



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

“Efecto quimioprotector de tortillas de maíz (*Zea mays L.*) elaboradas por procesos de nixtamalización tradicional y ecológico, con y sin aditivos, en un modelo de cáncer de colon”

## TESIS

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

**Presenta:**  
L.N. Sara Julietta Lozano Herrera

**Dirigido por:**  
Dra. Minerva Ramos Gómez

Centro Universitario Querétaro, Qro. Diciembre, 2014.



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

"Efecto quimioprotector de tortillas de maíz (*Zea mays L.*) elaboradas por procesos de nixtamalización tradicional y ecológico, con y sin aditivos, en un modelo de cáncer de colon"

**TESIS**

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

**Presenta:**

L.N. Sara Julietta Lozano Herrera

**Dirigido por:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

**SINODALES**

Dra. Minerva Ramos Gómez  
Presidente

Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas  
Secretario

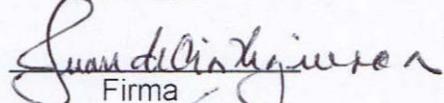
Dr. Gerardo Manuel Nava Morales  
Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Suplente

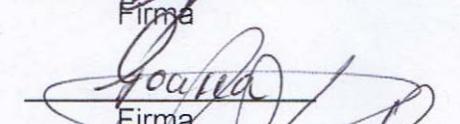
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Suplente

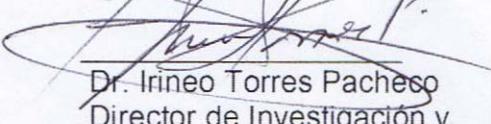
M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

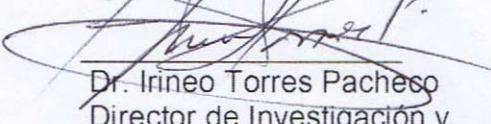
  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre 2014  
México

## RESUMEN

Estudios epidemiológicos demuestran que el consumo diario de 2 g de fibra proveniente de granos tiene efecto protector contra el cáncer de colon. Sin embargo, en estudios animales no siempre se ha tenido el resultado esperado administrando únicamente fibra, por lo que dicho efecto podría deberse a los fitoquímicos presentes en los granos enteros. En México, el grano más consumido es el maíz y la tortilla la forma más usual de consumo. Desde tiempos prehispánicos se ha utilizado el proceso de nixtamalización para su elaboración. En los últimos años se han propuesto procesos ecológicos, los cuales han aumentado el contenido de fibra en la tortilla. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto anticancerígeno en un modelo de cáncer de colon de tortillas de maíz obtenidas mediante el proceso tradicional (T), y ecológico (E), con y sin aditivos (A), así como tortillas obtenidas a partir de una harina comercial (M). De acuerdo al análisis nutrimental y de compuestos bioactivos (Fibra y fenoles libres), las tortillas E y EA presentaron mayor contenido de fibra insoluble (13.5 y 13.4%, respectivamente) que las tortillas T, TA y M (8.6, 8.7 y 7.6%, respectivamente). Sin embargo, las tortillas M tuvieron mayor contenido de fenoles libres (9.44 mg EAF por g de muestra;  $p<0.05$ ). Para el estudio animal, ratas macho Sprague-Dawley (4 semanas de edad) se dividieron aleatoriamente en siete grupos ( $n=15$ ): un grupo sano ( $n=10$ ), un grupo control y cinco grupos tratados con diferentes tortillas. Los animales se alimentaron con una dieta que contenía 20% de tortilla (p/p) (excepto el grupo sano y control), 4 semanas antes, 8 durante y 12 semanas después de la inducción con dimetilhidrazina (21 mg/kg de peso). Los resultados indican que el grupo tratado con la tortilla M, presentó menor incidencia de adenocarcinoma (20%,  $p<0.01$ ,  $\chi^2$  test) que los grupos tratados con tortillas E y EA (66.7%). Aunado a lo anterior se observó una correlación negativa ( $r=-0.907$ ,  $p<0.05$ ) entre el contenido de fenoles libres en las tortillas y la incidencia de adenocarcinomas. Estos resultados sugieren que los fenoles libres y la presencia de gomas en las tortilla M podrían ser los responsables del efecto quimioprotector.

**Palabras clave:** Cáncer de colon, tortillas de maíz, nixtamalización ecológica, aditivos, fibra.

## SUMMARY

Several biological explanations support the hypothesis that a generous consumption of dietary fiber from whole grains reduces the risk of colon cancer, probably due to stool bulking, production of anticarcinogenic short-chain fatty acids and reduction of  $\beta$ -glucuronidase activity, among others. However, animal experiments with only increased fiber consumption have been inconclusive, thus suggesting that other phytochemicals are also responsible for the chemoprotective effect of whole grains. In Mexico, maize is the main consumed grain and tortilla is its most traditional consumption form. Currently, tortillas are made by using the traditional alkaline cooking process, however, in the last years new ecologic processes with higher fiber content have been proposed. The objective of this work was to evaluate the anticarcinogenic effect of corn tortillas obtained by traditional (T) and ecological (E) processes, with and without additives (T, TA, E and EA), similar to those used industrially, and a commercial tortilla (M), in an animal model of colon cancer. As expected, E and EA tortillas had a higher content of insoluble fiber (13.5 and 13.4%, respectively) than T, TA and M tortillas (8.6, 8.7 and 7.6%, respectively). However, M tortillas had the highest free phenolic compounds content (9.44 mg AFE per g of sample;  $p<0.05$ ). For the carcinogenesis study, Sprague-Dawley male rats (4 weeks old) were randomly divided into seven groups ( $n=15$ ): one healthy group, a control group and five groups with tortilla treatment. Animals were feed by a diet containing 20% (w/w) tortillas (with exception of healthy and control groups), 4 weeks before, 8 during and 12 after induction with dimethylhydrazine (DMH, 21 mg/kg body weight). Although all tortilla-treated groups had lower adenocarcinoma related parameters, M tortilla-treated group had lower adenocarcinoma burden and incidence (only 20%,  $p<0.01$ ,  $\chi^2$  test) than those groups fed with E and EA (66.7%). In addition, a negative correlation ( $r=-0.907$ ,  $p<0.05$ ) was found between free phenolic compounds and adenocarcinoma incidence. These results suggest that the anticarcinogenic effect of corn tortilla is possibly due amount of free phenolics and its interaction with other compounds such as gums in M tortilla.

**Keywords:** Colon cancer, maize tortilla, ecologic nixtamalization, additives, fiber.

Este logro quisiera dedicarlo principalmente a mi hijo Luis David que no solo me ha impulsado a ser mejor persona, también ha sacrificado el tiempo que le corresponde para que yo pudiera dedicarlo a mi trabajo. En los momentos más difíciles de la maestría el solo pensar en él y en lo que estaba sacrificando me obligaban a que el tiempo que no le dedicaba valiera la pena.

