



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE  
ALIMENTOS**

***TESIS***

Que para obtener el grado de: Maestro en Ciencia y Tecnología  
de Alimentos

Presenta:

**L.N JONATHAN MENDOZA ZAMORANO**

**“EFECTO DEL PROCESAMIENTO Y FERMENTACIÓN DE  
LA VAINA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) SOBRE SUS  
CARACTERÍSTICAS NUTRITIVAS, NUTRACÉUTICAS Y  
FUNCIONALES”**

Director: **Dra. ROCIO CAMPOS VEGA**

Santiago de Querétaro, Qro., 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“EFECTO DEL PROCESAMIENTO Y FERMENTACIÓN DE LA VAINA DE CACAO  
(*Theobroma cacao* L.) SOBRE SUS CARACTERÍSTICAS NUTRITIVAS,  
NUTRACÉUTICAS Y FUNCIONALES”

**TESIS**

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

Presenta:

L.N Jonathan Mendoza Zamorano

Dirigido por:

Dra. Rocio Campos Vega

Dra. Rocio Campos Vega  
Presidente

Dra. Marcela Gaytán Martínez  
Secretario

Dr. Aldo Amaro Reyes  
Suplente

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Suplente

Dra. Haydé A. Vergara Castañeda  
Suplente

## **Declaración de responsabilidad de estudiante**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jonathan Mendoza Zamorano', written in a cursive style. The signature is positioned above a horizontal line.

L.N. Jonathan Mendoza Zamorano

## Resumen

La vaina de cacao (VC) es el subproducto que más se produce en la industria del chocolate y se reporta una dificultad para su eliminación, por lo que nuestro grupo de investigación ha implementado su procesamiento con el objetivo de utilizarlo en la alimentación humana. Entre los procesos aplicados, la extrusión y el secado por flujo de aire han mostrado una modificación en sus características nutricionales y nutracéuticas; sin embargo, todavía existe la posibilidad de mejorar su función biológica. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del procesamiento por extrusión y fermentación en estado sólido (tipo tempeh) de la vaina de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre su composición química, nutracéutica y funcionalidad biológica *in vitro*. La VC fue extruida y después sometida a un proceso de fermentación sólida tipo tempeh con *Rhizopus oryzae* (VF) a diferentes tiempos de fermentación, los cuales se determinaron a través del crecimiento micelial. La VF a las 48 horas (VF48h) reveló cambios físicos (pH y humedad) y cambios en la composición química incluido el aumento del 50 % de proteína, 40 % de lípidos y 79 % de cenizas respecto a la vaina sin fermentar (VSF). La VF48h mostró un mayor contenido de taninos, fenoles y un aumento de la capacidad antioxidante dada principalmente por los fenoles totales, además de un incremento de su bioaccesibilidad y permeabilidad. Mientras que en la etapa del colon los fenoles, flavonoides y taninos incrementaron su bioaccesibilidad a las primeras horas de la fermentación colónica indicando actividad metabólica de la microbiota sobre la fracción no digerible de la matriz. Se corroboró por la formación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) principalmente el ácido propiónico y butírico. Para dilucidar el efecto de la fracción no digerible (FND) de la VF en el colon se realizó un análisis metabolómico, el cual corroboró la actividad microbiana de la síntesis de AGCC y utilización de los compuestos fenólicos. En conclusión, es la primera vez que se realiza la fermentación tipo tempeh en la vaina de cacao, la cual mostró un crecimiento adecuado a las 48 horas, cambios en la composición nutricional y nutracéutica, además de una mejora de la bioaccesibilidad y permeabilidad de los compuestos fenólicos.

Palabras clave: vaina de cacao, fermentación sólida, tempeh, nutracéuticos, subproductos.

## Abstract

The cocoa pod husk (CPH) is the by-product that is most produced in the chocolate industry and difficulty in its elimination is reported, so our research group has implemented its processing intending to use for human food. Among the applied processes, extrusion and airflow drying have shown a modification in their nutritional and nutraceutical characteristics; however, there is still the possibility of improving its biological function. The objective of this work was to determine the effect of the processing by extrusion and fermentation in solid-state (tempeh type) of the cocoa pod (*Theobroma cacao* L.) on its chemical composition, nutraceutical, and biological functionality *in vitro*. The CPH was extruded and then subjected to a tempeh-type solid fermentation process with *Rhizopus oryzae* (CPHF) at different fermentation times, which were determined through mycelial growth. The CPHF at 48 hours (CPHF48h) revealed physical changes (pH and humidity) and changes in the chemical composition including an increase of 50 % of protein, 40 % of lipids, and 79 % of ash compared to the unfermented pod (CPHUF). The CPHF48h showed a higher content of tannins, phenols, and an increase in the antioxidant capacity given mainly by total phenols, in addition to an increase in its bioaccessibility and bioavailability, while in the colon stage phenols, flavonoids, and tannins increased its bioaccessibility. In the first hours of colonic fermentation indicating metabolic activity of the microbiota on the indigestible fraction of the matrix, this was corroborated by the formation of short-chain fatty acids (SCFA), mainly propionic and butyric acid. To further elucidate the effect of FND of VF in the colon, a metabolomic analysis was carried out, which corroborated the microbial activity of the synthesis of SCFA and the use of phenolic compounds. In conclusion, It is the first time that to do the tempeh fermentation in CPH which It showed change in nutritional and nutraceutical composition, also to improve the bioaccessibility and permeation of the phenolic compounds.

Key words: cocoa pod husk, solid-state fermentation, tempeh, nutraceutical, by-products.

## **Agradecimientos**

A Dios, por brindarme sabiduría, paciencia y perseverancia para poder culminar una etapa más en mi vida personal y profesional.

A mi familia por siempre brindarme su apoyo a lo largo de mis estudios y siempre motivarme a dar lo mejor de mí.

A mi asesora, Dra. Rocio Campos Vega por apoyarme en mi formación como estudiante de maestría, por su paciencia, comprensión y principalmente aportarme de sus conocimientos y ver siempre el lado positivo de las cosas.

A mi comité Dra. Marcela Gaytán Martínez, Dr. Aldo Amaro Reyes, Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, Dra. Haydé A. Vergara Castañeda por su asesoramiento y disposición para lograr el objetivo de la investigación.

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

## Índice general

Resumen .....	i
Abstract.....	ii
Índice general .....	iv
Índice de Tablas .....	vii
Índice de Figuras .....	viii
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes .....	2
II.1 Historia de cacao.....	3
II.1.1 Importancia del cacao en México .....	4
II.1.2 Procesamiento del cacao .....	5
II.1.3 Subproductos del cacao .....	7
II.2 La vaina de cacao .....	8
II.2.1 Características físicas .....	8
II.2.2 Composición química .....	8
II.2.3 Composición nutracéutica .....	10
II.2.3.1 Compuestos nutracéuticos .....	10
II.2.3.2 Fibra dietaria de la vaina de cacao.....	12
II.2.3.2.1 Pectinas.....	14
II.3 Métodos para el procesamiento de la vaina de cacao.....	15
II. 3.1 Extrusión .....	15
II.3.2 Proceso de fermentación .....	17
II.3.2.1 Beneficios del consumo de alimentos fermentados .....	20
II.3.2.2.1 Fermentación con <i>Rhizopus oryzae</i> .....	22
II.4 Modelos para evaluar la funcionalidad biológica de la fibra dietaria .....	26
II.4.1 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	26
II.4.2 Fermentación colónica <i>in vitro</i> .....	27
II.4.2.1 Ácidos grasos de cadena corta y beneficios a la salud/cáncer de colon .....	28
II.5 Cáncer de colon .....	29
III. Justificación.....	31

IV.	Objetivos .....	32
IV.1	Objetivo general .....	32
IV.2	Objetivos específicos .....	32
V.	Materiales y Métodos .....	33
V.1	Materiales.....	33
V1.1	Materia prima .....	33
V.1.1.1	Procesamiento de la vaina de cacao .....	33
V.1.1.1.1	Flujo de aire y extruido.....	33
V.1.1.1.2	Fermentación con <i>Rhizopus oryzae</i> .....	34
V.2	Métodos .....	34
V.2.1	Análisis proximal .....	34
V.2.1.1	Análisis de cenizas .....	34
V.2.1.2	Determinación de humedad .....	35
V.2.1.3	Determinación de lípidos.....	35
V.2.1.4	Determinación de proteína.....	36
V.2.1.5	Determinación de carbohidratos totales.....	37
V.2.2	Composición nutracéutica .....	37
V.2.2.1	Determinación de fibra total, fibra soluble e insoluble .....	37
V.2.2.2	Fenoles totales.....	38
V.2.2.2.1	Extracción de compuestos antioxidantes .....	38
V.2.2.2.2	Fenoles por HPLC .....	38
V.2.2.3	Flavonoides totales .....	39
V.2.2.4	Taninos condensados .....	39
V.2.3	Capacidad antioxidante.....	40
V.2.3.1	Método DPPH.....	40
V.2.3.2	Método ABTS.....	41
V.2.4	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y determinación de la bioaccesibilidad. ..	41
V.2.4.1	Fase bucal .....	41
V.2.4.2	Fase gástrica .....	42
V.2.4.3	Fase digestiva.....	42
V.2.5	Manejo de los animales para la técnica de saco intestinal invertido .....	42
V.2.5.1	Eutanasia de los animales y preparación del saco intestinal .....	42

V.2.5.1.1 Manejo de los animales después de la eutanasia.....	43
V.2.6 Fermentación colónica <i>in vitro</i> .....	43
V.2.6.1 Cuantificación de los AGCC por GC-MS .....	44
V.2.7 Análisis metabólico.....	44
V.2.8 Análisis estadístico.....	45
VI. Resultados y discusión.....	46
VI.1 Análisis morfológico .....	46
VI.2 Determinación de los tiempos de fermentación sólida tipo tempeh .....	46
VI.3 Cambios en la humedad y pH durante la fermentación tipo tempeh.....	48
VI.4 Composición química de la vaina de cacao durante el proceso de fermentación .....	49
VI.6 Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de la vaina sin fermentar y fermentada a las 48 horas .....	56
VI.7 Bioaccesibilidad de flavonoides de la vaina sin fermentar y fermentada a las 48 horas .....	60
VI.8. Bioaccesibilidad de taninos condensados de la vaina sin fermentar y fermentada a las 48 horas.....	63
VI.9 Capacidad antioxidante de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	66
VI.7 Contenido de compuestos fenólicos y teobromina determinados por HPLC de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada a diferentes tiempos.....	68
VI.7.1 Contenido, bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad <i>in vitro</i> (boca-colon) de compuestos fenólicos y teobromina de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada determinados por HPLC .....	71
VI.8 Efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la vaina de cacao fermentada sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGGC).....	75
VI.9 Análisis metabólico del efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada.....	77
Conclusiones .....	84
Referencias.....	85

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición química (%) de la vaina de cacao cruda y procesada.....	9
<b>Tabla 2.</b> Composición mineral de la vaina de cacao.....	9
<b>Tabla 3.</b> Composición nutracéutica de la vaina de cacao .....	11
<b>Tabla 4.</b> Componentes y clasificación de la fibra dietaria .....	12
<b>Tabla 5.</b> Microorganismos utilizados en la fermentación con cultivo sumergido.....	18
<b>Tabla 6.</b> Microorganismos empleados en la fermentación de sustrato sólido y ejemplos de su uso. ....	20
<b>Tabla 7.</b> Alimentos producidos por fermentación en sustrato sólido .....	21
<b>Tabla 8.</b> Beneficios a la salud de los alimentos fermentados .....	23
<b>Tabla 9.</b> Efecto de diferentes especies de hongos en la vaina de cacao. ....	25
<b>Tabla 10.</b> Rasgos morfológicos cuantitativos del fruto del cacao.....	46
<b>Tabla 11.</b> Composición química de la vaina de cacao fermentada a diferentes tiempos .....	50
<b>Tabla 12.</b> Bioaccesibilidad gastrointestinal de compuestos fenólicos de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada.....	¡Error! Marcador no definido.
<b>Tabla 13.</b> Capacidad antioxidante de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> (boca-colon). ..	68
<b>Tabla 14.</b> Contenido de compuestos fenólicos determinados por HPLC de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada a distintas horas.....	69
<b>Tabla 15.</b> Contenido y bioaccesibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> (boca-colon) de compuestos fenólicos determinados por HPLC de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada.....	72
<b>Tabla 16.</b> Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada ..	76

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Características físicas de la vaina de cacao. ....	4
<b>Figura 2.</b> Procesamiento del fruto de cacao. ....	6
<b>Figura 3.</b> Principales subproductos de la vaina de cacao. ....	7
<b>Figura 4.</b> Componentes del extrusor de alimentos. Adaptado de: Cervantes-Ramírez et al., 2020. ....	17
<b>Figura 5.</b> Metabolismo de <i>Rhizopus oryzae</i> en condiciones aerobias y anaerobias .....	23
<b>Figura 6.</b> Proceso digestivo de la fibra dietara y funcionalidad fisiológica de la fibra soluble e insoluble. ....	27
<b>Figura 7.</b> Vaina de cacao a diferentes tiempos de fermentación. ....	48
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de humedad y pH de la vaina de cacao en diferentes tiempos de fermentación. ....	49
<b>Figura 9.</b> Composición nutraceútica y capacidad antioxidante de la vaina de cacao sin fermentar (V0h) y fermentada a diferentes tiempos. ....	55
<b>Figura 10.</b> Bioaccesibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> (boca-colon) de compuestos fenólicos totales en la vaina de cacao sin fermentar y fermentada. ....	58
<b>Figura 11.</b> Bioaccesibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> (boca-colon) de compuestos flavonoides totales en la vaina de cacao sin fermentar y fermentada. ....	61
<b>Figura 12.</b> Bioaccesibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> (boca-colon) de compuestos taninos condensados en la vaina de cacao sin fermentar y fermentada. ....	64
<b>Figura 13.</b> Metabolitos secundarios asociados a la fermentación colónica de la fibra de la vaina sin fermentar y fermentada a las 48 horas. ....	80
<b>Figura 14.</b> Puntuación VIP de los metabolitos secundarios producidos durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la VSF (sin fermentar) y VF48h (fermentada c/ <i>R. oryzae</i> ). ....	81
<b>Figura 15.</b> Rutas metabólicas asociadas a los metabolitos de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la vaina sin fermentar y vaina fermentada 48h. ....	83

## I. Introducción

Actualmente en el mundo se producen grandes cantidades de residuos agroindustriales y orgánicos, etiquetados como biomasa residual o subproductos. Estos subproductos representan aproximadamente el 60 % de la biomasa vegetal y causan diferentes problemas por su eliminación, debido al volumen y naturaleza lignocelulósica. Por lo tanto, se propone el procesamiento de estos subproductos a través de diversas tecnologías. Entre los diferentes subproductos que se reportan son: el bagazo de caña de azúcar, cáscara y cascarilla de café, rastrojo de maíz, paja de arroz, paja de trigo y subproductos del cacao (Vásquez *et al.*, 2018; Rodríguez-García *et al.*, 2018).

Los subproductos procedentes del cacao se originan durante la cadena de producción, donde los granos de cacao y el mucílago se extraen del fruto y son utilizados para generar algunos productos. Finalmente, la vaina de cacao (VC) es la parte exterior del fruto y representa el 70-80 % del peso seco del fruto, por lo que se produce una gran cantidad de este residuo, y su eliminación genera problemas de salud, económicos y de producción (Campos -Vega, Nieto-Figueroa & Oomah, 2018).

Para el uso de la vaina de cacao se han propuestos diferentes tecnologías de secado como la deshidratación por microondas y secado con aire forzado, tanto para procesarla como para mejorar sus propiedades químicas y nutracéuticas (Valadez-Carmona *et al.*, 2017; Chemat *et al.*, 2017; Nieto-Figueroa *et al.*, 2020).

La combinación de tecnologías para el procesamiento de subproductos como lo es extrusión ha reportado generar mejora en la composición y funcionalidad de estos (Chen *et al.*, 2018; Nieto-Figueroa *et al.*, 2020). Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó que la extrusión combinada con el secado por aire mostró un cambio en el contenido de taninos, capacidad antioxidante de la matriz y aumento en la bioaccesibilidad de fenoles, flavonoides y taninos condensados que influyen en la capacidad antioxidante, especialmente en la etapa intestinal (Nieto-Figueroa *et al.*, 2020).

Además de las tecnologías mecánico-térmicas para el procesamiento de subproductos y la vaina de cacao, se ha reportado el uso de métodos enzimáticos y

herramientas biotecnológicas como la fermentación en estado sólido (Vásquez *et al.*, 2018).

La fermentación sólida, incluyendo el tipo tempeh, la cual es un proceso que se caracteriza por la restricción de agua durante el proceso y el crecimiento de microorganismos, en medios sólidos o semisólidos. Este tipo de fermentación se realiza usando hongos filamentosos debido a que pueden transformar residuos con alto contenido de celulosa, hemicelulosas y lignina a través de sus actividades enzimáticas extracelulares (y Postigo *et al.*, 2021).

La fermentación sólida tipo tempeh se ha reportado que se realiza utilizando *Rhizopus oryzae*, este hongo es reconocido por la EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria) como un microorganismo seguro para su aplicación en alimentos y se ha reportado su uso para el procesamiento de alimentos y subproductos (Batt & Tortorello, 2014; Cantabrana, Perise & Hernández, 2015). El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del proceso de secado con flujo de aire, seguido de extrusión y fermentación tipo tempeh sobre la composición química y nutracéutica de la VC y su funcionalidad biológica a través de un modelo de digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* con la finalidad de proponerlo como un ingrediente nutracéutico y funcional.

## **II. Antecedentes**

## II.1 Historia de cacao

El árbol *Theobroma* es perteneciente a la familia de las Malvaceas e incluye numerosas formas y variedades. La denominación *Theobroma* es un término que en griego significa “alimentos de los dioses”, esto acuñado a la importancia histórica que ha obtenido (Salas & Hernández, 2015). *Theobroma* se describe como un árbol de 12 a 20 metros de altura con un tallo de corteza oscura, ramas cafés y vellosas, las hojas son cactáceas simples y forma redonda (Dostert *et al.*, 2011). Hasta el momento existen 22 especies descritas, las cuales se clasifican en diferentes linajes genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario. El grupo Criollo perteneciente a la subespecie *Theobroma cacao* L., se distingue por sus frutos con cubierta delgada y una pigmentación rojiza; su distribución comercial es vista en Venezuela, México, Nicaragua, Guatemala y Colombia. Por otra parte, el grupo Forastero se caracteriza por su fruto color verde-amarillo, una cubierta gruesa y semillas redondas y aplanadas. Este grupo de fruto se ve presente en áreas amazónicas como en Brasil, África Occidental, América Central y el Caribe (**Figura 1**); pertenece a la subespecie *Theobroma cacao* L. *Shpaerocarpum*. Finalmente, el Trinitario es un grupo que se distingue por ser de origen híbrido de las formas del grupo Criollo y Forastero (Dostert *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Características físicas de la vaina de cacao.

Desde tiempos prehispánicos el cacao se define como un fruto de importancia cultural por los diferentes usos cotidianos y simbolismo. Diferentes culturas indígenas han nombrado al cacao de diversas maneras, como: Kakaw (maya), cacahuatl (náhuatl), si ce (mixteco), chudenchu (otomí), biziaa (zapoteco) (Salas & Hernández, 2015). Según datos históricos, la civilización olmeca fue la primera en descubrir el sabor del cacao, el cual era mezclado con agua, especias y hierbas, además de ser los primeros en cultivar dicho fruto. Con el tiempo el cacao se extendió a otras culturas, obteniendo diferentes significados y usos por los usuarios indígenas. Posteriormente, con la conquista de los españoles, el cacao pudo extenderse a Europa, obteniendo así cierta transformación y adaptación de acuerdo con la región (Salas & Hernández, 2015).

### **II.1.1 Importancia del cacao en México**

De acuerdo con SAGARPA en 2017, el consumo *per cápita* de cacao en México fue aproximadamente de 0.5 kg, esto es debido a que no es parte de nuestra alimentación diaria y su uso es dirigido a la industria chocolatera (SAGARPA, 2017).

En 2007 México ocupaba el séptimo lugar como productor mundial del cacao, generando aproximadamente 40 mil toneladas al año. Para el 2012, el país ocupaba el doceavo lugar, con menos del 2 % de la producción mundial, aportando cerca de las 27 mil toneladas, esto es debido al déficit de tecnificación para la materia prima, y el mínimo apoyo a los agricultores (SAGARPA, 2017; Ocampo *et al.*, 2012).

De acuerdo con las características climatológicas del sur del país (bosques húmedos tropicales con clima cálido y una altitud de 500 metros sobre el nivel del mar) los principales productores nacionales de cacao son Tabasco (66 %) y Chiapas (33 %), el resto se produce en Oaxaca, Guerrero y Veracruz (SAGARPA, 2017).

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

El procesamiento del fruto de cacao consta en primera instancia de la recolección del fruto sin estropearlos; posteriormente se lleva a cabo la fermentación, que es el proceso donde el aroma y sabor se desarrollan. Este proceso consiste en almacenar el fruto en cajones y cubiertos con hojas de banano. Bioquímicamente los azúcares del mucílago se fermentan y se produce ácido acético, que se evapora; las semillas se hinchan y obtienen un color café y forma de almendra, además se reduce el amargor y la astringencia (Liendo, 2015). A continuación, se realiza el secado (< 65 °C/7 días), cuyo objetivo es reducir su humedad; esto se logra con el calor solar o calor artificial (cámaras de secado). Ambos procesos son de suma importancia, ya que si se excede o es insuficiente puede afectar al sabor del cacao. Para continuar con el proceso, es necesario realizar una limpieza del grano que consiste en retirar cuerpos extraños y granos defectuosos (Liendo, 2015; Oliveras-Sevilla, 2007).

Las siguientes etapas son primordiales para maximizar todas las cualidades organolépticas del cacao. Durante el descascarillado la cubierta del exterior de la semilla es eliminada; posteriormente se realiza el tostado (130 °C/15-20 min) que consiste en disminuir aún más la humedad (7 % p/p de humedad interna). Esta última es una etapa en donde se potencializan sus cualidades aromáticas y sabor (Lu *et al.*, 2018). En esta parte del proceso se obtiene la vaina de cacao, que constituye el 66 % p/p del fruto, la cual es usada como alimento para animales, pero en los últimos

años se ha investigado otras funciones y características nutraceuticas (Liendo, 2015).

Una vez que el grano tiene las características organolépticas deseadas, se procede a realizar la obtención de la pasta de cacao, la cual es sometida a un proceso de molturación para lograr una mezcla espesa. De la pasta procesada se obtienen dos derivados, la manteca de cacao y “torta de cacao” las cuales se obtienen mediante prensado a alta presión. La torta de cacao se tritura para obtener cacao en polvo, mientras que la manteca de cacao conocido como aceite de *Theobroma*, es destinado a otras industrias (**Figura 2**) (Lu *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Procesamiento del fruto de cacao. Imagen adaptada de <https://www.sucden.com/>

Los subproductos obtenidos del procesamiento del fruto de cacao son: la vaina de cacao, cáscara de granos de cacao y el mucílago (**Figura 3**), considerados como residuos orgánicos o definido en los últimos años como biomasa residual. Sin embargo, se han empezado a estudiar sus propiedades nutricionales con la finalidad de encontrar un uso como ingrediente de valor agregado en la producción de alimentos o biocombustibles (Vásquez *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Principales subproductos de la vaina de cacao. Imagen adaptada de Vásquez *et al.*, (2018)

### **II.1.3 Subproductos del cacao**

Los subproductos o residuos orgánicos son aquellos componentes del fruto que se consideran desperdicio; sin embargo, se ha optado por nombrarlos biomasa residual, la cual representa un 60 % del fruto. De manera general, la producción de esta biomasa se genera a grandes volúmenes y se dificulta su eliminación, contribuyendo a problemas de salud, económicos, de producción y fitosanitarios (podredumbre de la vaina). Entre los ejemplos de biomasa residual, se pueden mencionar el bagazo de la caña de azúcar, cáscara de café, los rastrojos de maíz, arroz y trigo, así como en lo que nos compete, los subproductos del cacao (Vásquez *et al.*, 2018).

Los subproductos del cacao representan un problema en países especializados en la cosecha y transformación de la materia (cosecha 2015-2016: 3.9 millones de toneladas, produciendo 16 millones de toneladas de residuos), pero a la vez un área de oportunidad en el uso de la biomasa del cacao por sus recientes hallazgos nutraceuticos y ser un residuo barato, reusable y abundante (Vásquez *et al.*, 2018). El procesamiento de los residuos orgánicos a través de herramientas biotecnológicas permite la obtención de compuestos de valor agregado como: pectinas, polisacáridos fermentables, polifenoles, etc. (Vásquez *et al.*, 2018).

## II.2 La vaina de cacao

### II.2.1 Características físicas

Del árbol *Theobroma cacao* crece la vaina de cacao que se caracteriza por ser un fruto grande de color amarillo o marrón de 15 a 30 cm de largo y 7 a 10 cm de grueso, en el interior se puede encontrar una pulpa color blanco y unos cincuenta granos (**Figura 1**). El grano de cacao forma un 30 % del peso total de fruto, el otro 70 % es la vaina, de la cual se han podido extraer otros compuestos para su estudio. La vaina de cacao se compone de tres elementos, el epicarpio, la capa más externa que está en contacto directo con el medio externo, cambiando de color conforme la maduración del fruto se va presentando. La siguiente capa es el mesocarpio, que muestra una estructura más sólida y que junto con el endocarpio, mantiene a los granos en su posición además de brindar protección, una característica extra del endocarpio es proveer un aceite para la protección de los granos. Cada una de las capas tiene una composición química diferente (Mohd *et al.*, 2018).

### II.2.2 Composición química

La vaina de cacao cruda se distingue por ser rica en fibra y proteína, pero es necesario someterla a pretratamientos térmicos para procesarla para las diferentes industrias que hacen uso de este fruto (**Tabla 1**). De acuerdo con el procesamiento que se aplique cambia su composición química. Por ejemplo, el molido en seco incrementa el contenido de proteína, carbohidratos y fibra dietaria, de la cual sobresale la fibra insoluble y lignina. En cambio, con secado en horno y molido a 80 °C con un molido de 22 µm por un día, su composición se caracteriza por tener un mayor contenido de cenizas y fibra insoluble de la cual se distingue la celulosa, hemicelulosa y lignina. El procesado en horno y molido (40-45 °C, <1.68 mm) causa un incremento de la fibra total y derivados insolubles (**Tabla 1**). Por otro lado, la vaina fermentada de acuerdo con el tipo de microorganismo y composición del ambiente presenta un cambio en el contenido de proteína, grasa, fibra total, cenizas y humedad (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018).

**Tabla 1.** Composición química (%) de la vaina de cacao cruda y procesada

Componente (%)	Sin procesar	Picada (1 cm)	Molido en seco (< 1mm)	Secado en horno y molido (80 °C/ 1 día/ 22 µm)	Secado en horno y molido (40-45 °C/ <1.68mm)	Secado natural y molido (0.40-0.45mm)
Proteína	5.9-9.1	8.4	8.6	2.1	9	-
Lípidos	1.2-10	-	1.5	1.5	2.0	-
Carbohidratos Totales	17.5-47	20.6	32.3	17.5	13	-
Fibra total	22.6	55.7	36.6		60	74
Lignina	35.7	38.8	21	24.2	19.4	14.7
Hemicelulosa	-	6.0	-	8.7	-	37
Celulosa	-	35.3	-	26.4	-	35.4
Cenizas	5.9-13.0	-	6.7	9	8	12.3
Humedad	6.4-14.1	-	-	10.5	8.5	14

Datos obtenidos de: Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah (2018)

En cuanto a las cenizas, Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah (2018) reportan variación del contenido según el nivel de la capa de la vaina de cacao (**Tabla 2**); el alto porcentaje predomina en el epicarpio y pericarpio de la vaina. Respecto al contenido de aminoácidos de la vaina de cacao esta reportado que contiene; ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, histidina, lisina, prolina, valina, leucina y metionina por lo que lo hace un polímero con alto valor biológico (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018; Vásquez *et al.*, 2018).

**Tabla 2.** Composición mineral de la vaina de cacao

Minerales	Vaina de Cacao (%)	Epicarpio (%)	Mesocarpio (%)	Endocarpio (%)	Contenido (mg/100g de materia seca)
Ca	0.32	0.58	0.19	0.13	254

<b>K</b>	3.18	4.61	1.56	2.66	2768
<b>P</b>	0.15	0.16	0.06	0.09	-
<b>Mg</b>	0.22	0.39	0.10	0.15	110.9
<b>Na</b>	3.1	9.1	6.0	7.2	10.5
<b>Zn</b>	40.4	64.9	23.5	30.8	39.74
<b>Fe</b>	90.1	197.1	106.3	112.4	5.8
<b>Cu</b>	7.2	13.2	5.6	7.1	6.18
<b>Mn</b>	33.6	103.2	21.3	31.9	35.72

Datos obtenidos de: Campos-Vega *et al.*, (2018); Vásquez *et al.*, (2018).

