10.55 ^{bc} (12.78) ± 0.56	7.30 ^{cd} (8.84) ± 0.45
	Quercetina ramnosil-hexósido	77.58 ^a (100) ± 2.11	7.59 ^b (9.79) ± 0.53	5.94 ^{bc} (7.65) ± 0.30
	Kaempferol hexósido-ramnosil-hexósido	47.51 ^a (100) ± 0.02	7.22 ^b (15.20) ± 0.33	7.44 ^b (15.65) ± 0.32
	Miricetina ramnosido	18.89 ^a (100) ± 0.35	1.40 ^c (7.43) ± 0.02	1.00 ^{cd} (5.28) ± 0.00
	Quercetin ramnosido	6.53 ^a (100) ± 0.16	0.32 ^b (4.88) ± 0.01	0.21 ^b (3.27) ± 0.02
	Rutinósido de Kaempferol	12.25 ^a (100) ± 1.30	1.40 ^{bcd} (11.42) ± 0.03	0.99 ^{bcd} (8.09) ± 0.02
	Kaempferol hexosido-ramnosido	6.67 ^a (100) ± 0.10	0.51 ^c (7.59) ± 0.01	0.42 ^c (6.24) ± 0.04
	(Iso)-ramnetina hexosido	12.87 ^a (100) ± 1.12	1.26 ^b (9.79) ± 0.47	0.82 ^b (6.39) ± 0.14
	Quercetina*	5.39 ^a (100) ± 0.25	ND	ND
	Kaempferol*	3.27 ^a (100) ± 0.09	0.15 ^b (4.68) ± 0.00	ND
	(Iso)-ramnetina	9.27 ^a (100) ± 0.90	0.59 ^b (6.37) ± 0.02	0.15 ^b (1.59) ± 0.00
Ácido Hidroxibenzoico	Ácido dihidroxibenzoico	3.28 ^d (100) ± 0.223	24.15 ^c (735.87) ± 0.89	18.14 ^c (552.61) ± 0.40
	Isomero I del ácido hidroxybenzoico hexosido	15.77 ^d (100) ± 0.32	118.70 ^b (752.77) ± 2.95	47.53 ^c (301.33) ± 3.38

	Ácido vanílico	4.35 ^b (100) ± 0.04	21.82 ^a (502.07) ± 0.23	ND
	Isomero II del ácido hidroxybenzoico hexosido	45.91 ^e (100) ± 1.42	262.05 ^c (570.75) ± 18.15	252.52 ^c (549.83) ± 10.57
	Isomero I del ácido hidroxibenzoico*	15.12 ^d (100) ± 0.19	62.65 ^b (414.45) ± 2.37	35.31 ^c (233.51) ± 9.32
	Isomero II del ácido hidroxibenzoico	4.63 ^b (100) ± 0.11	16.37 ^a (353.90) ± 1.53	ND
Ácido Hidroxicinámico	Hexósido del ácido cafeico	27.07 ^a (100) ± 1.13	5.89 ^b (21.74) ± 0.17	3.55 ^c (13.11) ± 0.21
	Ácido cafeoilquínico (ácido clorogénico) *	4.79 ^a (100) ± 0.39	0.47 ^{cd} (9.85) ± 0.06	0.50 ^{cd} (10.38) ± 0.05
	Hexósido de ácido Cumarico	7.79 ^a (100) ± 0.30	0.80 ^b (10.30) ± 0.01	0.72 ^b (9.21) ± 0.02
	Hexósido de ácido Felurico	45.20 ^a (100) ± 2.86	5.92 ^{bc} (13.09) ± 1.23	3.98 ^{bcd} (8.80) ± 0.34
	Hexósido de ácido sinápico	24.02 ^a (100) ± 1.73	2.38 ^b (9.90) ± 0.24	1.90 ^{bc} (7.89) ± 0.11
	Ácido cumaroilquínico	3.72 ^a (100) ± 0.15	0.47 ^c (12.75) ± 0.01	0.26 ^d (7.00) ± 0.02
	Ácido sinápico*	2.00 ^a (100) ± 0.08	0.20 ^c (10.07) ± 0.00	0.18 ^c (9.24) ± 0.00
	Ácido feruloilquínico	1.64 ^a (100) ± 0.13	0.17 ^c (10.55) ± 0.01	0.17 ^c (10.52) ± 0.00
	Ácido cumarico*	6.79 ^a (100) ± 0.02	0.85 ^d (12.47) ± 0.03	0.55 ^e (8.12) ± 0.01
	Ácido cumaroil málico	1.73 ^a (100) ± 0.09	0.18 ^c (10.49) ± 0.00	0.12 ^{cd} (7.12) ± 0.00
Ácido Felurico*	4.18 ^a (100) ± 0.17	0.48 ^d (11.37) ± 0.01	0.27 ^d (6.38) ± 0.02	
Betacianina	Betanidina β-hexosido (betanina)*	833.70 ^a (100) ± 26.40	68.45 ^c (8.21) ± 0.52	34.68 ^{cd} (4.16) ± 0.05
	Betanidina	3.01 ^a (100) ± 0.20	0.26 ^b (8.51) ± 0.02	ND
Betaxantina	Prolina-betaxantina (indicaxantina)	121.74 ^a (100) ± 2.78	12.82 ^b (10.53) ± 0.41	3.21 ^d (2.64) ± 0.07
	Metionina-betaxantina (miraxantina)	11.91 ^a (100) ± 0.34	0.93 ^b (7.84) ± 0.01	ND
Fitoesteroles	Beta-sitosterol*	0.08 ^a (100) ± 0.00	ND	ND
	Colestanol	0.01 ^a (100) ± 0.00	ND	ND
	Brasicasterol	0.03 ^a (100) ± 0.00	ND	ND
	Schottenol	0.01 ^a (100) ± 0.00	ND	ND

Tocoferoles	Beta-Tocoferol	0.53 ^b (100) ± 0.00	1.16 ^a (218.46) ± 0.12	0.48 ^b (90.29) ± 0.00
	Alfa-Tocoferol*	0.28 ^b (100) ± 0.02	0.35 ^a (127.67) ± 0.02	0.20 ^c (70.79) ± 0.00

Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar de dos repeticiones. Los resultados se expresan como $\mu\text{g/g}$. Los números entre paréntesis expresan bioaccesibilidad (%) ND: no detectado. *Identificación confirmada con estándares comerciales.

Tabla 3. Continuación.

Familia	Nombre del compuesto	DI 15 min FD	DI 30 min FD	DI 60 min FD
Flavanona	Eriocitrina*	ND	ND	ND
Isoflavona	Dihexósido de Genisteína	0.46 ^{cd} (6.12) ± 0.03	0.25 ^{cd} (3.28) ± 0.02	ND
	Dihexósido de Daidzeína	ND	ND	ND
Flavonoide	Dihexósido de Kaempferol	ND	ND	ND
	Rutinosido de Miricetina	ND	ND	ND
	Quercetina ramnosil-ramnosil-hexósido	244.85 ^b (25.70) ± 5.97	ND	0.28 ^e (0.03) ± 0.00
	Kaempferol -ramnosil-ramnosil-hexósido	1.30 ^{def} (1.76) ± 0.02	0.39 ^{ef} (0.53) ± 0.04	0.33 ^f (0.44) ± 0.01
	Rutinosido de Quercetina (rutina)*	1.39 ^{efg} (1.68) ± 0.05	1.03 ^{fg} (1.25) ± 0.02	0.36 ^g (0.43) ± 0.02
	Quercetina ramnosil-hexósido	1.37 ^{bc} (1.76) ± 0.02	0.29 ^c (0.37) ± 0.01	0.26 ^c (0.33) ± 0.01
	Kaempferol hexósido-ramnosil-hexósido	1.72 ^d (3.62) ± 0.02	1.29 ^d (2.72) ± 0.04	0.86 ^d (1.81) ± 0.02
	Miricetina ramnosido	0.24 ^e (1.29) ± 0.01	0.46 ^e (2.44) ± 0.00	0.41 ^e (2.15) ± 0.02
	Quercetin ramnosido	ND	ND	ND
	Rutinosido de Kaempferol	0.31 ^d (2.53) ± 0.02	1.35 ^{bcd} (10.99) ± 0.01	2.42 ^b (19.79) ± 0.02
	Kaempferol hexosido-ramnosido	ND	ND	ND
	(Iso)-ramnetina hexosido	1.41 ^b (10.95) ± 0.07	0.98 ^b (7.64) ± 0.07	0.73 ^b (5.65) ± 0.02
	Quercetina*	ND	ND	ND
	Kaempferol*	ND	ND	ND

	(Iso)-ramnetina	ND	ND	ND
Ácido Hidroxibenzoico	Ácido dihidroxibenzoico	ND	ND	ND
	Isomero I del ácido hidroxybenzoico hexosido	ND	ND	ND
	Ácido vanílico	ND	ND	ND
	Isomero II del ácido hidroxybenzoico hexosido	220.42 ^c (480.08) ± 2.11	185.20 ^{cd} (403.38) ± 0.21	110.96 ^{de} (241.67) ± 4.91
	Isomero I del ácido hidroxibenzoico*	ND	ND	ND
	Isomero II del ácido hidroxibenzoico	ND	ND	ND
	Ácido Hidroxicinámico	Hexósido del ácido cafeico	1.51 ^{de} (5.58) ± 0.07	1.12 ^e (4.14) ± 0.08
Ácido cafeoilquínico (ácido clorogénico) *		ND	ND	ND
Hexósido de ácido Cumarico		ND	ND	ND
Hexósido de ácido Felurico		7.82 ^b (17.30) ± 0.65	1.57 ^d (3.48) ± 0.02	1.33 ^d (2.95) ± 0.02
Hexósido de ácido sinápico		ND	ND	ND
Ácido cumaroilquínico		ND	ND	ND
Ácido sinápico*		ND	ND	ND
Ácido feruloilquínico		ND	ND	ND
Ácido cumarico*		1.69 ^b (24.95) ± 0.04	0.87 ^d (12.89) ± 0.04	0.59 ^e (8.66) ± 0.03
Ácido cumaroil málico		ND	ND	ND
Ácido Felurico*	ND	ND	ND	
Betacianina	Betanidina β-hexosido (betanina)*	5.69 ^d (0.68) ± 0.26	3.66 ^d (0.44) ± 0.06	1.77 ^d (0.21) ± 0.03
	Betanidina	ND	ND	ND
Betaxantina	Prolina-betaxantina (indicaxantina)	ND	ND	ND
	Metionina-betaxantina (miraxantina)	ND	ND	ND
Fitoesteroles	Beta-sitosterol*	ND	ND	ND
	Colestanol	ND	ND	ND
	Brasicasterol	ND	ND	ND

	Schottenol	ND	ND	ND
Tocoferoles	Beta-Tocoferol	0.23 ^c (43.87) ± 0.00	ND	ND
	Alfa-Tocoferol*	0.08 ^d (27.48) ± 0.01	ND	ND

Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar de dos repeticiones. Los resultados se expresan como $\mu\text{g/g}$. Los números entre paréntesis expresan bioaccesibilidad (%) ND: no detectado. *Identificación confirmada con estándares comerciales.