También quiero dedicarlo a mis padres, ya que siempre me han apoyado en todo, además de que pudiera decir que sufrieron y gozaron de mi trabajo en la maestría al igual que yo.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a CONACYT por la beca otorgada y al financiamiento otorgado por el Consejo de Investigación y Posgrado de la UAQ (FOFI-UAQ con número de registro FCQ-2012-23).

También quiero agradecer a la Dra. Minerva Ramos Gómez quien confió en mí y que con paciencia me asesoró durante dos años además de transmitirme sus conocimientos.

También quiero agradecer a la Dra. Loarca a la Dra. Rosalía, al Dr. Figueroa y al Dr. Gerardo por sus correcciones y aportaciones en el presente trabajo.

Quisiera agradecer a todas las personas que me apoyaron con mis ratas, a Carlos Duarte, Rosa María Piña y a mis tres prestadores de servicio social, Ale, Diego y Mar. Al igual que a Roberto Millán por ayudarme no solo con las ratas, también en lo académico y porque siempre confió en mí y me daba palabras alentadoras para seguir con mi trabajo.

También quisiera agradecer a Eli, Aurea, Dunia, Beto y Cris quienes me apoyaron en algún momento con mi trabajo experimental. A todos mis compañeros y amigos los cuales en algún momento fueron apoyo y de gran ayuda durante la maestría, en especial a Gaby, Etzuly, Ximena, Maguie, Diana y Sandy y por último a Carmelita y Laurita quienes fueron un gran apoyo en todo lo relacionado a trámites.

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Cáncer	3
2.1.1. Definición	3
2.1.2. Factores etiológicos	3
2.1.3. Carcinogénesis	4
2.1.4. Epidemiología	5
2.2. Cáncer de colon	6
2.2.1. Incidencia	6
2.2.2. Morfología y función del colon	7
2.2.3. Metabolismo microbiano en el colon	9
2.2.4. Modelos de cáncer de colon	10
2.3. Tortilla de maíz	11
2.3.1 Origen del maíz	11
2.3.2. Consumo <i>per cápita</i>	11
2.3.3. Proceso de nixtamalizado	12
2.3.4. Alternativas ecológicas del proceso de nixtamalizado	14
2.3.5. Propiedades nutracéuticas del maíz y la tortilla	15
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo general	21
5.2. Objetivo específico	21

VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1.	Materiales	22
6.1.1.	Reactivos químicos	22
6.1.2.	Tortillas	22
6.1.3.	Animales	22
6.2.	Métodos	23
6.2.1.	Elaboración de las tortillas de maíz	23
6.2.2.	Ánalisis proximal de la tortilla de maíz	24
6.2.2.1.	Porcentaje de humedad	24
6.2.2.2.	Cenizas totales	24
6.2.2.3.	Contenido de calcio	24
6.2.2.4.	Ánalisis de fibra	25
6.2.2.5.	Contenido de grasas	25
6.2.2.6.	Proteína total	26
6.2.2.6.	Determinación de fenoles totales	26
6.2.3.	Modelo de carcinogénesis	27
6.2.3.1.	Inducción de cáncer de colon con DMH	28
6.2.3.1.	Determinación de glucosa	30
6.2.3.3.	Sacrificio de animales y obtención de muestras	31
6.2.4.	Ánalisis macroscópico	32
6.2.5.	Ánalisis histopatológico	33
6.2.6.	Ánalisis de contenido cecal, colónico y fecal	33
6.2.6.1.	Ánalisis de pH	33
6.2.6.2.	Determinación de la actividad de la enzima □-glucuronidasa	33
6.2.7.	Ánalisis estadístico	34
VII.	RESULTADOS	35
7.1.	Caracterización química y nutracéutica de tortillas de maíz nixtamalizada	35
7.2.	Contenido de compuestos fenólicos en tortillas de maíz nixtamalizada	41

7.3. Composición de la dieta suplementada con tortilla (20%) administrada en el modelo animal	43
7.4. Efecto quimioprotector de tortillas de maíz nixtamalizadas sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con DMH en ratas SD	44
7.4.1. Ganancia de peso y consumo de alimento de ratas inducidas con DMH y tratadas con tortillas de maíz nixtamalizado	45
7.5. Peso de las heces de las ratas en experimentación	47
7.6. Efecto del consumo de tortillas sobre la tolerancia de glucosa antes y después de la inducción con DMH	48
7.7. Evaluación macroscópica de las lesiones del modelo de experimentación inducido con DMH y tratado con diferentes tortillas (T, TA, M, E, EA)	50
7.8. Evaluación histopatológica del colon de ratas inducidas con DMH y tratadas con diferentes tortillas (T, TA, E, EA, M)	53
7.9. Efecto de las tortillas (T, TA, E, EA, M) sobre el nivel de pH en el contenido cecal, colónico y fecal	58
7.10. Efecto de las tortillas (T, TA, E, EA, M) sobre la actividad de $\beta$ -glucuronidasa del contenido cecal, colónico y fecal de ratas SD inducidas con DMH	60
VIII. CONCLUSIÓN	63
IX. BIBLIOGRAFÍA	65
X. ANEXOS	76
10.1. Aditivos autorizados por la NOM187-SSA1/SCFI-2002	77
10.2. Curva de calibración de fenoles	81
10.3. Curvas de crecimiento de ratas SD reportadas por Harlan	82
10.4. Curva de calibración de fenolftaleína	82
10.5. Análisis de correlación de Pearson	83

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Valor nutritivo por 100 g de tortilla de maíz	16
2. Diseño experimental del modelo animal de cáncer de colon	28
3. Composición proximal de tortillas de maíz	36
4. Contenido de calcio (mg/g de materia seca) en tortillas de maíz	38
5. Contenido de fibra dietaria en tortillas de maíz	39
6. Porcentaje de nutrientes en las diferentes dietas proporcionadas en el modelo experimental	43
7. Nutrientes (g) consumidos dependiendo del grupo experimental	44
8. Peso de heces fecales	47
9. Tamaño relativo del colon de ratas Sprague-Dawley	50
10. Clasificación macroscópica de tumores encontrados en ratas inducidas con DMH y los grupos tratados con diferentes tortillas	52
11. Distribución por zona de tumores en ratas tratadas con diferentes tortillas	53
12. Porcentaje de displasia de bajo y alto grado y adenocarcinomas encontrados en el total de muestras analizadas por histopatología	56
13. Porcentaje de incidencia e inhibición de adenocarcinomas, promedio y multiplicidad de tumores de ratas inducidas con DMH y tratadas con diferentes tortillas	58
14. Valores de pH de muestras de colon de ratas tratadas con tortillas elaboradas por diferentes proceso (T, TA, E, EA, M)	60
A1. Uso de aditivos para la tortilla de maíz a granel	77
A2. Uso de aditivos para la harina de tortilla de maíz o	