## II.2.3 Composición nutracéutica

De acuerdo con diversos estudios se ha podido identificar en la vaina de cacao compuestos orgánicos con una función en los seres humanos, además de las diferentes aplicaciones en la industria alimentaria. A continuación, se describen características, función y uso en la industria alimentaria de los diferentes compuestos nutracéuticos de la vaina de cacao (Vásquez *et al.*, 2018).

### II.2.3.1 Compuestos nutracéuticos

Los nutracéuticos son sustancias aisladas de los alimentos que proveen un efecto fisiológico. Entre estos compuestos se incluyen los antioxidantes, que se definen como las sustancias en los alimentos que, al estar presentes a bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de este. Los sistemas antioxidantes se denominan en función de los mecanismos de acción. Estos mecanismos son: antioxidantes de prevención, (impide la formación de radicales libres, secuestro del metal por quelación e inactivación del oxígeno activo) antioxidantes eliminadores de radicales (renuevan radicales al inhibir su propagación de estos) y enzimas de reparación y *de novo* (reparan daños y reconstituyen la membrana) (González-Aguilar *et al.*, 2017).

En general, los compuestos antioxidantes participan en la disminución de especies reactivas de oxígeno, lo cual frenan cierta respuesta celular, como: el crecimiento celular acelerado, el daño del ADN previniendo la formación de células dañinas, inhibición de la expresión de genes inflamatorios, por último y no menos importante el uso antifúngico y bactericida natural (Amorim *et al.*, 2016; González-Aguilar *et al.*, 2017).

De acuerdo con el método de extracción varía el porcentaje de concentración de estos compuestos bioactivos, de los cuales se reporta la presencia de compuestos fenólicos (catequina, quercetina, epicatequina, ácido gálico, ácido cúmarico), terpenos (crisoplenol) flavonoides y ácido linoleico (**Tabla 3**) (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018).

Lo antes mencionado se reportó en un estudio, donde evaluaron el efecto de tres métodos de procesamiento de la vaina de cacao en el rendimiento de compuestos antioxidantes; los métodos fueron: secado por aire caliente (60 °C/24 h/0.1 ms<sup>-1</sup> la velocidad del aire), secado en microondas (595 W/11.5 min) y secado en frío (muestra liofilizada 20-40 Pa con temperatura de la cámara 20 °C y condensador a -60 °C/24 h). Reportaron que el contenido fenólico total aumentó en las muestras tratadas con secado frío 5.8 veces de la muestra inicial (323.7 ± 26.5 mg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g). Mientras que el contenido de flavonoides total, en el secado por frío y microondas tuvo un aumento de 6.1 veces en relación con la muestra inicial (97 mg equivalente de epicatequina (EE)/ 100 g muestra seca), además de mostrar una fuerte actividad enzimática. Estos fenoles pueden ser hallados en la misma pared celular, lo cual se ha visto que en modelos de digestión *in vitro* de la fibra de algunos alimentos han permitido mostrar que, durante el proceso de la digestión gástrica, intestinal y fermentación colónica, hay un porcentaje de la liberación de polifenoles (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018; Valadez-Carmona *et al.*, 2017).

**Tabla 3.** Composición nutracéutica de la vaina de cacao

Componente (%)	Valadez-Carmona <i>et al.</i> , 2017	Vásquez <i>et al.</i> , 2018	Campos- Vega <i>et al.</i> , 2018					
			Ácido acético	Ácido nítrico	Ácido cítrico	HCl	Agua 50 °C	Agua 100 °C
Catequina	36							

Quercetina	22							
Epicatequina	21							
Ácido gálico	12							
Ácido cumárico	7							
Ácido protocatechuico	5							
Taninos		5.2						
Teobromina		0.34						
Fenoles totales mg GAE/100g	323.7	460-690						
Pectina (% rendimiento)			8-11	9.8	10.1	11.7	7.5	12.6

### II.2.3.2 Fibra dietaria de la vaina de cacao

Según el Codex Alimentario, la fibra dietaria o fibra alimentaria se define como polímero de carbohidratos con más de nueve monómeros no digeribles con efectos funcionales en el cuerpo humano (FAO, 2009; Bader UI Ain *et al.*, 2018). La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación) reconoce a la celulosa, hemicelulosa, pectinas, inulina y almidones resistentes como parte de la fibra dietaria. Mientras que a la lignina y compuestos menores (polifenoles, ceras, saponinas, fitatos y fitoesteroles) como asociados de la fibra, siempre y cuando éstos se encuentren en la pared celular vegetal (FAO, 2009). Como se mencionó, la fibra es considerada como un polisacárido no digerible, ya que los enlaces químicos que lo constituyen lo hacen resistente a las enzimas del intestino delgado, pasando directamente al colon, donde se encuentran bacterias que permiten la transformación a ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Vilcanqui-Perez & Vilchez-Perales, 2017; Bader UI Ain *et al.*, 2018).

Existen diversas maneras de clasificar la fibra dietaria, la más común es por el tipo de solubilidad en agua, la cual se divide en soluble e insoluble. En el apartado de fibras solubles, se encuentran pectina, inulina,  $\beta$ -glucanos, galactomananos, gomas y almidón resistente; mientras que en el grupo de fibra insolubles lignina, celulosa, hemicelulosa (Vilcanqui-Perez & Vilchez-Perales, 2017; Maphosa & Jideani, 2015) (**Tabla 4**). Ambos tipos de fibra pueden encontrarse en alimentos como: cereales, nueces, frutas y verduras (Bader UI Ain *et al.*, 2018).

**Tabla 4.** Componentes y clasificación de la fibra dietaria

Carbohidratos	Polisacáridos	No amiláceos	Celulosa, Hemicelulosa		Fibra insoluble	No fermentable	
			No celulósicos	Hemicelulosa		Fibra soluble	Fermentable
				$\beta$ -glucanos			
				Pectinas			
				Gomas y mucílagos			
		Galactomananos, alginatos, arabinosilanos, carragenanos		Fibra insoluble			
		Almidón resistente					
Oligosacáridos resistentes (rafinosa, estaquiosa, verbacosa)		Fibra soluble					
No CH	Lignina		Fibra insoluble	No fermentable			
	Compuestos bioactivos (polifenoles, carotenoides, fitoesteroles, etc)		Fibra soluble				

Datos obtenidos de: Mataix-Verdu, 2015. No carbohidratos (No CH).

Los diferentes beneficios que aporta la fibra dietaria varían de acuerdo con el tipo de fibra (soluble e insoluble). Se ha reportado que la fibra soluble tiene acciones fisiológicas como: inducción a la saciedad, control de la glucemia, actividad antiinflamatoria, regulación de síntesis de colesterol endógeno y la última y más importante la fermentación colónica. Por otro lado, la fibra insoluble mejora el peristaltismo intestinal, aumento del volumen fecal y aumento de la presión intraintestinal (Maphosa & Jideani, 2015; Gerschenson, Rojas & Flssore, 2019). Entre las funciones tecnológicas que se reportan se incluyen: emulsionantes, agente espesante, estabilizantes, agente floculante, formador de películas, inhibidor de la cristalización, disminución del índice glucémico de los alimentos, la mayoría de las funciones están acuñadas a la fibra soluble (Bader Ul Ain *et al.*, 2018).

Respecto a la vaina de cacao, esta se compone de tres capas diferentes, las cuales varían en el contenido de polisacáridos (**Tabla 1**). La primera capa está definida como epicarpio, su composición está dada en mayor proporción por la hemicelulosa (50 %), que es un componente ubicado en la pared celular y es la vinculación entre la lignina y la celulosa; se diferencia por ser un heteropolisacárido conformado por glucosa, galactosa, manosa, xilosa y arabinosa. La segunda capa reportada es el mesocarpio, que se distingue por conformarse solamente de celulosa

(53 %), el cual es un homopolisacárido compuesto de unidades de glucosa. La última capa de la vaina de cacao es el endocarpio que lo constituye la pectina (59 %), se caracteriza por ser un polímero de tipo heteropolisacárido, constituido de unidades de ácido galacturónico, agregado esencial en la composición de la pared celular de la vaina de cacao y otros organismos del grupo plantae (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018; Galanakis, 2019).

### **II.2.3.2.1 Pectinas**

La vaina de cacao está compuesta en mayor proporción de los siguientes polisacáridos insolubles: celulosa, hemicelulosa y pectinas (Vásquez & *et al.*, 2018). Esta última se caracteriza por ser un polímero conformado por ácido galacturónico con enlaces  $\alpha$ -1,4 y con cadenas laterales de galactosa, glucosa, ramnosa y arabinosa, de acuerdo con el monosacárido que conforme las cadenas laterales es el grado de solubilidad (Mataix-Verdu, 2015). Para hacer uso de este polímero es necesario realizar su extracción. Se ha propuesto la extracción de pectinas mediante agua caliente (50 y 100 °C) o el uso de diferentes ácidos orgánicos (acético, nítrico, cítrico, clorhídrico), estos últimos de acuerdo con el tipo de ácido y concentración pueden variar la composición de la pectina (**Tabla 3**) (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018). La mejor extracción se ha reportado con ácido cítrico y agua a alta temperatura, lo cual se caracteriza por tener un bajo grado de metilación, contener malto-oligosacáridos, proteínas y calcio. Estas mismas características lo sitúan como un polímero importante en la industria alimentaria ya que se usa como agente antimicrobiano, encapsulante (en la industria del yogurt para proteger a los prebióticos), espesante, gelificante y estabilizantes (Priyangini *et al.*, 2018). Además del papel que juegan en la industria alimentaria, también se han descrito beneficios a la salud, entre los que destacan: efecto antiinflamatorio, bloqueador del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucinas, prolongación de vaciado gástrico y reducción de colesterol en modelos *in vivo* e *in vitro* (Amorim *et al.*, 2016).

## **II.3 Métodos para el procesamiento de la vaina de cacao**

Como se mencionó en los capítulos anteriores, la vaina de cacao está considerada como un subproducto rico en fibra insoluble y otros compuestos por lo que se ha optado por aplicar diferentes procesamientos con la finalidad de obtener un producto con valor agregado. Entre los procesos aplicados a la vaina, el procesamiento por secado ha mostrado un aumento en el porcentaje de fibra soluble, proteína y compuestos bioactivos, volviéndolo un producto de uso en diferentes industrias, por ende, se ha apostado por otros métodos para conocer sus efectos en la vaina de cacao (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018).

Inicialmente los procesamientos implican un fraccionamiento, el cual es un proceso crucial ya que elimina todo compuesto que no es fibra. Posteriormente, acorde al objetivo de la investigación o aplicación es el tipo de método a elegir; entre los métodos más usados se encuentran: procesamiento mecánico (pulverizado, molido, micronización), extrusión, procesamiento térmico (secado, cocción, tostado), tratamiento químico (ácidos, álcalis), enzimático y microbiológico (fermentación). El método de extrusión y enzimático se encuentran entre los que mejoran la funcionalidad de los alimentos ricos en fibra (Gerschenson, Rojas & Flissore, 2019). Cabe mencionar que el método usado dependerá del porcentaje de fibra en el alimento y las características químicas de la fibra (naturaleza química, grado de polimerización y presencia de oligosacáridos). Además, es importante recalcar que el objetivo del procesamiento de estos subproductos es mejorar su composición estructural, química y nutracéutica con la finalidad de brindar una mayor bioaccesibilidad de sus compuestos bioactivos y funcionalidad en la industria de alimentos (Elleuch, *et al.*, 2010; Maphosa & Jideani, 2015).

### **II. 3.1 Extrusión**

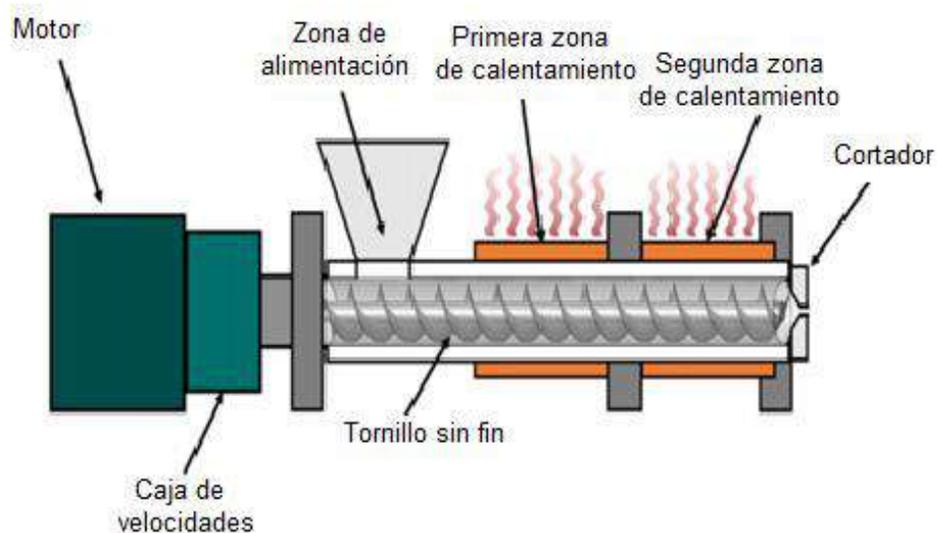
La extrusión es un proceso automatizado que combina diversas operaciones como el mezclado, calentamiento y cizallamiento de los alimentos en corto tiempo hasta conseguir una masa semisólida (Chen *et al.*, 2018).

El proceso inicia con el ingreso de la materia prima al barril extrusor a través de una tolva, sufriendo un pre-acondicionamiento con agua y calentamiento a baja

temperatura, posteriormente la mezcla pasa a través del extrusor por un orificio o matriz con la ayuda de un pistón o un tornillo giratorio dentro del barril, las secciones de la maquinaria se pueden observar en la **(Figura 4)** (Dang & Vasanthan, 2018). El proceso difiere de cada objetivo de la investigación, además de la variedad de las muestras.

La extrusión es un método innovador para el procesamiento de la vaina, por ello se han tomado de referencia otras matrices alimentarias que se caracterizan por ser ricas en fibra insoluble. Entre las condiciones que se proponen: temperatura de 90 a 130 °C, humedad del alimento de 25-35 %, velocidad del tornillo 160-220 rpm y secado posterior a 60 °C/6 h, utilizando una extrusora de corona doble tornillo (Chen *et al.*, 2018; Nikmaram *et al.*, 2017; Salazar-Lopez *et al.*, 2016).

La acción mecánica de la extrusión origina una ruptura de enlaces covalentes de los polisacáridos insolubles liberando los compuestos solubles. Por lo que se puede observar en cualquier matriz alimentaria un aumento de fibra soluble, mayor retención de aminoácidos, vitaminas y minerales, gelatinización del almidón, disminución de la oxidación de lípidos y disminución de factores anti-nutricios (oxalato, fitato, inhibidores de enzimas, hemaglutininas, saponina) (Nikmaram *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Dang & Vasanthan, 2018; Zhong & *et al.* 2018).



**Figura 4.** Componentes del extrusor de alimentos. Adaptado de: Cervantes-Ramírez *et al.*, (2020).

### **II.3.2 Proceso de fermentación**

Son diferentes los métodos que se utilizan para el procesamiento de los alimentos, contribuyendo a la mejora de su digestibilidad y composición química. Entre ellos, la fermentación, el cual es un procesamiento antiguo pero que en los últimos años ha recuperado importancia tecnológica y científica (Anal, 2019).

La fermentación se define como un proceso metabólico para obtener compuestos orgánicos sin la participación de un agente oxidante. Tiene la finalidad de preservar los alimentos mediante la formación de ácidos orgánicos, la inhibición de patógenos o eliminación de compuestos tóxicos por la acción fúngica y la mejora del valor nutricional (aumento de proteínas, ácidos grasos, vitaminas) (Bourdichon *et al.*, 2012; Urbonaviciene *et al.*, 2014).

El proceso de fermentación es llevado a cabo por algunos microorganismos, principalmente: hongos, levaduras y bacterias (bacterias lácticas). Para que los microorganismos puedan llevar a cabo el proceso fermentativo es indispensable contar con condiciones específicas y apropiadas en el ambiente, alimento o cultivo, tales como: temperatura, presencia o ausencia de oxígeno, pH, actividad de agua y tipo y contenido de nutrientes; los factores antes mencionados permitirán la sobrevivencia del microorganismo y la actividad de enzimas.

Muchas enzimas son obtenidas de bacterias y en mayor parte de hongos, con la finalidad de ayudar a la producción de otros alimentos, además de permitir a los microorganismos llevar a cabo la fermentación. Entre las enzimas que destacan se encuentran las proteasas (tripsina, papaína, renina, quimosina), sacarasas (amilasa, lactasa) y lipasas; todas ellas participan en la degradación de compuestos complejos en compuestos simples, por ende, se desarrollan precursores de sabor, aroma y pigmentación, los cuales contribuyen a la mejora tecnológica y nutricional del alimento (Anal, 2019).

De acuerdo al tipo de microorganismo varía el tipo de fermentación en la matriz alimentaria, por ende la reacción metabólica y el tipo de sustrato sintetizado, como:

fermentación alcohólica, láctica, acética, butírica, fórmica, metánica y maloláctica, todas generadas por bacterias. En cambio, levaduras y hongos tienen mayor afinidad por el tipo de fermentación alcohólica, láctica y acética (**Tabla 5**) (Anal, 2019).

Existen dos métodos de fermentación: el cultivo sumergido y la fermentación en sustrato sólido. En el cultivo sumergido existe una mayor disponibilidad de agua en el medio, los nutrientes provienen de fuentes diversas, se constituye de una fase líquida y una gaseosa, se requiere de un inóculo pequeño y el producto final se encuentra diluido en el medio. Este método es realizado en su mayoría por bacterias (**Tabla 5**) (Cuoto & Sanroman, 2006).

La fermentación en sustrato sólido; se caracteriza por la restricción de agua en el alimento, disminución del crecimiento microorganismos que no son de interés. Los microorganismos que logran crecer y desarrollarse exponen cualidades únicas, este tipo de fermentación es realizado por pocas bacterias y principalmente por hongos o levaduras (**Tabla 6**).

**Tabla 5.** Microorganismos utilizados en la fermentación con cultivo sumergido

Tipo de fermentación	Microorganismos	Sustratos	Productos
Alcohólica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida seudotropicalis</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Mucor</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i>	Malta de cebada, cereales, arroz, maíz, trigo, caña de azúcar, melaza, sorgo, soya.	Etanol, vinos, cervezas, licores, pan, salsas.
Láctica homofermentativa	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>lactis</i> , <i>fecalis</i> ; <i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> ,	Leche, suero de leche, vegetales, sacarosa	Yogur, suero de leche, queso,

	<i>acidophilus, bulgaricus, casei</i>		mantequillas, encurtidos
Láctica heterofermentativa	<i>Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus brevis, fermenti, Bifidobacterium bifidus</i>	Leche, suero de leche, vegetales, sacarosa	
Propiónica	<i>Propionibacterium freundenreichii, shermanii, Micrococcus lactylicus, Clostridium propionicum</i>	Productos lácteos, glucosa, sacarosa, pentosas, ácido láctico, ácido málico	Ácido propiónico, ácido acético
Butírica	<i>Clostridium butyricum, Clostridium spp.</i>	Almidón, pectina, proteínas, etanol.	Ácido butírico, acético, fórmico, láctico, succínico, alcoholes
Maloláctica	<i>Leuconostoc oenos</i>	Ácido málico	Vinos blancos, rojos y cidra

Datos obtenidos de: Puerta- Quintero, (2010).

Entre las ventajas y requerimientos que presenta este método, son: disponibilidad de agua restringida, crecimiento de microorganismo de interés y nutrientes que provienen del sustrato sólido. Se requiere de un inóculo abundante para iniciar el cultivo y se obtienen productos de importancia en la industria alimentaria (enzimas, saborizantes, ácidos orgánicos, etc.) (Cuoto & Sanroman, 2006).

Como se observa en la **Tabla 6**, son varios los microorganismos utilizados para la fermentación sólida, pero los hongos son los microorganismos que mejor se adaptan a este proceso de fermentación, debido a su crecimiento en forma de micelio, tolerancia a baja actividad de agua y resistencia a la alta presión osmótica. Entre los subproductos usados como sustrato para la fermentación sólida, se encuentran: bagazo de caña de azúcar, yuca, naranja, manzana, uva, café usado, salvado, paja de arroz, paja de trigo, harina de maíz y trigo. En la **Tabla 7** se

presentan alimentos tradicionales obtenidos a través de la fermentación en sustrato sólido (Cuoto & Sanroman, 2006).

### II.3.2.1 Beneficios del consumo de alimentos fermentados

En países occidentales y europeos se ha empleado la fermentación principalmente para la conservación de alimentos mediante la formación de ácidos orgánicos. Por lo tanto, en países orientales han centrado el uso de la fermentación como proceso de conservación y potenciador de las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos, usando principalmente los hongos como cultivo iniciador. Por ejemplo, en Asia se ha desarrollado alimentos basados en proteína vegetal utilizando diferentes clases de hongos para el proceso de fermentación en estado sólido, mostrando una mejora en la composición de algunos alimentos (Giraffa, 2004).

**Tabla 6.** Microorganismos empleados en la fermentación de sustrato sólido y ejemplos de su uso

Microorganismo	Ejemplo de fermentación en sustrato sólido
Bacteria	Composta, ensilado, producción de alimentos.
<i>Bacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Serratia</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.	

<i>Clostridium</i> sp.	
Levaduras	
<i>Endomycopsis burtonii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schwanniomyces castelli</i>	Producción de ta-peh, procesamiento de alimentos, producción etanol, producción de amilasa.
Hongos	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Composta, degradación de lignina.
<i>Amylomyces rouxii</i>	Producción de ta-peh.
<i>Aspergillus oryzae</i>	Producción de salsa de soja, sake y vinagre de arroz.
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Producción de tempeh.
<i>Aspergillus niger</i>	Producción de amilasa, ácido cítrico.
<i>Penicillium notatum, roquefortii</i>	Producción de penicilina y queso.

Datos obtenidos de: Cuoto & Sanromán, (2005).

A través de la fermentación, los alimentos o en este caso subproductos sufren una modificación química, mejorando su digestibilidad y contenido nutricional debido a la formación de metabolitos producidos por hongos o bacterias, pueden aportar un efecto positivo a la salud humana (**Tabla 8**). Ejemplo de ello, a través de la fermentación se aumentan el contenido de vitaminas (B2, B9, B12 y vitamina K), síntesis de melatonina, síntesis de compuestos bioactivos, formación de péptidos que originarán efecto antioxidante, efecto probiótico, hipocolesterolemico, anticancerígeno, antiinflamatorio, antimicrobiano, antitrombótico (Sanlier, Basar-Gökçen & Ceyhun-Sezgin, 2017).

**Tabla 7.** Alimentos producidos por fermentación en sustrato sólido

Materia prima	Alimento producido	Microorganismo
---------------	--------------------	----------------

Soya	Ketjap	<i>Aspergillus oryzae</i>
Legumbres	Kimchi	Bacterias lácticas
Arroz, soja	Miso	<i>Aspergillus niger</i> y bacterias lácticas
Soya	Sufu	<i>Mucor sp</i>
Soya	Tempeh	<i>Rhizopus oryzae</i>
Arroz	Torani	<i>Candida, Saccharomyces</i>

Datos obtenidos de: Cuoto & Sanromán, (2005).

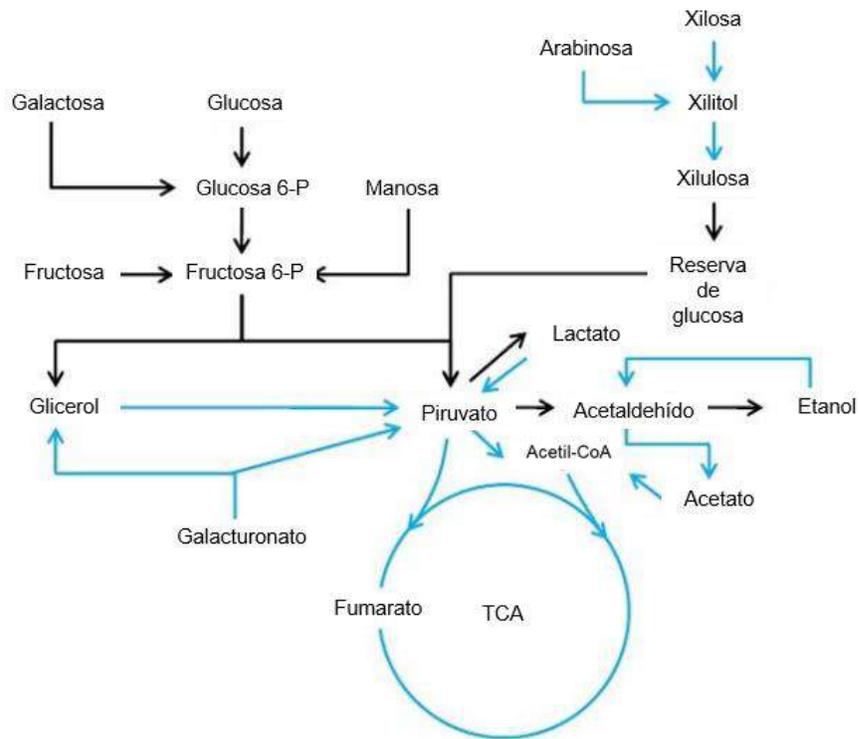
### II.3.2.2.1 Fermentación con *Rhizopus oryzae*

La fermentación por hongos se ha desarrollado desde la antigüedad, actualmente la industria alimentaria en Asia se ha centrado en evaluar la funcionalidad de diferentes especies de hongos y levaduras mediante la fermentación en sustrato sólido (**Tabla 6 y 7**). Entre los diferentes tipos de hongos *Rhizopus* es en el que investigadores han tenido un mayor interés, el cual se caracteriza por ser saprofito y colonizar material orgánico. *Rhizopus* está compuesto por 10 especies, entre ellas se encuentran las especies relacionadas al procesamiento de alimentos: *Rhizopus oligosporus* y *Rhizopus oryzae*. Esta última presenta características de interés para la producción de alimentos, como el aumento de la bioaccesibilidad por la presencia activa de amilasa, lipasa y proteasas, además del catabolismo y anabolismo de hexosas o pentosas según la presencia o ausencia de oxígeno. Por ejemplo, *Rhizopus* en condiciones aeróbicas, induce la transformación de hexosas de la matriz a piruvato y posteriormente en ácido láctico o etanol. En cambio, en condiciones anaeróbicas precede por el uso de xilosa y arabinosa, volviéndolo un agente fermentador de polisacáridos (hemicelulosa, gomas, arabinosilanos) encontrados en el material vegetal (**Figura 5**) (Batt & Tortorello, 2014; Cantabrana, Perise & Hernández, 2015).

Cabe mencionar que las dos especies previamente mencionadas están avaladas por la EFSA (European Food Safety Agency), por lo que es reconocido como microorganismo seguro para la aplicación en alimentos (Cantabrana, Perise & Hernández, 2015). Entre los efectos que *Rhizopus* genera en los diferentes alimentos

(frutas, verduras, cereales, nueces y legumbres) son: la mejora del sabor y la textura con el pasar del tiempo, aumento del contenido proteico y fibra soluble, esto debido a la hidrólisis enzimática de proteínas, lípidos y polisacáridos estructurales (Cantabrana, Perise & Hernández, 2015).

Estas modificaciones benéficas en los alimentos previamente mencionados por *Rhizopus*, ha interesado a investigadores para usarlo como agente fermentador en subproductos, entre ellos la vaina de cacao (**Tabla 9**) (Vásquez, *et al.*, 2019).



**Figura 5.** Metabolismo de *Rhizopus oryzae* en condiciones aerobias (flechas azules) y anaerobias (flechas negras). Imagen modificada de: Batt & Tortorello, (2014).

**Tabla 8.** Beneficios a la salud de los alimentos fermentados

Grupo de alimento	Microorganismos	Modificación en el alimento	Efecto a la salud
Productos lácteos	BAL	Formación del ácido láctico, acción proteolítica en la proteína de la leche.  Aumento síntesis de folato, proteínas, ácido linoleico y minerales, mejora de la digestibilidad de las proteínas y absorción de calcio.	Efecto hipocolesterolémico, antimicrobiano, modificación de la microbiota intestinal, anticancerígenos, antiinflamatorio, efecto prebiótico
Frutas y verduras	BAL	Oxidación de carbohidratos, formación de alcoholes y ácidos orgánicos. Aumento de las propiedades antioxidantes.	Efecto antimicrobiano, prevención de cirrosis, diarrea, efecto prebiótico.
Legumbres	Hongos y bacterias	Mejora del sabor, apariencia, digestibilidad. Inhibición de compuestos no nutritivos. Aumento de compuestos fenólicos.	Propiedades antioxidantes, modulador de enzimas como acetilcolinesterasa, glucosidasa y amilasa, propiedad antitrombótica y fibrinolítica.
Cereales	Hongos y levaduras	Diminución de carbohidratos no digeribles, aumento síntesis de aminoácidos, mejora de la biodisponibilidad de	Prevención de enfermedades relacionadas al estrés oxidativo: enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, enfermedades

		compuestos fenólicos y vitaminas	neurodegenerativa s.
--	--	----------------------------------	----------------------

Datos obtenidos de: Sanlier, Basar-Gökçen & Ceyhun-Sezgin (2017). BAL: Bacterias ácido-lácticas.