Tabla 3. Continuación.

Familia	Nombre del compuesto	DI 15 min FND	DI 30 min FND	DI 60 min FND
Flavanona	Eriocitrina*	0.22 ^b (16.22) ± 0.01	0.17 ^b (12.87) ± 0.01	0.19 ^b (14.05) ± 0.00
Isoflavona	Dihexósido de Genisteína	1.75 ^b (23.27) ± 0.12	0.63 ^{cd} (8.39) ± 0.04	ND
	Dihexósido de Daidzeína	ND	ND	ND
Flavonoide	Dihexoósido de Kaempferol	ND	ND	ND
	Rutinosido de Miricetina	0.48 ^b (13.03) ± 0.02	ND	ND
	Quercetina ramnosil-ramnosil-hexósido	195.21 ^{bc} (20.49) ± 5.66	72.14 ^{de} (7.57) ± 7.78	52.71 ^{de} (5.53) ± 5.65
	Kaempferol -ramnosil-ramnosil-hexósido	4.89 ^c (6.58) ± 0.27	3.56 ^{cde} (4.79) ± 0.35	3.69 ^{cd} (4.97) ± 0.22
	Rutinosido de Quercetina (rutina)*	12.64 ^b (15.31) ± 0.71	4.75 ^{de} (5.75) ± 0.47	4.04 ^{def} (4.89) ± 0.31
	Quercetina ramnosil-hexósido	7.57 ^b (9.76) ± 4.46	3.49 ^{bc} (4.50) ± 0.40	3.30 ^{bc} (4.25) ± 0.54
	Kaempferol hexósido-ramnosil-hexósido	5.43 ^c (11.44) ± 0.53	4.88 ^c (10.28) ± 0.31	4.28 ^c (9.00) ± 0.47
	Miricetina ramnosido	1.93 ^b (10.20) ± 0.05	0.97 ^{cd} (5.11) ± 0.02	0.63 ^{de} (3.35) ± 0.03
	Quercetín ramnosido	0.38 ^b (5.88) ± 0.01	ND	ND
	Rutinósido de Kaempferol	2.09 ^{bc} (17.04) ± 0.05	0.78 ^{bcd} (6.39) ± 0.02	0.65 ^{cd} (5.28) ± 0.04
	Kaempferol hexosido-ramnosido	0.92 ^b (13.83) ± 0.00	ND	ND
	(Iso)-ramnetina hexosido	1.63 ^b (12.68) ± 0.10	0.78 ^b (6.06) ± 0.02	0.63 ^b (4.90) ± 0.01
	Quercetina*	ND	ND	ND

	Kaempferol* (Iso)-ramnetina	ND ND		ND ND		ND ND
Ácido Hidroxibenzoico	Ácido dihidroxibenzoico	65.18 ^a (1986.30) ± 1.48		58.56 ^a (1784.63) ± 8.37		44.28 ^b (1349.32) ± 4.13
	Isomero I del ácido hidroxybenzoico hexosido	230.93 ^a (1464.54) ± 5.48		ND		ND
	Ácido vanílico	ND		ND		ND
	Isomero II del ácido hidroxybenzoico hexosido	562.40 ^a (1224.93) ± 70.71		502.86 ^a (1095.26) ± 14.42		382.54 ^b (833.19) ± 9.39
	Isomero I del ácido hidroxibenzoico*	169.51 ^a (1121.28) ± 0.72		ND		ND
	Isomero II del ácido hidroxibenzoico	ND		ND		ND
	Ácido Hidroxicinamico	Hexósido del ácido cafeico	6.24 ^b (23.05) ± 0.24		2.75 ^{cd} (10.14) ± 0.02	
Ácido cafeoilquínico (ácido clorogénico) *		1.77 ^b (37.03) ± 0.10		0.48 ^c (10.05) ± 0.02		0.36 ^c (7.57) ± 0.04
Hexósido de ácido Cumarico		0.59 ^{bc} (7.62) ± 0.01		0.30 ^{cd} (3.80) ± 0.01		0.23 ^{cd} (2.93) ± 0.01
Hexósido de ácido Felurico		4.93 ^{bcd} (10.91) ± 0.31		2.63 ^{cd} (5.81) ± 0.01		1.95 ^{cd} (4.32) ± 0.03
Hexósido de ácido sinápico		2.46 ^b (10.25) ± 0.03		ND		ND
Ácido cumaroilquínico		0.84 ^b (22.57) ± 0.04		0.42 ^{cd} (11.23) ± 0.03		0.37 ^{cd} (9.85) ± 0.01
Ácido sinápico*		0.39 ^b (19.31) ± 0.01		ND		ND
Ácido feruloilquínico		0.40 ^b (24.05) ± 0.01		ND		ND
Ácido cumarico*		1.48 ^c (21.78) ± 0.03		0.54 ^e (7.95) ± 0.09		0.50 ^e (7.34) ± 0.08
Ácido cumaroil málico		0.47 ^b (26.98) ± 0.03		0.40 ^b (23.03) ± 0.03		ND
Ácido Felurico*		1.21 ^b (28.80) ± 0.02		0.79 ^c (18.93) ± 0.04		ND
Betacianina	Betanidina β-hexosido (betanina)*	618.08 ^b (74.14) ± 0.60		34.09 ^{cd} (4.09) ± 0.58		22.04 ^d (2.64) ± 0.93
	Betanidina	ND		ND		ND
Betaxantina	Prolina-betaxantina (indicaxantina)	8.19 ^c (6.73) ± 0.80		2.37 ^d (1.95) ± 0.05		1.35 ^d (1.11) ± 0.06
	Metionina-betaxantina (miraxantina)	ND		ND		ND
Fitoesteroles	Beta-sitosterol*	ND		ND		ND
	Colestanol	ND		ND		ND
	Brasicasterol	ND		ND		ND

	Schottenol	ND	ND	ND
Tocóferoles	Beta-Tocoferol	ND	ND	ND
	Alfa-Tocoferol*	ND	ND	ND

Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar de dos repeticiones. Los resultados se expresan como $\mu\text{g/g}$. Los números entre paréntesis expresan bioaccesibilidad (%) ND: no detectado. *Identificación confirmada con estándares comerciales.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

10.3 Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) y radio de eflujo (ER) durante la digestión *in vitro* del garambullo

Los valores de Papp de algunas de las familias de polifenoles presentes en el garambullo digerido mostrados en la Tabla 4, permiten llevar a cabo una relación entre la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos presentes en cada una de las familias y su posible absorción a través del saco intestinal invertido siendo utilizada como una medida *ex vivo* (Luzardo- Ocampo *et al.*, 2017), en donde el lado apical (AP) representa la superficie mucosa y el lado basolateral (BL) corresponde al flujo sanguíneo (Volpe, 2010). Se consideran como una permeabilidad baja los valores de Papp $<5 \times 10^{-6}$ cm/s y a una permeabilidad alta a los valores de Papp $>14 \times 10^{-6}$ cm/s (Volpe *et al.*, 2007).

Tabla 4. Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) y radio de eflujo (ER) de algunas familias de polifenoles en intestino delgado, durante la digestión gastrointestinal *in vitro* del garambullo.

Familia	Tiempo	Papp AP-BL ($\times 10^{-3}$)	Papp BL-AP($\times 10^{-3}$)	ER (AP-BL/BL-AP)
Isoflavona	15	2.92 \pm 0.17 ^a	11.21 \pm 0.78 ^b	3.80 \pm 0.042 ^a
	30	0.79 \pm 0.06 ^b	2.02 \pm 0.13 ^b	2.57 \pm 0.36 ^b
	60	ND	111.60 \pm 6.4 ^a	ND
Flavanona	15	ND	8.10 \pm 0.24 ^a	ND
	30	ND	3.21 \pm 0.094 ^b	ND
	60	ND	1.75 \pm 0.033 ^c	ND
Flavonoide	15	4.96 \pm 5.47 ^a	8.00 \pm 0.038 ^a	4.13 \pm 4.59 ^b
	30	0.10 \pm 0.002 ^a	1.57 \pm 0.15 ^c	15.73 \pm 1.15 ^b
	60	0.05 \pm 0.0001 ^a	3.67 \pm 0.11 ^b	75.63 \pm 2.12 ^a
Ácido hidroxibenzoico	15	2.77 \pm 0.027 ^a	12.90 \pm 0.96 ^a	4.66 \pm 0.30 ^a
	30	1.16 \pm 0.001 ^b	3.53 \pm 0.12 ^b	3.03 \pm 0.10 ^b
	60	0.35 \pm 0.015 ^c	0.02 \pm 0.0002 ^c	0.05 \pm 0.00 ^c
Ácido hidroxicinámico	15	4.00 \pm 0.2 ^a	7.50 \pm 0.1 ^a	1.89 \pm 0.16 ^b
	30	0.65 \pm 0.02 ^b	1.50 \pm 0.01 ^c	2.33 \pm 0.05 ^b
	60	0.25 \pm 0.002 ^b	2.00 \pm 0.08 ^b	7.94 \pm 0.42 ^a
Betacianina	15	0.72 \pm 0.03 ^a	43.55 \pm 50 ^a	61.39 \pm
	30	0.23 \pm 0.004 ^b	2.18 \pm 0.03 ^a	71.90 ^a
	60	0.06 \pm 0.0006 ^c	0.04 \pm 0.002 ^a	9.32 \pm 0.00 ^a 0.76 \pm 0.04 ^a

Betaxantina	15	ND	11.3 ± 1.00^a	ND
	30	ND	1.60 ± 0.03^b	ND
	60	ND	ND	ND

Los datos se muestran como la media de dos repeticiones. Papp AP-BL: transporte de compuestos bioactivos del lado apical al basolateral. Papp BL-AP: transporte de compuestos bioactivos del lado basolateral al apical. Los resultados son expresados en cm/s. Diferentes letras muestran una diferencia significativa (ANOVA, prueba *post hoc* de Tukey $p < 0.05$) entre cada uno de los tiempos de digestión. ND (no detectado)