tortilla preempacada establecidos por la	
NOM-187-SSA/SCFI-2002	78
A3. Curva de calibración de ácido ferúlico	81
A4. Curva de calibración de fenolftaleína	82
A4. Análisis de correlación de Pearson	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Supervivencia y proliferación celular	4
2. Etapas múltiples en el proceso de carcinogénesis química	5
3. Nuevos casos de cáncer en 2013	6
4. Morfología del colon	8
5. Nixtamalización del maíz y preparación de tortillas	13
6. Diseño experimental del modelo animal de cáncer de colon	29
7. Técnica de inmovilización para llevar a cabo la inyección subcutánea en ratas	29
8. Técnica de inmovilización para llevar a cabo la intubación intragástrica en ratas	31
9. Clasificación de tumores	32
10. Contenido de calcio (mg/g)	38
11. Contenido de fenoles totales en tortillas elaboradas por diferentes procesos expresados en mg de EAF por g de muestra seca	42
12. Curva de crecimiento (g) de las ratas durante el periodo de experimentación	45
13. Consumo de alimento (g) de las ratas durante el periodo de experimentación	46
14. Concentración de glucosa sanguínea en ayunas de ratas con un consumo habitual de 4 semanas (A y B) y 18 semanas (C y D) de tortillas	49
15. Clasificación macroscópica encontrada en el modelo de experimentación inducido con DMH	51
16. Caracterización histopatológica de un colon sano	54
17. Focos de criptas aberrantes	54
18. Muestras de tejido epitelial colónico	55
19. Actividad enzimática de $\beta$ -glucuronidasa en muestras de	

contenido cecal, colónico y fecal de ratas de los grupos control y sano alimentado con dieta estándar	61
20. Actividad enzimática de $\beta$ -glucuronidasa en muestras de contenido cecal, colónico y fecal de ratas tratadas con diferentes tortillas	62
A1. Curva de calibración de ácido ferúlico para la cuantificación de polifenoles libres	81
A2. Curva de crecimiento de ratas Sprague-Dawley	82
A3. Curva de calibración de fenolftaleína para la determinación De la actividad $\beta$ -glucuronidasa	82

## I. INTRODUCCIÓN

En el 2012, el cáncer de colon representó el 4.96% de las muertes por cáncer en México, (INEGI, 2012). El desarrollo de cáncer colorrectal (CCR), el cual inicia en la parte distal del colon llamado recto, presenta una serie de cambios genéticos, así como morfológicos en el epitelio del colon, incluyendo la formación de fosas crípticas aberrantes, pólipos, adenomas y carcinomas.

La incidencia por este cáncer se debe a factores dietéticos, como es la ingesta alta de grasas y carnes rojas (Takahashi-Monroy *et al.*, 2006; Calderillo-Ruiz *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). El alto consumo de alcohol, el tabaquismo y la obesidad incrementan el riesgo de este padecimiento y antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal, como colitis ulcerosa, aumentan entre 7 y 11 veces el riesgo (SSA, 2008); mientras que, la ingesta abundante de fibras, calcio, vitamina A, C y E, carotenoides, fenoles, índoles, selenio y antiinflamatorios no esteroideos lo reducen (Calderillo-Ruiz *et al.*, 2010).

De manera adicional, la influencia de la microbiota alterada por patrones dietéticos o inflamatorios juega un papel importante en el desarrollo de cáncer de colon. Además, la microbiota interviene en el metabolismo de tóxicos, los cuales son excretados por el cuerpo de forma conjugada por el sistema hepatobiliar, pero al llegar al colon son hidrolizados por la microbiota y reabsorbidos en el cuerpo, disminuyendo así la eliminación de dichos tóxicos del organismo. La modulación de la microbiota intestinal, promueve la síntesis de ácido grasos de cadena corta (AGCC), lo que a su vez disminuye el pH colónico. También, se reduce la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa y otras enzimas que favorecen la reabsorción de tóxicos. Los AGCC también se han visto relacionados con un efecto anti-inflamatorio y antitumoral (Terzic *et al.*, 2010; Alberts *et al.*, 2011; Hijová *et al.*, 2012; Bultman, 2014).

Un alimento que contiene diversos compuestos bioactivos como polifenoles, flavonoides, carotenoides, fitoesteroles, xantofilas, calcio y fibra a los que se les ha demostrado actividades antimutagénicas, anticancerígenas, y antiinflamatorias es la tortilla, (Raicht *et al.*, 1980; Fiala *et al.*, 1985; Viñas-Salas *et al.*, 1998; Setchel y Aedin, 1999; Verghese *et al.*, 2002; Reynoso-Camacho *et al.*, 2011; Zilic *et al.*, 2012).

El consumo *per cápita* de tortilla reportado por Bressani es de 328 g diarios (1972); sin embargo, recientemente se ha visto una disminución aproximada del 10% como resultado del aumento de precios (Secretaría de Economía, 2012), por lo que actualmente se puede estimar un consumo *per cápita* de 295 g diarios. Nixtamalización es el proceso por el cual se elabora la tortilla y se ha utilizado desde época de los aztecas en nuestro país. El proceso consiste en una cocción alcalina con hidróxido de calcio (1%) a 80 °C durante 20-45 min, posteriormente se deja reposar durante toda la noche y al día siguiente es lavado. Resultado de este proceso se obtiene el “nixtamal” con el cual se realiza la masa para la tortilla y el “nejayote” o agua de desecho que contiene gran cantidad de sólidos solubles y un pH muy alcalino. Por esta razón, se han planteado varias alternativas ecológicas como las propuestas por Figueroa *et al.* (2006), utilizando carbonato de calcio al 1%, proceso que permite obtener una tortilla sensorialmente atractiva, rica nutricionalmente y con una disminución importante en el daño ecológico. Actualmente, a nivel industrial se emplean una gran cantidad de aditivos en la elaboración de la tortilla con la finalidad de preservar las cualidades sensoriales y aumentar la vida de anaquel de la tortilla; sin embargo, no existe sustento científico que enuncie que el uso indiscriminado de aditivos no cause daño a la salud, o bien, que éstas interfieran con la actividad biológica de la tortilla.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Cáncer

#### 2.1.1. Definición

El cáncer es un trastorno genético caracterizado por la alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular; su consecuencia es el desarrollo de una clona que posteriormente puede invadir y destruir tejidos adyacentes y diseminarse hacia sitios distantes en los que se forman nuevas colonias u ocurre propagación metastásica. Esto puede llevarse a cabo gracias a la des-diferenciación de la célula cancerosa, lo que le da una ventaja con respecto a las células normales. Las células cancerosas adquieren independencia hacia factores de crecimiento para poder proliferar, volviéndose autónomas y perdiendo inhibición por contacto por lo que pueden generar masas tumorales para un desplazamiento posterior (Toroella-Kourí y Villa-Treviño, 1998; Herrera-Gómez *et al.*, 2010).