**Tabla 9.** Efecto de diferentes especies de hongos en la vaina de cacao.

Hongo	Efecto en la vaina da cacao	Referencia
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Contenido de fibra disminuyo 7.2 %; Contenido de proteína aumento un 94.8 %; disminuyo 10.6 % la cantidad de lípidos. Capacidad antioxidante (DPPH) aumento 62 %.	Lateef <i>et al.</i> , (2008)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Vaina se secó y fermento/ 14 días; contenido de proteína aumento 48.59 %, mientras que fibra (14 %) y lípidos (22 %) disminuyeron; el contenido de teobromina, taninos y fitatos disminuyó significativamente; contenido de fibra insoluble disminuyo conforme avanzaban los días de fermentación.	Olugosi <i>et al.</i> , (2019)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Aumento del contenido de proteína de 1.95 a 23.16 % y una pérdida de materia seca del 31-35 %; aumento valina, glutamato y alanina.	Sriherwanto <i>et al.</i> , (2016)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Disminución de fibra total del 4 %, hemiceluloa 31 % y 10.1 % de celulosa; incremento del contenido de proteína 37.3 %.	Alemawor <i>et al.</i> , (2010)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Uso de Mn/ 7 semanas de fermentación, aumento el 39.93 % de proteína; disminución de fibra 17.08 %; disminución del contenido de lignica, hemicelulosa (22.78 %), celulosa (26.34 %); aumento de fibra soluble (42.25 %); disminución de taninos.	Alemawor <i>et al.</i> , (2009)

## **II.4 Modelos para evaluar la funcionalidad biológica de la fibra dietaria**

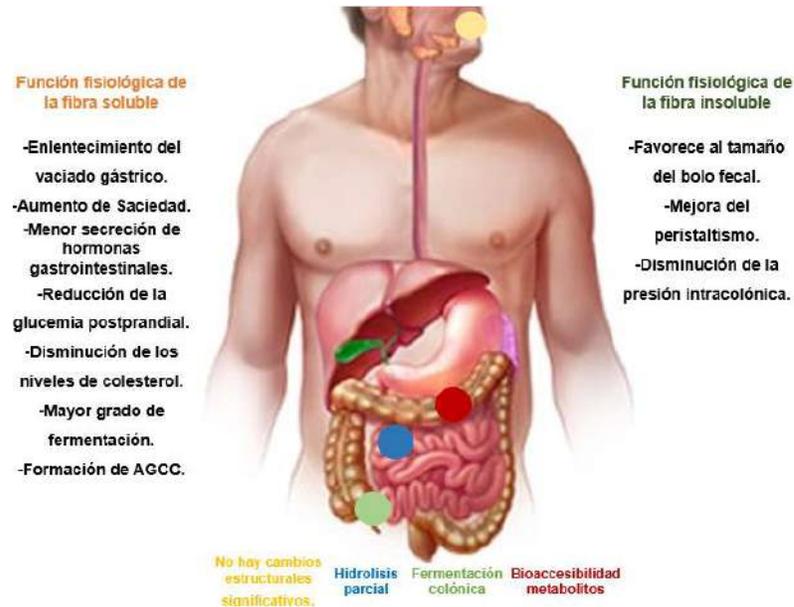
El proceso de digestión es un sistema complejo en el que los alimentos atraviesan por una transformación mecánica y química con la finalidad de aportar nutrientes y otros compuestos al organismo. De manera general, la fibra dietaria sufre una modificación mecánica en la boca y de acuerdo con el tipo de enlace glucosídico algunas fibras son hidrolizadas parcialmente en el aparato digestivo por la amilasa pancreática o por la sacarasa e isomaltasa ubicadas en el borde del cepillo intestinal y la glucoamilasa. Finalmente, la fibra llega al colon para que los microorganismos mediante la fermentación puedan hidrolizar los enlaces  $\beta$ -glucosídicos que las enzimas del intestino delgado no lograron romper (Wang *et al.*, 2019).

Para analizar las modificaciones fisicoquímicas y la bioaccesibilidad de los alimentos, se han implementado modelos *in vitro* que simulan el proceso fisiológico de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica. Estos tienen la ventaja de ser modelos sencillos, sin restricciones, controlables y sin interferencias fisiológicas (Wang *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019).

### **II.4.1 Digestión gastrointestinal *in vitro***

Los modelos de digestión *in vitro* de acuerdo con la región del sistema digestivo de los seres humanos pueden simular: el proceso fisiológico, el tiempo de tránsito, condiciones enzimáticas y pH. En el caso particular de la fibra dietaria, inicia su transformación en la boca, la cual sufre una modificación física por el proceso de masticación. A pesar de estar presente la ptialina, esta enzima no genera efecto alguno en la fibra dietaria; pero el proceso mecánico genera una respuesta en el estómago en donde aumenta la secreción de HCl. A nivel gástrico, la fibra dietaria (soluble) por su capacidad de absorción genera la formación de soluciones viscosas provocando un aumento de saciedad y un enlentecimiento del vaciado gástrico. Después, en el intestino delgado, dependiendo de los enlaces glucosídicos que conforman la fibra, las enzimas amilasa pancreática, la isomaltasa, la sacarasa y la glucoamilasa van a hidrolizar parcialmente al polímero. A nivel del duodeno la fibra

alimentaria principalmente soluble genera un efecto en la gradualidad de absorción de glucosa, lípidos e impedimento de un cierto grado de absorción de colesterol y sales biliares. Lo cual ocasiona de manera secundaria una secreción menor de hormonas gastrointestinales y la conversión de colesterol endógeno en sales biliares, generando un efecto hipocolesterolemiante (**Figura 7**) (Capuano, 2017).



**Figura 6.** Proceso digestivo de la fibra dietaria y funcionalidad fisiológica de la fibra soluble e insoluble. Adaptado de: Mataix-Verdu, (2015); Capuano, (2017).

#### II.4.2 Fermentación colónica *in vitro*

Posterior al proceso digestivo, la fibra dietaria con mínimas modificaciones químicas y físicas llega al ciego que forma parte del colon ascendente. En esta sección del aparato digestivo la microbiota colónica puede digerir la fibra dependiendo de su composición química y estructural. En el caso de la fibra dietaria insoluble por su característica mínima de retención de agua y formación de geles, la microbiota no puede inferir en su totalidad en ella y procede al colon distal, en donde favorece al tamaño del bolo fecal y brinda un mejor peristaltismo, así como disminución de la presión intracolónica (**Figura 7**) (Capuano, 2017). En cambio, la fibra soluble, por su capacidad de retención de agua y formación de geles, es fermentada por la microbiota colónica por bacterias sacarolíticas. Esta fermentación

origina la formación de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato) y ácidos grasos de cadena ramificada (isobutirato, isovalerato), gases y aumento de masa bacteriana (bifidobacterias) (Wang *et al.*, 2019).

Es importante mencionar que mediante la digestión y fermentación también se da la liberación de compuestos fenólicos, que se encuentran unidos por enlaces covalentes a la fibra soluble, los cuales mediante el proceso de masticación permiten una mayor bioaccesibilidad de estos compuestos bioactivos. Posteriormente se dirigen al estómago donde algunos fenoles son afectados por el pH presente, mientras que en el intestino delgado algunos de ellos son absorbidos (permeabilidad), para posteriormente alcanzar el torrente sanguíneo (biodisponibilidad). Los compuestos que no fueron absorbidos llegan al colon, en donde serán fermentados por la microbiota (bioaccesibilidad), algunos serán absorbidos por los colonocitos y alcanzarán el torrente sanguíneo (biodisponibilidad) (González-Aguilar *et al.*, 2017).

#### **II.4.2.1 Ácidos grasos de cadena corta y beneficios a la salud/cáncer de colon**

Mediante la fermentación colónica se presenta la síntesis de AGCC, estos se caracterizan por ser ácidos carboxílicos con colas alifáticas con uno a seis carbonos y son producidos por las colonias bacterianas presentes en el colon. Estos grupos de bacterias son: la familia de las bacteriodetes que producen tanto acetato como propionato y las firmicutes que producen butirato (Mataix-Verdu, 2015).

La formación de los ácidos grasos ocurre por la utilización de polisacáridos no digeribles como sustrato, mediante la glucólisis; pero también se pueden sintetizar a partir del metabolismo de ácidos orgánicos y aminoácidos. Esta síntesis ocurre en la mucosa intestinal del colón ascendente. De acuerdo con mediciones de concentración de los AGCC en sujetos sanos, la relación que se reporta es 60 % de acetato, 20 % de propionato y 20 % butirato. Sin embargo, de acuerdo con los hábitos alimenticios, actividad física, estado de salud, pueden modificar a la población bacteriana y por ende la concentración de AGCC (Mataix-Verdu, 2015).

El 90-95 % de los AGCC son absorbidos en el colon en donde generan diversos efectos fisiológicos. Una vez sintetizado el butirato es metabolizado por los colonocitos, usándose como fuente preferente de energía para la mucosa colónica distal; también se le ha relacionado por tener un efecto inhibitorio del desarrollo de tumores, atribuyéndole importancia en el cáncer de colon. Por otro lado, el propionato es metabolizado a nivel hepático, el cual sirve como precursor de la gluconeogénesis y se le atribuye tener efecto hipocolesterolemiante por inhibir la enzima hidroximetil glutaril CoA reductasa. Mientras que el acetato puede ser metabolizado en tejidos periféricos mediante la gluconeogénesis, formar ácidos grasos de cadena larga y cuerpos cetónicos (Mataix-Verdu, 2015; Fernández *et al.*, 2016).

Además del papel fisiológico previamente mencionado, los AGCC participan en la absorción y regulación de agua e intercambio iónico, aumento de una microbiota beneficiosa, regulación de pH ácido, mejora de la vasodilatación en el lumen intestinal y disminución de la secreción de ácidos biliares. Todas estas acciones fisiológicas benefician principalmente a la mucosa intestinal y a los colonocitos. Los cuales a nivel celular a través de estudios *in vitro* o *in vivo* se ha demostrado que los AGCC generan una respuesta inhibitoria de factores de transcripción implicados en la proliferación celular (histona deacetilasa (HDAC)), inhibición de genes implicados en la inflamación (NF-kB, receptor tipo Toll (TLR), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 y la expresión de genes implicados en el transporte de los AGCC y mejora de la mucosa intestinal (GPR43, MCT1) (Venegas *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

## **II.5 Cáncer de colon**

De acuerdo con la Clínica Mayo y la Sociedad Americana contra el Cáncer, el cáncer de colon se define como neoplasia de tipo leiomioma que puede dar origen en la válvula ileocecal hasta el recto, comenzando con la aparición de pólipos, los cuales al pasar el tiempo estos pólipos se pueden volver malignos. Un 15-20 % de la población adulta presenta este crecimiento anormal de tejido en el colon (American Cancer Society, 2018). Esta patología es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial, afectando a 700,000 personas al año. El riesgo de padecer cáncer colorrectal es del 5 % pero existe un 90 % de erradicar la patología con un

diagnóstico oportuno; este tipo de neoplasia es menos frecuente en mujeres (4.19 %) y más común en hombres entre 60 - 65 años (4.49 %). Sin embargo, la prevalencia en edades más tempranas ha incrementado en los últimos años (Reynoso-Noverón & Torres-Domínguez, 2017).

Según el INEGI y el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSTE) en el 2018 se diagnosticaron cerca de 15 mil casos, además de un aumento de la tasa de mortalidad de 6.5 casos por 100,000 individuos aumentando un 1.7 casos por 100,000 individuos los últimos 3 años, ubicándose en el 3er lugar como el cáncer más común en el país, teniendo un aumento en las últimas tres décadas (Fernando *et al.*, 2016).

La aparición de este cáncer se asocia a la edad, estilo de vida (ingesta de alcohol, tabaquismo, sedentarismo), antecedentes patológicos (diabetes, cáncer, obesidad), factores ambientales y alimenticios (Barriga-Sánchez, 2017).

Entre los factores que desarrollan el cáncer de colon, el tipo de alimentación es uno de los puntos importantes para el desarrollo y prevención del mismo. De acuerdo con diversos estudios y recomendaciones de las diferentes organizaciones e instituciones nacionales e internacionales, una dieta rica en grasa saturadas, un consumo excesivo de carnes rojas y una alimentación nula o mínima en frutas y verduras, podría aumentar el riesgo de cáncer colorrectal.

Diversos estudios señalan una vinculación entre la obesidad y el cáncer de colon a causa de un aumento de la activación y síntesis de proteínas de respuesta inflamatoria crónica. Tales proteínas pueden ser factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF-1-alfa), factor activador de proteína (AP-1), factor nuclear-kappa B (NF-kB), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), IL6 y IL1, de las cuales se tienen evidencia que originan una alteración en la división celular y su expresión es debido a una dieta alta en grasas saturadas. Para prevenir la aparición del cáncer colorrectal, se recomienda una dieta alta en frutas, vegetales, granos enteros y leguminosas que aportan agentes bioactivos y fibra dietaria (flavonoides, prontosianidinas, taninos, licopeno, ácido siringico, tirosol, resveratrol, limonoides, hesperetina, naringeninas, antocianinas, sulfuranos, alicina, curcumina), vitaminas y minerales que brindarán

protección celular de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tao, La, Li, & Huna-Bin, 2018).

### **III. Justificación**

Recientemente se ha propuesto el uso de semillas y epicarpio de diferentes plantas o frutos, entre ellos, la vaina de cacao. Este es el principal subproducto de la industria del chocolate, representando un problema de contaminación en países productores debido a que se tiene un manejo inadecuado del desecho y no se le ha dado aplicaciones considerables hasta el momento.

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado a la vaina de cacao con la finalidad de disminuir el problema de contaminación y aprovecharla para su inclusión en la alimentación humana, como fuente de compuestos nutritivos y nutracéuticos, especialmente fibra dietaria, con potenciales beneficios a la salud. Dado los aportes previos de la funcionalidad biológica de la vaina y la caracterización de esta misma, este es un subproducto que al ser procesado es de utilidad para desarrollar ingredientes o aditivos alimentarios, aportando características positivas a los productos elaborados con el mismo. El procesamiento evaluado hasta el momento (microondas, flujo de aire y extrusión), mejoran limitadamente la bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* de los compuestos antioxidantes (fenoles, flavonoides y taninos), con un impacto significativo pero mínimo sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano, como medida de evaluación de su funcionalidad biológica. Sin embargo, aún existe oportunidad de mejorar su composición química y funcionalidad, por lo que se propone la fermentación tipo tempeh como método innovador para el procesamiento de la vaina de cacao.

La fermentación en estado sólido tipo tempeh (*Rhizopus oryzae*) es un método típico para el procesamiento de los subproductos, debido a que a través de su naturaleza permite mejorar la composición química y nutracéutica de estos, mejorando su perfil antioxidante y contenido en fibra dietaria, contribuyendo a beneficios a la salud principalmente en el colon, evitando así enfermedades

gastrointestinales. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fué determinar los efectos del procesamiento por extrusión y fermentación de la vaina de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre su composición química, nutracéutica y funcionalidad biológica *in vitro*.

## **IV. Objetivos**

### **IV.1 Objetivo general**

Determinar el efecto del procesamiento por extrusión y fermentación tipo tempeh de la vaina de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre su composición química, nutracéutica y funcionalidad biológica *in vitro*.

### **IV.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la composición química y nutracéutica de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada con *Rhizopus oryzae*.
2. Analizar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada mediante un sistema de digestión gastrointestinal *in vitro*.
3. Cuantificar los ácidos grasos de cadena corta en la etapa colónica e identificar los metabolitos volátiles presentes en las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada.

## **V. Materiales y Métodos**

### **V.1 Materiales**

#### **V1.1 Materia prima**

Se usó la vaina de cacao procedente del fruto en un estado de madurez y sin lesiones ni contaminación aparente, de la especie *Theobroma cacao* L. proveniente de Jalpan de Méndez, Tabasco. Las vainas se lavaron y desinfectaron manualmente con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % v/v, se separó el mucílago y las semillas, finalmente la vaina se trituroó en molino hasta obtener una pasta (Yapo *et al.*, 2013).

##### **V.1.1.1 Procesamiento de la vaina de cacao**

Acorde a los objetivos del presente proyecto, las muestras analizadas fueron: a) la vaina de cacao seca y extruida, b) la vaina de cacao seca-extruida y fermentada con *Rhizopus oryzae* a diferentes tiempos.

##### **V.1.1.1.1 Flujo de aire y extruido**

La pasta obtenida del molino se extrudió en un prototipo de un tornillo de 45 con diámetro de 2.54 cm y dos zonas de calentamiento de 15 y 10 cm. Las condiciones utilizadas fueron: 15 rpm y 1.1 mm diámetro del dado, la primera zona de calentamiento se ajustó a 60 °C y la segunda a 120 °C (Nieto-Figueroa, 2019). El material extruido se sometió a una fermentación sólida por el método del tempeh.

#### **V.1.1.1.2 Fermentación con *Rhizopus oryzae***

La muestra extrudida se sometió a una fermentación con *Rhizopus oryzae*, adaptando el método de preparación de TEMPEH MX® (Bélgica) y las condiciones sugeridas por Lateef *et al.* (2008).

La muestra extrudida fue hidratada por dos horas hasta obtener un porcentaje de humedad del 69 % v/v y se colocó en autoclave por 15 min a 121 °C. Se dejó enfriar hasta que la muestra obtuvo una temperatura de 30 a 35 °C y se procedió a inocular con *Rhizopus oryzae* (cultivo iniciador). Se utilizó un g del cultivo iniciador/200 g de muestra. Finalmente se procedió a incubar en una bolsa de plástico, con orificios, a 30-34 °C por dos días sin presencia de luz. Durante el proceso, se verificó la formación del micelio y la cobertura de este sobre vaina de acuerdo con lo descrito por Chalid & Rahmawati (2019). Se obtuvieron muestras a 0, 12, 18, 24, 36, 48 horas de fermentación, cada muestra se secó a 40 °C/ 24 h para la inactivación del hongo y se pulverizó y guardó en un lugar fresco y seco, protegida de la luz para análisis posteriores.

### **V.2 Métodos**

#### **V.2.1 Análisis proximal**

Se evaluó la composición proximal de acuerdo con los métodos de la AOAC (2002) para la cuantificación de proteínas, lípidos, cenizas y humedad de las diferentes muestras mencionadas en el apartado V.1.1.1

##### **V.2.1.1 Análisis de cenizas**

El contenido de cenizas se realizó mediante el método 923.03 de la AOAC (2006). Se colocó el crisol a peso constante (80 °C/12 h), se enfrió y procedió a colocar 4 g de la muestra en los crisoles y calcinó en una mufla (550 °C/ 4 h) hasta obtener cenizas de color blanco. Se dejó enfriar los crisoles en el desecador. Por último, se realizaron los cálculos pertinentes y se determinó el porcentaje de cenizas por la siguiente formula (1):

(1)

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{W_f - W_i}{W_m} \times 100$$

*W<sub>f</sub>*: Peso del crisol con ceniza

*W<sub>i</sub>*: Peso del crisol inicial

*W<sub>m</sub>*: Peso de la muestra

### V.2.1.2 Determinación de humedad

La humedad se determinó por el método 934.01 de la AOAC. Se colocó en la estufa a peso constante (105 °C/3 h) y secó en el desecador durante 40 min. Posteriormente se colocaron tres gramos de la muestra en el crisol, se registró su peso y continuó colocando el crisol en la estufa (130 °C/3 h), se dejó enfriar y peso el crisol. Se determinó el porcentaje de humedad por la fórmula (2):

(2)

$$\% \text{ humedad} = \frac{(W_{cv} + W_m) - W_f}{W_m} \times 100$$

*W<sub>cv</sub>*: Peso del crisol vacío

*W<sub>m</sub>*: Peso de la muestra

*W<sub>f</sub>*: Peso final del crisol y la muestra

### V.2.1.3 Determinación de lípidos

Los lípidos totales se determinaron por el método 920.29 descrito en la AOAC (2006). Previo a realizar el protocolo se colocaron los matraces a peso constante (105 °C/3 h), se dejó enfriar en el desecador y se pusieron 3 g de la muestra en papel filtro del No.1; se registró el peso. Se metió la muestra envuelta con papel filtro a los cartuchos de celulosa y se tapó con algodón. Una vez que se prepararon los cartuchos, se colocó el éter de petróleo en los vasos de precipitado (2/3 partes del vaso). Se procedió a iniciar el calentamiento del éter de petróleo, y una vez que empezó a ebulir se contaron 4 horas para retirar del calor. Posteriormente a la extracción se utilizó el solvente, se secó en estufa a 100 °C/30 min y dejó enfriar para finalmente pesar y obtener el porcentaje de lípidos por la siguiente fórmula (3):

(3)

$$\% \text{ lípidos} = \frac{Wf - Wmz}{Wm} \times 100$$

*Wf*: Peso del extracto obtenido

*Wmz*: Peso del matraz

*Wm*: Peso de la muestra

#### V.2.1.4 Determinación de proteína

La determinación de proteína se usó el método Kjeldhal. Se colocó 1 g de muestra desgrasada, 3.5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4 g de CuSO<sub>4</sub> y 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Previamente se encendió y calentó el equipo a 360 °C. Se colocaron los tubos en el digestor durante 3 h o hasta que se presente en la muestra un color verde. Posteriormente se realizó la destilación; se añadieron 100 mL de agua destilada, 50 mL NaOH al 40 % p/v y se obtuvo un destilado con 25 mL de ácido bórico que se implementó como indicador rojo de metilo. Se tituló con NaOH 0.2 N, para finalmente obtener el registro de la cantidad de NaOH.

Se usó la siguiente fórmula (4):

(4)

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(V_{H_2SO_4})(N) - (V_{NaOH})(N)(0.014)(100)}{Wm}$$

$$\text{Factor} = \frac{100 \text{ g Proteína}}{16 \text{ g nitrógeno}} = 6.25$$

$$\% \text{ Proteína} = (\%N)(\text{Factor})$$

### V.2.1.5 Determinación de carbohidratos totales

El porcentaje de carbohidratos totales se obtuvo por diferencia, el cual fue calculado al restar los porcentajes de agua, proteínas, grasas y cenizas de un 100 %, esto de acuerdo con el método FAO/OMS (1998).

## V.2.2 Composición nutracéutica

### V.2.2.1 Determinación de fibra total, fibra soluble e insoluble

La determinación de fibra dietaria se llevó a cabo mediante el método gravimétrico-enzimático descrito en AOAC (2002), el cual la muestra esta desgrasada. Se pesó un gramo de la muestra previamente desgrasada y se adicionaron 50 mL de fosfato y 100 µL de α-amilasa (3,000 U/mL); la muestra se incubó en baño de agua a 95 °C/30 min con una agitación constante cada 5 min; finalmente la muestra se enfrió a 60 °C y se ajustó el pH a 7.5. El siguiente paso consistió en adicionar 100 µL de proteasa (350 U equivalentes de tirosina/mL), se sometió a baño de agua a 60 °C/ 30 min con agitación continua, importante mantener la muestra a 60 °C y ajustar el pH a 4.0. Finalmente se adicionaron 300 µL de amiloglucosidasa 3,300 U/mL y se incubó a 60 °C/30 min con agitación continua. Se pesó y filtró en papel filtro No. 4, después se realizó dos lavados con 15 mL de agua destilada a 60 °C y dos lavados de etanol al 80 % v/v. Por último, el residuo del papel filtro se pesó, este residuo se consideró como fibra insoluble. El porcentaje de fibra insoluble se determina con la siguiente fórmula (5):

(5)

$$\%fibra\ insoluble = \frac{(W_{pm} - W_{ps})}{W_m} \times 100$$

$W_{pm}$ : Peso del filtro con muestra

$W_{ps}$ : Peso del filtro sin muestra

$W_m$ : Peso de la muestra

El residuo obtenido de la fase anterior se puso a precipitar con 4 veces el volumen de la muestra con etanol al 95 % v/v y se filtró la muestra en papel filtro No.4 previamente pesado y realizaron dos lavados con 15 mL de acetona. La muestra se secó por 24 h a 60 °C y procedió a pesar para obtener el porcentaje de fibra soluble por la fórmula previamente mencionada.

Para la determinación de la fibra total, es necesario sumar los porcentajes de fibra soluble e insoluble.

### **V.2.2.2 Fenoles totales**

#### **V.2.2.2.1 Extracción de compuestos antioxidantes**

Se usaron 500 mg de muestra seca y se pesó en matraces individuales. Posteriormente se agregaron 20 mL de acetona-agua- ácido acético (70:29.5:05) en un matraz, el cual se colocó en una placa de agitación a 400 rpm/60 min/20-25 °C en oscuridad. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm/ 4 °C y se colectó el sobrenadante. Se almacenó en viales individuales a -20 °C hasta su uso (Valadez-Carmona, 2017).

Una vez obtenido el extracto, se determinó la cantidad de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. Se colocó un volumen de 0.3 mL de etanol o metanol en las muestras previamente extraídas (30 g/L) en tubos de ensayo, seguido de 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 10 veces con agua y 2 mL de carbonato de sodio al 7.5 % p/v. Finalmente, los tubos se agitaron e incubaron a 50 °C/ 5 min. Se midió la absorbancia de las muestras a 760 nm usando un lector de microplaca y comparó con una curva de calibración de ácido gálico con una concentración de 10 a 70 µg/mL. Los resultados se expresaron en µg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de masa seca de la muestra (Singleton, *et al.*, 1999).

#### **V.2.2.2.2 Fenoles por HPLC**

Con el extracto obtenido previamente, dos mililitros del sobrenadante se filtraron en un filtro para jeringa de 0.45 µm e inyectó en el HPLC (cromatografía líquida de alta resolución, por sus siglas en inglés) Agilent Serie Agilent Serie 1100 (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.). Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C8 (Agilent Technologies, 4.6 x 250 mm, 5.0 micras). Se inyectaron 20 µL de cada sobrenadante de la matriz por diferente método para el análisis por HPLC. Para la fase móvil se usó, ácido fórmico al 3 % v/v en H<sub>2</sub>O y metanol grado HPLC en una tasa de flujo de 1 mL/1min con una relación 1:1 v/v. La elución se realizó con un gradiente que iniciará al 98 % de la fase A y el 2 % de la fase B, a los 20 min, se alcanzó el 68 % de la fase A y el 32 % de la fase B. Después de 30 min, se alcanzó el 60 % de la fase A y el 40 % de la fase B. Finalmente, después de 40 min, se alcanzó el 5 % de la fase A y el 95 % de la fase B y se mantuvo con un flujo isocrático durante 5 min de la fase B. La lectura del detector se ajustó a 278 nm (Belščak et al., 2009).

#### **V.2.2.3 Flavonoides totales**

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

#### **V.2.2.4 Taninos condensados**

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

### **V.2.2.5 Determinación de teobromina**

La determinación de la capacidad antioxidante, se realizó mediante el ensayo de decoloración 2,2-difenil-1-picrilhidracilo mediante lo propuesto por Fukomoto & Mazza (2000) en microplaca. En principio se añadieron 20  $\mu$ L de extracto etanolico y 200  $\mu$ L de solución DPPH (24 mg en 100 mL de metanol) en una microplaca, las muestras fueron por triplicado. Después se preparó un control (20  $\mu$ L de metanol y 200  $\mu$ L de DPPH). Posteriormente las muestras se leyeron cada 10 min durante 90 min a una longitud de onda de 540 nm en un lector de Elisa. La placa se mantuvo en la oscuridad y a temperatura ambiente entre lecturas.

Se elaboró una curva de calibración de trolox (TEAC) de 0 – 800  $\mu$ M y los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente de trolox en  $\mu$ M /g de muestra.

## **V.2.3 Capacidad antioxidante**

### **V.2.3.1 Método DPPH**

Para la determinación de la capacidad antioxidantes, se realizó mediante el ensayo de decoloración 2,2-difenil-1-picrilhidracilo mediante lo propuesto por Fukomoto & Mazza (2000) en microplaca. En principio se añadieron 20  $\mu$ L de extracto etanolico y 200  $\mu$ L de solución DPPH (24 mg en 100 mL de metanol) en una microplaca, las muestras fueron por triplicado. Después se preparó un control (20  $\mu$ L de metanol y 200  $\mu$ L de DPPH). Posteriormente las muestras se leyeron cada 10 min durante 90 min a una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplaca. La microplaca debe mantenerse en oscuridad y a 20-25 °C. temperatura ambiente entre lecturas.

Se elaboró una curva de calibración de trolox (TEAC) de 0 – 800  $\mu$ M y los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente de trolox en  $\mu$ M /g de muestra.