Los resultados muestran una alta permeabilidad en las familias de polifenoles presentes en garambullo. Artursson y cols. (2001), mencionan que una alta permeabilidad en un modelo *in vitro* de células Caco-2 representa una similitud con los modelos *in vivo*, por lo que la alta permeabilidad presente en las familias de polifenoles del garambullo puede indicar que el modelo utilizado en este trabajo es similar a un modelo *in vivo*, lo que concuerda con lo reportado por Luzardo-Ocampo y cols. (2017) y Campos-Vega y cols. (2015). Dentro de la familia de las isoflavonas se presentó la mayor permeabilidad a los 60 min en un sentido BL-AP con un valor de 111.6×10^{-3} , similar a lo reportado en el modelo de permeabilidad con células Caco-2 en donde se observó que las isoflavonas presentaron el mayor Papp (Fang *et al.*, 2017). En el caso de las flavononas solamente se encontraron con valores de Papp en sentido BL-AP siendo mayor a los 15 min (8.099×10^{-3}) y habiendo una disminución a largo de los tiempos de incubación. Respecto a los flavonoides se pudo observar una disminución en la Papp AP-BL conforme a los tiempos de incubación; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. Mientras que en sentido BL-AP la mayor Papp se observa a los 15 min (8×10^{-3}) seguida de una disminución a los 30 min (1.57×10^{-3}), y un aumento a los 60 min (3.67×10^{-3}). En el caso de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos tanto para la Papp en sentido AP-BL y BL-AP, la mayor permeabilidad se presentó a los 15 min seguida de una disminución conforme a los tiempos de incubación, lo que coincide con lo reportado por Agudelo y cols. (2018) en berry andina, en la que los ácidos fenólicos presentaron los valores más altos de Papp a los 15 min, seguido de una disminución

al final de los tiempos de incubación. Las betacianinas mostraron una disminución de la Papp AP-BL acorde al tiempo de incubación, mientras que en la Papp BL-AP no se observaron diferencias significativas. Las betaxantinas solamente presentaron Papp en sentido BL-AP, siendo mayor a los 15 min (11.3×10^{-3}) la cual nuevamente fue disminuyendo a lo largo del tiempo. Las diferencias en la Papp observadas en cada una de las familias pueden deberse a las características estructurales de los compuestos fenólicos, lo cual se ha visto que puede intervenir en el grado de absorción por parte de las células intestinales (Hithamani *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados muestran una tendencia a la disminución de Papp conforme el aumento del tiempo de incubación lo cual se ha reportado en frutos como la berry andina (Agudelo *et al.*, 2018) y maracuyá (Aguillón-Osma *et al.*, 2019) mediante el uso del mismo modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*.

El radio de eflujo (ER) predice el tipo de transporte por el cual se pueden absorber los compuestos ya sea pasivo o activo. Valores de ER < 0.5 ó > 2 indican un mecanismo de absorción por transporte activo, de lo contrario el mecanismo de absorción será por difusión pasiva (Hubatsch *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos muestran que el transporte activo es el principal mecanismo por el cual los compuestos bioactivos del garambullo pueden ser absorbidos, excepto en la familia de los ácidos hidroxicinámico al min 15 y las betacianinas al min 60, en donde el posible mecanismo de absorción es por transporte pasivo. Dentro del mecanismo activo observado en los compuestos bioactivos presentes en el garambullo pueden estar asociados transportadores de eflujo como las Pglicoproteínas (P-gp) o las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MDRP), las cuales se encargan de transportar compuestos fenólicos en dirección basal a apical (Campos-Vega *et al.*, 2015; Domínguez-Avila *et al.*, 2016). Lo anterior podría explicar a su vez que el mayor transporte observado en este trabajo fue en sentido BL-AP. Así mismo el transporte activo por parte de compuestos como el ácido gálico, cafeico y clorogénico se ha reportado previamente en la berry andina por Agudelo y cols. (2018).

10.4 Fermentación colónica

Durante la fermentación colónica *in vitro* se evaluaron los cambios en el pH a lo largo de los tiempos de fermentación, los resultados se muestran en la Tabla 5. En la muestra correspondiente a la fracción no-digerible fermentada de garambullo (FNDFG) se observaron diferencias estadísticamente significativas al haber una disminución en el pH a las 6 h (6.9) respecto a las 24 h (7.3) donde el pH aumentó, sucediendo lo mismo en la muestra control en donde a las 6 h el pH fue de 5.75 seguido de un aumento a las 24 h a un pH de 6.83. Esto coincide con lo reportado por Agudelo y cols. (2018) en la fracción fermentada no-digerible del jugo de bayas andinas, así como lo reportado por Cheng y cols. (2020) en el orujo de arándano en donde ambos autores mencionan una disminución a las 6h de fermentación y un aumento en el pH a las 24 h. Se ha reportado que a pH menores a 5.7 existe una disminución en la producción de ácido acético y propiónico debido a una disminución en el crecimiento de *Bacteroidetes* las cuales son las principales productoras de ambos metabolitos, ocasionando a su vez un aumento de Firmicutes permitiendo una mayor producción de ácido butírico (Louis y Flint, 2016), lo que coincide con las concentraciones de AGCC descritas en la Tabla 6. Así mismo, estos resultados nos indican que las muestras fecales utilizadas en el modelo de fermentación colónica *in vitro* son una fuente de microbiota de origen natural (Agudelo *et al.*,2018).

Tabla 5. Valores del pH durante los tiempos de fermentación colónica *in vitro* de la fracción no-digerible fermentada de garambullo (FNDFG).

MUESTRA	0H	6H	12H	24H
FNDFG	7.20 ± 0.02 ^{aAB}	6.90 ± 0.01 ^{aC}	7.02 ± 0.06 ^{aBC}	7.30 ± 0.09 ^{aA}
CONTROL	7.20 ± 0.01 ^{aA}	5.75 ± 0.04 ^{bC}	6.27 ± 0.17 ^{bB}	6.83 ± 0.09 ^{bA}
BLANCO	7.26 ± 0.12 ^{aAB}	7.01 ± 0.04 ^{aB}	7.13 ± 0.04 ^{aAB}	7.44 ± 0.00 ^{aA}

Los datos se muestran como la media ± desviación estándar de dos repeticiones. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre filas y las letras minúsculas entre columnas (ANOVA, prueba *post hoc* de Tukey $p < 0.05$). Control (rafinosa).

10.4.1 Identificación y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de los AGCC generados del proceso de fermentación del garambullo. Se puede observar que para el ácido acético no se encontró alguna diferencia significativa entre los tiempos de fermentación tanto para FNDFG como para el grupo control. El ácido propiónico no mostró diferencias significativas en la FNDFG dentro de los tiempos de fermentación mientras que en el grupo control se mostró una mayor presencia de este compuesto a las 6 h (13.19 mmol/L). La poca diferencia en cuanto a la concentración de los AGCC durante tiempos de fermentación tempranos (6-9 h) ha sido previamente reportado (Harries *et al.*, 2020). En cuanto al ácido butírico, se observó una concentración estadísticamente significativa a las 24 h de fermentación tanto para la FNDFG (11.37 mmol/L) como en el grupo control (12.68 mmol/L) respecto a los tiempos 6 y 12 h. El aumento en el ácido butírico es similar a lo reportado por Jakobsdottir y cols. (2013) en ratas alimentadas con frambuesa y grosella negra, lo

que se relacionó con una mayor presencia de fibra soluble que contienen glucosa ocasionando una mayor solubilidad de la glucosa polimérica y por lo tanto un aumento en los niveles de ácido butírico. Así mismo Liu y cols. (2021) reportaron una mayor concentración de ácido butírico en muestras fecales de ratas alimentadas con baya de aronia lo cual asociaron a las características de la matriz alimentaria de la baya, debido a que ocasionó un cambio en el catabolismo microbiano de succinato y piruvato a ácido butírico. De tal manera que el aumento en el ácido butírico a las 24 h observado en la FNDFG puede indicar no solo posibles modificaciones en el catabolismo microbiano, sino que también cambios en la diversidad microbiana debido a que en frutos como la pitaya se ha reportado que a las 24 h de fermentación existe un aumento en el número de bifidobacterias y lactobacillus (Dasaesamoh *et al.*, 2016).

Tabla 6. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC, mmol/L) durante los tiempos de fermentación colónica *in vitro* de la fracción no-digerible fermentada de garambullo (FNDFG).

MUESTRA	Á. ACÉTICO	Á. PROPIÓNICO	Á. BUTÍRICO
FNDFG			
0H	ND	ND	ND
6H	3.51 ± 3.12 ^{aA}	4.53 ± 2.69 ^{bA}	4.08 ± 3.45 ^{bA}
12H	ND	ND	4.12 ± 0.55 ^b
24H	2.73 ± 0.15 ^{aB}	4.87 ± 1.11 ^{bB}	11.37 ± 0.64 ^{aA}
CONTROL			
0H	ND	ND	ND
6H	3.29 ± 0.31 ^{aC}	13.19 ± 0.35 ^{aA}	7.24 ± 0.27 ^{abB}
12H	2.02 ± 1.31 ^{aA}	4.47 ± 1.05 ^{bA}	6.30 ± 0.61 ^{abA}
24H	1.30 ± 0.08 ^{aB}	6.12 ± 2.05 ^{bAB}	12.68 ± 2.23 ^{aA}

Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar de dos repeticiones. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre filas y las letras minúsculas entre columnas (ANOVA, prueba *post hoc* de Tukey $p < 0.05$). Control (rafinosa). Se utilizó 100 mg de sólido y 100 μ L de líquido de FNDFG para el proceso de fermentación. ND (no detectado).

Los resultados obtenidos de la fermentación colónica *in vitro* indican que los polisacáridos no digeribles presentes en el garambullo permitieron la generación de AGCC los cuales se conoce contribuyen a la salud del colon debido a que permiten la homeostasis de mucosa intestinal en el desarrollo del sistema inmune, así como en el metabolismo, diferenciación y crecimiento de las células epiteliales y en la modulación de la microbiota colónica (O'Keefe, 2016).

10.5 Capacidad antioxidante

Debido a que en el cuerpo humano existen diferentes mecanismos asociados al estrés oxidativo es necesario el uso de más de un método para evaluar la capacidad antioxidante (CA) *in vitro*, siendo ABTS, DPPH, FRAP y ORAC los métodos más utilizados (Pérez-Jiménez *et al.*, 2007). DPPH, ABTS y ORAC permiten evaluar la capacidad de transferencia de electrones y átomos de hidrógeno y eliminación de radicales libres, mientras que FRAP mide la capacidad de reducción de metales, disminuyendo la producción de radicales hidroxilos vía reacciones de Fenton (Baenas *et al.*, 2020). En la siguiente Tabla (Tabla 7), se muestran los resultados de CA mediante los métodos utilizados tanto del garambullo no-digerido como de cada una de las fases de digestión gastrointestinal.

Tabla 7. Capacidad antioxidante de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* del garambullo mediante cuatro métodos (ABTS, DPPH, ORAC y FRAP).