#### 2.1.2. Factores etiológicos

El cáncer es una enfermedad genética y su molécula blanco es el ADN, el cual por su característica nucleofílica es susceptible a mutaciones, por lo que la etiología del cáncer es bastante extensa. Las causas del cáncer pueden dividirse en dos grandes grupos: Endógenas a las que se debe el 10-20%, divididas en espontáneas y heredables y exógenas o ambientales asociadas al 80-90% de todos los cánceres padecidos por los seres humanos. En las causas exógenas se incluyen las de origen químico, como el uso cotidiano de medicamentos, aditivos alimenticios, cosméticos, pesticidas, productos industriales y del hogar, tabaquismo, ingestión de bebidas alcohólicas, exposición ocupacional y la dieta. Las causas de tipo físico incluyen radiaciones ionizantes o no y las causas de naturaleza biológica son las infecciones crónicas microbiológicas o las causadas

por virus. Otros factores descritos como sociales son el estrés, depresión y angustia (Toroella-Kourí y Villa-Treviño, 1998; Kim *et al.*, 2013).

### 2.1.3. Carcinogénesis

La transformación de una célula corporal normal en maligna requiere de múltiples mutaciones a nivel somático, por lo general durante un periodo de muchos años. Estas mutaciones pueden presentarse en proto-oncogenes que son los genes encargados del control de proliferación celular o en genes supresores de tumores que son los encargados de inhibir la proliferación celular y, por lo tanto, si se encuentran mutados la estimulan (Figura 1) (Alberts *et al.*, 2011)

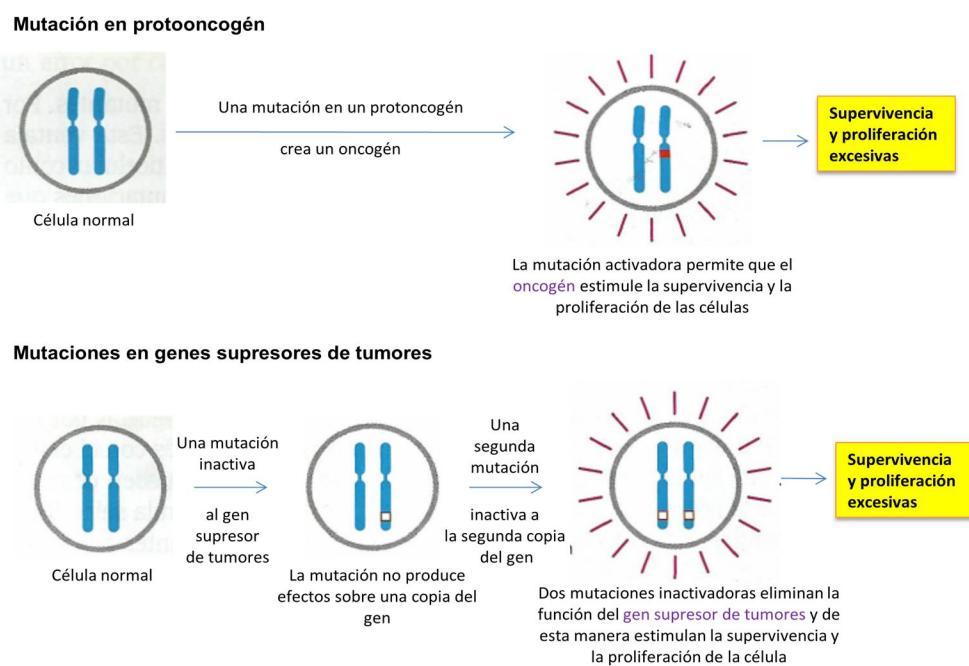


Figura 1. Supervivencia y proliferación celular (Modificado de Alberts *et al.*, 2011).

El proceso de carcinogénesis química empieza con la exposición a un agente mutagénico que puede causar daño a un proto-oncogen, dando lugar a las diferentes etapas de carcinogénesis, las cuales se pueden dividir en: a) iniciación, un cambio permanente y heredable que altera el ADN, donde no se diferencia

morfológicamente con facilidad una célula cancerosa y una normal; b) promoción, un proceso reversible en el cual se ven defectos en la diferenciación, crecimiento celular y resistencia a la toxicidad, generando una lesión pre-neoplásica; c) transformación, la lesión pre-neoplásica da origen a las células cancerígenas y d) progresión, cuando las células genéticamente alteradas perpetúan su crecimiento (Figura 2) y proliferación, invaden los tejidos adyacentes y metastizan a otras partes del organismo (Klaassen, 2007; Herrera-Montalvo *et al.*, 2010).

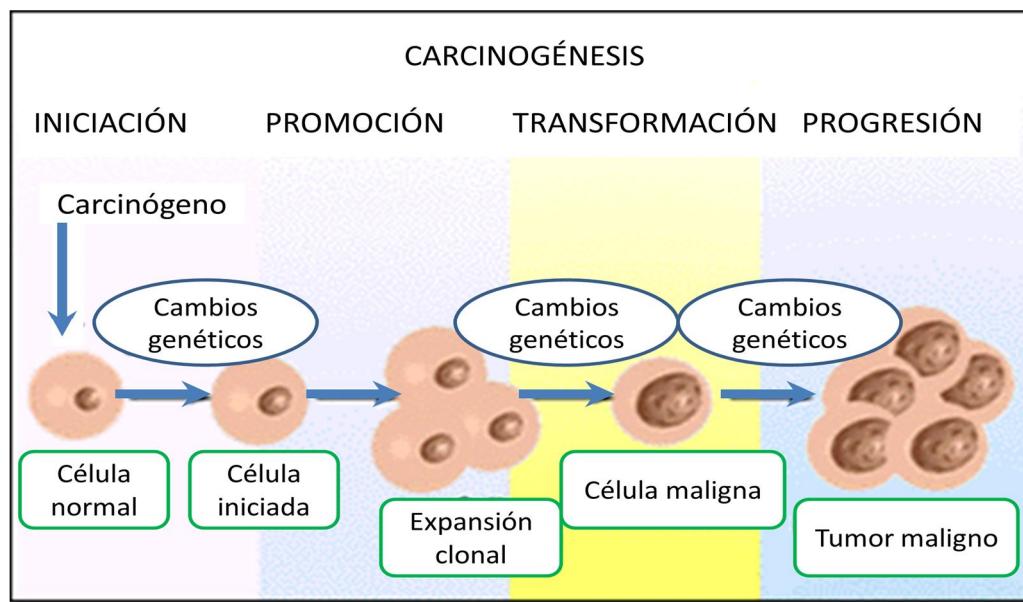


Figura 2. Etapas múltiples en el proceso de carcinogénesis química (Tomado de; Peralta *et al.*, 1997; Klaassen, 2007)

#### 2.1.4. Epidemiología

La mortalidad por cáncer en los países menos desarrollados presenta un patrón ascendente, México no es la excepción y en el 2008 se observaron el doble de defunciones por neoplasias (62.8 defunciones por 100,000 habitantes) que en 1980 (37.9 defunciones por 100,000 habitantes), de manera que los tumores representan la tercera causa de defunción en México. La incidencia del cáncer varía según la edad, grupo étnico, país o región y tiempo. Un factor importante es el envejecimiento de la población. En el 2008, el 54.3% de las defunciones por

cáncer en México fueron en mayores de 65 años. La diferencia de defunciones entre hombres y mujeres no es muy significativa (Figura 3); sin embargo, existe una diferencia etaria, las mujeres son más afectadas entre los grupos entre 25 y 65 años y los hombres en el grupo etario menores de 25 y mayores de 64 años.