### **V.2.3.2 Método ABTS**

La determinación por el método ABTS 2,2- azinobis(3- etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico) se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Nenadis *et al.* (2004). La cual consistió en preparar una solución acuosa 7 mM de ABTS con volumen de 5 mL y una solución de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> a 140 mM con volumen de 88 µL, ambas soluciones se mezclaron y se esperó 12 h en un cuarto oscuro para que se genere el radical y este protegido de la luz. Después de la incubación, se realizó una dilución de 500 µL de la solución preparada con 20- 25 mL de etanol, esta solución se leyó a 734 nM. En la placa se adicionaron 20 µL del extracto etanólico, un control con 20 µL de metanol y 230 µL de ABTS en cada pozo. La placa se mantuvo en la oscuridad y temperatura de 20-25 °C. Los valores obtenidos se expresaron como µM equivalentes de trolox/g de muestra.

### **V.2.4 Digestión gastrointestinal *in vitro* y determinación de la bioaccesibilidad.**

La digestión gastrointestinal se empleó de acuerdo con lo descrito por Campos-Vega *et al.*, (2015). Se contó con la participación de sujetos sanos y utilizaron intestinos de rata, por lo que se sometió la presente investigación al comité de Bioética de la Facultad de Química de la UAQ (No. De oficio CBQ20/036).

La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y flavonoides provenientes de la vaina de cacao se determinó cuantificando en los fluidos de cada etapa de la digestión gastrointestinal. Para esto se siguió las técnicas descritas previamente en los apartados V.2.2.2.2, V.2.2.3 y V.2.2.4. Además, se determinaron la capacidad antioxidante de los fluidos derivados de cada etapa de la digestión gastrointestinal *in vitro* de acuerdo con los métodos previamente descritos en el apartado V.2.3.

#### **V.2.4.1 Fase bucal**

Cada voluntario donó 5 mL de saliva y mezcló con 1 g de la muestra (VSF/VF48h) y 5 mL de agua destilada. Se simularon las condiciones de la boca colocando la

muestra en agitación por 3 min a 37 °C. Se realizó el mismo procedimiento para el blanco, pero únicamente se utilizó agua destilada con la respectiva saliva.

#### **V.2.4.2 Fase gástrica**

Al volumen final de la fase anterior se le añadieron HCl y pepsina 0.055 g (0.7 FIP-U/mg), se disolvieron en 0.94 mL de HCl 20 nM e incubó en agitación durante 2 h a 37 °C.

#### **V.2.4.3 Fase digestiva**

Para la simulación de la fase del intestino delgado, se preparó un extracto intestinal por disolución de 3 mg de hiel de buey y 2.6 mg de pancreatina, los cuales se disolvieron en 5 mL de solución de Krebs-Ringer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub> y 11 mM glucosa). La suspensión se transfirió a un recipiente que contenía el saco intestinal invertido. La solución se añadió a cada muestra y al blanco.

#### **V.2.5 Manejo de los animales para la técnica de saco intestinal invertido**

Se utilizaron ratas macho tipo Wistar sanas. Se mantuvieron en condiciones de acuerdo con la NOM-062-200-199 y se controló la humedad, ciclos día/ noche de 12/12 h, temperatura adecuada y en condiciones aceptables de limpieza y ventilación.

##### **V.2.5.1 Eutanasia de los animales y preparación del saco intestinal**

Para el sacrificio, las ratas inicialmente fueron anestesiadas con CO<sub>2</sub>. Después, se cortó la aorta para una muerte instantánea. Posteriormente se realizó una incisión abdominal para la obtención del intestino delgado 20-25 cm y segmentó con una longitud de 6 cm y colocó en la solución de Krebs-Ringer, gasificado con CO<sub>2</sub> a 37 °C. Después los segmentos removidos se lavaron en la misma solución e invirtieron con una varilla metálica y llenaron con 2 mL de la solución y ligaron por ambos extremos. El intestino invertido se incubó en baño de agua a 37 °C /2 h/ 80 ciclos por

min/ atmósfera anaeróbica. Finalmente, los sacos se retiraron a 15, 30 y 60 minutos para obtener la fracción digerida (muestra dentro del saco) y la fracción no digerida (muestra fuera del saco), esta última se sometió a la fermentación colónica.

#### **V.2.5.1.1 Manejo de los animales después de la eutanasia**

Los restos de los animales se manejaron de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

#### **V.2.6 Fermentación colónica *in vitro***

El método de fermentación colónica se realizó de acuerdo con Campos-Vega *et al.* (2009). Se emplearon 100 mg de inulina como control positivo de carbohidrato fermentable. Se usó un inculo fecal humano como fuente representativa de la microbiota colónica, la cual será obtenido de individuos sanos con normopeso, sin patologías gastrointestinales y sin consumo de antibióticos en los últimos tres meses previos a la muestra.

Se prepararon en tubos estériles 9 mL de cultivo basal, el cual se compone (g/L): agua peptonada 2.0, extracto de levadura 2.0, cloruro de sodio 0.1, fosfato dibásico de potasio 0.04, fosfato monobásico de potasio 0.04, sulfato de magnesio heptahidratado 0.01, cloruro de calcio dihidratado 0.01, carbonato de sodio 2.0, cisteína HCl 0.5, sales biliares 0.5, Tween-80 2 mL y hematina 0.2 g.

Los tubos se sellaron y mantuvieron en una atmósfera anaeróbica que contenía una mezcla de gases  $H_2/CO_2/N_2$  durante 24 h. Se homogenizaron 3 g de materia fresca con 27 mL de solución de  $Na_2HPO_4$  a 1 M. Los tubos con cultivo basal se inocularon con 1 mL del homogenizado fecal y se adicionó la fracción no digerida proveniente de la muestra (0.5 g de sólido y 0.5 de líquido) e inulina (100 mg). Se agitaron los tubos con vortex durante 30 segundos e incubaron en baño de agua a 37 °C. Durante la fermentación se determinaron el pH y los AGCC a las 0, 6, 12 y 24 h. La fermentación se detuvo mediante centrifugación y las muestras obtenidas se almacenaron a – 70 °C hasta su análisis.

### V.2.6.1 Cuantificación de los AGCC por GC-MS

Las muestras de la fermentación colónica *in vitro* se analizaron de acuerdo con Zamora-Gasga *et al.* (2015) a través de un detector selectivo de masas Agilent 5975C VL acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), equipado con una columna capilar DB-5MS (60 mx 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ; Agilent). Se utilizó helio (caudal, 1 mL/min) como gas portador. Los AGCC se cuantificaron utilizando curvas estándar de ácidos acético, propiónico y butírico (Sigma Aldrich). Se realizó el análisis de datos utilizando el software MSD ChemStation (Agilent G1701EA versión E.02.00.493). Los ácidos grasos de cadena corta se identificaron comparando los espectros de masas con los de la biblioteca NIST / EPA / NIH (NIST, EE. UU.) y el tiempo de retención con los estándares. Los resultados se expresaron en  $\text{mmol L}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{g}$  de muestra.

El radio molar se calculó utilizando la siguiente ecuación (6):

(6)

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

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

El índice de fermentabilidad (IF) se calculó de la siguiente manera (7):

(7)

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

### V.2.7 Análisis metabólico

Las señales espectrométricas de cualquier molécula madre o metabolito fueron identificadas y confirmadas por la biblioteca espectral de masas NIST / EPA / NIH. Los metabolitos se analizaron utilizando la plataforma MetaboAnalyst para el análisis e interpretación metabólicos (<https://www.metaboanalyst.ca>)

### **V.2.8 Análisis estadístico**

Todas las mediciones se llevaron a cabo como experimentos independientes al menos por triplicado y los datos experimentales se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE). Se realizaron comparaciones múltiples usando ANOVA unidireccional y la prueba de Tukey post hoc. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software JMP 10.0 y las diferencias estadísticas se consideraron  $p \leq 0.05$ . Se utilizó la correlación de rango de Spearman (r) para buscar cualquier relación entre polifenoles y capacidad antioxidante.

## **VI. Resultados y discusión**

### **VI.1 Análisis morfológico**

Actualmente el fruto del cacao se clasifica en tres diferentes linajes: Criollo, Forastero y Trinitario, esta clasificación se da por las características fenotípicas del fruto, las cuales se definen a través de los descriptores morfológicos propuestos por la Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Los descriptores morfológicos se clasifican en cualitativos y cuantitativos, estos últimos son: rugosidad, color, tamaño y forma. Cabe mencionar que los rasgos morfológicos varían de acuerdo con el lugar de origen y su principal función es conocer el tipo de especie, análisis del fenotipo/genotipo y la estandarización y calidad en los cultivos (Sudjud , Mahmud & Djafar, 2019).

En la **Tabla 10** se definen las características morfológicas cuantitativas que se seleccionaron. Los frutos de cacao que se utilizaron concuerdan con los frutos criollos utilizados como estándares por Ramírez-Guillermo *et al.* (2018), lo que confirman un lugar de origen, una especie y una procedencia de una plantación homogénea del fruto utilizado en la presente investigación. Mientras que, el peso total de las semillas, número total de semillas y peso de la vaina indican que el fruto del cacao del presente estudio se encontraba en un estado de maduración fisiológica media, adecuado para su procesamiento industrial, de acuerdo con lo sugerido por Rojas *et al.* (2020).

### **VI.2 Determinación de los tiempos de fermentación sólida tipo tempeh**

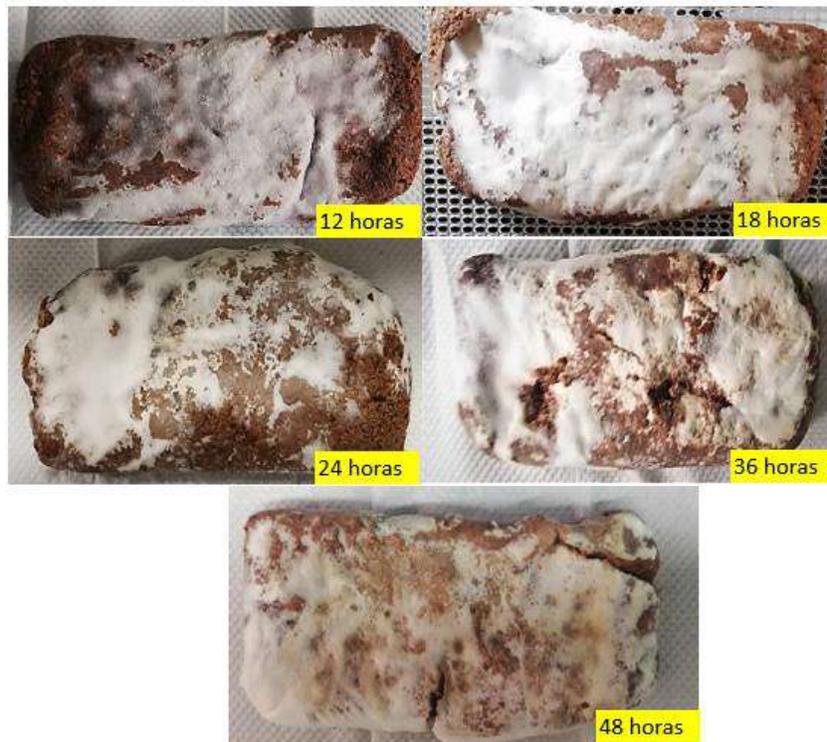
Posteriormente a la inoculación de la fermentación sólida tipo tempeh, de acuerdo a lo mencionado en los materiales y métodos, se procedió a determinar el tiempo de fermentación de acuerdo con el crecimiento del micelio siguiendo lo sugerido por Chalid, Hermanto & Rahmawati (2018). A las 12, 18 y 24 horas se mostró un crecimiento del micelio limitado, y fue hasta las 36 horas donde el micelio se expandió; el proceso continuó hasta obtener un recubrimiento abundante del micelio en la superficie de la vaina de cacao, mostrando así un crecimiento adecuado

a las 48 horas (**Figura 8**); posteriormente a las 72 horas el micelio en la vaina de cacao mostraba una pigmentación de color negra dando un aspecto organoléptico negativo. Cabe mencionar que el tiempo de fermentación máximo utilizado en esta investigación es menor a lo reportado por otros estudios en la vaina de cacao (Lateef *et al.*, 2008; Alemawor, Dzogbefia, Oddoye, & Oldham 2009; Sriherwanto *et al.* 2016; Olugosi *et al.*, 2019).

**Tabla 10.** Rasgos morfológicos cuantitativos del fruto del cacao.

Rasgo morfológico	Fruto de cacao (n=15)	
	Intervalo	Media
<b>Peso total del fruto (g)</b>	340 – 500	427 ± 44.48
<b>Longitud (cm)</b>	12.5 - 15.5	14 ± 0.7
<b>Ancho central (cm)</b>	7.4 - 8.5	8 ± 0.35
<b>Volumen (mL)</b>	350 – 600	440 ± 66.01
<b>Número total de semillas</b>	35 – 48	41 ± 3.96
<b>Pesos total semillas (g)</b>	70 – 110	95 ± 11.25
<b>Peso total pulpa (g)</b>	10 – 90	78 ± 20.77
<b>Peso total vaina (g)</b>	160 – 300	249 ± 35.02

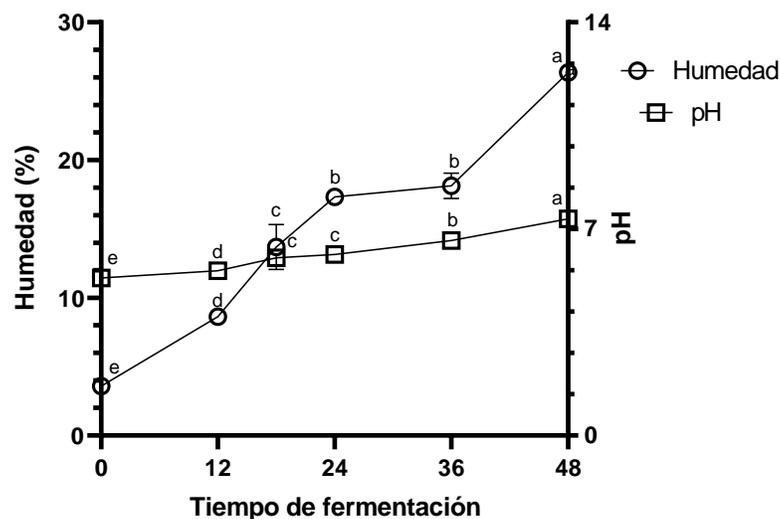
El tiempo de fermentación determinado en la presente investigación fue similar a lo reportado por Erkan *et al.*, (2020), donde se establecieron tiempos óptimos de fermentación entre las 24 y 48 horas en diferentes leguminosas, sugiriendo que los tiempos de fermentación pueden variar de acuerdo con el tipo de materia prima. Otros puntos que considerar y que tienen efecto en el crecimiento del micelio, y por ende acortar o a largar los tiempos de fermentación son: la cantidad del inóculo y la temperatura. Para la vaina de cacao se utilizó 1 g de inóculo ( $1 \times 10^6$  esporas) y una temperatura de 34 °C, similar a lo reportado por Cantabrana, Perise & Hernández (2015) y Nelofer *et al.*, (2018), quienes señalan que un inóculo óptimo para un crecimiento del micelio no mayor a las 36 horas es entre  $1 \times 10^6$  –  $1.5 \times 10^6$  y una temperatura entre 30 - 34 °C.



**Figura 7.** Vaina de cacao a diferentes tiempos de fermentación.

### **VI.3 Cambios en la humedad y pH durante la fermentación tipo tempeh**

Para determinar los posibles cambios en la matriz alimentaria debidos al crecimiento del hongo se evaluaron cambios en el pH y humedad (**Figura 9**). La humedad mostró un incremento significativo a las 48 horas de fermentación (26.35 %) respecto a las 0 horas (3.59 %) coincidiendo con lo reportado por otros autores (Chalid, Hermanto & Rahmawati, 2018; Wang *et al.*, 2018; Nelofer *et al.*, 2018), quienes indican que el cambio en la humedad es debido a la producción de agua libre por el proceso metabólico que se genera durante la fermentación sólida para producir el tempeh. De la misma manera se observó un aumento del pH durante el proceso de fermentación, iniciando con un pH de 5.35 y finalizando con un pH de 7.3. Un cambio similar en el pH fue reportado por Erkan *et al.* (2020) durante la producción de tempeh con diferentes leguminosas, atribuyendo el aumento del pH a la producción de amoníaco; sin embargo, de acuerdo con el tipo de microorganismo el pH puede cambiar en el proceso de fermentación.



**Figura 8.** Porcentaje de humedad y cambios de pH de la vaina de cacao en diferentes tiempos de fermentación.

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresados como porcentaje en base seca. Letras diferentes expresan diferencia significativa entre tiempos de fermentación ( $p=0.05$ , por prueba de Tukey).

#### VI.4 Composición química de la vaina de cacao durante el proceso de fermentación

En la **Tabla 11** se presenta la composición proximal (carbohidratos, proteínas, lípidos, cenizas) y el contenido de fibra total, soluble e insoluble de la vaina de cacao sin fermentar (VSF) y fermentada (VF) a diferentes tiempos de fermentación.

De manera general se puede observar un cambio en los diferentes componentes del análisis proximal, mostrando un efecto de la fermentación sobre la vaina de cacao. De acuerdo con Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah (2018) la composición química de la vaina es diferente y se modifica de acuerdo con el tratamiento al que se somete.

El contenido de carbohidratos disminuyó conforme avanzaron las horas de fermentación. Sin embargo, la VSF (muestra extrudada-esterilizada), la VF12h y la VF18h mostraron un mayor contenido de carbohidratos sin diferencia significativa respecto a las demás muestras. De acuerdo con Offiah, Kontogiorgos & Falade

(2018) y Dang & Vasanthan (2018) esto se podría atribuir al pretratamiento de la extrusión y el calentamiento en la autoclave previo a la fermentación, ambos procesos originan una modificación en la estructura rígida de las paredes celulares aumentando el contenido de carbohidratos. Por otro lado, se presentó una disminución del contenido de carbohidratos a las 24 horas (de 4.18 a 6.37 %), a las 36 horas y finalmente una disminución significativa de 8.8 % a las 48 h en la VSF. Esto mismo se observó por Nelofer *et al.* (2018) a las 36 horas, quién menciona que la disminución de carbohidratos se relaciona con la disminución de fibra, este fenómeno puede variar de acuerdo con la matriz alimentaria y se le atribuye a la acción enzimática como algunas carbohidratasas propias de *Rhizopus oryzae*, originando una degradación de las moléculas de mayor peso molecular.

**Tabla 11.** Composición química de la vaina de cacao fermentada a diferentes tiempos.

Concentración (%)	Tiempos de fermentación (horas)					
	0 (VSF)	12	18	24	36	48
<b>Carbohidratos</b>	87.14 ± 2.11 <sup>a</sup>	86.79 ± 0.14 <sup>a</sup>	86.44 ± 0.50 <sup>a</sup>	82.96 ± 0.02 <sup>ab</sup>	80.77 ± 1.62 <sup>bc</sup>	78.34 ± 1.28 <sup>c</sup>
<b>Fibra total</b>	66.70 ± 0.70 <sup>ab</sup>	69.32 ± 0.92 <sup>a</sup>	69.19 ± 2.38 <sup>a</sup>	66.49 ± 2.07 <sup>ab</sup>	64.43 ± 2.22 <sup>b</sup>	64.89 ± 0.53 <sup>ab</sup>
<b>Fibra insoluble</b>	61.12 ± 0.05 <sup>ab</sup>	64.28 ± 0.86 <sup>a</sup>	64.34 ± 2.45 <sup>a</sup>	62.01 ± 1.50 <sup>ab</sup>	60.27 ± 1.58 <sup>b</sup>	58.81 ± 0.78 <sup>b</sup>
<b>Fibra soluble</b>	5.58 ± 0.73 <sup>ab</sup>	5.03 ± 0.26 <sup>ab</sup>	4.85 ± 0.47 <sup>ab</sup>	4.47 ± 0.60 <sup>ab</sup>	4.15 ± 0.63 <sup>b</sup>	6.06 ± 0.71 <sup>a</sup>
<b>Proteína</b>	4.87 ± 0.31 <sup>d</sup>	4.99 ± 0.08 <sup>d</sup>	5.63 ± 0.19 <sup>d</sup>	6.84 ± 0.48 <sup>c</sup>	8.84 ± 0.33 <sup>b</sup>	9.73 ± 0.19 <sup>a</sup>
<b>Lípidos</b>	1.49 ± 0.99 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.40 ± 0.22 <sup>b</sup>	2.54 ± 0.46 <sup>a</sup>	3.21 ± 0.98 <sup>a</sup>	3.71 ± 0.93 <sup>a</sup>
<b>Cenizas</b>	6.50 ± 0.93 <sup>a</sup>	6.90 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.53 ± 0.46 <sup>a</sup>	7.66 ± 0.11 <sup>a</sup>	7.18 ± 0.40 <sup>a</sup>	8.22 ± 0.19 <sup>a</sup>

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes por triplicado ± DE y son expresadas como porcentaje en base seca. Letras diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre muestras (p=0.05, por prueba de Tukey).

El contenido de fibra total de la VSF es mayor (7.6 %) a lo reportado por Nieto-Figueroa *et al.* (2019) a pesar de que existe un mismo pretratamiento como la extrusión, el efecto de vapor bajo presión que se presenta en la esterilización, previo a inocular, pudo influir en el contenido de fibra total en la VSF, lo que ha sido atribuido al incremento de la fracción soluble (Dang & Vasanthan 2018).

Respecto a la VSF, la VF12h y VF18h presentaron un incremento significativo

de 2.62 y 2.49 %, respectivamente, de la fibra total, además de 3.16 y 3.22 % de la fracción insoluble respectivamente. Posteriormente una disminución significativa de 2.7 % de fibra total y 2.3 % de fibra insoluble a las 24 horas, continuando esta tendencia a las 36 y 48 horas de fermentación. Este mismo fenómeno de aumento y disminución del contenido de fibra a través de las horas de fermentación ha sido reportado previamente por Oliveira, *et al.* (2010) y Kupski *et al.* (2012) atribuyendo el aumento del contenido de fibra total e insoluble en las primeras horas de fermentación al crecimiento del hongo. Los hongos filamentosos como *R. oryzae* producen de manera intrínseca otros polisacáridos como celulosa y quitinas, ambas propias de su pared celular, las cuales son similares a las estructuras del sustrato sólido en el que se desarrollan. Mientras que la disminución del contenido de fibra total e insoluble después de un tiempo prolongado de la fermentación se asocia a la habilidad de *R. oryzae* para degradar componentes de la pared celular del sustrato (vaina de cacao) a través de su sistema enzimático, es decir, secreción de enzimas que degradan celulosa y hemicelulosa. Esto fue observado también por Alemawor, Dzogbefia, Oddoye, & Oldham (2009) en donde usaron vaina de cacao con el hongo filamentoso *Pleurotus ostreatus*. De igual manera se informó esta tendencia por Lateef *et al.* (2008) y Olugosi *et al.* (2019) quienes usaron la vaina de cacao con *R. stolonifer*.

En cuanto al contenido de fibra soluble hay una disminución conforme el tiempo de fermentación avanza; sin embargo, a las 48 horas el contenido de fibra soluble es mayor, sin diferencia significativa, a las demás muestras. De Lima, *et al.* (2021) a través del uso de *R. oligosporus* en un subproducto (anacardo) caracterizado por ser rico en fibra insoluble reportaron un incremento del 20 % de fibra soluble después de las 32 horas de fermentación. También Vong, Hua & Liu, (2018) mencionaron tener un incremento del contenido de fibra soluble del 109 % y una disminución de fibra insoluble del 28 %, utilizando *R. oligosporus*. La matriz utilizada (okara) se caracterizaba por ser rica en fibra insoluble, atribuyendo este cambio en la composición química a las enzimas fúngicas, las cuales descomponen la estructura lignocelulósica del sustrato (vaina de cacao) y se liberan oligosacáridos

y disacáridos originando una bioconversión de fibra insoluble a fibra soluble. Das, Lonappan, Brar & Verma (2015) de igual manera reportaron bioconversión de las fracciones de fibra en el orujo de manzana a través de la fermentación sólida por *R. Oryzae*. Otros autores también evidencian el uso de la fermentación sólida como alternativa para el procesamiento de diferentes subproductos que se caracterizan por tener un alto contenido de fibra insoluble, teniendo como ventaja una menor destrucción de la estructura de la fibra y menor contaminación con el uso de sustancias químicas (y Postigo, *et al.* 2021; Acosta-Estrada, *et al.* 2019; Guo, Kang, Bai, & Xu 2018; Queiroz-Santos *et al.* 2018; Zhao, Guo & Zhu, 2017).

Sobre el contenido de proteína, la VSF mostró un contenido menor del 2% a lo reportado por Nieto-Figueroa *et al.* (2019). De acuerdo con Offiah, Kontogiorgos & Falade (2018) y Dang & Vasanthan (2018) de igual manera que con el contenido de carbohidratos y fibra, ambos pretratamientos previos a la fermentación originan un menor contenido de proteína debido a la desnaturalización. Sin embargo, el contenido de proteína incrementa conforme las horas de fermentación avanzan, mostrando una diferencia significativa a las 24, 36 y 48 horas. Lo anterior concuerda con Lateef, *et al.* (2008), Alemawor, Dzogbefia, Oddoye, & Oldham (2009), Sriherwanto, *et al.* (2016) y Olugosi *et al.* (2019), en donde usaron la vaina de cacao como sustrato y el procesamiento de fermentación sólida. Este incremento de proteína se atribuye al crecimiento de las hifas del hongo y se caracterizan por ser de alto valor biológico (Lateef, *et al.* 2008; Oliveira, *et al.* 2010; Kupski, *et al.* 2012; Olugosi, *et al.* 2019).

Por otro lado, la vaina sin fermentar mostró un contenido menor de lípidos con valores cercanos a lo reportado por Vriesmann, Amboni & Petkowicz (2011), Chun *et al.* (2016), Nguyen & Nguyen, (2017), pero contrario a lo reportado por Nieto-Figueroa *et al.* (2019), en donde el valor reportado es 50 % menor a la VSF a pesar de tener la extrusión como procesamiento similar con este estudio. Esta diferencia se le puede atribuir al tipo y cantidad de procesamientos térmicos y mecánicos reportados por Nieto-Figueroa *et al.* (2019), los cuales pueden contribuir a la

peroxidación lipídica. Posteriormente de las 0 horas, se presentó una disminución no significativa del 12 y 6 % a las 12 y 18 horas, respectivamente; de acuerdo con Lateef *et al.* (2008), Kupski *et al.* (2012) y Oliveir, *et al.* (2010) la disminución es debido a la síntesis micelial o de quitina, esta última es un componente principal de la pared celular de las hifas de los hongos filamentosos. Sin embargo, la VF36h y VF48h presentaron un incremento del 115 y 148 % del contenido de lípidos. De acuerdo con dos Santos Oliveira *et al.* (2011) y Lennartsson, Edebo & Taherzadeh (2014), señalan que *R. oryzae* entre otros hongos filamentosos tienen la capacidad de sintetizar sus propios ácidos grasos. De igual manera, se presentó un incremento del contenido de cenizas conforme el tiempo de fermentación avanza, mostrando un mayor contenido y diferencia significativa a las 24 y 48 horas, lo cual concuerda con lo reportado previamente por Kupski *et al.* (2012) en el salvado de arroz y Lateef *et al.* (2008), Alemawor, Dzogbefia, Oddoye, & Oldham (2009) ambos usando la vaina de cacao y mencionando que el aumento observado de cenizas probablemente se debió a la disminución de algunas fracciones orgánicas de la vaina durante el proceso de bioconversión.