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE				
FASE	ABTS	DPPH	ORAC	FRAP
GARAMBULLO SIN DIGERIR	23562.03±654.72 ^a	29826.10±282.73 ^a	1227.78 ±73.89 ^a	1284.83±29.17 ^a
BOCA	872.91 ± 85.40 ^b	883.63 ± 148.05 ^{bc}	385.24 ± 25.29 ^{cd}	631.21±162.85 ^b
ESTÓMAGO	836.22 ± 50.57 ^b	942.05 ± 55.72 ^b	288.98 ± 31.34 ^d	494.92 ± 93.43 ^c
INTESTINO DELGADO				
FD 15 MIN	402.76 ± 20.01 ^c	455.97 ± 3.97 ^d	165.97 ±75.27 ^e	90.94 ± 9.53 ^d
FD 30 MIN	408.96± 17.76 ^c	447.48 ± 22.07 ^d	452.82 ±124.99 ^c	120.92 ± 19.78 ^d
FD 60 MIN	399.41 ± 8.53 ^c	480.53 ± 22.26 ^d	173.13 ± 8.83 ^e	123.23 ± 21.57 ^d
FND 15 MIN	426.90 ± 15.88 ^c	505.14 ± 9.31 ^d	654.89 ± 97.17 ^b	204.87 ± 25.73 ^d
FND 30 MIN	427.75 ± 40.05 ^c	507.70 ± 31.65 ^d	89.17 ± 19.62 ^e	183.95 ± 79.26 ^d
FND 60 MIN	429.97 ± 27.05 ^c	478.75 ± 39.33 ^d	121.92 ± 40.22 ^e	189.44 ± 36.09 ^d
FERMENTACIÓN COLÓNICA				
0H	836.16 ± 56.40 ^b	709.39 ± 20.90 ^c	156.38 ± 39.73 ^e	108.36 ± 8.32 ^d
6H	861.55 ± 41.73 ^b	716.10 ± 27.01 ^c	111.17 ± 7.51 ^e	108.40 ± 26.11 ^d
12H	829.17 ± 73.26 ^b	738.13 ± 29.02 ^c	105.32 ± 29.36 ^e	109.07 ± 12.11 ^d
24H	803.45 ± 35.88 ^b	754.72 ± 24.39 ^c	87.52 ± 8.49 ^e	114.151 ± 24.5 ^d

Los datos se muestran como la media ± desviación estándar de dos repeticiones. Los resultados son expresados en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca ($\mu\text{mol ET/g MS}$). Diferentes letras muestran una diferencia significativa (ANOVA, prueba *post hoc* de Tukey $p < 0.05$) entre el garambullo sin digerir y cada una de las fases y tiempos tanto de digestión como de fermentación colónica.

Podemos observar que el garambullo sin digerir presenta la mayor CA respecto a la fracción digerida tanto en ABTS (23562.03 $\mu\text{mol ET/g MS}$), DPPH (29826.10 $\mu\text{mol ET/g MS}$), ORAC (1227.78 $\mu\text{mol ET/g MS}$) y FRAP (1284 $\mu\text{mol ET/g MS}$). Esto puede ser debido a que el garambullo no-digerido presenta una mayor cantidad de compuestos bioactivos, mismos que aún no sufren modificaciones químicas en comparación a la fracción digerida. Además, el método de extracción utilizado acetona-agua permite una mayor liberación de compuestos fenólicos, causando una modificación en la CA de los extractos de berries (Kahkonen *et al.*, 2002). El método de extracción puede explicar las diferencias en la CA observada en el extracto de garambullo en comparación a lo reportado anteriormente por Montiel-Sánchez y cols. (2020) en un extracto metanólico de garambullo, en donde para DPPH se obtuvo un valor de 764 $\mu\text{mol ET/g MS}$ y para ORAC de 16000 $\mu\text{mol ET/g MS}$. Dichas diferencias también pueden estar asociadas a la localidad en la que fue obtenido el fruto, según lo reportado por Guzmán-Maldonado y cols. (2010), quienes obtuvieron diferencias en la cantidad de compuestos bioactivos presentes así como en su CA entre el garambullo de Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro y Guanajuato. En comparación a otros berries la CA presente en garambullo fue mayor. Baenas y cols. (2020) reportan para *Andean blueberry* 278 $\mu\text{mol ET/g MS}$ por ABTS, 85.1 $\mu\text{mol ET/g MS}$ por DPPH y 402.2 $\mu\text{mol ET/g MS}$ por ORAC. En cuanto a la técnica de FRAP, Pertuzatti y cols. (2014) mencionan valores de CA de un blueberry brasileño en un rango de 128-312 $\mu\text{mol ET/g MS}$, mientras que para ORAC obtuvieron valores de 600-1028 $\mu\text{mol ET/g MS}$.

Respecto a la CA observada en la digestión gastrointestinal del garambullo en los ensayos con ABTS, DPPH y FRAP se puede observar que es mayor en boca con valores entre 631.21- 872.91 $\mu\text{mol ET/g MS}$ y en estómago de 494.92-942.05 $\mu\text{mol ET/g MS}$ respecto la fase intestinal, en donde se presenta una disminución en la CA con valores entre 90.94-507.70 $\mu\text{mol ET/g MS}$. No se encontraron diferencias significativas entre la FD y la FND, así como entre los tiempos de incubación de cada fracción. La disminución observada en la fase intestinal coincide con lo

observado en frutos de características similares como la ciruela, arándano, mora, fresa, frambuesa (Chen *et al.*, 2014; Marhuenda *et al.*, 2016), sugiriendo que el pH alcalino afecta la bioaccesibilidad de algunos compuestos bioactivos al modificar su estructura, lo que permite la formación de complejos con constituyentes de la matriz alimentaria (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020). La mayor CA en la fase de boca respecto a intestino delgado puede deberse al proceso mecánico de masticación el cual contribuye a una mayor liberación de compuestos fenólicos presentes en matrices sólidas (Pinelo *et al.*, 2006; Tagliazucchi *et al.*, 2010). La presencia de una mayor CA en la fase de estómago en comparación a la fase intestinal puede deberse a las condiciones del pH ácido presente en dicha fase el cual se sabe puede contribuir a una mayor liberación de polifenoles. Esto coincide con lo reportado por Tagliazucchi y cols. (2010), quienes observaron que en la fase gástrica hubo una mayor liberación de polifenoles presentes en la piel de la uva roja, y al realizar una digestión *in vitro* con enzimas digestivas y sin la presencia de ellas determinaron que la bioaccesibilidad de los polifenoles fue similar, concluyendo que la liberación de los polifenoles es consecuencia del entorno químico. La CA medida por ORAC mostró que la FND a los 15 min tiene la mayor CA, lo cual puede ser debido a que la captación de radicales por parte de los polifenoles es dependiente del pH, en donde a un pH alto favorece el aumento de la misma, posiblemente por la desprotonación de los grupos hidroxilo que se encuentran en los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos (Tyrakowska *et al.*, 1999; Campos-Vega *et al.*, 2015). Tal es el caso de las betalainas las cuales son más estables en condiciones alcalinas, lo que les permite aumentar su capacidad de captación de radicales libres al ser mejores donantes de hidrógenos y electrones (Gliszczynska-Świgło *et al.*, 2005). En cuanto a los tiempos de fermentación no se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los tiempos en los cuatro métodos de capacidad antioxidante. La CA medida por ABTS y DPPH en la fermentación colónica fue mayor respecto a la CA observada en la fase intestinal lo cual puede ser debido a que la captación de radicales por parte de los polifenoles es dependiente del pH, en donde a un pH alto produce un aumento en la CA. Además de que los compuestos

bioactivos sometidos al proceso de fermentación colónica son metabolizados por la microbiota colónica lo que ocasiona una liberación de los compuestos bioactivos que se encuentran unidos a la fibra dietaria mediante una hidrólisis de los enlaces β -glucosídicos o modificaciones en los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos, favoreciendo su bioaccesibilidad (Barros *et al.*, 2020) y permitiendo a su vez la generación de metabolitos secundarios que incluso pueden presentar una mayor CA en comparación a los compuestos originales (Manach *et al.*, 2015). En cuanto a la CA mediante ORAC y FRAP no se encontraron diferencias significativas en la fase de fermentación respecto a la fase intestinal lo que nos puede indicar que los compuestos bioactivos que presentan actividad antioxidante mediante el método de ABTS y DPPH no son los mismos que acceden a los métodos de CA medida por ORAC y FRAP (Barros *et al.*, 2020). Sin embargo, los valores de CA de la fermentación del fruto de garambullo evaluada mediante los cuatro métodos son mayores a los encontrados en un fruto de características similares como la fresa (14 -100 $\mu\text{mol ET/g}$) durante un proceso de fermentación *in vitro* (Barros *et al.*, 2020), y a su vez son valores similares a los reportados por Campos-Vega y cols. (2015) (857-938 $\mu\text{mol ET/g}$ en DPPH y 302-390 $\mu\text{mol ET/g}$ en ABTS) en el café tostado mediante la misma metodología.

Con el propósito de determinar una relación entre la CA en cada fase de la digestión respecto a algunas de las familias de polifenoles presentes en el garambullo, se llevó a cabo un análisis de correlación (Tabla 8).

Tabla 8. Coeficiente de correlación entre familias de polifenoles respecto a la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP y ORAC) en cada fase de la digestión gastrointestinal *in vitro* del garambullo.