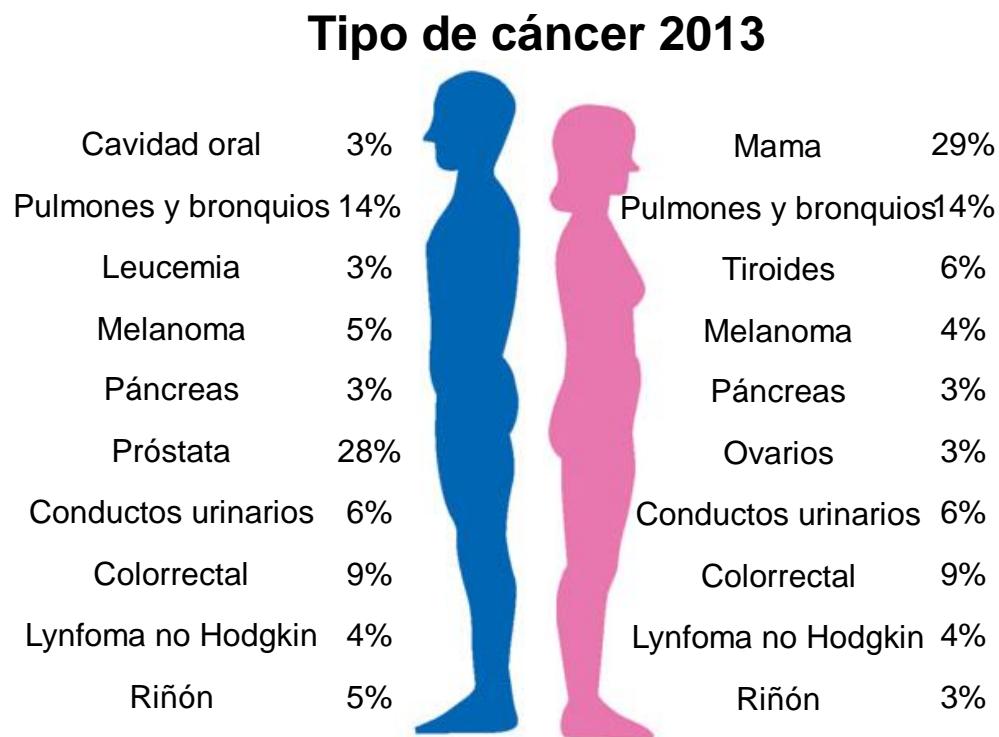


Figura 3. Nuevos casos de cáncer en 2013 (Siegel *et al.*, 2013).

## 2.2. Cáncer de colon

### 2.2.1. Incidencia

En el 2006 se registraron 2,844 casos de cáncer de colon en México, integrando el 2.7% de la morbilidad total de cáncer en el mismo año. En cuanto a la tasa de mortalidad, entre los años 1980-2008 se observó un incremento significativo de 0.9 a 3.1 de 100,000 habitantes, representando en promedio 3.6% del total de los tumores malignos y 0.4% de las defunciones generales (SSA, 2008). Para el 2012, se registraron 3,894 casos de cáncer de colon lo que

representa un incremento del 37% en 6 años (INEGI, 2012). Estudios epidemiológicos sugieren que el cáncer colorrectal (CCR), término usado para describir tumores malignos en colon y recto, se debe principalmente a factores dietéticos, como es la ingesta alta de grasas y carnes rojas (Takahashi-Monroy *et al.*, 2006; Calderillo-Ruiz *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). El alto consumo de alcohol, el tabaquismo y la obesidad incrementan el riesgo de este padecimiento. Se estima que el tabaquismo aumenta 2.5 veces el riesgo de cáncer de colon; antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal, como colitis ulcerosa, aumenta entre 7 y 11 veces el riesgo (SSA, 2008); mientras que, la ingesta abundante de fibras, calcio, vitamina A, C y E, carotenoides, fenoles, índoles, selenio y antiinflamatorios no esteroideos la reduce (Calderillo-Ruiz *et al.*, 2010). El riesgo de presentar CCR se incrementa a partir de los 35 años de edad.

En México, la tasa de mortalidad por CRR prácticamente se duplica después de los 60 años y continúa incrementándose progresivamente en decenios más avanzados; sin embargo, pacientes con algunas predisposiciones genéticas o familiares pueden desarrollar cáncer de colon a edades más tempranas con mayor frecuencia (ENSANUT, 2012a). Por las características clínicas, epidemiológicas y genéticas del CCR, se distinguen los siguientes tipos: esporádico, familiar, hereditario y el que se encuentra relacionado con enfermedades inflamatorias. El cáncer hereditario se subdivide en dos grandes síndromes: el vinculado con pólipos y el que carece de ese nexo, también llamado síndrome de Lynch (Calderillo-Ruiz *et al.*, 2010). El CCR se presenta en mayor porcentaje en el colon por la morfología que presenta.

### **2.2.2. Morfología y función del colon**

El colon se describe en cuatro partes: ascendente, transverso, descendente y sigmoide, que se suceden formando un arco. El colon se sitúa primero a la derecha del intestino delgado; luego, por encima y delante; después a la izquierda y, por último, por debajo (Figura 4). El colon presenta tres tenias

cólicas (banda de fibras musculares) que constituyen la mayor parte del músculo longitudinal del colon. Como las tenias son cortas, el colon tiene la forma sacular característica que adoptan las haustras, además de presentar pequeñas proyecciones grasas llamadas apéndices omentales (Moore y Dalley, 2005).

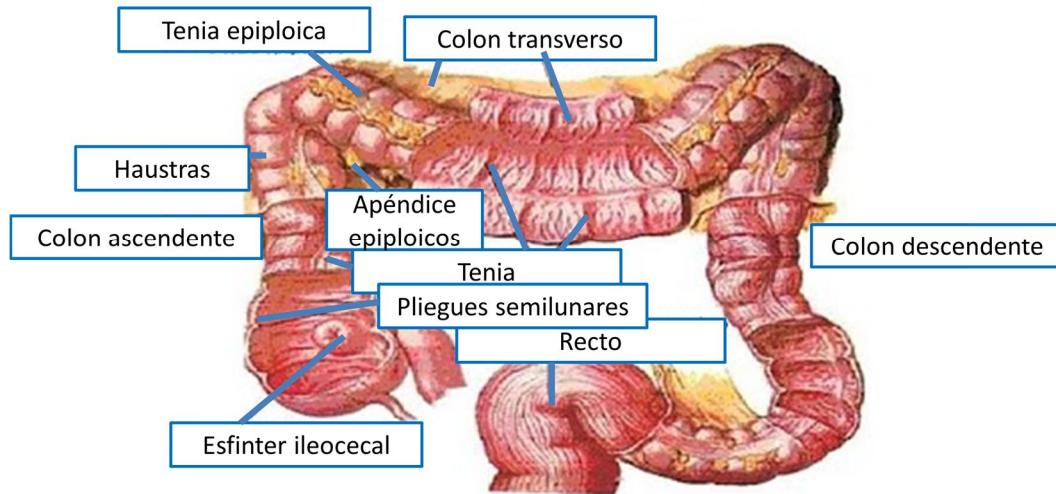


Figura 4. Morfología del colon (<http://terapiadecolon.blogspot.mx/>).