#### **VI.5 Composición nutraceútica de la vaina de cacao durante el proceso de fermentación**

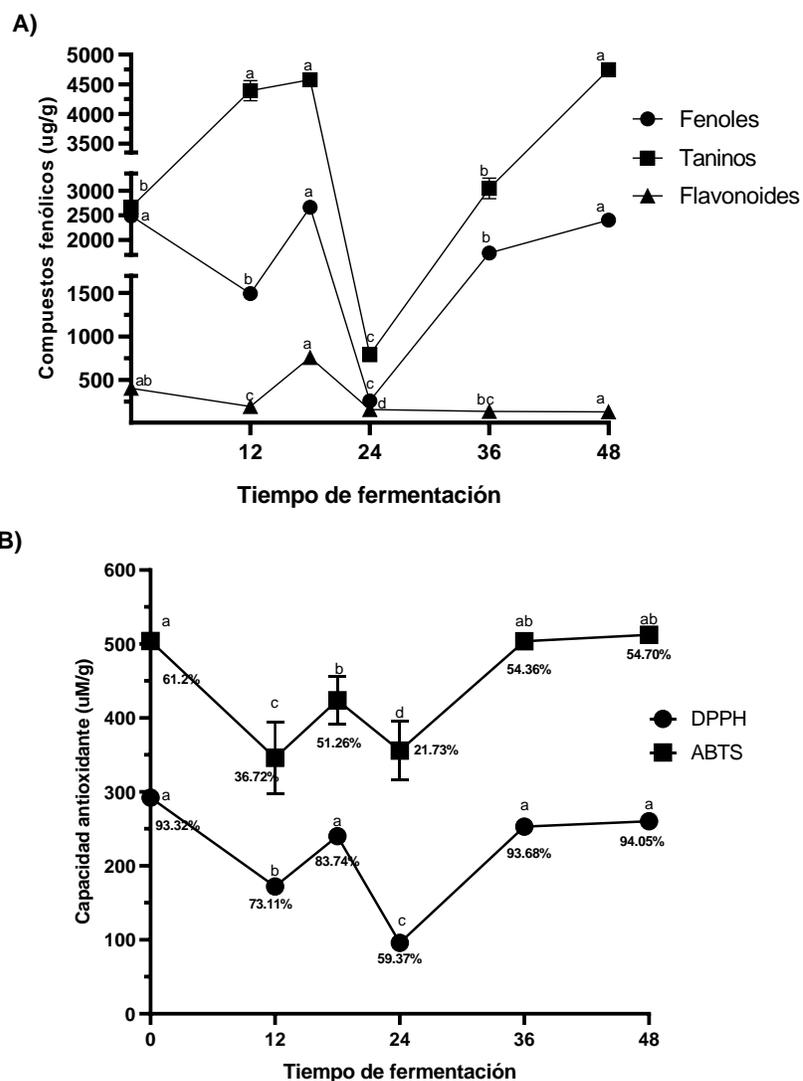
En la **Figura 2** se presenta el contenido de fenoles, taninos y flavonoides totales durante el proceso de fermentación, observándose cambios conforme los tiempos de fermentación en la vaina de cacao avanzan. Se presentó una disminución inicial de fenoles y flavonoides y un aumento de taninos; posteriormente se observó un incremento a las 18 horas en todos los grupos de compuestos fenólicos y a las 24 horas de fermentación una disminución significativa, concluyendo a las 48 horas con un incremento de fenoles y taninos además de la disminución de flavonoides.

Kupski *et al.* (2012), reportaron está misma tendencia en la fermentación sólida del salvado de arroz respecto al contenido de fenoles totales, mostrando una variación en las primeras horas y un incremento significativo en la últimas horas de fermentación (120 h), atribuyendo este comportamiento a la descomposición de la

lignina ocasionando una liberación de fenoles de la pared celular. Coincidiendo así con Das *et al.* (2015), sin embargo, el tiempo de fermentación fue mayor y se utilizó pulpa de manzana, este aumento de fenoles totales se debe de igual manera al grupo enzimático y oxidativo lignolítico de los hongos filamentosos como *R. oryzae* para la degradación del anillo de fenilo. Por otra parte, la disminución repentina es dada por la hidrólisis de compuestos antioxidantes en moléculas más pequeñas o por que se encuentran ligados a componentes de la matriz alimentaria, dificultando así su lectura, además de proponer un tiempo de 36 a 48 h para empezar a notar cambios significativos en el contenido de compuesto antioxidantes (Buen-Rostro *et al.*, 2017).

El grupo de taninos condensados presentó el mismo comportamiento que los fenoles, sin embargo, fue el polifenol que en mayor concentración se reportó. Esto debido a que los hongos filamentosos se caracterizan por ser microorganismos productores de taninas por excelencia (Kumar, Sharma & Singh 2007; Altop, 2019; Londoño-Hernández *et al.*, 2020). Otro factor que considerar es lo reportado por Altop (2018), quien menciona que los taninos condensados son polifenoles unidos a las proteínas y a la celulosa, conforme la fermentación avanza estos son liberados por la hidrólisis ocasionada a la pared celular y a las proteínas de la matriz alimentaria.

A comparación de los otros compuestos fenólicos, los flavonoides mostraron el mismo comportamiento que los anteriores, pero fueron los compuestos de menor abundancia. Gebru & Sbhatu (2020) y Adebo *et al.* (2018), reportan que la disminución repentina es debido a una hidrólisis de los flavonoides y la presencia de un bajo contenido es por la alta actividad del polifenol oxidasa secretada por una amplia gama de cepas de hongos filamentosos. De acuerdo con lo reportado por Buen-Rostro *et al.* (2017) se pueden proponer a los hongos filamentosos como un microorganismo para el procesamiento de subproductos lignocelulósicos como la vaina de cacao. A pesar de no mostrar una diferencia significativa entre tiempos de fermentación, se presentó un cambio en la composición nutracéutica, por lo que se propone llevar a la vaina de cacao a un mayor tiempo de fermentación e incluso una combinación con otras tecnologías (Nieto-Figueroa *et al.*, 2019), las cuales podrían ayudar al aumento significativo de compuestos antioxidantes.



**Figura 9.** Composición nutracéutica (a) y capacidad antioxidante (b) de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada a diferentes tiempos.

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresadas como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico, (+) catequina, rutina por g de muestra para fenoles, taninos y flavonoides respectivamente. La capacidad antioxidante es expresada como como  $\mu\text{M}$  eq. Trolox/g de muestra Letras minúsculas diferentes expresan diferencia significativa entre muestras ( $p=0.05$ , por prueba de Tukey).

Por otra parte, la capacidad antioxidante mantuvo una misma variación a través de las horas de fermentación, a pesar de no haber diferencia significativa, a las 24 horas se presentó una capacidad antioxidante menor y una mayor a las 36 y 48 horas, mostrando una correlación de la capacidad antioxidante de DPPH y ABTS ( $r=0.915$ ,  $p=0.000$ ;  $r=0.834$ ;  $p=0.001$ ) con los fenoles totales. Esta misma variación obtenida en la capacidad antioxidante durante la fermentación sólida se ha reportado

por otros autores. Lateef *et al.* (2008) reportaron valores por debajo y un aumento de la capacidad antioxidante (15.74 - 37.27  $\mu\text{M}$  eqTrolox/g) a las 48 horas de fermentación en vaina de cacao. De la misma manera Kupski *et al.* (2012) reportaron un mayor porcentaje de inhibición de DPPH del 92 % a las 96 horas de fermentación, atribuyendo esta capacidad antioxidante al aumento del contenido de fenoles. Sin embargo, Dulf *et al.* (2017) al comparar dos cepas de hongos (*R. oligosporus* y *A. niger*) en hueso de durazno reportaron un aumento del porcentaje de inhibición al segundo día del 62 al 85 % y posteriormente una disminución del 85 al 65 % al 6to día y no encontraron correlación alguna; concluyeron que las variaciones pueden ser dadas por el tipo de cepa y por la matriz alimentaria que se utiliza como sustrato. Cabe mencionar que la concentración de compuestos y capacidad antioxidante difiere de acuerdo con la matriz alimentaria, en nuestro caso el tipo de cultivo y lugar de procedencia del fruto de cacao como también el método de extracción y procesamiento aplicado a la matriz alimentaria podrían afectar (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018; Nieto-Figueroa *et al.*, 2019).

#### **VI.6 Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de la vaina sin fermentar y fermentada a las 48 horas**

La bioaccesibilidad es la liberación de compuestos presentes en la matriz alimentaria a través del tracto gastrointestinal que contribuye a la biodisponibilidad para finalmente generar una respuesta fisiológica (Saura-Calixto, Serrano & Goñi, 2007). Hay alimentos o subproductos los cuales tiene que ser previamente procesados con la finalidad de mejorar la accesibilidad de los componentes nutraceuticos debido a su característica química que imposibilita su liberación y absorción. La fermentación sólida de manera general es un bioprocesamiento que origina un cambio en la composición nutraceutica, sin embargo, estos estudios solamente se centran en la composición y bioactividad, pasando por alto los beneficios a la salud (Roasa, De Villa, Mine & Tsao, 2021).

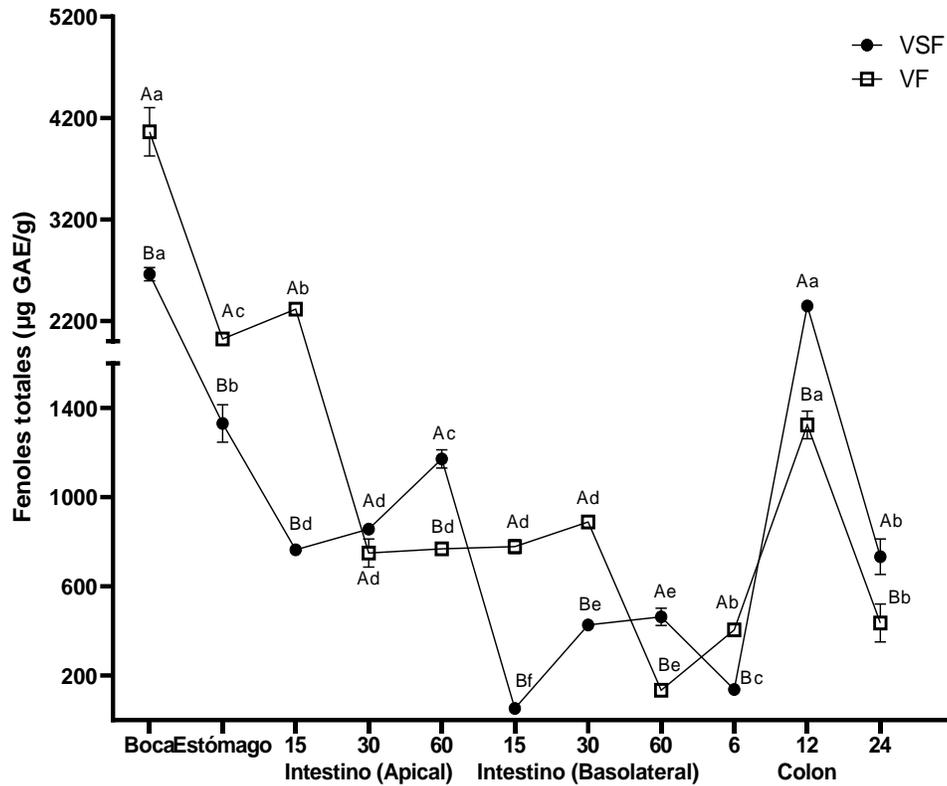
Son escasos los artículos en donde reportan el efecto de la fermentación sólida sobre la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de matrices alimentarias diferentes. Respecto a la vaina de cacao, actualmente solo Nieto-Figueroa *et al.*

(2019) han reportado la bioaccesibilidad de la vaina de cacao a través de un sistema gastrointestinal *in vitro*. Cabe señalar, que la presente investigación es el primer estudio que evaluó la bioaccesibilidad de la vaina de cacao fermentada.

En la **Figura 10** se muestra que la bioaccesibilidad de los fenoles en la etapa de la boca. Entre la VSF y VF se presentó diferencia significativa, e inclusive de acuerdo con el contenido inicial, la VF en la boca casi duplica el contenido, con un valor de bioaccesibilidad del 169 %. Estos datos sugieren que la fermentación tipo tempeh origina cambios en la matriz, reflejados en la bioaccesibilidad de fenoles, e inclusive el procesamiento por el hongo origina una posible síntesis de compuesto bioactivos, como ha sido sugerido previamente (Roasa, De Villa, Mine & Tsao, 2021). A pesar de los posibles efectos de la fermentación tipo tempeh de la vaina, también debe considerarse que la bioaccesibilidad en la boca está influida también por el proceso mecánico de la masticación, que origina una liberación de estos compuestos como también la formación de complejos de compuestos fenólicos (Capuano, 2017).

Después de la fase bucal, la matriz alimentaria compuesta de carbohidratos no digeribles como lo es la vaina de cacao pasa a través del estómago con un ligero cambio en su composición debido al HCl y enzimas gástricas, esta obtiene una consistencia viscosa y más o menos permeable dependiendo de los polímeros que la conforman. Nieto-Figueroa *et al.* (2019) reportaron tener una ausencia del contenido de compuestos fenólicos, atribuyendo a la composición alta en fibra de la vaina de cacao y de acuerdo con Palafox-Carlos, Ayala-Zavala, & González-Aguilar (2011) el tipo y contenido de fibra puede reducir la absorción de antioxidantes como

otros nutrientes, atrapándolos en la matriz.



**Figura 10.** Bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* (boca-colon) de compuestos fenólicos totales en la vaina de cacao sin fermentar y fermentada.

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresadas como  $\mu\text{g GAE/g}$  de muestra. Letras mayúsculas diferentes expresan diferencia significativa entre muestra sin fermentar (VSF) y fermentada (VF). Letras minúsculas diferentes expresan diferencia significativa entre etapas de la digestión ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey).

Caso contrario a lo obtenido en la presente investigación en la fase gástrica, en donde se reportó una disminución para ambas muestras en el contenido de fenoles, pero con una diferencia significativa entre ellas, indicando una mayor bioaccesibilidad de la VF sobre la VSF (80 % y 52 %, respectivamente). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Janarny & Gunathilake (2020) en salvado de arroz, atribuyendo este aumento de la bioaccesibilidad en la fase gástrica por un posible mecanismo de las enzimas extracelulares producidas por el metabolismo del hongo que provoca una ruptura estructural de la matriz. De igual manera Chen *et al.*

(2019) reportaron resultados similares en la fase gástrica a través de las mismas tecnologías utilizadas para procesamiento de la vaina de cacao, sugiriendo que a través del procesamiento de subproductos como la fermentación tipo tempeh con *R. oryzae*, se origina un aumento de la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos.

En la etapa intestinal de lado apical (fracción no absorbida en el intestino delgado) a los 15 minutos se obtuvo un aumento significativo del contenido de fenoles de la VF respecto a la VSF, obteniendo una bioaccesibilidad del 92% y 30.2%, respectivamente. Posteriormente, en los últimos tiempos de la digestión intestinal, la VSF incrementó su contenido significativamente respecto a la VF. Mientras que del lado basolateral (fracción permeada/absorbida en el intestino delgado) al tiempo 15 y 30 minutos, el porcentaje de bioaccesibilidad de la VF (31% y 35.5%, respectivamente) fue significativamente mayor respecto a la VSF (2% y 16.9%) indicando una permeabilidad y absorción en los diferentes tiempos, pero una mayor absorción de los compuestos fenólicos al tiempo 15 de acuerdo con un análisis de permeabilidad aparente (Papp). De acuerdo con el lado A (apical) y B (basolateral) [Papp A->B (9.96 cm/sx10<sup>-6</sup>)]; sin embargo, al tiempo 30 y 60 hay un eflujo de fenoles a lado apical, esto de acuerdo con los valores de Papp B->A (9.60 y 9.85 cm/s x10<sup>-6</sup>) . Este mismo incremento en el porcentaje de bioaccesibilidad se reportó por Chen *et al.* (2019), señalando que el procesamiento de subproductos como el salvado de arroz a través de la fermentación sólida y extrusión permite mejorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos. También, por parte de Janarny & Gunathilake (2020) se reportó un incremento de la biodisponibilidad del salvado de arroz (2 de 4 especies), la cual está dada por el previo procesamiento enzimático con *R. oryzae*; sin embargo, el proceso de transformación de los compuestos fenólicos durante la fase intestinal también puede ser afectada por las condiciones de la fermentación ocasionando una baja biodisponibilidad.

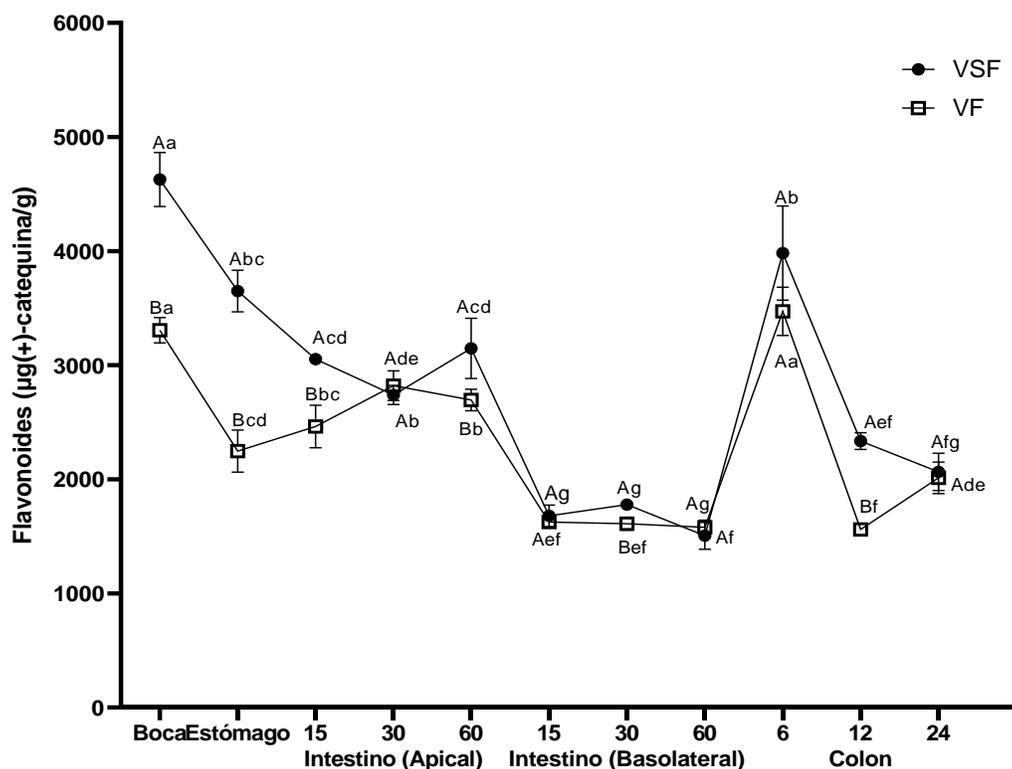
Finalmente, los compuestos fenólicos durante la fermentación colónica en la VF48h aumentaron la bioaccesibilidad de fenoles a las 6 y 12 horas y con una disminución a las 24 horas de la fermentación colónica, siendo estadísticamente

diferente a las 6 horas respecto a la VSF. Se ha reportado que, a través del procesamiento de subproductos de trigo por fermentación sólida también origina un aumento de la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en el colon. Koistinen *et al.* (2017) investigaron los efectos de la fermentación, a través de la levadura *S. cerevisiae* y el tratamiento enzimático, sobre el metabolismo colónico de fenoles provenientes del pan de trigo fortificado con salvado de centeno fermentado a través de un modelo de colon *in vitro*. Sus hallazgos mostraron que se originó un aumento de la bioaccesibilidad de los ácidos fenólicos en el colon con en el pan fermentado. De acuerdo con lo reportado por Roasa, De Villa, Mine & Tsao (2021), los cambios a través del tiempo, reportados en la presente investigación, podrían ser debido al procesamiento de las enzimas de la microbiota que origina la liberación de fenoles de la fibra procedente de la vaina de cacao y la síntesis de metabolitos fenólicos en las primeras horas. Sin embargo, la disminución posterior podría darse por la utilización de la misma microbiota (Herrera-Cazares *et al.*, 2017).

#### **VI.7 Bioaccesibilidad de flavonoides de la vaina sin fermentar y fermentada a las 48 horas**

A través de un sistema gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*, se analizó el efecto de la fermentación tipo tempeh en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los flavonoides, los cuales son compuestos principales en la vaina de cacao.

En la **Figura 11**, se observa los cambios originados de la fase bucal hasta la fase colónica. En la etapa de la boca se observó un incremento de la bioaccesibilidad del casi 900% en la VSF y VF a partir de la muestra sin digerir (**Figura 9**), indicando que la fermentación tipo tempeh influye en la liberación de estos compuestos. Nieto-Figueroa *et al.* (2019), reportaron tener una mayor bioaccesibilidad de los flavonoides en la boca en comparación con los otros compuestos antioxidantes.



**Figura 11.** Bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* (boca-colon) de compuestos flavonoides totales en la vaina de cacao sin fermentar y fermentada.

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresadas como  $\mu\text{g}$  rutina/g de muestra. Letras mayúsculas diferentes expresan diferencia significativa entre muestra sin fermentar (VSF) y fermentada (VF). Letras minúsculas diferentes expresan diferencia significativa entre etapas de la digestión ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey).

Posteriormente en la fase del estómago la bioaccesibilidad de los flavonoides se sigue manteniendo por arriba del 500 %. Sin embargo, el contenido de flavonoides disminuye en ambas muestras, mostrando un menor contenido la VF sin diferencia significativa. Ban *et al.*, (2015) mencionaron que los flavonoides de manera general presentan una menor estabilidad en la fase gástrica debido a su naturaleza hidrófoba, por lo que tienden a degradarse por factores como el pH y las enzimas digestivas.

En la etapa intestinal de lado apical, el contenido de flavonoides en la VF incrementó, mostrando una mayor concentración a los 30 minutos, pero sin diferencia significativa entre tiempos. Este incremento se puede atribuir al efecto sinérgico de la matriz

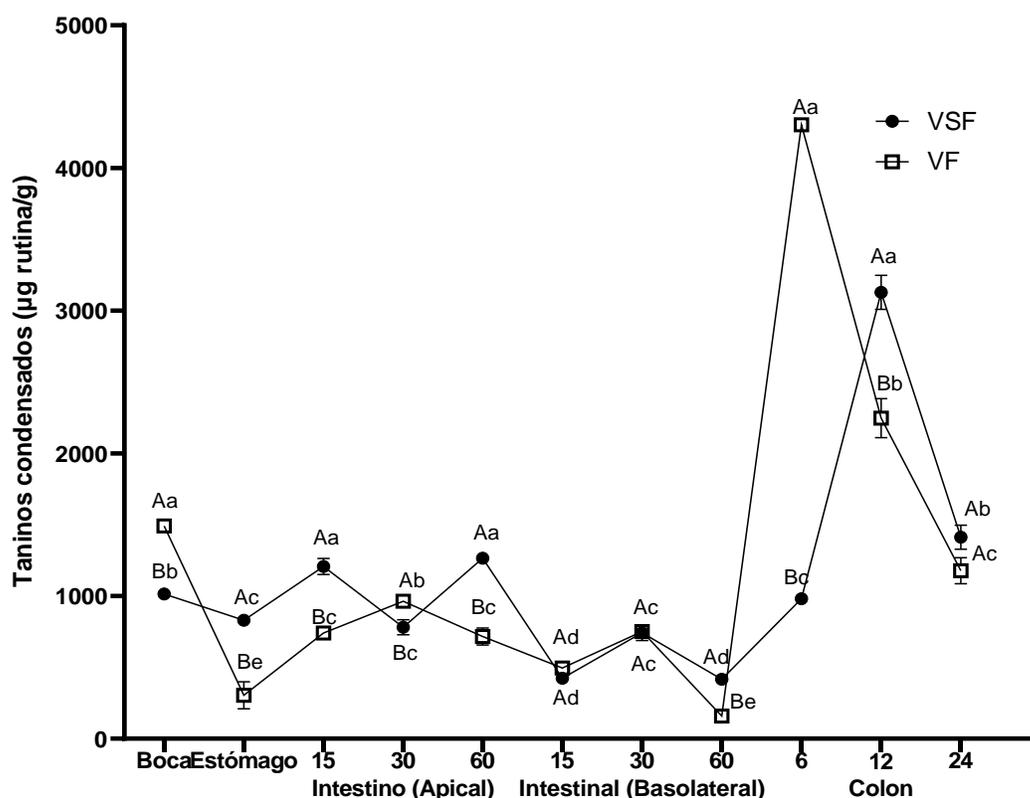
alimentaria que protege a los flavonoides hasta la fase intestinal (Mosele *et al.*, 2016); como también a la acción de la enzima lactasa floridzina hidrolasa (LPH), la cual específicamente hidroliza una amplia gama de glucósidos como los flavonoides. Mientras en el lado basolateral, se reportó una disminución del 50 % del contenido de flavonoides, sin diferencia significativa entre tiempos de incubación y solamente se observó una mayor permeabilidad aparente A->B a los 15 minutos en la VSF y VF (7.84 y 7.59 cm/sx10<sup>-6</sup>) indicando una absorción de los flavonoides y una permeabilidad a través de la barrera intestinal de acuerdo con Papp B->A, mientras que al minuto 30 y 60 no hubo permeabilidad. Herrera-Cazares *et al.* (2020), reportó un mayor contenido del lado apical y una ausencia de lado basolateral de acuerdo con la permeabilidad aparente, indicado que esto es debido a que la mayoría de los flavonoides se unen a otros compuestos no digeribles o de digestión lenta mejorando su resistencia a la degradación gastrointestinal, disminuyendo así su biodisponibilidad. Otro factor que pudiera afectar la absorción de flavonoides es por la posible interacción con proteínas pancreáticas, hidrolizando flavonoides a agliconas menos polares antes de la absorción gastrointestinal (Xia, Deng, Guo y Li, 2010).

Durante la fermentación colónica de la VSF y VF obtuvieron una mayor liberación de flavonoides a las 6 horas respecto a los otros tiempos de fermentación, sin diferencia significativa (**Figura 12**). Esto mismo se reportó por Campos-Vega *et al.* (2015), obteniendo una mayor bioaccesibilidad de flavonoides a las 24 horas de la fermentación colónica en café usado. Tomas *et al.* (2019), reportó una abundancia de metabolitos procedentes de flavonoides en la fermentación colónica, indicando que estos son metabolizados en gran medida por la microbiota. Williamson, Kay, & Crozier (2018), indicaron que parte de los flavonoides que no son absorbidos en la fase intestinal, viajan hasta el colon y señala que las fracciones conjugadas y las agliconas resultantes están sujetas a la fisión del anillo, lo que lleva a la producción de ácidos fenólicos y compuestos aromáticos. Estos también pueden absorberse y someterse a un metabolismo de fase II y en última instancia, excretarse en la orina.

## **VI8. Bioaccesibilidad de taninos condensados de la vaina sin fermentar y fermentada a las 48 horas**

A pesar del aumento del contenido de taninos en la VF48h reportado en la **Figura 9**, el contenido en la etapa bucal disminuyó en ambas muestras, siendo menor en la VSF (31.4%) indicando una bioaccesibilidad significativamente mayor en la VF (37.9%), comparado con la muestra sin digerir. Esta disminución puede ser debido a lo reportado por Nieto-Figueroa *et al.* (2019), donde solamente 1% de los taninos fue bioaccesible, indicando que el grado de polimerización de los taninos condensados puede afectar la liberación de estos compuestos. Otro factor para tener en cuenta es la interacción que los taninos puedan tener con la fibra de la vaina de cacao, ocasionando que su bioaccesibilidad se vea afectada.

En la etapa gástrica se observó una disminución del contenido de taninos condensados respecto a lo visto en la etapa bucal. La VSF (31.1%) obtuvo un mayor porcentaje ( $p < 0.05$ ) de bioaccesibilidad respecto a la VF (6.4%). Esta disminución del contenido de taninos en la fase gástrica es acorde a lo reportado por Nieto-Figueroa *et al.* (2019) en la vaina de cacao seca y Janarny & Gunathilake, (2020) en el salvado de arroz fermentado por *R. oryzae*, señalando que las enzimas gástricas y el HCl no tienen algún efecto en la liberación de taninos y despolimerización de estos de su matriz procedente. De igual manera, Saura-Calixto *et al.* (2010), reportaron que en las matrices alimentarias con presencia de fibra dietética se tienen una fuerte asociación (puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, enlaces electrostáticos y covalentes) con los taninos, originando una acción mínima por parte de las enzimas digestivas.



**Figura 12.** Bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* (boca-colon) de compuestos taninos condensados en la vaina de cacao sin fermentar y fermentada.

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresadas como  $\mu\text{g (+)-catequina/g}$  de muestra. Letras mayúsculas diferentes expresan diferencia significativa entre muestra sin fermentar (VSF) y fermentada (VF). Letras minúsculas diferentes expresan diferencia significativa entre etapas de la digestión ( $\alpha=0.05$ , prueba de Tukey).

En la etapa intestinal del lado apical la VF mostró un aumento de la bioaccesibilidad de taninos en los primeros minutos y un incremento significativo a los 30 minutos (20.2 %) respecto a la VSF; finalmente a los 60 minutos (15 %) el contenido disminuyó. Mientras que, en el lado basolateral, la bioaccesibilidad de ambas muestras disminuyó en los primeros minutos, posteriormente incrementó a los 30 minutos y decreció a los 60 minutos nuevamente, reportándose una diferencia significativa de la VSF (15.6 %) respecto a la VF (3.3 %). Acorde a la Papp, a los 15 minutos la VF mostró valores altos de permeación de lado A->B y un radio de flujo positivo respecto a la VSF, indicando una absorción de taninos de la vaina fermentada, mientras que en la VSF mostraron valores positivos de lado A->B pero

una nula permeabilidad de lado B->A, señalando una dificultad de los taninos condensado de la vaina sin fermentar por cruzar la barrera intestinal. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Herrera-Cazares *et al.* (2020), Nieto-Figueroa *et al.* (2019) indicando que en un modelo de digestión *in vitro*, para evaluar la bioaccesibilidad del gabazo del mango, se observó una disminución de la concentración de taninos en la fase intestinal, atribuyendo la baja bioaccesibilidad y nula permeabilidad a la estructura molecular de los taninos y a la ausencia de una despolimerización previa, sugiriendo que estos compuestos bioactivos serán metabolizados en la fase colónica por la microbiota. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado por Janarny & Gunathilake, (2020) los taninos condensados del salvado de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* mostraron una mayor bioaccesibilidad en la fase intestinal y una mayor disponibilidad, por lo que mencionan que la variación en la bioaccesibilidad y permeabilidad varía por los factores de la fermentación sólida, en este caso esta variación de permeabilidad podría ser dado por la diferencia de la matriz alimentaria y su modificaciones utilizada en la investigación.