Capacidad antioxidante Fase/Familia	ABTS					DPPH					FRAP					ORAC				
	FL	AHBZ	AHCM	BTC	BTX	FL	AHBZ	AHCM	BTC	BTX	FL	AHBZ	AHCM	BTC	BTX	FL	AHBZ	AHCM	BTC	BTX
Garambullo sin digerir	0.512	0.542	-0.853	0.1803	0.1871	-0.333	0.042	0.471	0.305	0.299	-0.576	0.430	0.476	-0.634	-0.638	0.643	0.554	0.828	-0.279	-0.2865
Boca	-0.262	0.342	0.070	-0.523	-0.525	0.150	0.260	-0.114	-0.292	-0.307	-0.365	0.391	0.106	-0.622	-0.621	0.636	-0.484	-0.469	0.634	0.614
Estómago	-0.362	0.860	-0.154			-0.347	0.533	0.236			0.283	-0.701	-0.114			-0.537	0.0117	0.217		
FD 15 min	-0.434		-0.423			-0.267		0.475			0.430		-0.264			-0.160		0.211		
FD 30 min	-0.338		-0.551			0.369		0.416			0.473		-0.423			0.092		0.009		
FD 60 min	-0.845		-0.244			0.677		0.275			0.510		-0.043			0.618		0.934		
FND 15 min	0.891	-0.005	-0.087			-0.22	-0.708	0.524			0.343	0.303	-0.037			-0.312	-0.448	0.939		
FND 30 min	0.2058	-0.247	-0.179			-0.468	0.765	0.118			-0.456	0.609	-0.019			-0.027	-0.684	-0.021		
FND 60 min	-0.303	-0.107	0.017			-0.597	0.893	-0.157			0.151	-0.462	-0.324			-0.843	0.692	-0.165		

El coeficiente de correlación entre la capacidad antioxidante y las familias de polifenoles fueron calculadas mediante el análisis de correlación de Pearson. Flavonoide (FL), Acido hidroxibenzoico, (AHBZ), Ácido hidroxicinámico (AHCM), Betaciaina (BTC), Betaxantina (BTX). Los valores resaltados en **negritas** representan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los resultados muestran respecto al garambullo no digerido una correlación significativa ($r=0.828$) entre la familia de los ácidos hidroxicinámicos y el ensayo de ORAC. En estómago la CA por ABTS se correlacionó positivamente con la presencia de ácidos hidroxibenzoicos ($r= 0.860$). En cuanto a la FD al min 15 y 30 no se encontraron diferencias significativas, mientras que al min 60 se puede observar que existe una correlación significativa ($r= 0.934$) entre la CA por ORAC y la presencia de ácidos hidroxicinámicos. Dentro de la FND a los 15 min se encontró una correlación significativa ($r= 0.891$) entre los flavonoides y la CA por ABTS, mientras que en la CA medida con ORAC muestra una correlación significativa ($r= 0.939$) respecto a la familia de los ácidos hidroxicinámicos. Respecto a los 60 min de la FND se encontró una correlación significativa entre la CA por DPPH respecto a la familia de ácidos hidroxibenzoicos ($r= 0.893$), mientras que la CA por ORAC se observa una correlación respecto a la familia de flavonoides ($r=0.843$). En cuanto a la CA medida por FRAP no se encontraron diferencias significativas en ninguna fase de la digestión. Por otra parte, las correlaciones negativas observadas pueden indicar que la CA por parte de los diferentes compuestos que conforman cada familia de polifenoles puede estar asociada a un método específico de inhibición de radicales (Aguillón-Osma *et al.*, 2019).

11. CONCLUSIONES

Se identificaron 9 familias de compuestos bioactivos presentes en el extracto de garambullo que incluyen flavanona, isoflavonas, flavonoides, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinánicos, betacianinas, betaxantinas, fitoesteroles y tocoferoles. Los compuestos que se presentaron en mayor concentración en el extracto de garambullo fueron la quercetina ramnosil-ramnosil-hexósido y la betanidina β -hexósido, mientras que compuestos como la eriocitrina, dihexósido de genisteína y dihexósido de daidzeína fueron identificados por primera vez en garambullo. En cuanto a la bioaccesibilidad, la quercetina ramnosil-ramnosil-hexósido, betanidina β -hexósido, el isómero II del hexósido del ácido hidroxibenzoico y el dihexósido de genisteína presentaron una mayor bioaccesibilidad en la fase intestinal principalmente en la FND, mientras que en los compuestos restantes su bioaccesibilidad se presentó en un orden mayoritario en boca, seguido de una disminución en estómago y finalmente en intestino. Las diferencias en la bioaccesibilidad por parte de los compuestos bioactivos del garambullo fueron explicadas mediante los cambios en el pH que se presentan en cada fase debido a que ocasiona una modulación en la liberación de los compuestos de su matriz alimentaria del garambullo. Dentro de la fase intestinal se determinó que las familias de polifenoles del garambullo presentan una alta permeabilidad, la cual disminuye conforme el aumento del tiempo de incubación, siendo el transporte activo el principal mecanismo por el cual los compuestos bioactivos del garambullo pueden ser absorbidos.

La capacidad antioxidante evaluada mediante ABTS, DPPH, ORAC y FRAP fue mayor en el garambullo no-digerido, seguido de la fase de boca, estómago, colon y finalmente intestino delgado donde se presentó la menor CA. El aumento en la CA en la fermentación colónica indica que los compuestos bioactivos presentes en el garambullo pueden ser metabolizados por la microbiota permitiendo la formación de metabolitos secundarios que contribuyen al aumento de la capacidad antioxidante en el colon, por lo que sería recomendable llevar a cabo un estudio metabolómico

del extracto de fermentación colónica del garambullo. Las diferencias en las correlaciones entre cada uno de los ensayos respecto a las fases de digestión indican que los compuestos bioactivos del garambullo están relacionados con un método específico de inhibición de radicales libres a lo largo del tracto gastrointestinal.

Respecto a la fermentación colónica *in vitro* del garambullo se identificó la presencia de ácido acético, propiónico y butírico a las 6, 12 y 24 h de fermentación. El ácido butírico fue el compuesto que se presentó en una mayor concentración a las 12 h de fermentación, seguido del ácido propiónico y el ácido acético. Esto concuerda con los valores de pH observados durante los tiempos de fermentación en donde a las 6h se presentó una disminución en el pH, lo cual está asociado a un aumento en la producción de ácido acético y propiónico; mientras que a las 24h se observó un aumento en los valores de pH, lo que indica menor producción de ácido acético y mayor de ácido butírico.

Por lo tanto, el modelo de digestión *in vitro* y fermentación colónica utilizado en este trabajo permitió la liberación progresiva de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante presentes en el garambullo, así como la producción de ácido acético, propiónico y butírico el cual presentó la mayor concentración. Debido a que los modelos *in vitro* son una herramienta que simula lo que puede ocurrir en el organismo humano, podemos inferir que el consumo del fruto de garambullo puede contribuir a la salud intestinal y del colon, sin embargo, son necesarios estudios *in vivo*.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agudelo, C.D., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., y Maldonado, M. 2018. Bioaccessibility during *in vitro* digestion and antiproliferative effect of bioactive compounds from Andean berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1-39. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01604>.

Aguillón-Osma, J., Luzardo-Ocampo, I., Cuellar-Nuñez, M.L., Maldonado-Celis, M.E., Loango-Chamorro, N., y Campos-Vega, R. 2019. Impact of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves and juice extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 1-11. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12879>.

Antunes-Ricardo, M., Rodriguez-Rodriguez, C., Gutiérrez-Urbe, J.A., Cepeda-Cañedo, E., Serna-Saldívar, O. 2017. Bioaccessibility, Intestinal Permeability and Plasma Stability of Isorhamnetin Glycosides from *Opuntia ficus-indica* (L.), *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-15, <https://doi.org/10.3390/ijms18081816>.

Artursson, P, Palm, K. y Luthman, K. 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transpor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 27-43, [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00128-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00128-9)

Aura, A.M. 2008. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, 7, 407-429, <https://doi:10.1007/s11101-008-9095-3>.

Baenas, N., Ruales, J., Moreno, D.A., Barrio, D.A., Stinco, C.M., Martinez-Cifuentes, G., Meléndez-Martínez, A. y García-Ruiz, A. 2020. Characterization of Andean Blueberry in Bioactive Compounds, Evaluation of Biological Properties, and *In Vitro* Bioaccessibility. *Foods*, 9, 1-16, <https://doi.org/10.3390/foods9101483>.

Barros, R.G.C., Pereira, U.C., Andrade, J.K.S., Santos de Olivera, C., Vasconcelos, S.V. y Narain, N. 2020. *In vitro* gastrointestinal digestion and probiotics fermentation impact on bioaccessibility of phenolics compounds and antioxidant capacity of some native and exotic fruit residues with potential antidiabetic effects. *Food Research International*, 136, 1-14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109614>.

Baú, T. R., y Ida, E. I. 2015. Soymilk processing with higher isoflavone aglycone content. *Food Chemistry*, 183, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03026>.

Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-Lopez, O. y 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. <http://dx.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., y Oomah, B. D. 2015. Simulated gastro-intestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 2-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>.

Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., y Frigola, A. 2014. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 155–171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>.

Castro-Enríquez, D., Montañó-Leyva, B., Toro-Sánchez, C.L., Josué-Onofre, J.E., Carvajal-Millan, E., López- Ahumada, G.A., Barreras-Urbina, C.G., Tapia-Hernández, J.A. y Rodríguez.Félix, F.R. 2020. Effect of Ultrafiltration of Pitaya Extract (*Stenocereus thurberi*) on Its Phytochemical Content, Antioxidant Capacity,

and UPLC-DAD-MS Profile. *Molecules*, 25 (281), 2-13.
<https://doi.org/10.3390/molecules25020281>.

Chen G.L., Chen, S.G., Zhao, Y.Y., Lou, C.X., Li, J. y G., Y.Q. 2014. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. *Industrial Crops and Products*, 57, 150-157,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.018>

Cheng, Y., Wu, T., Chu, X., Tang, S., Cao, W., Liang, F., Fang, Y., Pan, S. y Xu, X. 2020. Fermented blueberry pomace with antioxidant properties improves fecal microbiota community structure and short chain fatty acids production in an *in vitro* mode. *Food Science and Technology*, 125, 1-9,
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109260>

Correa-Betanzo, J., Jacob, J.K., Pérez-Pérez, C. & Paliyath, G. 2011. Effect of a sodium caseinate edible coating on cactus berry fruit (*Myrtillocactus geometrizans*) phytochemicals. *Food Research International*, 44. 1897–1904.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.053>.

Crozier, A., Del Rio, D. y Clifford, M.N. 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 446-467,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>.

Da Costa, P.A., Ballus, C.A., Teixeira-Filho, J. y Godoy, H. T. 2010. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International*, 43, 1603-1606, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.025>.

Dasaesamoh, R., Youravong, W. y Wichienhot, S. 2016. Digestibility, fecal fermentation and anti-cancer of dragon fruit oligosaccharides. *International Food Research Journal*, 23 :6, 2581-2587.

Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. y Bartolomé, B. 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Food Chemistry*, 52:1, 48-54, <http://dx.doi.org/10.1021/jf0305231>

De Souza, E. L., de Albuquerque, T. M. R., dos Santos, A. S., Massa, N. M. L., & de Brito Alves, J. L. (2018). Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–15. doi:10.1080/10408398.2018.1425285

Dima, C., Assadpour E., Dima, S. y Jafari, S.M. 2020. Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. *Compreh ensive reviews in food science and food safety*, 1-22, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12623>

Domínguez-Avila, J. A., Wall-Medrano, A., Velderrain-Rodríguez, G. R., Chen, C.-Y. O., Salazar-López, N. J., Robles-Sánchez, M., & González- Aguilar, G. A. 2017. Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food & Function*, 8(1), 15–38. <https://doi.org/10.1039/C6FO01475E>.

Faassen, F., Vogel, G., Spanings, H. y Vormans, H. 2003. Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 263, 113-122, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00372-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00372-7)

Fang, Y., Cao, W., Xia, M., Pan, S., y Xu, X. 2017. Study of Structure and Permeability Relationship of Flavonoids in Caco-2 Cells. *Nutrients*, 9, 1301, <https://doi.org/10.3390/nu9121301>.