Las funciones principales del colon son: absorción de agua y electrolitos, procedentes del quimo para formar heces sólidas, donde interviene principalmente la mitad proximal del colon y el almacenamiento de la materia fecal hasta el momento de la expulsión, donde actúa la mitad distal. Como estas funciones no necesitan movimientos intensos, los movimientos del colon suelen ser muy perezosos. Los principales movimientos que presenta son segmentales, los cuales dan lugar a la formación de haustras, aunque también presenta movimientos atípicos para favorecer la absorción y los movimientos peristálticos de propulsión o llamados “en masa”, los cuales vacían el contenido a partir del colon transverso.

Cualquier factor que obstaculice el vaciamiento favorece la interacción de los productos de desecho con la microbiota, interviniendo en la biodisponibilidad de los mismos para su reabsorción, además de aumentar el tiempo de contacto de

dichos desechos con el epitelio lo que puede dañarlo y ser causa de padecer cáncer de colon (Guyton *et al.*, 2001; Moore y Dalley, 2005; Simons *et al.*, 2010).

La mucosa del colon tiene muchas criptas de Lieberkühn que, a diferencia de las del intestino delgado, no contienen vellosidades y casi no poseen enzimas, predominando las células secretoras de moco, el cual proporciona un medio adherente que mantiene unida la materia fecal, también protege la pared del colon frente a excoriaciones, pH y actividad microbiana (Guyton *et al.*, 2001).

### **2.2.3. Metabolismo microbiano en el colon**

Se ha sugerido que la microbiota tiene un papel fundamental para mantener condiciones saludables en el colon, incluyendo la prevención del cáncer del mismo. La microbiota en el intestino grueso tiene la oportunidad de fermentar de forma anaeróbica nutrientes no absorbidos o digeridos por el intestino delgado, principalmente hidratos de carbono y proteínas. Los principales productos de la fermentación de hidratos de carbono son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales tienen la función de proporcionar energía a los colonocitos además de impedir atrofia celular y apoptosis en colonocitos normales y, por el contrario, en células cancerosas inhibe proliferación celular, induce apoptosis e inhibe angiogénesis.

En contraste, los productos finales de la fermentación proteolítica incluyen compuestos fenólicos, aminas y amoníaco, los cuales pueden ser tóxicos para el huésped (Zoran *et al.*, 1997; Wachtershauser *et al.*, 2000; Manning y Gibson, 2004; Kim *et al.*, 2013).

La microbiota interviene en la promoción de células cancerosas es mediante la inhibición de enzimas como nitrorreductasas, azorreductasas, hidrolasas y  $\beta$ -glucuronidasa, que pueden revertir compuestos inactivos a los metabolitos activos (London *et al.*, 1981; Cheng *et al.*, 2013).

## 2.2.4. Modelo de cáncer de colon

Los modelos animales para el estudio del cáncer de colon se pueden clasificar en dos categorías: modelos inducidos y modelos espontáneos. La denominación de modelos espontáneos son aquellos producidos por manipulación genética, así como los de trasplante tumoral o celular en ratones inmunodeficientes. Los modelos inducidos por la administración de diversos agentes químicos adquirieron relevancia por ser relativamente económicos, fácilmente manipulables y razonablemente reproducibles.

Dentro de los químicos utilizados para inducir cáncer de colon se encuentran la dimetilhidrazina (DMH) y su metabolito azoximetano (AOM), la metil nitrosourea y el 2-amino-1-metil-6,6-fenilimidazol-(4,5-b)-piridina (Augusto *et al.*, 1985; Persê y Cerar, 2011).

La DMH produce una alta incidencia de adenomas y adenocarcinomas en el colon de ratas y ratones. Después de administrarse, el precarcinógeno se absorbe rápidamente vía subcutánea y es oxidado a azometano a través de las flavinmonooxigenasas (FMO) que se encuentran en el hígado; posteriormente, este metabolito sufre otra oxidación formando el azoximetano (AOM), el cual por medio de una N-hidroxilación es convertido a metilazometanol (MAOM). Este compuesto es muy inestable y puede descomponerse a formaldehído, agua y nitrógeno; durante esta descomposición también puede dar origen al metildazonio, siendo este último un compuesto alquilante ya que puede formar iones metil carbono.

MAOM es glucuronidado por enzimas de fase dos de destoxicificación para su posterior excreción por vía biliar hacia colon. Sin embargo, las  $\beta$ -glucuronidasas de la microflora liberan el conjugado y el MAOM, que es inestable, se rearregla para formar iones metil carbono que le permite formar aductos con el ADN de los

colonocitos (Glauert y Bennink, 1983; Augusto *et al.*, 1985; Boffa y Bolognesi, 1986; Persê y Cerar, 2011).

Por lo anterior, este modelo es muy utilizado para probar el efecto quimioprotector de algunos compuestos, extractos, fármacos y alimentos; tal es el caso de los carotenoides, polifenoles y fibra que contiene la tortilla de maíz.

## **2.3. Tortilla de Maíz**

### **2.3.1. Origen del maíz**

La evidencia arqueológica indica que el maíz existió como un precursor silvestre hace 8,000 años en América. Dos mil años después, el maíz jugó un papel vital en el desarrollo de grandes civilizaciones que se establecieron en Mesoamérica, particularmente la náhuatl y la maya, ya sea como alimento o como ofrenda a los antiguos dioses.

Existen diferentes teorías sobre su origen, unas que apoyan la hipótesis de que proviene del teocintle y otras que es producto de la domesticación del maíz silvestre con base a los descubrimientos de olores en Tehuacán Puebla. En América del Sur, el maíz junto con otros cultivos, fueron decisivos en el desarrollo de las civilizaciones andinas (Figueroa-Cárdenas y Aguilar, 1997; Bressani 2008).

### **2.3.2. Consumo per cápita**

El maíz ha sido la base de la alimentación de la cultura mesoamericana desde tiempos prehispánicos. Además, el maíz ha sido el principal alimento para los habitantes de las zonas rurales que representan los estratos sociales de menor ingreso (Menchu *et al.*, 1973). En las zonas urbanas, el patrón de consumo de la tortilla ha cambiado por la disponibilidad de mayores recursos económicos y por la oferta de otros productos alimenticios.

Las tortillas son el alimento básico más importante de la cocina mexicana y el maíz blanco el principal producto producido en el país (SIAP, 2011). Sin embargo, es cada vez más visible que hay sectores sociales cuyo consumo de tortilla y otros productos alimenticios a base de maíz tiende a disminuir (Paredes-López *et al.*, 2006). El consumo *per cápita* rural de tortilla reportado por Bressani en 1972 fue de 328 g diarios; sin embargo, se ha visto una disminución aproximada del 10% como resultado del aumento de precios (Secretaría de Economía, 2012), por lo que actualmente se puede estimar un consumo *per cápita* de 295 g diarios.