En la etapa colónica la VF a las 6 horas de la fermentación colónica incrementó significativamente la bioaccesibilidad de taninos, posteriormente disminuyó, lo que sugiere el papel importante de la fermentación de la microbiota para la liberación de los taninos condensados. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2015) y Herrera-Cazares *et al.* (2020), concluyendo ambos autores que la mayor liberación de los taninos está dada en el colon por las enzimas de la microbiota colónica. Cabe añadir que la interacción de los taninos condensados con la fibra dietaria pueden actuar como matriz de atrapamiento, evitando la liberación de estos compuestos en el tracto gastrointestinal y liberándose en el colon (Tomas *et al.*, 2019). A las 12 y 24 horas de fermentación colónica el contenido de taninos decrece significativamente en la VF. De acuerdo con Serrano *et al.* (2009) los taninos liberados en las primeras horas de fermentación son descompuestos por las bacterias colónicas para originar taninos absorbibles o no absorbibles.

## VI.9 Capacidad antioxidante de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada durante la digestión gastrointestinal *in vitro*

En la **Tabla 13** se muestran la capacidad antioxidante de la FSV y VF, en las etapas de la digestión y fermentación colónica *in vitro*. Se observó, de manera general, que la capacidad antioxidante evaluada por DPPH en la VF, en comparación con la VSF, es significativamente mayor en cada etapa, con excepción del lado basolateral del intestino delgado y con diferencia significativa en la boca respecto a las demás etapas. Cuando la capacidad antioxidante se evaluó por el método de ABTS, la VF solamente mostró diferencia significativa en la boca respecto a cada fase y muestra, observándose una tendencia de disminución en el estómago-lado apical y un incremento en el lado basolateral-colon. Este mismo cambio en la capacidad antioxidante en la boca fue reportado por Campos-Vega *et al.* (2015) en el café usado y por Luzardo-Ocampo *et al.* (2017) en frijol y maíz procesado, indicando que el aumento de la capacidad antioxidante está dado por el aumento de la liberación de compuestos fenólicos. De igual manera Nieto-Figueroa *et al.* (2019), reportaron un incremento en la capacidad antioxidante por DPPH de la vaina de cacao procesada por microondas, aire caliente y extrusión en la fase de la boca.

Después de la fase de la boca, se reportó una tendencia de disminución conforme la matriz avanza por cada etapa; sin embargo, en la etapa colónica la capacidad antioxidante incrementó. De acuerdo con Campos-Vega *et al.* (2015), la capacidad antioxidante se puede ver afectada por el efecto del pH de la etapa gástrica generando una disminución de compuestos fenólicos, tal y como se observó en la presente investigación. Nieto-Figueroa *et al.* (2019) mencionaron que la disminución de los polifenoles y aumento de la capacidad antioxidante es debido a que los compuestos fenólicos se encuentran atrapados en la matriz de la fibra en el quimo, lo que obstruye su cuantificación y variación de la concentración de fenoles con la capacidad antioxidante.

Durante la etapa intestinal, se observó una disminución de la capacidad antioxidante, siendo al minuto 30 de incubación el tiempo con el mayor valor (DPPH)

en la VF. Según Quiros-Sauceda *et al.* (2015), la mayor absorción de compuestos fenólicos se realiza en el estómago y solo un pequeño porcentaje se libera en el intestino, razón de la disminución de la capacidad antioxidante durante esta etapa. De acuerdo con Saura-Calixto, Serrano, & Goñi, (2007) a pesar de la disminución de la capacidad antioxidante por DPPH, la capacidad antioxidante puede estar dada por la liberación de los compuestos nutraceuticos de la VF en el intestino; posteriormente llegaran al colon y con la liberación de otros compuestos nutraceuticos y metabolitos aumentara la capacidad antioxidante en esta etapa. Sin embargo, de lado basolateral también se presentó capacidad antioxidante, lo cual indica que la absorción de los compuestos poli fenólicos de la VF podrán ejercer un efecto. Estos mismos resultados concuerdan por lo reportado por Nieto-Figueroa *et al.* (2019) en la vaina de cacao.

Janarny & Gunathilake, (2020) reportaron de igual manera a través de la fermentación sólida en salvado de arroz una capacidad antioxidante en la fase gástrica e intestinal, sugiriendo a la fermentación como método innovador para el procesamiento de subproductos y uso como ingredientes con beneficios a la salud.

Acorde a lo reportado en la presente investigación, se sugiere que la fermentación tipo tempeh mejora la bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos y por ende su liberación, pudiendo alcanzar incluso el colon, originando un aumento de la capacidad antioxidante y posiblemente contribuyendo a un efecto celular en otros tejidos.

**Tabla 13.** Capacidad antioxidante de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro* (boca-colon).

ETAPAS	DPPH ( $\mu\text{M}$ trolox/g)		ABTS ( $\mu\text{M}$ trolox/g)	
	VSF	VF	VSF	VF
Boca	2194 $\pm$ 11.4 <sup>Aa</sup>	2276 $\pm$ 73.8 <sup>Aa</sup>	1595 $\pm$ 95.6 <sup>Ba</sup>	1995 $\pm$ 89.9 <sup>Aa</sup>
Estómago	1752 $\pm$ 102.3 <sup>Ac</sup>	1883 $\pm$ 155.0 <sup>Ac</sup>	1653 $\pm$ 16.4 <sup>Aa</sup>	1202 $\pm$ 96.4 <sup>Bc</sup>
Intestinal (Apical)				
15 min	1451 $\pm$ 37.9 <sup>Ad</sup>	1442 $\pm$ 112.1 <sup>Ad</sup>	948 $\pm$ 14.7 <sup>Ac</sup>	795 $\pm$ 67.8 <sup>Bd</sup>
30 min	1441 $\pm$ 29.3 <sup>Bd</sup>	1579 $\pm$ 51.0 <sup>Ade</sup>	836 $\pm$ 51.2 <sup>Ac</sup>	713 $\pm$ 9.6 <sup>Bd</sup>
60 min	1398 $\pm$ 39.4 <sup>Bd</sup>	1498 $\pm$ 46.9 <sup>Ad</sup>	911 $\pm$ 5.9 <sup>Ac</sup>	790 $\pm$ 46.9 <sup>Bd</sup>
Intestinal (Basolateral)				
15 min	1325 $\pm$ 370 <sup>Ad</sup>	1219 $\pm$ 62.9 <sup>Aef</sup>	1151 $\pm$ 48.5 <sup>Ab</sup>	1188 $\pm$ 29.9 <sup>Ac</sup>
30 min	1337 $\pm$ 245 <sup>Ad</sup>	1160 $\pm$ 77.4 <sup>Bf</sup>	1261 $\pm$ 24.5 <sup>Ab</sup>	1164 $\pm$ 37.1 <sup>Bc</sup>
60 min	1347 $\pm$ 17.7 <sup>Ad</sup>	1171 $\pm$ 9.1 <sup>Bef</sup>	1285 $\pm$ 3.2 <sup>Ab</sup>	1276 $\pm$ 12.8 <sup>Ac</sup>
Colon				
6 h	1775 $\pm$ 62.0 <sup>Bc</sup>	1959 $\pm$ 84.5 <sup>Abc</sup>	1560 $\pm$ 19.2 <sup>Aa</sup>	1584 $\pm$ 10.5 <sup>Ab</sup>
12 h	2004 $\pm$ 13.3 <sup>Bb</sup>	2232 $\pm$ 99.3 <sup>Aab</sup>	1561 $\pm$ 65.5 <sup>Aa</sup>	1650 $\pm$ 78.7 <sup>Ab</sup>
24 h	1929 $\pm$ 29.6 <sup>Bb</sup>	2341 $\pm$ 156.4 <sup>Aa</sup>	1621 $\pm$ 94.8 <sup>Aa</sup>	1559 $\pm$ 75.3 <sup>Ab</sup>

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  DE y son expresadas como  $\mu\text{M}$  equivalentes de trolox por g de muestra. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre muestra sin fermentar y fermentada. Letras minúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre etapas de la digestión de cada muestra ( $p=0.05$ , prueba de Tukey).

## VI.7 Contenido de compuestos fenólicos y teobromina determinados por HPLC de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada a diferentes tiempos

En la **Tabla 14** se muestra el contenido de fenoles específicos y teobromina de las muestras de la vaina fermentada a distintos tiempos de fermentación. La VSF (0 h) mostró un mayor contenido con diferencia significativa de rutina, ácido elágico y teobromina. A las 12 horas, se presenció ácido cafeico y ácido gálico, además de una disminución de los demás componentes y una ausencia de quercetina. Posteriormente, conforme el tiempo de fermentación avanza hay cambios en la concentración y presencia de los compuestos fenólicos. La VF48h mostró un aumento significativo de quercetina, presencia del ácido gálico, disminución de rutina y teobromina, además de la ausencia del ácido elágico.

Son pocos los estudios que evalúan el contenido de fenoles en la vaina de cacao de manera específica. La vaina de cacao sin procesar se caracteriza por contener

catequina (36 %), quercetina (21 %), epicatequina (21 %), ácido gálico (11.3 %), ácido cumárico (6.5 %) y ácido protocatecuico (4.5 %) (Valadez-Carmona *et al.*, 2017). Sin embargo, conforme la VC es procesada su contenido de fenoles se modifica. Valadez-Carmona *et al.* (2017) reportaron diferentes compuestos fenólicos de la vaina de cacao sometida a diferentes procesos de secado de los cuales en la VF únicamente se cuantificó quercetina y ácido gálico. Esto podría ser debido al método de cuantificación y extracción, el tipo del fruto y principalmente al procesamiento de la fermentación tipo tempeh. Lo antes mencionado se corroboró con Nieto-Figueroa *et al.* (2019), quienes reportan tener solamente la presencia de ácido gálico en la VC sometida a tres procesamientos de secado diferente.

**Tabla 14.** Contenido de compuestos fenólicos determinados por HPLC de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada a distintas horas.

Muestra	Ácido Cafeico	Ácido Gálico	Ácido Eláxico	Rutina	Catequina	Quercetina	Teobromina
VSF	NC	NC	4800 ± 215.8 <sup>a</sup>	16205 ± 120.0 <sup>a</sup>	NC	1359 ± 14.9 <sup>c</sup>	4.37 ± 0.01 <sup>a</sup>
VF12h	9 ± 0.43	23716 ± 1003.0 <sup>a</sup>	3358 ± 2.2 <sup>b</sup>	4036 ± 21.1 <sup>c</sup>	NC	NC	4.14 ± 0.01 <sup>bc</sup>
VF18h	NC	24615 ± 1403.9 <sup>a</sup>	3673 ± 143.1 <sup>b</sup>	8662 ± 124.9 <sup>b</sup>	NC	1125 ± 8.5 <sup>e</sup>	4.16 ± 0.01 <sup>c</sup>
VF24h	NC	12806 ± 586.1 <sup>b</sup>	2392 ± 1.4 <sup>c</sup>	NC	NC	1424 ± 6.2 <sup>b</sup>	4.14 ± 0.01 <sup>bc</sup>
VF36h	NC	23243 ± 1720.3 <sup>a</sup>	2203 ± 173.6 <sup>c</sup>	2225 ± 16.4 <sup>d</sup>	NC	1222 ± 4.5 <sup>d</sup>	4.17 ± 0.01 <sup>b</sup>
VF48h	NC	22911 ± 1003.9 <sup>a</sup>	NC	1557 ± 1.6 <sup>e</sup>	NC	1737 ± 9.0 <sup>a</sup>	4.14 ± 0.01 <sup>bc</sup>

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado ± desviación estándar y son expresadas como µg/g de muestra. Letras minúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa del compuesto entre muestras a distintas horas de fermentación. (p=0.05, prueba de Tukey). ND, no detectado, debajo del límite de detección. NC, no cuantificado, debajo del límite de cuantificación.

La fermentación puede cambiar el contenido de los polifenoles tal y como se observó en la **Figura 10**, corroborando este cambio en la variación del contenido de fenoles específicos en la **Tabla 14**. Esta variación es debido al sistema enzimático que la fermentación tipo tempeh conlleva, ya que enzimas como la α-amilasa, lacasa y β-glucosidasa, tanino acil hidrolasa, elagitanino acil hidrolasa juegan un papel importante en la movilización de compuestos fenólicos bioactivos durante la fermentación sólida, debido a que los hongos filamentosos como *R. oryzae* tienen

dos sistemas oxidativos; un sistema que degrada polisacáridos y otro que degrada la lignina e hidroliza los anillos de fenilo, aumentando el contenido y la modificación química de ciertos compuestos bioactivos (Martins *et al.*, 2011). Zambrano *et al.* (2018), reportaron un contenido diferente al inicial y una variación de los fenoles individuales a través de la fermentación sólida en residuos de uva, manzana y pitaya. De igual manera Wang *et al.* (2019) reportaron obtener un contenido de fenoles específicos diferente a la inicial en residuos de cebada, mostrando una variación de estos conforme la fermentación avanza a través de *R. oryzae*, atribuyendo este cambio en el contenido de fenoles individuales a la actividad enzimática de la fermentación. Por otro lado, Torres-León *et al.* (2019) obtuvieron un alto contenido de ácido gálico y elágico en semilla de mango fermentada, tal y como se presentó en la VC, atribuyendo este cambio a la biodegradación de taninos condensados por la fermentación sólida (*A. niger*) originando que los polifenoles complejos se hidrolicen en compuestos más simples y activos.

En cuanto a la teobromina, el contenido de la VSF es mayor respecto a las muestras fermentadas, mostrando un menor contenido sin diferencia significativa la VSF48h. Cabe mencionar, que la teobromina es el alcaloide principal del fruto del cacao con sitio de síntesis en los granos del fruto (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018). En la presente investigación se obtuvo un contenido de la VSF y VF48h de 4.37 y 4.14, respectivamente. En cuanto lo reportado por otros autores se obtuvo un contenido bajo. Sotelo *et al.* (2015) reportaron un contenido de la VC sin procesar entre los 20 µg/g a 37.5 µg/g. Mientras que Nguyen & Nguyen (2017) reportaron 67.9 µg/g. El contenido de teobromina como de polifenoles puede variar por el tipo de especie, la variabilidad genética, lugar de origen y factores ambientales durante la plantación (Vázquez-Ovando *et al.*, 2015). No obstante, a partir del procesamiento de la VC el contenido de teobromina también se modifica. Nieto-Figueroa *et al.* (2019) reportaron valores de 210 µg/g, 205 µg/g y 135 µg/g para la extrusión, secado por flujo de aire y secado por microondas, respectivamente. De la misma manera que Nguyen, Tran & Tran (2021) obtuvieron una disminución de la presencia de teobromina a través del secado por microondas. Sin embargo, a través

de la fermentación sólida también se reportó un cambio en el contenido de teobromina. Amorim *et al.* (2017), Oduro-Mensah *et al.* (2018) y Olugosi *et al.* (2019) reportaron una disminución significativa del contenido de este alcaloide conforme la fermentación avanza. A diferencia de nuestro estudio los autores antes mencionados utilizaron otros tipos de hongos filamentosos y más de dos días de fermentación.

#### **VI.7.1 Contenido, bioaccesibilidad gastrointestinal y permeabilidad *in vitro* (boca-colon) de compuestos fenólicos y teobromina de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada determinados por HPLC**

En la **Tabla 15** se muestra la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos individuales de la VF durante la digestión. A través de la digestión solamente el ácido cafeico, ácido gálico, ácido elágico, rutina, catequina y teobromina fueron cuantificados en la VF48h en diferentes concentraciones y distintas etapas.

El ácido cafeico solamente se cuantificó en la VF12h y en la etapa de la boca de la VF48h, de acuerdo con lo reportado la vaina de cacao no se caracteriza por ser un subproducto que predomine el ácido cafeico (Abdul Karim *et al.*, 2014; Valadez-Carmona *et al.*, 2017). Sin embargo, la presencia de este compuesto fenólico podría ser dado por la degradación de la lignina ocasionada por *R. oryzae* durante la fermentación a las 12h y la liberación en la etapa de la boca por el proceso mecánico que se origina (Martins *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2015; Capuano, 2017).

A diferencia del ácido cafeico; el ácido gálico y elágico fueron los ácidos fenólicos más constantes a través de la digestión *in vitro* en la VF48h. La bioaccesibilidad del ácido gálico se observó de la siguiente manera: boca > colon > lado basolateral > lado apical, sin cuantificación en la fase del estómago. Indicando que, en la fase bucal y gástrica, la bioaccesibilidad del ácido gálico es limitada por la baja actividad enzimática para la hidrólisis de taninos, evitando así la liberación de este compuesto bioactivo (Quatrin *et al.*, 2020); mientras que el ácido gálico cuantificado puede ser procedentes de la fermentación tempeh (Chen *et al.*, 2019).

**Tabla 15.** Contenido y bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* (boca-colon) de compuestos fenólicos determinados por HPLC de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada

Muestra	Ácido Caféico	Ácido Gálico	Ácido Eláxico	Rutina	(+) Catequina	Quercetina	Teobromina
<b>MUESTRA SIN DIGERIR</b>							
VSF	NC	NC	4800 ± 215.8 <sup>a</sup>	16205 ± 120.0 <sup>Aa</sup>	NC	1359 ± 14.9 <sup>Ba</sup>	4.37 ± 0.01 <sup>Aa</sup>
VF48h	NC	22911 ± 1003.9 <sup>a</sup>	NC	1557 ± 1.6 <sup>Bb</sup>	NC	1737 ± 9.0 <sup>Aa</sup>	4.14 ± 0.00 <sup>Ba</sup>
<b>BOCA</b>							
VSF	ND	2488 ± 234.7 <sup>Aa</sup>	NC	NC	NC	ND	1.22 ± 0.02 <sup>Ab</sup>
VF48h	606 ± 6.0	13863 ± 29.9 <sup>Bb</sup>	4453 ± 155.5 <sup>b</sup>	NC	NC	NC	1.14 ± 0.01 <sup>Bc</sup>
<b>ESTÓMAGO</b>							
VSF	NC	NC	79 ± 0.36 <sup>Ae</sup>	NC	NC	ND	1.17 ± 0.02 <sup>Ac</sup>
VF48h	ND	ND	18 ± 2.7 <sup>Bf</sup>	NC	NC	ND	1.16 ± 0.01 <sup>Ab</sup>
<b>INTESTINO DELGADO</b>							
<i>Apical 15 min</i>							
VSF	NC	1789 ± 60.2 <sup>Ab</sup>	132 ± 3.6 <sup>Be</sup>	3038 ± 60.2 <sup>b</sup>	1207 ± 10.7 <sup>Ab</sup>	ND	0.28 ± 0.0 <sup>Ae</sup>
VF48h	NC	1299 ± 53.0 <sup>Bde</sup>	196 ± 7.1 <sup>Ae</sup>	NC	1118 ± 26.8 <sup>Bd</sup>	ND	0.28 ± 0.0 <sup>Ae</sup>
<i>Apical 30 min</i>							
VSF	ND	1715 ± 157.2 <sup>Ab</sup>	1307 ± 83.6 <sup>Ad</sup>	NC	1413 ± 62.0 <sup>Aa</sup>	ND	0.28 ± 0.0 <sup>e</sup>
VF48h	NC	1295 ± 157.6 <sup>Bde</sup>	1127 ± 5.1 <sup>Bd</sup>	NC	1211 ± 1.0 <sup>Bc</sup>	ND	ND
<i>Apical 60 min</i>							
VSF	ND	1785 ± 139.0 <sup>Ab</sup>	NC	NC	923 ± 56.8 <sup>c</sup>	ND	0.28 ± 0.0 <sup>e</sup>
VF48h	NC	934 ± 5.6 <sup>Bdef</sup>	1126 ± 68.7 <sup>d</sup>	4051 ± 6.9 <sup>a</sup>	1111 ± 7.5 <sup>d</sup>	ND	ND
<i>Basolateral 15 min</i>							
VSF	NC	644 ± 12.0 <sup>Bc</sup>	1946 ± 154.8 <sup>Bbc</sup>	NC	771 ± 2.1 <sup>Bd</sup>	ND	0.28 ± 0.0 <sup>e</sup>
VF48h	ND	2544 ± 20.6 <sup>Ac</sup>	3137 ± 163.2 <sup>Ac</sup>	NC	1357 ± 6.3 <sup>Ab</sup>	ND	ND
<i>Basolateral 30 min</i>							
VSF	ND	953 ± 44.1 <sup>Bc</sup>	2359 ± 31.6 <sup>Bb</sup>	NC	941 ± 6.6 <sup>Bc</sup>	ND	0.28 ± 0.0 <sup>e</sup>
VF48h	NC	1361 ± 14.8 <sup>Ccde</sup>	5613 ± 415.1 <sup>Aa</sup>	NC	1362 ± 0.7 <sup>Ab</sup>	ND	ND
<i>Basolateral 60 min</i>							
VSF	ND	743 ± 158.8 <sup>Ac</sup>	5124 ± 200.8 <sup>Aa</sup>	NC	1255 ± 25.1 <sup>Ab</sup>	ND	0.28 ± 0.0 <sup>e</sup>
VF48h	NC	537 ± 5.4 <sup>Bef</sup>	4023 ± 54.8 <sup>Bb</sup>	NC	776 ± 3.1 <sup>Be</sup>	ND	ND
<b>COLON</b>							
<i>6 horas</i>							
VSF	NC	NC	1504 ± 84.5 <sup>cd</sup>	NC	NC	ND	1.13 ± 0.0 <sup>Ad</sup>
VF48h	NC	NC	NC	NC	3641 ± 26.4 <sup>a</sup>	ND	1.11 ± 0.0 <sup>Ad</sup>
<i>12 horas</i>							
VSF	NC	2308 ± 10.3 <sup>Aa</sup>	ND	NC	NC	ND	1.13 ± 0.0 <sup>d</sup>
VF48h	NC	2055 ± 47.18 <sup>Bcd</sup>	ND	NC	ND	ND	ND
<i>24 horas</i>							
VSF	NC	1805 ± 30.0 <sup>Ab</sup>	199 ± 2.6 <sup>e</sup>	NC	NC	ND	1.13 ± 0.0 <sup>d</sup>
VF48h	NC	1373 ± 5.4 <sup>Bcde</sup>	ND	NC	1399 ± 6.8 <sup>b</sup>	ND	ND

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado ± desviación estándar y son expresadas como µg/g de muestra. Letras minúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa del compuesto entre etapas de la digestión. Letras mayúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa ente VSF y VF48h (p=0.05, prueba de Tukey). ND, no detectado, debajo del límite de detección. NC, no cuantificado, debajo del límite de cuantificación.

En la fase intestinal, la bioaccesibilidad incrementó además de indicar que hay una permeación de este compuesto fenólico, tal y como se reportó por Nieto-Figueroa *et al.* (2019) en la vaina de cacao, Luzardo-Ocampo *et al.* (2020) en el sorgo y Chait *et al.* (2020) en el algarrobo. Esto debido a que los polifenoles complejos, conjugados y unidos a la VC se liberara de la matriz e hidrolizan por las enzimas intestinales (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020). Posteriormente se originó una mayor liberación de ácido gálico a las 12 y 24 horas de la fermentación colónica, lo que indica una descomposición de elagitaninos procedentes de la VC por la microbiota intestinal (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020; Chait *et al.*, 2020).

Para el ácido elágico se presentó la misma tendencia en la fase intestinal que en el ácido gálico, pero sin presencia en el colon y en la etapa inicial. Lado basolateral > lado apical > boca > estomago. Indicando que en la etapa oral hay una liberación del ácido elágico procedente de la fermentación tipo tempeh, el cual a través de la masticación de acuerdo con González-Aguilar *et al.* (2017) se origina una mayor bioaccesibilidad por el proceso mecánico que esta implica. Durante el estómago se presentó una disminución significativa, esto debido a que algunos compuestos bioactivos como el ácido elágico pueden interactuar con los polímeros de la matriz a través de interacciones covalentes y no covalentes y la afinidad resultante también se ve influenciada por la solubilidad de los polifenoles (Landete, 2011); sin embargo, la acción de las enzimas pancreatina y pepsina originó una mayor bioaccesibilidad en el intestino tal y como se presentó en Colantuono, Ferracane, & Vitaglione (2016) en la cascara de granada y Van, Pirovani, & Drago (2018) en la mora, observándose también una mayor biodisponibilidad. Por lo tanto, en la fase del colon no hay presencia de este compuesto bioactivo, debido a que la mayor parte del ácido elágico fue absorbido o metabolizado gradualmente en urolitina (Landete, 2011; Colantuono, Ferracane, & Vitaglione, 2016; Van, Pirovani, & Drago, 2018).

Por otra parte, en la VF48h se presentaron rutina y quercetina, ambos flavonoides no se cuantificaron durante las diferentes etapas de la digestión. Sin embargo, la catequina no se cuantificó en el extracto inicial pero si fue el único flavonoide que se presentó durante la digestión *in vitro*. Algunos flavonoides como catequina son muy susceptibles al pH bajo, pero a su vez las características de la

fase gástrica pueden permitir la liberación de polifenoles en la etapa intestinal (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2017; Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020); otro factor a considerar es la característica de la matriz alimentaria, la cual puede afectar la cuantificación de los compuestos bioactivos (Oliveira & Pintado, 2015; Mosele *et al.*, 2016). Sin embargo, las condiciones fisiológicas aportaron una mejora en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de catequina, tal y como se reportó por Nieto-Figueroa *et al.* (2019), debido a que los metabolitos como catequina son altamente permeables y sufren una ligera modificación para llegar al colon y ser metabolizados dando lugar a ácidos fenilvaléricos (Clifford, Van der Hooft & Crozier, 2013; Shabbir *et al.*, 2021). De manera general los flavonoides tienen baja estabilidad y bioaccesibilidad debido a su naturaleza hidrofóbica, además de poder degradarse por factores bioquímicos como sales, pH y enzimas digestivas durante el proceso gastrointestinal (Ban *et al.*, 2015).

Finalmente, la teobromina presentó una baja bioaccesibilidad en las primeras fases de la digestión *in vitro* e incrementó en la fase colónica. Este comportamiento puede ser debido a que las metilxantinas como la teobromina son compuestos estables ante las condiciones gástricas e intestinales (Cantele *et al.*, 2020). Un efecto similar en las primeras fases se reportó por Nieto-Figueroa *et al.* (2019) en la vaina de cacao y Rojo-Poveda *et al.* (2020) en galletas de cascara de semilla de cacao, atribuyendo la baja bioaccesibilidad a la unión de polifenoles y proteínas de la matriz alimentaria. Son pocos los estudios que evalúan la permeabilidad de la teobromina. Sin embargo, estudios *in vivo* han demostrado que la teobromina es absorbida entre las dos y dos horas y media (Martínez-López *et al.*, 2014; Sarria *et al.*, 2020). Lo anterior concuerda con la nula permeabilidad que se observó en nuestro estudio, y por lo tanto para estudios posteriores se sugiere aumentar el tiempo de incubación. A diferencia de Nieto-Figueroa *et al.* (2019), en el presente estudio se presentó un incremento en las primeras horas de la fermentación colónica, sugiriendo que a través de la fermentación tipo tempeh se permite parte de la matriz alimentaria llegue al colon para poder ser metabolizada por la microbiota y originar la liberación de esta metilxantina.

## **VI.8 Efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la vaina de cacao fermentada sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)**

Debido a que el objetivo de la presente investigación es la obtención de un producto con beneficios a la salud proveniente de una biomasa residual alta en fibra previamente procesada como lo es la VC, se analizó la producción de ácidos grasos de cadena corta. En la **Tabla 15** se observa el contenido de AGCC de la VF en comparación con la VSF y un control altamente fermentable (inulina) cuantificados por GC-MS.

La producción de ácidos grasos de cadena corta durante el colon es debido a la utilización de la fracción no digerible por la microbiota, procedente del bolo alimenticio de la fase intestinal. Esta síntesis de AGCC se relaciona con el estado de salud del donante, esto debido a que una microbiota conformada por bifidobacterias incrementa la cantidad de ácidos grasos, principalmente butirato (De Vuyst & Leroy, 2011; Wang *et al.*, 2019). En la presente investigación el inóculo utilizado fue de una persona sana con normo peso. Durante la fermentación colónica la VF48h presentó una mayor producción del ácido acético y butírico, este último con un incremento gradual junto con el ácido propiónico además de ser el ácido graso de mayor proporción a las 24 horas, mientras que el ácido acético disminuyó significativamente en el mismo tiempo. Caso contrario con la VSF, la cual mostró una concentración mayor del ácido acético en todos los tiempos de fermentación. Zamora-Gasca *et al.* (2018) reportaron un aumento del contenido de AGCC en productos de maíz, principalmente ácido acético (18.8-49.8 mmol/L) y butírico (23.5-33.1 mmol/L) a las 24 y 48 horas, atribuyendo este cambio a bacterias benéficas de la microbiota. De Cosío-Barrón, Hernández-Arriaga, & Campos-Vega (2019) reportaron 36.51 mmol/L de AGCC y 26.7 mmol/L de butirato en café usado materia fecal de un donador con sobrepeso. Mencionado lo anterior se sugiere que en estudios posteriores del efecto de la fermentación tempeh en la producción de AGCC se realice un análisis de población bacteriana para corroborar este factor.