García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., Guajardo-Flores, D., Welti-Chanes, J. y Cano, P.M. 2019. Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.

Mill) tissues: A comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76, 1-13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2018.11.002>.

Gliszczynska-Świgło, A., Szymusiak, H. y Malinowska, P. 2005. Betanin, the main pigment of red beet - molecular origin of its exceptionally high free radical scavenging activity. *Food Additives and Contaminants*, 1-24, <http://dx.doi.org/10.1080/02652030600986032>

González-Nava, C. 2010. Physicochemical characterization of Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). MSc Thesis, Autonomous University of Querétaro, México. (in Spanish). ri.uaq.mx

Guzmán-Maldonado, S., Herrera-Hernández, G., Hernández-López, D., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Tovar, A., Vaillant, F., & Brat, P. 2010. Physicochemical, nutritional, and functional characteristics of two underutilised fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. *Food Chemistry*, 121(2): 381-386, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.039>.

Harries, H. C., Morrison, D.J. y Edwards, C. A. 2020. Impact of the source of fermentable carbohydrate on SCFA production by human gut microbiota *in vitro* - a systematic scoping review and secondary analysis. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-13, <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1809991>.

Herbach, K. M., Stintzing, F.C. y Carle, R. 2006. Betalain Stability and Degradation—Structural and Chromatic Aspects. *Journal of food science*, 71:4, 41-49, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x>

Hernández-López, D., Vaillant, F., Reynoso-Camacho, R. and Guzman-Maldonado, S. 2008. *Myrtillocactus* (cactaceae): botanical, agronomic, physicochemical and chemical characteristics of fruits. *Fruits*, 63(5):269-276. <https://doi.org/10.1051/fruits:2008042>.

Herrera-Hernández, M., Guevara-Lara, F., Reynoso-Camacho, R. and Guzmán Maldonado, S. 2011. Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 129(4):1744,1750, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.042>.

Hithamani, G., Kizhakayil, D. y Srinivasan, K. 2017. Uptake of phenolic compounds from plant foods in human intestinal Caco-2 cells. *Journal Bioscience*, 42:4, 603-611, <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9705-6>.

Hossain, A y Jayadeep, A. 2018. Determination of tocopherol and tocotrienol contents in maize by *in vitro* digestion and chemical methods. *Journal of cereal Science*, 1- 25, [https://doi: 10.1016/j.jcs.2018.08.003](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.003).

Huang, D., Ou, B. y Prior, R. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841-1856, <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.

Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., & Artursson, P. 2007. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2(9), 2111–2119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>.

Jakobsdottir, G., Blinaco, N., Xu, J. Ahrné, S., Molin, G., Sterner, O. y Nyman, M. 2013. Formation of Short-Chain Fatty Acids, Excretion of Anthocyanins, and Microbial Diversity in Rats Fed Blackcurrants, Blackberries, and Raspberries. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 1-12, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/202534>.

Jones, J.M.2014. CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the ‘fiber gap’. *Journal Nutrition*, 13-34, [https://doi: 10.1186/1475-2891-13-34](https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-34)

Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., y Heinonen, M. 2002. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49,8, <http://doi.org/10.1021/jf010152t>.

Klavins, L., y Klavins, M. 2020. Cuticular Wax Composition of Wild and Cultivated Northern Berries. *Foods*, 9,587, <https://doi.org/10.3390/foods9050587>.

Lassoued, M. A., Khemiss, F., & Sfar, S. 2011. Comparative study of two in vitro methods for assessing drug absorption: Sartorius SM 16750 apparatus versus everted gut sac. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 117–127, <http://doi.org/10.18433/j3gc7r>.

Liggins, J., Bluck, L.J.C., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W.A. y Bingham, S.A. 2000. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *Journal nutrition Biochemistry*, 11, 326-331. [http://dx.doi.org/10.1016/s0955-2863\(00\)00085-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0955-2863(00)00085-1)

Liu, X., Martin, D.A., Valdez, J.C., Sudakaran, S., Rey, F. y Bolling, B.W. 2021. Aronia berry polyphenols have matrix-dependent effects on the gut microbiota. *Food Chemistry*, 359, 1-10, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129831>

Louis, P. y Flint C. 2016. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 19:1, 29-41. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13589>

Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Preciado-Ortíz, R., Mendoza, S., y 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*, 2-38, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.018>.

Macfarlane, G. and Macfarlane, S. 2012. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Journal of AOAC International*, 95(1):50-60, https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE_Macfarlane

Manach, M.M., Nagy, P. y Szollosi, J. 2015. Chemoprevention of Breast Cancer by Dietary Polyphenols. *Molecules*, 20(12): 22578-22620, <https://doi.org/10.3390/molecules201219864>

Marhuenda, J., Alemán, M.D., Gironés-Vilaplana, A., Pérez, A., Caravaca, G., Figueroa, F., Mulero, J., y Zafrilla, P. 2016. Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and *In Vitro* Availability of Four Different Berries. *Journal of Chemistry*, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5194901>.

Mocanu, C., Scalbert, A., Morad, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. 2015. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-247, <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.72>.

Mojzer, E.B., Hrnčić, M.K., Skerget, M., Knez, Z. y Bren, U. 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative, Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21, 901- 938, <https://doi:10.3390/molecules21070901>

Montiel-Sánchez, M., García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., García, H.S., y Cano, P.C. 2020. *In vitro* gastrointestinal stability, bioaccessibility and potential biological activities of betalains and phenolic compounds in cactus berry fruits (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food chemistry*, 342. 1-42, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128087>.

Nenadis, N., Lazaridou, O. y Tsimidou, M.Z. 2007. Use of Reference Compounds in Antioxidant Activity Assessment. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5452-5460, <https://doi.org/10.1021/jf070473q>

O'Keefe, Stephen J.D. 2016. Diet, Microorganisms and Their Metabolites, and Colon Cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 13(12): 691–706. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2016.165>.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, E., Serrano, J., Goñi, I. y Saura-Calixto, F. 2007. Updated methodology to determine antioxidant capacity in

plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274- 285, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>.

Pertuzatti, P.B., Barcia., M.T., Rodrigues, D., Da Cruz., P.N., Hermosin-Gutierrez, I., Smith, R. y Teixeira, H. 2014. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. *Food Chemistry*, 1-27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.114>

Pieszka, M., Migdal, W., Gadsior, R., Rudzinska, M., Bederska-Lojewska, D., Pieszka, M., y Szczurek, P. 2014. Native Oils from Apple, Blackcurrant, Raspberry, and Strawberry Seeds as a Source of Polyenoic Fatty Acids, Tocochromanols, and Phytosterols: A Health Implication. *Journal of chemistry*, 1-9, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/659541>.

Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M.J., Nicoli, M.C. 2006. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 88, 201-207, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.034>

Quirós- Saucedo, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S.G., Ayala-Zavala, J.F., Bello-Perez, L.A., Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L.A., González-Córdova, A.F. y González-Aguilar, G.A. 2014. Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and posible effect after ingestión. *Food and Function*, 5, <https://doi:10.1039/c4fo00073k>.

Ramírez-Rodríguez, Y., Martínez-Huélamo, M., Pedraza-Cheverri, J., Ramírez, V., Martínez-Tagueña, N. y Tujillo, J.2020. Ethnobotanical, nutritional and medicinal properties of Mexican drylands Cactaceae Fruits: Recent findings and research opportunities. *Food Chemistry*, 312, 126073- 126086.

Reynoso-Camacho, R., Rodríguez- Villanueva, L.D., Sotelo-González, A.M., Ramos-Gómez, M. y Pérez-Ramírez I.F. 2021. Citrus decoction by-product represents a rich source of carotenoid, phytosterol, extractable and non-extractable

polyphenols. *Food Chemistry*, 350, 1-14,
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129239>

Saura-Calixto F. 2011. Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1):43-49

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

Serra, A., Macia, A., Romero, M.P., Reguant, J., Ortega, N. y Motilva, M.J. 2012. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food and Chemistry*, 130, 383-393, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.055>.

Sun, Y., Tao, W., Huang, H., Ye, X., & Sun, P. 2018. Flavonoids, phenolic acids, carotenoids and antioxidant activity of fresh eating citrus fruits, using the coupled in vitro digestion and human intestinal HepG2 cells model. *Food Chemistry*. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2018.12.01>

Swallah, M. S., Fu, H., Sun, H., Affoh, R. y Yu, H. 2020. The Impact of Polyphenol on General Nutrient Metabolism in the Monogastric *Gastrointestinal Tract*. *Journal of Food Quality*. 20, 1-12, <https://doi.org/10.1155/2020/5952834>.

Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., y Conte, A. 2010. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599–606. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.030>.

Tyrakowska, B., Soffers, E.M.F., Szymusiak, H., Boeren, S., Boersma, M.G., Lemanska, K., Vervoort, J. y Rietjens, I. 1999. TEAC antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1427-1436, [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00192-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00192-6).

Van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H., & Bast, A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4), 511–517. doi:10.1016/s0308-8146(99)00089-8

Vilcanqui-Pérez, F. y Vílchez-Perales, C. 2017. Fibra dietaria: nuevas definiciones, propiedades funcionales y beneficios para la salud. Revisión. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 67 (2), 1-11.

Volpe, D.A. 2010. Application of Method Suitability for Drug Permeability Classification. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 12:4, 670-678, <https://doi.org/10.1016/10.1208/s12248-010-9227-8>.

Volpe, D.A., Faustino, P.J., Ciavarella, A.B., Asafu-Adjaye, E.B., Ellison, C.D., Yu, L.X. y Hussain, A.S. 2007. Classification of drug permeability with a caco-2 cell monolayer assay. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24:1, 39-47, <https://doi.org/10.1080/10601330701273669>.

Walsh, K.R., Zhang, Y.C., Vodovotz, Y., Schwartz, S.J., Failla, M.L. 2003. Stability and Bioaccessibility of Isoflavones from Soy Bread during *In Vitro* Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4603- 4609, <http://dx.doi.org/10.1021/jf0342627>

Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D. y Matwijczuk, A. 2020. Influence of *In Vitro* Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols—A Non-Systematic Review. *Nutrients*, 12: 1401, 2-29, <https://doi.org/10.3390/nu12051401>

Zamora-Gasca, V. M., Loarca-Piña, G., Vázquez-Landaverde, P. A., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, J. y Sáyago-Ayerdi, S.G. 2014. In vitro colonic fermentation of food ingredients isolated from Agave tequilana Weber var. azul applied on granola bars. *Food Science and Technology*, 60, 766-772, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.032>

Zeng, H., Lazarova, D.L. y Bordonaro, M. 2014. Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 6 (2), 41-51, <https://doi: 10.4251/wjgo.v6.i2.41>

Zhang H. y Tsao R. 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current opinion in food science*, 8, 33-42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>.