### **2.3.3. Proceso de nixtamalizado**

El maíz para consumo humano es procesado siguiendo una técnica pre-colombina conocida con el nombre de nixtamalización (del náhuatl *nextli*, cal de cenizas, y *tamali*, masa cocida de maíz) (Paredes-López *et al.*, 2006). El proceso sigue el diagrama de flujo mostrado en la Figura 5. El tratamiento térmico alcalino al cual se somete el maíz da como producto central la masa, que luego se transforma en diversas formas, siendo la tortilla el producto principal (Bressani, 2008). Desde el punto de vista tecnológico, Illescas (1943) fue uno de los primeros que describió la práctica de este proceso en México.

El proceso de nixtamalización involucra el agregado de una parte de maíz entero y aproximadamente dos partes de solución de 1% de hidróxido de calcio. La mezcla se calienta a 80 °C durante 20 a 45 min y se deja reposar durante la noche (8-14 h). Al día siguiente, el agua del remojo de color amarillo lechoso se desecha y el maíz remojado se lava de dos a tres veces con agua limpia, removiendo la cáscara, la cápsula, el exceso de cal y las impurezas que pudiera tener el grano. El maíz cocido llamado “nixtamal” se muele con una piedra para obtener la masa y posteriormente se toman alrededor de 50 g para formar la tortilla (Paredes-López *et al.*, 2006; Bressani, 2008).

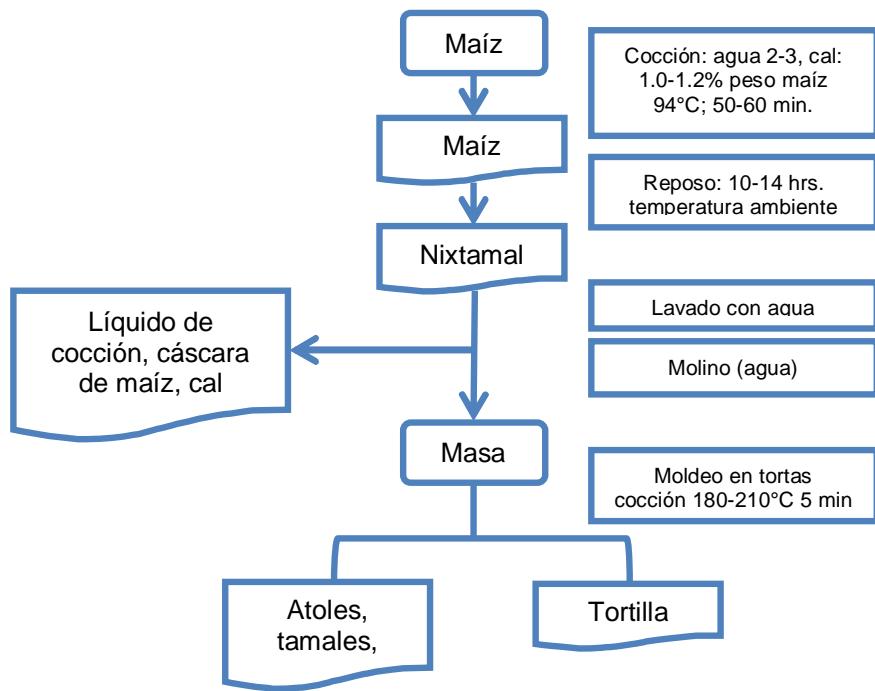


Figura 5. Nixtamalización del maíz y preparación de tortillas (Tomado de Bressani, 2008).

Actualmente, es común el uso de aditivos para la elaboración de tortillas de maíz. La norma (NOM-187-SSA1/SCFI-2002) establece el uso de aditivos y su límite permisible para la fabricación de tortilla de maíz a granel y harinas destinadas a la fabricación o pre-empacadas. Sin embargo, la regulación de la mayoría de los aditivos se basa en las buenas prácticas de fabricación (BPF) dejando su uso a criterio del productor (Anexo A1).

De los aditivos utilizados para la elaboración de tortilla, estudios realizados en modelos animales reportan que la tartrazina y el rojo allura son los que presentan un efecto cancerígeno a bajas dosis (10 mg/kg durante seis días), por lo que el consumo límite al día es de 7.5 y 7.0 mg/kg al día, respectivamente (Sasaki *et al.*, 2002). La norma (NOM-187-SSA1/SCFI-2002) restringe el uso de estos

aditivos, 50 mg/kg de tortilla para el rojo allura y 600 mg/kg de tortilla para la tartrazina, encontrando que de acuerdo al consumo *per cápita* (292 g/día) el rojo allura entraría en normatividad no así la tartrazina.

Aunque el proceso de nixtamalización tradicional es una práctica que se lleva a cabo desde hace muchos años y se tiene reglamentado, actualmente existen nuevas alternativas ecológicas que además de proponer mejoras en el proceso, también el fin es repercutir positivamente en la calidad de la tortilla.

#### **2.3.4. Alternativas ecológicas del proceso de nixtamalizado**

El proceso de nixtamalización utiliza grandes cantidades de agua para la cocción, remojo y lavado del grano. El agua de cocción es llamada nejayote, la cual posee pH muy alcalino y corrosivo que contribuye al taponamiento de los sistemas de desagüe, daña los tubos del drenaje, además de contener sólidos solubles (3-15% del volumen del grano) que son fuente de contaminación al medio ambiente (Jackson *et al.*, 1988). Sin embargo, el cocimiento alcalino además de mejorar características sensoriales, proporciona mayor biodisponibilidad de nutrientes (Bressani 2008).

Se han buscado alternativas donde, además de conservar las características sensoriales y nutricionales de la tortilla, se evite la contaminación por el nejayote. Figueroa *et al.* (2006) propusieron nuevos procesos ecológicos, donde la cal se sustituye por sales de calcio como cloruro de calcio, carbonato de calcio, sulfato de calcio y acetato de calcio. Por cada kg de maíz se utilizan 2 L de agua con 1% de la sal seleccionada, se cocina a 90 °C por 23-26 min, posteriormente se deja el grano por 16 h a temperatura ambiente, se lava y se separa del nejayote, para su posterior producción en masa y tortilla (Maya-Cortés *et al.*, 2010; Campechano-Carrera *et al.*, 2012). Las sales de calcio utilizadas conservan el pericarpio del grano, reduciendo las pérdidas de materia seca en el nejayote en un 50% y el pH que se obtiene es cercano a la neutralidad (Maya-

Cortés *et al.*, 2010), lo que reduce los impactos ambientales del proceso de nixtamalización original. Además, se encontró que las cualidades nutricionales también se ven mejoradas, ya que aumenta la retención de fibra insoluble en un 54.51%, fibra soluble 54.19%, lípidos 14.05% y contenido de proteína 6.03% (Campechano-Carrera *et al.*, 2012).