De igual manera otro factor de la variación y contenido de AGCC es el tipo de polímero predominante de la matriz alimentaria que metabolizará la microbiota y a su vez la composición de la fracción no digerida dependerá del tipo de bacterias

presentes en el colon; esta modificación en la estructura puede darse por el procesamiento tecnológico previo y el efecto de la digestión (Fernández *et al.*, 2016). Nieto-Figueroa *et al.* (2019) reportaron un aumento en la concentración de AGCC a las 24 horas, la concentración de los ácidos grasos cambio de acuerdo con el tratamiento utilizado para el procesamiento de la VC; el tratamiento por extrusión y secado por flujo de aire caliente mostró una mayor concentración de butírico y acético.

La VF48h mostró un mayor contenido de AGCC totales y un índice de fermentabilidad mayor que la VSF, indicando la utilización de la vaina de cacao fermentada como sustrato. Cabe mencionar que el pretratamiento de la fermentación tipo tempeh y VSF, es la extrusión, de acuerdo con lo reportado por Arcila, Weier, & Rose, (2015) y Nieto-Figueroa *et al.* (2019) la extrusión también podría generar una modificación en el contenido de fibra de la VF para la formación de ácidos grasos en el colon. Son pocos los estudios que evalúan la fermentación tipo tempeh en la producción de ácidos grasos. Yang *et al.* (2021), reportaron a través de la fermentación tipo tempeh por *R. oryzae* y *A. oryzae* en salvado de arroz, un aumento del número de bacterias *Bifidobacterium* y *Bacteriodaceae* y por ende un incremento del contenido de ácidos grasos 35.60-39.5 mmol/L principalmente butirato (5.20-6.12 mmol/L) y acético (17.87-19.73 mmol/L). Cheng *et al.* (2020), a través de la fermentación sólida de pulpa de moras azul con *Lactobacillus casei*, observó de igual manera un aumento de bacterias productoras de butirato como: *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, además de un incremento de ácido butírico y ácido acético. Acorde a los resultados previos, la fermentación tipo tempeh y el proceso de vapor bajo presión que genera la autoclave en la VSF, podrían proponerse como procesos tecnológicos para la modificación en la estructura de la vaina de cacao para ser metabolizada por la microbiota.

**Tabla 16.** Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada

Muestra	Tiempo	AGCC	Concentraciones (mM) <sup>1</sup>	Radio molar (%)	Ácidos grasos totales	IF (%)
	0 h	Acético	14.4 ± 0.5 <sup>b</sup>	77.0	17.5	62.2

<b>Vaina sin fermentar (VSF)</b>	6 h	Propiónico	1.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	7.3	25.9	38.2
		Butírico	2.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	15.7		
		Acético	19.8 ± 3.0 <sup>b</sup>	70.0		
	12 h	Propiónico	2.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	8.7	20.4	23.2
		Butírico	4.1 ± 1.4 <sup>ab</sup>	21.3		
		Acético	12.5 ± 1.1 <sup>b</sup>	53.2		
	24 h	Propiónico	2.6 ± 0.4 <sup>c</sup>	13.7	21.1	22.0
		Butírico	5.3 ± 0.5 <sup>c</sup>	33.1		
		Acético	9.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	38.7		
<b>Vaina fermentada 48 h (VF48h)</b>	0 h	Propiónico	4.5 ± 0.3 <sup>c</sup>	21.9	12.2	43.3
		Butírico	6.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	39.4		
		Acético	5.8 ± 0.5 <sup>c</sup>	39.6		
	6 h	Propiónico	2.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	19.4	32.3	47.6
		Butírico	4.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	41.1		
		Acético	20.0 ± 7.8 <sup>b</sup>	53.9		
	12 h	Propiónico	4.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	13.3	46.6	53.0
		Butírico	8.3 ± 2.9 <sup>ab</sup>	32.8		
		Acético	30.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	58.4		
	24 h	Propiónico	5.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	12.2	52.6	55.0
		Butírico	10.6 ± 1.1 <sup>b</sup>	29.5		
		Acético	4.8 ± 0.0 <sup>c</sup>	6.6		
<b>Control (inulina)</b>	0 h	Propiónico	9.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	15.4	28.1	
		Butírico	38.7 ± 3.3 <sup>a</sup>	78.0		
		Acético	19.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	63.8		
	6 h	Propiónico	5.8 ± 2.0 <sup>a</sup>	23.3	67.8	
		Butírico	2.7 ± 0.0 <sup>ab</sup>	12.9		
		Acético	43.9 ± 5.8 <sup>a</sup>	58.0		
	12 h	Propiónico	14.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	23.2	87.9	
		Butírico	9.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	18.8		
		Acético	30.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	28.1		
	24 h	Propiónico	19.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	21.9	95.6	
		Butírico	37.5 ± 1.2 <sup>a</sup>	50.0		
		Acético	35.9 ± 1.2 <sup>a</sup>	30.3		
		Propiónico	21.8 ± 3.9 <sup>a</sup>	22.7		
		Butírico	37.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	47.0		

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes por triplicado ± DE. Las letras minúsculas diferentes por fila expresan diferencia significativa AGCC de las muestras por tiempo de fermentación (p=0.05, por prueba de Tukey). AGCC: ácidos grasos de cadena corta. IF (%): índice de fermentabilidad. <sup>1</sup>Contenido de AGCC expresado en mM compuesto por 0.001L de muestra (500 mg sólidos + 500 µL líquido) y 100 mg de inulina, respectivamente.

## VI.9 Análisis metabólico del efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la vaina de cacao sin fermentar y fermentada

Son limitados los estudios que evalúan el proceso fisiológico y metabólico de la vaina de cacao procesada. En esta investigación se identificaron los metabolitos secundarios procedente de la fermentación colónica, se utilizó un enfoque no dirigido

para conocer y profundizar en la transformación de los compuestos provenientes de la digestión en metabolitos durante la fase colónica de la VSF y VF48h.

En la **Figura 13** se observa la agrupación de 50 metabolitos por tiempo de fermentación (0, 6, 12 y 24 h) en los diferentes tipos de muestras de la VC, los cuales conforme avanza el tiempo de fermentación la abundancia y presencia de estos cambia.

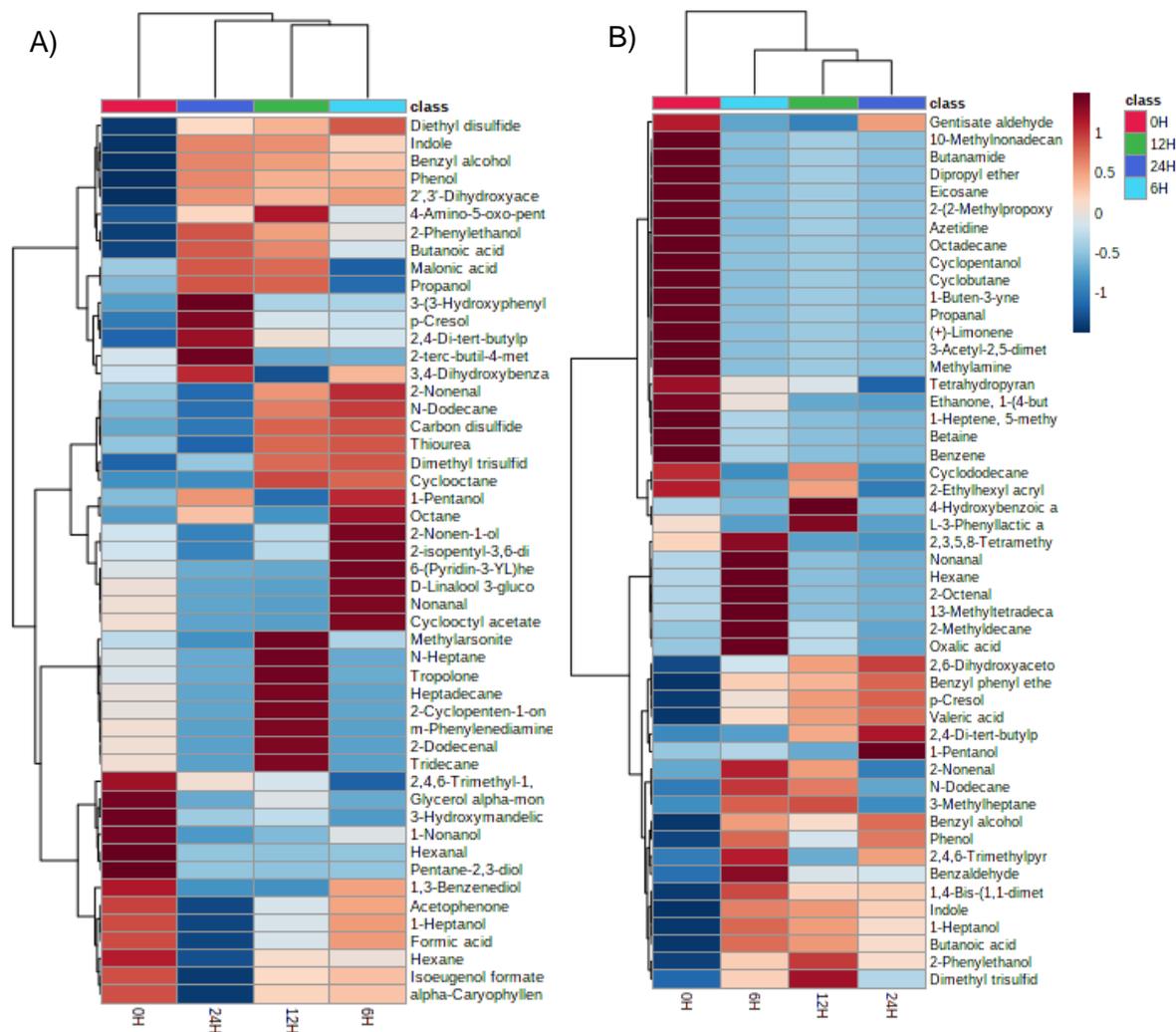
En la VF48h en las primeras horas de la fermentación colónica se presentaron moléculas de tipo aldehídos, hidroxilos, hidrocarburos aromáticos y aceites esenciales; estas moléculas son sintetizadas o provenientes de la fase intestinal de la FND, por ejemplo, las moléculas de hexano y hexanal son metabolitos derivados de la oxidación ácidos grasos polinsaturados (Larsson *et al.*, 2016); de igual manera la presencia de pentanodiol se relaciona con la hidrólisis previa de aminoácidos (Wang *et al.*, 2020).

Posteriormente, conforme avanza el tiempo de fermentación las moléculas antes mencionadas disminuyen y aumenta la presencia de compuestos relacionados con el metabolismo de la microbiota intestinal. El 2,4-di-terc-butilfenol es un metabolito secundario a partir del fenol producido por varios organismos, entre ellos, bacterias como *Bacillus licheniformis*, la cual es una bacteria que tiene función probiótica y se reporta su presencia en el colon (Li, *et al.*, 2020), indicando una posible actividad metabólica de la microbiota sobre los compuestos antioxidantes de la VF48h. Metabolitos como *p*-cresol, indole, benzil alcohol y 2-feniletanol incrementaron de manera gradual hasta tener una mayor concentración a las 24 horas, estos metabolitos se caracterizan por tener un origen proteolítico y se asocian con el consumo de alimentos altos en proteína, esta última característica se asocia con el cambio observado en la composición química de la vaina fermentada a las 48 horas (Maccaferri *et al.*, 2010; Al Hinai *et al.*, 2018; Hendrikx & Schnabl, 2019). De igual manera, el aumento de la abundancia de fenol, 2,6-dihidroxiacetofenona puede asociarse con el uso de los compuestos antioxidantes y macromoléculas como fuentes de energía por parte de la microbiota colónica, debido a que productos bioactivos pueden unirse a las matrices alimentarias y posteriormente se hidrolizan

en micromoléculas libres o se metabolizan y se convierten en compuestos bioactivos más simples (Ramakrishna, 2013; Shahidi & Peng, 2018).

Por otra parte, el ácido malónico, propanol y 1-pentanol incrementaron a las 24 horas, los dos últimos metabolitos relacionados con el metabolismo de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta. Las propionibacterias como *Clostridium propionicum* producen de forma nativa ácido propiónico a través de la vía Wood-Werkman a la par que el 1-propanol y pentanol, sin embargo, el ácido propiónico sigue siendo el principal producto (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017; Payne, Zhao & Fossey, 2017). Se ha reportado que el ácido malónico es precursor de la síntesis de AGCC principalmente propiónico y producto de la oxidación de estos mismos, además de reportar tener un efecto antiinflamatorio (Ridgway & McLeod, 2008; Chen, Chen, & Tang, 2020).

A diferencia de la vaina fermentada la VSF presentó un alto contenido de compuestos volátiles (3-Metilheptano, nonanal, hexano, 2-octanol, 2-metildecano, dodecano), moléculas comunes en el colon (ácido oxálico, 2-nonenal, alcohol benzilo, benzaldehído) y metabolitos relacionados con la oxidación de compuestos fenólicos (fenol). Sin embargo, se observó una mayor abundancia del ácido butanoico a las 6 horas. Posterior a las 6 horas, a las 24 horas se vuelve aumentar la abundancia de metabolitos implicados en la oxidación de compuestos fenólicos (2,6-dihidroxiacetofenona, 2,4-Di-terc-butilfenol), aminoácidos (*p*-cresol, 1-pentanol) y ácido valérico, el cual es un AGCC más largo y producto del metabolismo de la proteína.

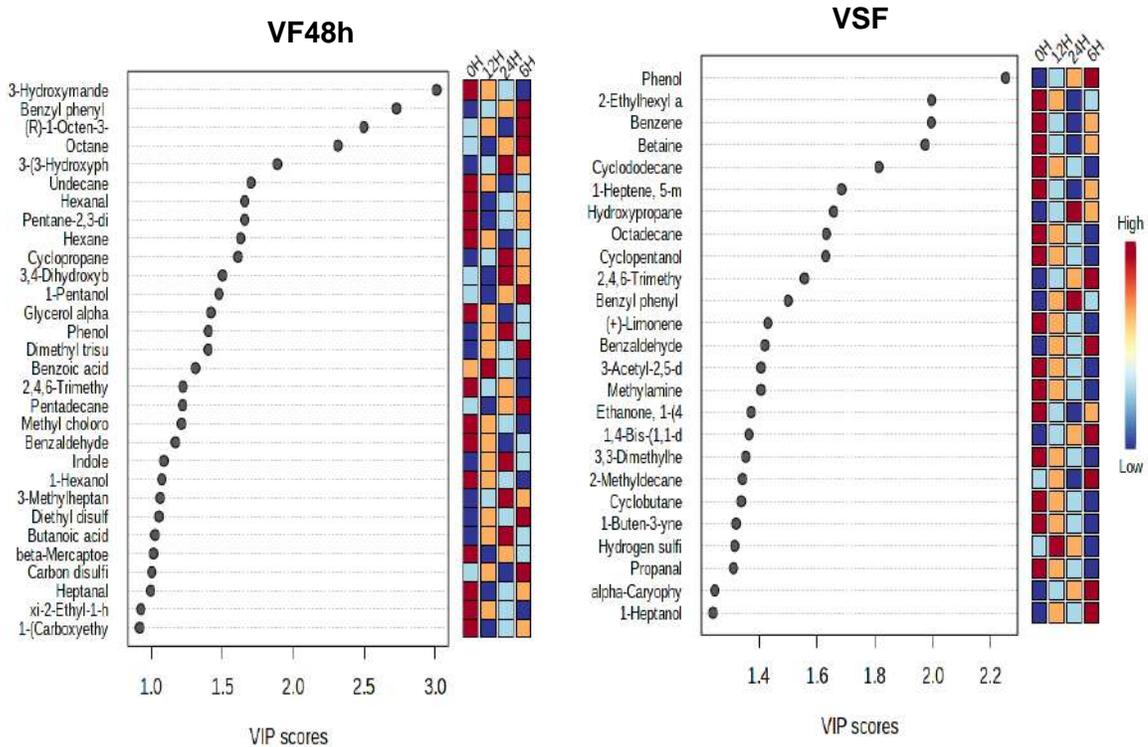


**Figura 13.** Metabolitos secundarios asociados a la fermentación colónica de la fibra de la vaina sin fermentar y fermentada a las 48 horas. A) Vaina fermentada 48 h; B) vaina sin fermentar.

La VF48h (1.0–3.0) mostró cambios significativos respecto a las VSF (1.4-2.2), puntuaciones VIP > 2.0 (**Figura 14**). Los metabolitos específicos que obtuvieron un valor mayor a 2.0 de la VF48 h, fueron: éter bencil fenílico, 1-octanol, 3,4-dihidroxibenzaldehído y ácido 3- (3-hidroxifenil) -3-hidroxiopropanoico. La mayoría de los metabolitos son procedentes de la degradación de los compuestos fenólicos y generan un efecto a la salud. Por ejemplo, el 3,4-dihidroxibenzaldehído es un aldehído fenólico conocido también como protocatechualdehído, el cual es producto

de la degradación de los ácidos hidroxicinámicos y se reporta tener beneficios a la salud (Santos & Vieira, 2013; List & Sun, 2018). Otro compuesto derivado de compuestos antioxidantes, el ácido 3- (3-hidroxifenil) -3-hidroxipropanoico, es un metabolito procedente del ácido hidrocafeico y del ácido hidroxipropionico, estos últimos compuestos procedente de la catálisis de Malonil CoA o del propionato, ambos compuestos intermediarios de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (Rekdal *et al.*, 2020; Kumar, Ashok & Park 2013).

Los metabolitos que sobresalen en la VSF (puntuaciones VIP > 2.0); betaína, acrilato de 2-etilhexilo, benceno y fenol, los cuales son metabolitos precursores de la síntesis de compuestos volátiles y aromáticos e intermediarios de la degradación de aminoácidos y carbohidratos como la betaina y el acrilato (Claus, Guillou & Ellero-Simatos, 2016; Koistinen *et al.*, 2019; Oliphant & Allen-Vercoe, 2019).

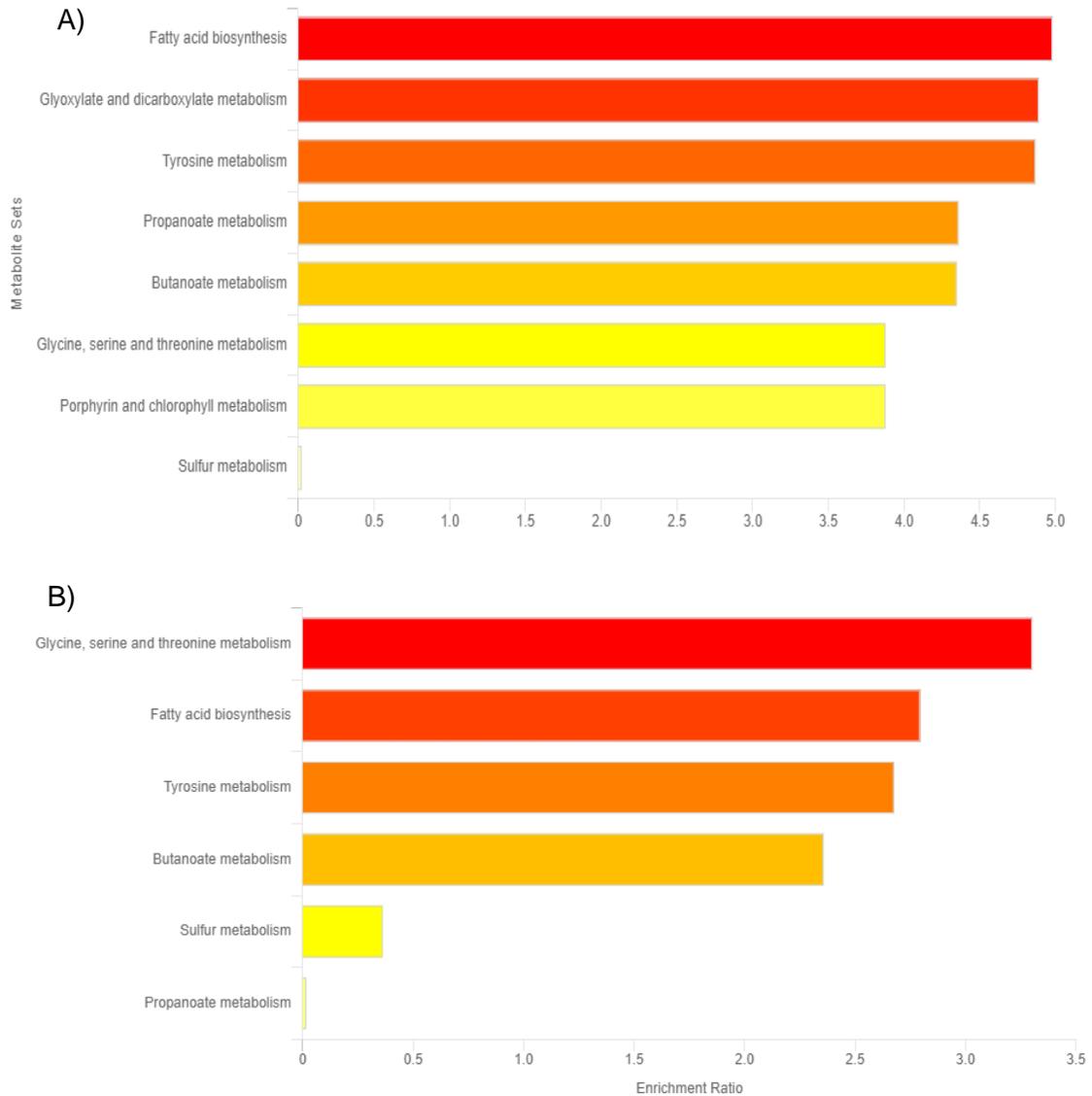


**Figura 14.** Puntuación VIP de los metabolitos secundarios producidos durante la fermentación colónica *in vitro* de la VSF (sin fermentar) y VF48h (fermentada c/ *R. oryzae*).

De acuerdo con los resultados reportados en la **Figura 13** y **Figura 14** se puede indicar que la composición química de la VF48h a las 24 horas origina la síntesis e incluso la oxidación de AGCC, además de la utilización de los compuestos antioxidantes y proteínas como energía por parte de la microbiota intestinal. Por otra parte, el proceso de extrusión-autoclave también pudiera ejercer un cambio en la composición química que permita la formación de AGCC en menor tiempo y utilización de ácidos fenólicos en mayor tiempo en el colon. Confirmando lo antes mencionado con los metabolitos VIP, debido a que la VF48h muestra un mayor número de metabolitos a las 24 horas y la VSF a las 6 horas, indicando una actividad diferente de la microbiota intestinal posiblemente a la diferencia de la estructura física-química de las diferentes muestras.

Lo antes mencionado se corrobora con las rutas asociadas a la fermentación (**Figura 15**); en la VF48h sobresalen la ruta metabólica del glioxinato-dicarboxilato y la ruta de la síntesis de ácidos grasos ambas rutas metabólicas se relacionan entre sí, y a su vez la ruta relacionada con la síntesis de ácidos grasos deriva a la vía metabólica relacionada con la síntesis de AGCC (butirato y propiónico). En bacterias la vía del glioxilato sirve como alternativa al ciclo del ácido tricarboxílico y es esencial para el metabolismo del acetato y los ácidos grasos en las bacterias (Leewis *et al.*, 2020). Debido a que, a través de la fuente de energía proveniente de ácidos grasos o carbohidratos, se deriva acetato, piruvato y lactato, los cuales son sustratos que contribuyen a la síntesis del ácido propiónico y butírico (Louis & Flint, 2017; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017). Sin embargo, fuentes como aminoácidos también contribuyen a la síntesis de AGCC como cisteína, serina y treonina (Louis & Flint, 2017). A diferencia de la vaina fermentada, la VSF mostró una mayor predominancia de la ruta metabólica asociada al metabolismo de glicina, serina, treonina y tirosina y también con la síntesis de ácidos grasos principalmente butirato. De acuerdo a la literatura, la síntesis de ácidos grasos de cadena corta podría estar dada principalmente por compuestos aminos, esto debido a la presencia de la ruta del metabolismo del azufre, la cual nos indica una oxidación de aminoácidos y fenoles (Carbonero *et al.*, 2012; Shahidi & Peng, 2018). Lo antes mencionado nos indica que el procesamiento con *R. oryzae* e inclusive el proceso térmico que genera la

autoclave influirá en la salud colónica a través de la formación de ácidos grasos de cadena corta y corrección de la disbiosis microbiana.



**Figura 15.** Rutas metabólicas asociadas a los metabolitos de la fermentación colónica *in vitro* de la vaina sin fermentar y vaina fermentada 48h. A) Vaina fermentada a las 48 horas; B) Vaina sin fermentar.

## Conclusiones

Por primera vez se reporta el efecto de la fermentación tipo tempeh con *R. oryzae* sobre la vaina de cacao, mostrándose un crecimiento y desarrollo óptimo del hongo a las 48 horas, originando un cambio en su composición química, principalmente en el contenido de proteínas, lípidos y cenizas. También se observó un incremento en el contenido de compuestos nutraceuticos principalmente taninos y fenoles, este último mostró una relación con la capacidad antioxidante de la VC. Cabe mencionar que la evaluación biológica (digestión *in vitro*) demostró que a través de la fermentación tipo tempeh mejoró la bioaccesibilidad y permeabilidad de los compuestos fenólicos (ácido gálico y ácido elágico) sugiriendo que el proceso de la fermentación tipo tempeh modifica la composición nutraceutica y nutricional de la vaina de cacao otorgando una beneficio nutricional. Debido a que la VC se caracteriza por ser un subproducto alto en fibra, la fermentación tipo tempeh no ocasionó un cambio significativo en el tipo de fibra. Sin embargo, a nivel del colon se presentó una mayor liberación de compuestos fenólicos a las (ácido gálico, catequina y teobromina); además de un aumento de la síntesis de AGCC, principalmente ácido propiónico y butírico, corroborando lo antes mencionado con las rutas metabólicas asociada a los principales metabolitos reportados del GC-MS, sugiriendo esto una actividad de la microbiota intestinal, la cual origina un efecto benéfico a la salud colónica. Sin embargo, aún existe la oportunidad de evaluar el efecto de los compuestos antioxidantes y AGCC en tejidos específicos para proponer a la vaina de cacao como un ingrediente funcional.

## Referencias

- Acosta-Estrada, B. A., Villela-Castrejón, J., Perez-Carrillo, E., Gómez-Sánchez, C. E., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2019). Effects of solid-state fungi fermentation on phenolic content, antioxidant properties and fiber composition of lime cooked maize by-product (nejayote). *Journal of Cereal Science*, *90*, 102837.
- Adebo, O. A., & Gabriela Medina-Meza, I. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. *Molecules*, *25*(4), 927.
- Al Hinai, E. A., Kullamethee, P., Rowland, I. R., Swann, J., Walton, G. E., & Commane, D. M. (2019). Modelling the role of microbial *p*-cresol in colorectal genotoxicity. *Gut Microbes*, *10*(3), 398-411.
- Alemawor, F., Dzogbefia, V. P., Oddoye, E. O., & Oldham, J. H. (2009). Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on cocoa pod husk composition: Influence of fermentation period and Mn<sup>2+</sup> supplementation on the fermentation process. *African Journal of Biotechnology*, *8*(9), 1950-1958.
- Alemawor, F., Oddoye, E. O. K., Dzogbefia, V. P., Oldham, J. H., & Donkoh, A. (2010). Broiler performance on finisher diets containing different levels of either *Pleurotus ostreatus*-fermented dried cocoa pod husk or dried cocoa pod husk supplemented with enzymes. *Tropical Animal Health and Production*, *42*(5), 933-939.
- Altop, A. (2019). Effect of solid-state fermentation on main nutritional components, some minerals, condensed tannin and phenolic compounds of olive leaves. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, *7*(1), 115-119.
- Altop, A., Coskun, I., Filik, G., Kucukgul, A., Genc, Y., Bekiroglu, H. C. & Erener, G (2018). Amino acid, mineral, condensed tannin, and other chemical. *Ciencia e Investigación Agraria*, *45*(2), 220-230.
- Amorim GM, Oliveira AC, Gutarra MLE, Godoy MG, Freire DMG (2017). Solid state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. *Biocatalyst and Agricultural Biotechnology*. 11:34-41.