Dirección General de Bibliotecas UAO

13. ANEXO

13.1. Formato de Consentimiento informado donante de heces.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Posgrado Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

CARTA CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Proyecto de investigación: Digestión, bioaccesibilidad gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*).

Responsable del proyecto: Dra. Haydé Vergara Castañeda

Alumna: Edelmira Sánchez Recillas; teléfono: 7773402714; correo: edelmira.s.r@hotmail.com

Sede donde se realizará el estudio: Departamento de investigación y posgrado de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

1. invitación

Por medio de este documento, me gustaría invitarlo a participar como donador de muestra de heces en el proyecto de investigación titulado Digestión, bioaccesibilidad gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Antes de decidir, necesita entender por qué se está realizando esta investigación y en qué consistirá su participación. Por favor tómese el tiempo que usted necesite, para leer la siguiente información cuidadosamente y pregunte cualquier cosa que no comprenda. Si usted lo desea puede consultar con personas de su confianza (Familiar y/o Médico tratante) sobre la presente investigación.

2. Justificación del estudio

En diferentes matrices alimentarias se ha observado que los compuestos bioactivos son poco absorbidos en intestino delgado, debido a que algunos de ellos se encuentran unidos a la fibra por fibra dietaria lo que les permite alcanza el colon en donde es sometida al proceso fermentativo anaeróbico de la microbiota intestinal, originando ácidos grasos de cadena corta (AGCC) con y sin hidroxilación. Dichos productos se han visto involucrados en mecanismos fisiológicos que intervienen en la salud del huésped. Por lo que es importante

el conocer los compuestos secundarios originados del proceso fermentativo de un fruto rico en compuestos bioactivos como el garambullo.

3. Beneficios del estudio.

Este estudio permitirá conocer los metabolitos secundarios producidos a partir de la fibra dietaria que contiene el garambullo a partir de la fermentación colónica de la microbiota del ser humano.

4. Objetivos del procedimiento

Como parte de los objetivos por cumplir dentro del proyecto de investigación, se plantea realizar una fermentación colónica *in vitro* como paso final del modelo de simulación de digestión gastrointestinal. Para poder cumplir con dicho objetivo es necesario contar con bacterias fermentativas las cuales solamente las podemos encontrar de forma fisiológica en la materia fecal de los seres humanos. Por lo que surge la necesidad de donación de heces fecales por parte de voluntarios sanos.

5. Descripción general del procedimiento

La muestra fecal donada deberá ser la primera del día, de tal manera que se le solicitará acudir a las instalaciones de la facultad de química a las 7:00 am del día indicado por el investigador a cargo. una vez en las instalaciones se le permitirá usar el sanitario donde se le proporcionará un vaso estéril para muestra fecal y se le pedirá deje una muestra de aproximadamente 4 gramos. Al término el investigador tomará la muestra para su posterior uso. Si está de acuerdo en participar, le pediremos que escriba su nombre y firme el formato de Consentimiento Informado y firme al final de este.

6. Manejo de las muestras

Las muestras obtenidas no se etiquetarán con ningún dato que permita revelar la identidad del donante.

7. Riesgos

La donación de la muestra no presenta ningún riesgo para el participante.

8. ¿Dónde se llevará a cabo esta investigación?

Esta investigación se llevará a cabo en las instalaciones de la Facultad de Química dentro de la Universidad Autónoma de Querétaro, en el Laboratorio de Bioquímica Toxicológica.

9. ¿Por qué he sido invitado a participar en esta investigación?

Ha sido invitado a formar parte de esta investigación, porque cumple con las características enlistadas a continuación (criterios de inclusión):

Los participantes son incluidos si:

- No cuentan con enfermedades gastrointestinales
- Dieta vegetariana
- El haber consumido algún antibiótico al menos 3 meses antes de que se realice el estudio

9. ¿Estoy obligado a participar?

Su participación es **voluntaria, anónima y confidencial**; no tiene que participar forzosamente. No habrá impacto negativo alguno si decide no participar en la investigación.

10. Aclaraciones:

- a) Esta investigación ha sido revisada y aprobada por el Comité de Investigación y Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.
- b) Su decisión de participar en la presente Investigación es completamente voluntaria.
- c) En el transcurso de la Investigación, usted podrá solicitar información actualizada sobre la misma, al investigador responsable.
- d) La información obtenida en esta investigación, utilizada para la identificación de cada participante será mantenida con estricta confidencialidad, conforme la normatividad vigente.
- e) Se le garantiza que usted recibirá respuesta a cualquier pregunta, duda o aclaración acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios u otros asuntos relacionados con la presente investigación.

11. FIRMA DE CONSENTIMIENTO

Fecha / /20

Yo, _____, manifiesto que fui informado (a) del propósito, procedimientos y tiempo de participación y en pleno uso de mis facultades, es mi voluntad participar en esta investigación titulada Digestión, bioaccesibilidad gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)

No omito manifestar que he sido informado(a) clara, precisa y ampliamente, respecto de los procedimientos que implica esta investigación, así como de los riesgos expuestos.

He leído y comprendido la información anterior, y todas mis preguntas han sido respondidas de manera clara y a mi entera satisfacción, por parte del investigador a cargo de la Biól. Edelmira Sánchez Recillas.

NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE	NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL
TESTIGOS	
NOMBRE Y FIRMA PARENTESCO DOMICILIO	NOMBRE Y FIRMA PARENTESCO DOMICILIO

Dirección General de Bibliotecas UAQ

13.2. Formato de Consentimiento informado donante de saliva.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Posgrado Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

CARTA CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Proyecto de investigación: Digestión, bioaccesibilidad gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*).

Responsable del proyecto: Dra. Haydé Vergara Castañeda

Alumna: Edelmira Sánchez Recillas; teléfono: 7773402714; correo: edelmira.s.r@hotmail.com

Sede donde se realizará el estudio: Departamento de investigación y posgrado de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

1. Invitación

Por medio de este documento, me gustaría invitarlo a participar como donador de muestra de saliva en el proyecto de investigación titulado Digestión, bioaccesibilidad gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Antes de decidir, necesita entender por qué se está realizando esta investigación y en qué consistirá su participación. Por favor tómese el tiempo que usted necesite, para leer la siguiente información cuidadosamente y pregunte cualquier cosa que no comprenda. Si usted lo desea puede consultar con personas de su confianza (Familiar y/o Médico tratante) sobre la presente investigación.

2. Justificación del estudio

El garambullo es un fruto endémico de México consumido de forma local y muy poco estudiado, sin embargo, se sabe que es una fuente importante de compuestos bioactivos los cuales en otras matrices alimentarias se ha observado que su metabolismo conlleva una serie de transformaciones por parte de la microbiota intestinal a lo largo del tracto gastrointestinal, donde por medio de una serie de conjugaciones por enzimas bacterianas, los compuestos fenólicos son transformados en metabolitos secundarios como los ácidos grasos de cadena corta hidroxilados. Dichos productos se han visto involucrados en mecanismos fisiológicos que intervienen en la salud del huésped. Por lo que es importante el conocer los compuestos secundarios originados del

proceso de digestión y fermentación de un fruto rico en compuestos bioactivos como el garambullo.

3. Beneficios del estudio.

Este estudio permitirá conocer los metabolitos secundarios producidos a partir de la fibra dietaria y compuestos bioactivos que contiene el garambullo mediante el uso de un modelo *in vitro*.

4. Objetivos del procedimiento

Como parte de los objetivos por cumplir dentro del proyecto de investigación, se plantea realizar una digestión gastrointestinal *in vitro*. Para poder cumplir con dicho objetivo es necesario simular cada una de las fases de digestión iniciando por la fase de boca para la cual es necesario realizar el proceso de masticación y salivación. Por lo que surge la necesidad de contar con voluntarios sanos que nos permitan donar saliva y llevar a cabo el proceso de masticación del garambullo.

5. Descripción general del procedimiento

Se citará a los donantes a las 7:00 a.m. en el laboratorio de Bioquímica Toxicológica de la Facultad de Química. Se les solicitará no haber cepillado por la mañana sus dientes ni haber ingerido algún alimento. Una vez que inicie el experimento, se les pedirá que mastiquen 1g de garambullo liofilizado durante 15 veces por 15 s descargando el contenido en un vaso de precipitado con 5ml de agua destilada, enseguida se enjuagarán la boca con 5 ml de agua destilada depositando su contenido en el mismo recipiente previamente utilizado, el procedimiento será repetido 4 veces por cada sujeto.

6. Manejo de las muestras

Las muestras obtenidas no se etiquetarán con ningún dato que permita revelar la identidad del donante.

7. Riesgos

La donación de la muestra no presenta ningún riesgo para el participante.

8. ¿Dónde se llevará a cabo esta investigación?

Esta investigación se llevará a cabo en las instalaciones de la Facultad de Química dentro de la Universidad Autónoma de Querétaro en el Laboratorio de Bioquímica Toxicológica.

9. ¿Por qué he sido invitado a participar en esta investigación?

Ha sido invitado a formar parte de esta investigación, porque cumple con las características enlistadas a continuación (criterios de inclusión):

Los participantes son incluidos si:

- No cuentan con enfermedades gastrointestinales
- Dieta vegetariana
- El haber consumido algún antibiótico al menos 3 meses antes de que se realice el estudio
- No presentar caries

9. ¿Estoy obligado a participar?

Su participación es **voluntaria, anónima y confidencial**; no tiene que participar forzosamente. No habrá impacto negativo alguno si decide no participar en la investigación.

10. Aclaraciones:

- a) Esta investigación ha sido revisada y aprobada por el Comité de Investigación y Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.
- b) Su decisión de participar en la presente Investigación es completamente voluntaria.
- c) En el transcurso de la Investigación, usted podrá solicitar información actualizada sobre la misma, al investigador responsable.
- d) La información obtenida en esta investigación, utilizada para la identificación de cada participante será mantenida con estricta confidencialidad, conforme la normatividad vigente.
- e) Se le garantiza que usted recibirá respuesta a cualquier pregunta, duda o aclaración acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios u otros asuntos relacionados con la presente investigación.

11. FIRMA DE CONSENTIMIENTO

Fecha / /20

Yo, _____, manifiesto que fui informado (a) del propósito, procedimientos y tiempo de participación y en pleno uso de mis facultades, es mi voluntad participar en esta investigación titulada Digestión, bioaccesibilidad gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)

No omito manifestar que he sido informado(a) clara, precisa y ampliamente, respecto de los procedimientos que implica esta investigación, así como de los riesgos expuestos.

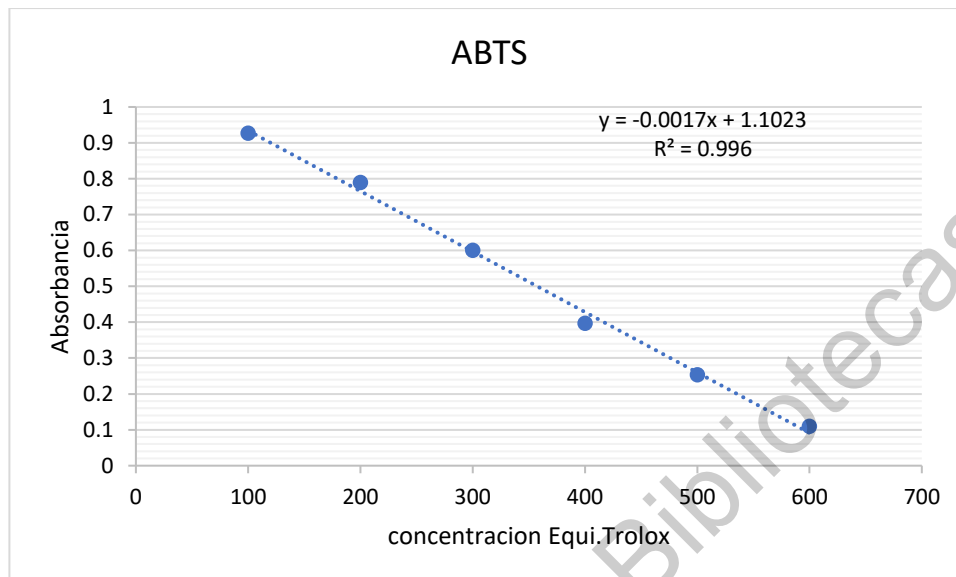
He leído y comprendido la información anterior, y todas mis preguntas han sido respondidas de manera clara y a mi entera satisfacción, por parte del investigador a cargo de la Biól. Edelmira Sánchez Recillas.

NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE	NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL
TESTIGOS	

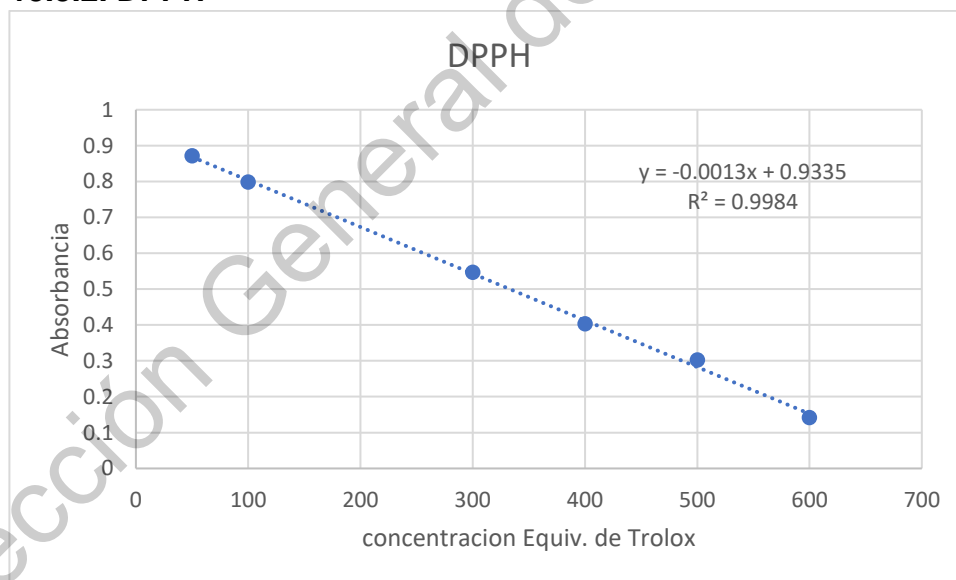
NOMBRE Y FIRMA PARENTESCO DOMICILIO	NOMBRE Y FIRMA PARENTESCO DOMICILIO
--	--

13.3. Curvas de calibración de capacidad antioxidante

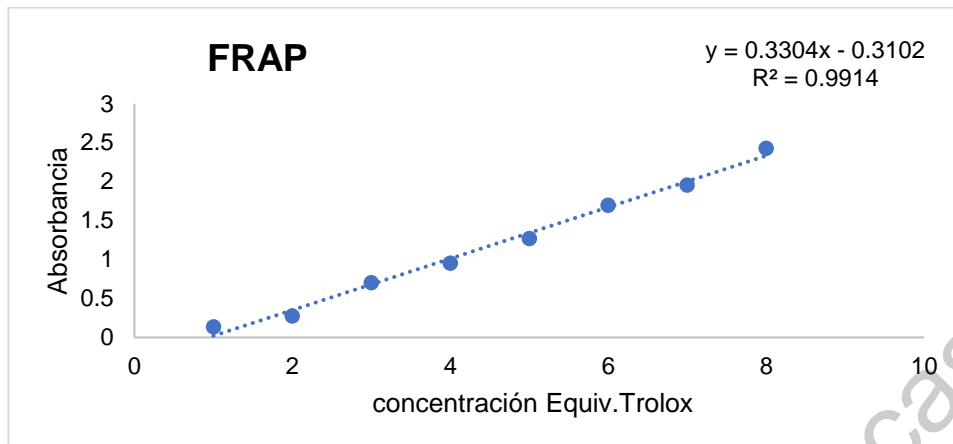
13.3.1. ABTS



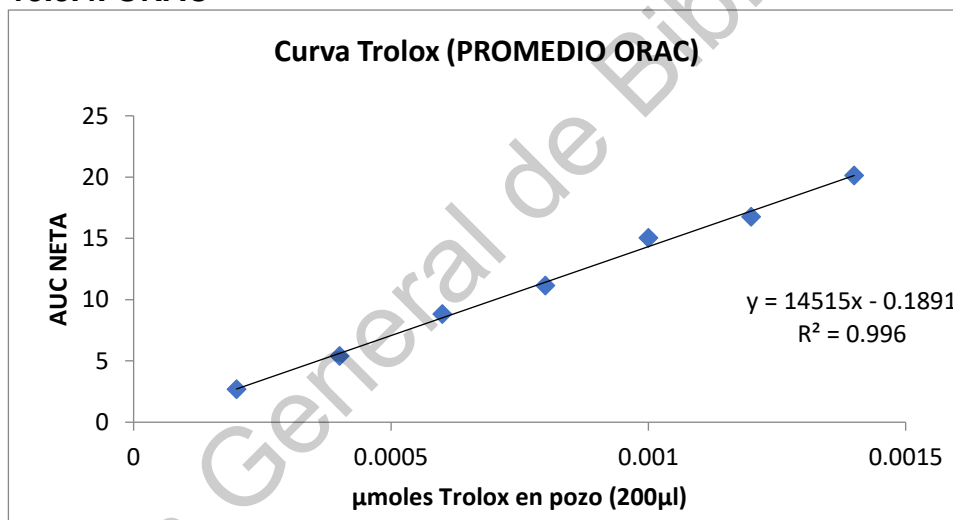
13.3.2. DPPH



13.3.3. FRAP

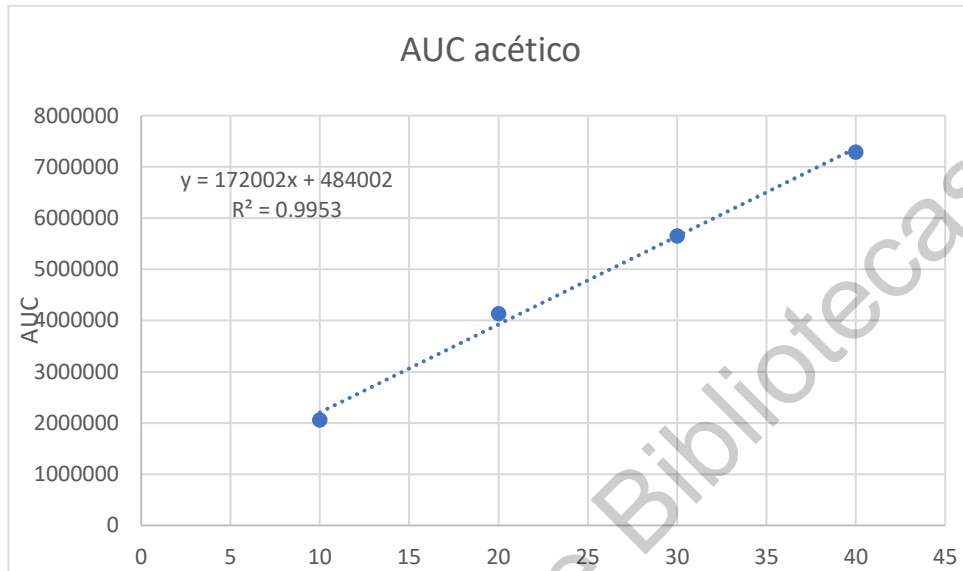


13.3.4. ORAC

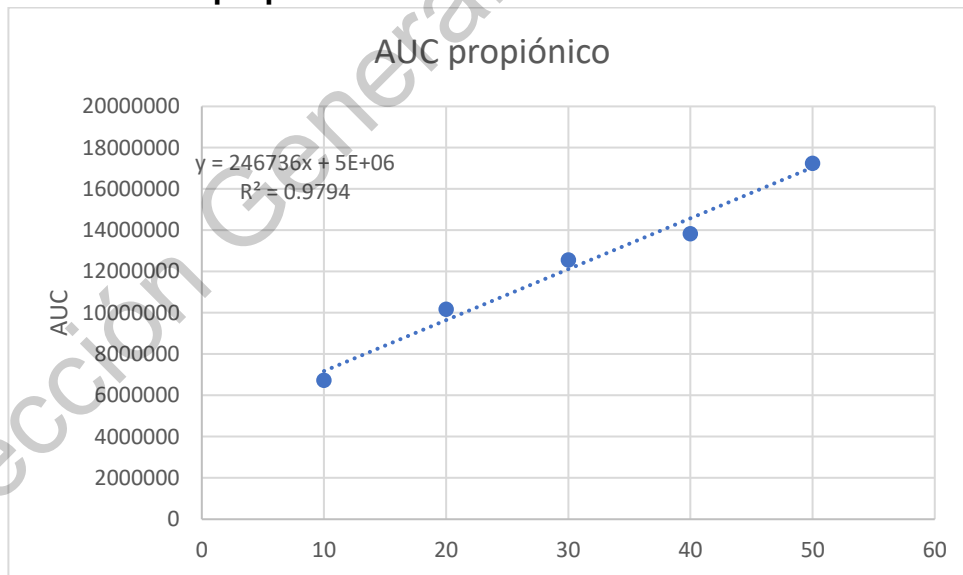


13.4. Curvas de calibración de ácidos grasos de cadena corta

13.4.1. Ácido acético



13.4.2. Ácido propiónico



13.4.3. Ácido butírico