- Amorim, J.C., Vriesmann, L.C., Petkowicz, C.L., Martinez, G.R., & Noletto, G.R. (2016). Modified pectin from *Theobroma cacao* induces potent pro-inflammatory activity in murine peritoneal macrophage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 1040-1048.
- Anal, A.K. (2019). Quality ingredients and safety concerns for traditional fermented foods and beverages from Asia: A Review. *Journal of Fermentation*, 5(8), 1-12.
- AOAC International. (2002) *Official methods of analysis of AOAC International* (17). Gaithersburg, MD, USA.
- Bader Ul Ain, H., Saeed, F., Ahmed, A., Asif Khan, M., Niaz, B., & Tufail, T. (2019). Improving the physicochemical properties of partially enhanced soluble dietary fiber through innovative techniques: A coherent review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(4), e13917.
- Ban, C., Park, S. J., Lim, S., Choi, S. J., & Choi, Y. J. (2015). Improving flavonoid bioaccessibility using an edible oil-based lipid nanoparticle for oral delivery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(21), 5266-5272
- Batt, C.A & Tortorello, M.L. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. ELSEVIER: United States of America.
- Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K. K., & Karlović, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 42(5), 707-716.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P.... & Powell, I. B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87-97.
- Buenrostro-Figueroa, J. J., Velázquez, M., Flores-Ortega, O., Ascacio-Valdés, J. A., Huerta-Ochoa, S., Aguilar, C. N., & Prado-Barragán, L. A. (2017). Solid state fermentation of fig (*Ficus carica L.*) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. *Process Biochemistry*, 62, 16-23.

- Campos-Vega, R., Guevara-González, R. G., Guevara-Olvera, B. L., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2010). Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International*, 43(4), 1057-1064.
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172-184.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J.A., Guzmán-Maldonado, S.H., Paredes-López, O., Oomah, B.D., & Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and *in vitro* polysaccharides fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Institute of Food Technologist*, 74(7), T59-T65.
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B.D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability, *Food Research International*, 77(2), 156-161.
- Cano, A., Roque, J., Luebert, F., Dostert, N., La Torre, M. I., & Weigend, M. (2012). Hoja botánica: Cacao. *Theobroma cacao* L.
- Cantabrana, I., Perise, R., & Hernández, I. (2015). Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2 (2), 103-111.
- Cantele, C., Rojo-Poveda, O., Bertolino, M., Ghirardello, D., Cardenia, V., Barbosa-Pereira, L., & Zeppa, G. (2020). *In vitro* bioaccessibility and functional properties of phenolic compounds from enriched beverages based on cocoa bean shell. *Foods*, 9(6), 715.
- Capuano, E. (2017). The behavior of dietary fiber in the gastrointestinal tract determines its physiological effect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3543-3564.
- Carbonero, F., Benefiel, A. C., Alizadeh-Ghamsari, A. H., & Gaskins, H. R. (2012). Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease. *Frontiers in Physiology*, 3, 448.

- Chait, Y. A., Gunenc, A., Bendali, F., & Hosseinian, F. (2020). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of carob polyphenols: Bioaccessibility and bioactivity. *LWT-Food Science and Technology*, 117, 108623.
- Chalid, S. Y., & Rahmawati, S. H. A. (2019). Angiotensin converting enzyme inhibitor activity of the soybean tempeh protein as functional food. *International Journal*, 16(56), 73-78.
- Chen, H., Zhao, C., Li, J., Hussain, S., Yan, S., & Wang, Q. (2018). Effects of extrusion on structural and physicochemical properties of soluble dietary fiber from nodes of lotus root. *LWT - Food Science and Technology*, 93, 204-211.
- Chen, X. F., Chen, X., & Tang, X. (2020). Short-chain fatty acid, acylation and cardiovascular diseases. *Clinical Science*, 134(6), 657-676.
- Chen, Y. *et al.*, (2019). Extrusion and fungal fermentation change the profile and antioxidant activity of free and bound phenolics in rice bran together with the phenolic bioaccessibility. *LWT - Food Science and Technology*, 115, 108461.
- Claus, S. P., Guillou, H., & Ellero-Simatos, S. (2016). The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants?. *Biofilms and Microbiomes*, 2(1), 1-11.
- Clifford, M. N., van der Hooft, J. J., & Crozier, A. (2013). Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(6), 1619S-1630S.
- Colantuono, A., Ferracane, R., & Vitaglione, P. (2016). *In vitro* bioaccessibility and functional properties of polyphenols from pomegranate peels and pomegranate peels-enriched cookies. *Food & Function*, 7(10), 4247-4258.
- Couto, S. R., & Sanromán, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
- Dang, T.T. & Vasanthan, T. (2018). Modification of rice bran dietary fiber concentrates using enzyme and extrusion cooking. *Food Hydrocolloids*, 89, 773-782.
- Das, R. K., Lonappan, L., Brar, S. K., & Verma, M. (2015). Bio-conversion of apple pomace into fumaric acid in a rotating drum type solid-state bench scale

- fermenter and study of the different underlying mechanisms. *RSC Advances*, 5(126), 104472-104479.
- de Cosío-Barrón, A. C. G., Hernández-Arriaga, A. M., & Campos-Vega, R. (2020). Spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds positively modulate indicators of colonic microbial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 60, 102286.
- de Lima, T. M., de Almeida, A. B., Peres, D. S., de Sousa, T. L., de Freitas, B. S. M., Silva, F. G., & Egea, M. B. (2021). *Rhizopus oligosporus* as a biotransforming microorganism of *Anacardium othonianum* Rizz. byproduct for production of high-protein, -antioxidant, and-fiber ingredient. *LWT - Food Science and Technology*, 135, 110030.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2011). Cross-feeding between bifidobacteria and butyrateproducing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 73-80.
- dos Santos Oliveira, M., Feddern, V., Kupski, L., Cipolatti, E. P., Badiale-Furlong, E., & de Souza-Soares, L. A. (2011). Changes in lipid, fatty acids, and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. *Bioresource technology*, 102(17), 8335-8338.
- Dulf, F. V., Vodnar, D. C., Dulf, E. H., & Pintea, A. (2017). Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (*Prunus armeniaca* L.) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 1-10.
- Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., Yang, L. (2014). Three- Dimensional Cell Culture Systems and the Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay and Drug Development Technologies* 12(4). 207-218.
- Elleuch, M., Dorothea, B., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H. (2010). Dietary fibre and fibre-rich by products of food processing: characterization, technological functionality and commercial applications: a review. *Food Chemistry*, 124(2), 411-21.

- Erkan, S. B., Gürler, H. N., Bilgin, D. G., Germec, M., & Turhan, I. (2020). Production and characterization of tempehs from different sources of legume by *Rhizopus oligosporus*. *LWT - Food Science and Technology*, 119, 108880.
- Evangelina, P., Miró, M.J., Boticario, C. (2011). Muerte celular y cáncer: Las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia del cáncer. *Anales de la Real Academia de Doctores de España* 15(2). 191-215.
- FAO (2006). Probióticos en los alimentos. *Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. 4-10.
- FAO (2009). Comisión del Codex alimentarius. *Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias*. 27-54.
- Fernández, J., Redondo-Blanco, S., Gutiérrez-del-Río, I., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2016). Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *Journal of Functional Foods*, 25, 511-522.
- Fissore, E. N., Ponce, N. M. A., de Escalada Pla, M. F., Stortz, C. A., Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2010). Characterization of acid-extracted pectin-enriched products obtained from red beet (*Beta vulgaris L. var. conditiva*) and butternut (*Cucurbita moschata Duch ex Poiret*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (6), 3793–3800.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., & Sarniguet, A. (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(4), 583-609.
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597-3604.
- Galanakis, C.M. (2019). *Dietary Fiber: properties, recovery and applications*. ELSEVIER: London, UK.

- Geburu, Y. A., & Sbhatu, D. B. (2020). Effects of Fungi-Mediated Solid-State Fermentation on Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Brown and White Teff (*Eragrostis tef* Zucc. Trotter) Grains. *Journal of Food Quality*, 2020.
- Gerschenson, L.N., Rojas, A.M., Fissore, E.M. (2019). Conventional and Emerging Extraction Technologies. In: *Dietary Fiber: Properties, Recovery and Applications* (199-245). Academic Press.
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (2), 251–260.
- González-Aguilar, G.A., Blancas-Benítez, F.J., & Sáyago-Ayerdi, S.G. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*, 13, 84-88.
- Gonzalez-Garcia, R. A., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L. K., & Marcellin, E. (2017). Microbial propionic acid production. *Fermentation*, 3(2), 21.
- Guo, Q., Kang, J., Bai, Y., & Xu, F. (2018). Dietary Fiber: Chemistry, Structure, and Properties.
- Hendriks, T., & Schnabl, B. (2019). Indoles: metabolites produced by intestinal bacteria capable of controlling liver disease manifestation. *Journal of Internal Medicine*, 286(1), 32-40.
- Herrera-Cazares, L. A., Hernández-Navarro, F., Ramírez-Jiménez, A. K., Campos-Vega, R., Reyes-Vega, M. de la L., Loarca-Piña, G., ... Gaytán-Martínez, M. (2017). Mango-bagasse functional-confectionery: vehicle for enhancing bioaccessibility and permeability of phenolic compounds. *Food & Function*, 8(11), 3906–3916.
- Janarny, G., & Gunathilake, K. D. P. P. (2020). Changes in rice bran bioactives, their bioactivity, bioaccessibility and bioavailability with solid-state fermentation by *Rhizopus oryzae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101510.
- Jozinovic, A., Panak-Balentic, J., Ackar, D., Babic, J., Pajin, B., Milicevic, B., Guberac, S., Vrdoljak, A., & Subaric, D. (2018) Cocoa husk application in the enrichment of extruded snack products. *Journal Food Processing and Preservation*, 42(2), e13866.

- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V. ... & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science: AMS*, 14(4), 910.
- Karim, A. A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., Abd Gani, S. S., Zainudin, B. H., & Abdullah, N. A. (2014). Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1-13.
- Koistinen, V. M., Nordlund, E., Katina, K., Mattila, I., Poutanen, K., Hanhineva, K., et al. (2017). Effect of bioprocessing on the *in vitro* colonic microbial metabolism of phenolic acids from rye bran fortified breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(9), 1854–1864.
- Koistinen, V. M., Kärkkäinen, O., Borewicz, K., Zarei, I., Jokkala, J., Micard, V., ... & Hanhineva, K. (2019). Contribution of gut microbiota to metabolism of dietary glycine betaine in mice and *in vitro* colonic fermentation. *Microbiome*, 7(1), 1-14.
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb-prot095497.
- Kumar, R., Sharma, J., & Singh, R. (2007). Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. *Microbiological Research*, 162(4), 384-390.
- Kumar, V., Ashok, S., & Park, S. (2013). Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnology Advances*, 31(6), 945-961.
- Kupski, L., Cipolatti, E., Rocha, M. D., Oliveira, M. D. S., Souza-Soares, L. D. A., & Badiale-Furlong, E. (2012). Solid-state fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(6), 937-942.

- Landete, J. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, *44*, 1150-1160.
- Larsson, K., Tullberg, C., Alminger, M., Havenaar, R., & Undeland, I. (2016). Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-hexenal are formed during dynamic gastrointestinal in vitro digestion of cod liver oils. *Food & Function*, *7*(8), 3458-3467.
- Lateef, A., Oloke, J.K., Gueguim-Kana, E.B., Oyeniyi, S.O., Onifade, O.R., Oyeleye, A.O., Oladosu, O.C., & Oyelami, A.O. (2008). Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24* (10), 2369-2374.
- Lennartsson, P., Edebo, L., & Taherzadeh, M. J. (2014). Rhizopus. Encyclopedia of Food Microbiology, Elsevier
- Leewis, M. C., Berlemont, R., Podgorski, D. C., Srinivas, A., Zito, P., Spencer, R. G. & Mackelprang, R. (2020). Life at the frozen limit: microbial carbon metabolism across a late Pleistocene permafrost chronosequence. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1753.
- Li, Y., Liu, M., Liu, H., Wei, X., Su, X., Li, M., & Yuan, J. (2020). Oral supplements of combined *Bacillus licheniformis* Zhengchangsheng® and xylooligosaccharides improve high-fat diet-induced obesity and modulate the gut microbiota in rats. *BioMed Research International*, 2020.
- Liendo, R. (2005). Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolates y sub productos. Tecnología Post cosecha. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Maracay. Food Research*, *29*, 279-307.
- List, B., & Sun, D. (2018). Temperature-Directed Biocatalysis for the Production of Aromatic Aldehydes. *Synfacts*, *14*(05), 0530.
- Londoño-Hernandez, L., Ruiz, H. A., Ramírez, T. C., Ascacio, J. A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2020). Fungal detoxification of coffee pulp by solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *23*, 101467.

- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 19(1), 29-41.
- Lu, F., Rodriguez-García, J., Van-Damme, I., Westwood, J. Shaw, L., Robinson, J.S., Warren, G., Chatzifragkou, A., McQueen-Mason, S., Gomez, L., Faas, L., Balcombe, K., Srinivasan, C. Picchioni, F., Hadley, P., Charalampopoulos, D. (2018). Valorization strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 80-88.
- Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Preciado-Ortiz, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during *in vitro* gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Food Research International*, 100, 304-311.
- Maccaferri, S., Vitali, B., Klinder, A., Kolida, S., Ndagijimana, M., Laghi, L., ... & Costabile, A. (2010). Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an *in vitro* approach using a continuous culture colonic model system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2556-2565.
- Maleyki, M. A., & Ismail, A. (2010). Antioxidant properties of cocoa powder. *Journal of Food Biochemistry*, 34(1), 111-128.
- Maphosa, Y., & Jideani, V.A. (2015). Dietary fiber extraction for human nutrition- A review. *Food Reviews International*, 32(1), 98-115.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological, and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39-45.
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Gómez-Juaristi, M., Goya, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Research International*, 63, 446-455.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I. (2015). HT29 Cell Line. In *The impact of food bioactives on health: In Vitro and Ex vivo Models*. Springer. 113-129.

- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365-373.
- Mitra, A., Mishra, L., & Li, S. (2013) Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends in Biotechnology*, 31(6), 347-354.
- Mohd, S.B., Sameer A., Jan, K., & Khalid, B. (2018). Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends in food Science & Technology*, 66, 108-116.
- Moreno-Jiménez, M.A., López-Barraza, R., Cervantes-Cardoza, V., Pérez-Ramírez, I.F., Reyna-Rojas, J.A., Gallegos-Infante, J.A., Estrella, I., Rojas-Contreras, J.A., González-Laredo, R.F., Rocha-Guzmán, N.R. (2018). Mechanisms associated to apoptosis of cancer cells by phenolic extracts from two canned common beans varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 43 (6), e12680.
- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS•+ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674.
- Nelofer, R., Nadeem, M., Irfan, M., & Syed, Q. (2018). Nutritional enhancement of barley in solid state fermentation by *Rhizopus oligosporus* ML-10. *Nutrition and Food Science International Journal*, 6, 555700.
- Nguyen, V. T., & Nguyen, N. H. (2017). Proximate Composition, Extraction, and Purification of Theobromine from Cacao Pod Husk (*Theobroma Cacao* L.). *Technologies*, 5(2), 14. H
- Nguyen, V. T., Tran, T. G., & Tran, N. L. (2021). Phytochemical compound yield and antioxidant activity of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) as influenced by different dehydration conditions. *Drying Technology*, 1-13.
- Nieto-Figueroa, K. H., Mendoza-García, N. V., Gaytán-Martínez, M., Wall-Medrano, A., Loarca-Piña, M. G. F., & Campos-Vega, R. (2020). Effect of drying methods on the gastrointestinal fate and bioactivity of phytochemicals from cocoa pod husk: In vitro and in silico approaches. *Food Research International*, 137, 109725.

- Nikmaram, N., Leong, S.Y., Koubaa, M., Zhu, Z., Barba, F.J., Greiner, R., Oey, I. & Roohinejad S. (2017). Effect of extrusion on the anti-nutritional factors of food products: An overview. *Food Control*, 79, 62-73.
- Oduro-Mensah D, Ocloo A, Lowor ST, Mingle C, Okine LKNA, Adamafio NA (2018). Bio detheobromination of cocoa pod husks: reduction of ochratoxin A content without change in nutrient profile. *Microbial Cell Factories*. 17:79-88.
- Olano-Martin, E., Mountzouris, K.C., Gibson, G.R. & Rastall, R.A. (2000). *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*, 83 (3), 247-255.
- Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(1), 1-15.
- Oliveira, A., & Pintado, M. (2015). *In vitro* evaluation of the effects of protein–polyphenol–polysaccharide interactions on (+)-catechin and cyanidin-3-glucoside bioaccessibility. *Food & function*, 6(11), 3444-3453.
- Oliveras-Sevilla, J.M. (2007). La elaboración del chocolate, una técnica dulce y ecológica. *Técnica Industrial* 263, 47-51.
- Oliveira, M. D. S., Feddern, V., Kupski, L., Cipolatti, E. P., Badiale-Furlong, E., & de Souza-Soares, L. A. (2010). Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass Caracterización físico-química de la biomasa del salvado de arroz fermentado. *CyTA–Journal of Food*, 8(3), 229-236.
- Olugosi, O. A., Agbede, J. O., Adebayo, I. A., Onibi, G. E., & Ayeni, O. A. (2019). Nutritional enhancement of cocoa pod husk meal through fermentation using *Rhizopus stolonifer*. *African Journal of Biotechnology*, 18(30), 901-908.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), R6–R15.
- Payne, D. T., Zhao, Y., & Fossey, J. S. (2017). Ethylenation of aldehydes to 3-propanal, propanol and propanoic acid derivatives. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8.

- Pazo-Cid, R.A., Álvarez-Alejandro, M., Cebollero-de Miguel, A., Agustín, M.J., Martínez-Lostao, L., Anel-Bernal, A., Pérez-García, J.L., Antón-Torres, A. (2012). Apoptosis, cáncer & Co. *Revista Internacional de Grupos de Investigación de Oncología*, 1(1), 23-28. Obtenido de: <https://www.elsevier.es/es-revista-regio-revista-internacional-grupos-investigacion-339-pdf-X225364501243094X>
- Priyangini, F., Walde, S.G., & Ramalingam, C. (2018). Extraction optimization of pectin from cocoa pod husks (*Theobroma cacao L.*) with ascorbic acid using response surface methodology. *Journal Carbohydrate Polymers*, 202, 497-503.
- Puerta-Quintero, G.I. (2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Avances Técnicos Cenicafe*, 402, 2-12. Obtenido de: <http://biblioteca.cenicafe.org/>
- Qi, X., Al-Ghazzewi, F. H., & Tester, R. F. (2018). Dietary fiber, gastric emptying, and carbohydrate digestion: A mini-review. *Starch Stärke*, 70 (9-10), 1700346.
- Quatrin, A., Rampelotto, C., Pauletto, R., Maurer, L. H., Nichelle, S. M., Klein, B., ... & Emanuelli, T. (2020). Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Functional Foods*, 65, 103714.
- Ramakrishna, B.S. (2013). Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 28: 9–17
- Rekdal, V. M., Bernadino, P. N., Luescher, M. U., Kiamehr, S., Le, C., Bisanz, J. E. & Balskus, E. P. (2020). A widely distributed metalloenzyme class enables gut microbial metabolism of host-and diet-derived catechols. *Elife*, 9, e50845.
- Reynoso-Noverón, N., & Torres-Domínguez, J. A. (2017). Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*, 8(1), 9-15. Obtenido de: <http://revistas.unam.mx/index.php/rlmc/article/view/65111>
- Ricci, A., Diaz, A.B., Caro, I., Bernini, V., Galaverna, G., Lazzi, C., & Blandino, A. (2019). Orange peels: from by-product to resource through lactic acid

- fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(15), 6761-6767.
- Ridgway, N., & McLeod, R. (2008). *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier.
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., El Khattabi, C., Youl, E. N., Bertolino, M., Delporte, C., ... & Stévigny, C. (2020). Polyphenolic and methylxanthine bioaccessibility of cocoa bean shell functional biscuits: metabolomics approach and intestinal permeability through caco-2 cell models. *Antioxidants*, 9(11), 1164.
- Roasa, J., De Villa, R., Mine, Y., & Tsao, R. (2021). Phenolics of cereal, pulse and oilseed processing by-products and potential effects of solid-state fermentation on their bioaccessibility, bioavailability and health benefits: A review. *Trends in Food Science & Technology*.
- Rosa, L.S., Silva, J.A., Soares, N.C.P., onteriro, M.C., Teodoro, A.K. (2016). Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer- A review. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6 (2), 1-7.
- SAGARPA (2017). Cacao Mexicano. *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*. 2-8. Obtenido de: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/255627/Planeacion\\_Agricola\\_Nacional\\_2017-2030- parte\\_uno.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/255627/Planeacion_Agricola_Nacional_2017-2030- parte_uno.pdf)
- Salas, J. & Hernández, L.Y. (2015). Cacao, una aportación de México al mundo. *Revista Ciencia*, 66(3), 33-39.
- Salazar-López, N. J., Loarca-Piña, G., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Morales-Sánchez, E., Esquerra-Brauer, J. M., González-Aguilar, G.A., Robles-Sánchez, M. (2016). The Extrusion Process as an Alternative for Improving the Biological Potential of Sorghum Bran: Phenolic Compounds and Antiradical and Anti-Inflammatory Capacity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-8.
- Sánchez-Barriga, J.J. (2017). Tendencias de mortalidad y riesgo de muerte por cáncer colorrectal en las 7 regiones socioeconómicas de México, 2000-2012. *Revista de Gastroenterología de México*, 82(3), 217-225.

- Sanlier, N., Basar-Gokcen, B., & Ceyhun-Sezgin, A. (2017). Health benefits of fermented foods. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 506-527.
- Santos, D.I., Saraiva, J.M.A., Vicente, A.A., Moldao-Martin, M. (2019). Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. In: *Innovate Thermal and Non-Thermal Processing Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds* (pp. 23-54). Woodhead Publishing.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.
- Saura-Calixto, F. (2010). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43-49
- Santos, P. M., & Vieira, A. J. (2013). Antioxidising activity of cinnamic acid derivatives against oxidative stress induced by oxidising radicals. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 26(5), 432-439.
- Sarriá, B., Gomez-Juaristi, M., López, S. M., Cordero, J. G., Bravo, L., & Briz, M. R. M. (2020). Cocoa colonic phenolic metabolites are related to HDL-cholesterol raising effects and methylxanthine metabolites and insoluble dietary fibre to anti-inflammatory and hypoglycemic effects in humans. *PeerJ*, 8, e9953.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.-M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S2), S310–S329.
- Shabbir, U., Rubab, M., Daliri, E. B. M., Chelliah, R., Javed, A., & Oh, D. H. (2021). Curcumin, quercetin, catechins and metabolic diseases: The role of gut microbiota. *Nutrients*, 13(1), 206.
- Shahidi, F., & Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, 4, 11-68.
- Shamir, E.R., & Ewald, A.J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(10), 647-664.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Sriherwanto, C., Santoso, B., Mahsunah, A., Suja'i, I., Toelak, S., & Rusmiyati, M. (2016). Effects of *Rhizopus oryzae* fermentation of cocoa byproduct on certain amino acid and theobromine contents. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 3(2), 72-80.
- Sudjud, S., Mahmud, S. A., & Djafar, C. A. (2020). Exploration of Morphological Diversity of Cacao Plant (*Theobroma cacao* L.) in Bacan Island. In *5th International Conference on Food, Agriculture and Natural Resources (FANRes 2019)* (pp. 89-93). Atlantis Press.
- Tang, J., Yan, H., & Zhuang, S. (2013). Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. *Clinical Science*, 124(11), 651-662.
- Tao, J., Li, Y., Li, S., & Li, H.B. (2018). Plant foods for the prevention and management of colon cancer. *Journal of Functional Foods*, 42, 95-110.
- Tomas, M., Rocchetti, G., Ghisoni, S., Giuberti, G., Capanoglu, E., Lucini, L. (2019). Effect of different soluble dietary fibres on the phenolic profile of blackberry puree subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and large intestine fermentation. *Food Research International*, 130, 108954.
- Torres-León, C., Ramírez-Guzmán, N., Ascacio-Valdes, J., Serna-Cock, L., dos Santos Correia, M. T., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*, 112, 108236.
- Urbonavičienė, D., Viškelis, P., Bartkienė, E., Juodeikienė, G., & Vidmantienė, D. (2015). The Use of Lactic Acid Bacteria in the Fermentation of Fruits and Vegetables—Technological and Functional Properties; Chapter 7. *Biotechnology/Edited by Deniz Ekinci*. Rijeka: InTech, 2015.
- Valadez-Carmona, L., Plazola-Jacinto, C.P., Hernández-Ortega, M., Hernández-Navarro, M.D., Villarreal, F., Necochea-Mondragón, H., Ortiz-Moreno, A., Ceballos-Reyes, G. (2017). Effects of microwaves, hot air and freeze-drying

- on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41, 378-386.
- Van de Velde, F., Pirovani, M. E., & Drago, S. R. (2018). Bioaccessibility analysis of anthocyanins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. *Journal of Food Composition and Analysis*, 72, 22-31.
- Vásquez, Z.S., Carvalho-Neto, D.P., Pereira, G.V.M., Vandenberghe, L.P.S., De Oliveira, P.Z., Tiburcio, P.B., Rogez, H.L.G., Goes-Neto, A., Soccol, C.R. (2018). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 90, 72-83.
- Vázquez-Ovando, A., Molina-Freaner, F., Nuñez-Farfán, J., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2015). Classification of cacao beans (*Theobroma cacao* L.) of southern Mexico based on chemometric analysis with multivariate approach. *European Food Research and Technology*, 240(6), 1117-1128.
- Venegas, D. P., Marjorie, K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., Faber, K.N. & Hermoso, M. A. (2019). Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*, 10.
- Ververis, K. & Karagiannis, T.C. (2012). Overview of the classical histone deacetylase enzymes and histone deacetylase inhibitors. *International Scholarly Research Notices Cell Biology*, 2012.
- Vilcanqui-Pérez, F., Vílchez,-Perales, C. (2017). 10. Fibra dietaria: nuevas definiciones, propiedades funcionales y beneficios para la salud. Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 67(2), 146-155.
- Vivian Offiah, Vassilis Kontogiorgos & Kolawole O. Falade (2018): Extrusion processing of raw food materials and by-products: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Vong, W. C., Hua, X. Y., & Liu, S. Q. (2018). Solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Yarrowia lipolytica* improved nutritional and flavour properties of okara. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 316-322.

- Wang, J., Li, C., Zou, Y., & Yan, Y. (2020). Bacterial synthesis of C3-C5 diols via extending amino acid catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(32), 19159-19167.
- Wang, K., Niu, M., Song, D., Liu, Y., Wu, Y., Zhao, J., Li, S., & Lu, B. (2019). Evaluation of biochemical and antioxidant dynamics during the co-fermentation of dehusked barley with *Rhizopus oryzae* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Biochemistry*, *44*(2), e13106.
- Wang, M., Wichienchot, S., He, X., Fu, X. Huang, Q., & Zhang, B. (2019). In vitro colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acids production and changes in microbiota. *Trends in Food Science and Technology*, *88*, 1-9.
- Williamson, G., Kay, C. D., & Crozier, A. (2018). The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(5), 1054-1112.
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—A non-systematic review. *Nutrients*, *12*(5), 1401.
- y Postigo, L. O. C., Jacobo-Velázquez, D. A., Guajardo-Flores, D., Amezquita, L. E. G., & García-Cayueta, T. (2021). Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by-products: Recent advances and its industrial feasibility. *Food Bioscience*, 100926.
- Zambrano, C., Kotogán, A., Bencsik, O., Papp, T., Vágvölgyi, C., Mondal, K. C., ... & Takó, M. (2018). Mobilization of phenolic antioxidants from grape, apple and pitahaya residues via solid state fungal fermentation and carbohydrase treatment. *LWT - Food Science and Technology*, *89*, 457-465.
- Zamora-Gasga, V. M., Álvarez-Vidal, C., Montalvo-González, E., Loarca-Piña, G., Vázquez-Landaverde, P. A., Bello-Pérez, L. A., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2018). Gut metabolites associated with pH and antioxidant capacity during in vitro colonic fermentation of Mexican corn products. *Cereal Chemistry*, *95*(3), 399-410.

- Zamora-Gasga, V. M., Loarca-Piña, G., Vázquez-Landaverde, P. A., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). In vitro colonic fermentation of food ingredients isolated from Agave tequilana Weber var. azul applied on granola bars. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 766-772.
- Zhao, H. M., Guo, X. N., & Zhu, K. X. (2017). Impact of solid-state fermentation on nutritional, physical and flavor properties of wheat bran. *Food Chemistry*, 217, 28-36.
- Zhong, L., Fang, Z., Wahlqvist, M.L., Hodgson, J.M., Johnson, S.K. (2018). Extrusion cooking increases soluble dietary fibre of lupin seed coat, *LWT - Food Science and Technology*, 99, 647-554.