### **2.3.5. Propiedades nutracéuticas del maíz y las tortillas**

El maíz es una planta que tiene muchas razas y variabilidad genética. Los granos de maíz varían en el contenido de flavonoides, polifenoles, fitoesteroles, carotenos, xantofilas, antocianinas, arabinoxilanos y otros compuestos nutracéuticos que benefician la salud del ser humano (Serna-Saldivar *et al.*, 2008). Varias investigaciones *in vitro* e *in vivo* relacionan el consumo de estos compuestos con la reducción de enfermedades cardiovasculares, desórdenes del tracto urinario y cáncer (Adom y Liu, 2002; Saeed *et al.*, 2011).

El maíz azul tiene diversos compuestos bioactivos como las antocianinas, entre otros, los cuales tienen la habilidad de disminuir la formación de radicales libres, inhibir la nitrosación, secuestrar metales y la capacidad de modular ciertas actividades celulares enzimáticas. También se ha demostrado que el maíz azul tiene actividades antimutagénicas/anticancerígenas y antiinflamatorias (Raicht *et al.*, 1980; Fiala *et al.*, 1985; Setchel *et al.*, 1999; Pedreschi *et al.*, 2006; Zilic *et al.*, 2012). Se ha estudiado las pérdidas de antocianinas durante la cocción alcalina del maíz, encontrando que el 39% se pierde en la elaboración de la masa, adicionalmente un 15% en la elaboración de la tortilla y cuando se procesa frituras se pierde 24% más (Del Pozo-Insafran *et al.*, 2006). También se ha reportado efectos benéficos que el proceso de nixtamalizado provee, ya que aumenta la concentración de calcio, siendo importante para el desarrollo de huesos fuertes (Figueroa-Cárdenas *et al.*, 2005) y la nixtamalización aumenta la biodisponibilidad de ciertos aminoácidos esenciales importantes para el estado nutricio (Figueroa-

Cárdenas *et al.*, 2006). La tortilla es un alimento rico nutricionalmente, tiene gran aporte calórico y mineral (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Valor nutritivo por 100 g de tortilla de maíz (Muñoz *et al.*, 2002).**

Cualidades/ Nutrientes	Unidad	Tortilla de maíz blanco	Tortilla de maíz amarillo	Tortilla de maíz azul o negro
Energía	Kcal	246	216	220
Humedad	%	42.40	47.50	46.50
Fibra dietética	g	1.47	1.09	1.09
Carbohidratos	g	47.20	45.30	44.00
Proteína	g	4.40	4.60	4.90
Lípidos totales	g	4.40	1.80	2.70
Ácidos grasos				
Saturados	g	0.10	0.20	0.30
Monoinsaturados	g	0.40	0.50	0.80
Poliinsaturados	g	0.80	0.90	1.40
Minerales				
Calcio	mg	108	146	125
Fosforo	mg	111	182	82
Hierro	mg	2.50	1.60	2.60
Magnesio	mg	79	82	79
Sodio	mg	0.60	1.00	0.60
Potasio	mg	148	145	151
Zinc	mg	0.90	0.90	1.00
Vitaminas				
Vitamina A	□g	1	9	3
Tiamina	mg	0.17	0.15	0.22
Riboflavina	mg	0.08	0.05	0.07
Niacina	mg	0.90	1.00	1.10

Las tortillas y productos relacionados pueden ser vehículos adecuados de fitoesteroles, carotenoides y xantofilas. Fitoesteroles tales como el ergoesterol, campesterol,  $\beta$ -sitoesterol y estigmaesterol, compiten en la absorción de colesterol y, por ende, son considerados hipocolesterolémicos y compuestos preventivos contra enfermedades cardiovasculares. El consumo diario de 200-400 mg de fitoesteroles disminuye el colesterol sérico (Jones *et al.*, 1997). La inclusión de 5 mg/kg de peso de  $\beta$ -sitoesterol disminuye la glucosa sanguínea y mejora la sensibilidad a la insulina en ratas Wistar (Radika *et al.*, 2013) y también se ha observado que la suplementación con este compuesto disminuye la aparición de

tumores inducidos químicamente en el colon de ratas Fisher y Wistar (Raicht *et al.*, 1980; Fiala *et al.*, 1985; Baskar *et al.*, 2012).

Otro componente importante en la tortilla es el calcio, el cual además de ayudar a la formación ósea se ha reportado tener efecto quimioprotector en cáncer de colon en ratas Sprague Dawley (SD) (Viñas-Salas *et al.*, 1998; Trautvetter *et al.*, 2012).

Los  $\beta$ -carotenos y xantofilas, tales como la zeaxantina y luteína, son nutracéuticos importantes. El consumo de carotenos está asociado con la disminución de riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades crónicas, así como el mejoramiento de la salud ocular y el funcionamiento del sistema inmunológico (Ziegler, 1989; Rock, 2003). Se ha reportado que los  $\beta$ -carotenos promueven la modulación de enzimas antioxidantes y enzimas de fase II de detoxificación (Anilakumar *et al.*, 2000). También se ha comprobado que la luteína disminuye el número de tumores teniendo un efecto quimioprotector mediante la modulación de la actividad proliferativa de *K-ras*, PKB, y  $\beta$ -catenina (Reynoso-Camacho *et al.*, 2011).

Otro componente importante de la tortilla de maíz es la cantidad de fibra que aporta, sobretodo la tortilla procesada por nixtamalización ecológica. La fibra que proviene principalmente del pericarpio del maíz es rica en ácidos hidroxicinámicos, siendo el más importante por su efecto quimioprotector el ácido ferúlico (Ayala *et al.*, 2014). La fibra soluble actúa como prebiótico, teniendo beneficios en la cantidad, calidad y sobretodo actividad de la microbiota (Verma *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que el maíz consumido con mayor cantidad de fibra tiene una respuesta glucémica más baja que la consumida con menor cantidad de fibra (Panlasigui *et al.*, 2010) y tiene efecto quimioprotector (Vergheese *et al.*, 2002; Saeed *et al.*, 2011).

En el grupo de trabajo (Nutracéuticos, Posgrado en alimentos de la Facultad de Química, UAQ) se han realizado estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para evaluar el efecto protector del maíz y sus productos. Se realizaron pruebas *in vitro* tanto del maíz como de la masa y tortilla de diferentes tipos de maíz, blanco, amarillo, azul y rojo; en los que se incluyen el perfil fitoquímico (fenoles, flavonoides, antocianinas y carotenoides), la capacidad antioxidante (medida a través de los métodos de ABTS y DPPH) y la actividad antimutagénica mediante la prueba de Ames; concluyendo que los maíces criollos pigmentados son ricos en antocianinas, carotenoides y otros compuestos que podrían tener un efecto sinérgico sobre la actividad antioxidante y anti-mutagénica. Sin embargo, los procesos de nixtamalización reducen la capacidad antioxidante y antimutagénica, por la liberación de algunos compuestos durante el proceso; no obstante, los resultados sugieren que en modelos animales pudieran conservar dicho efecto biológico (Mendoza-Díaz *et al.*, 2012).

Posteriormente, se realizaron estudios en modelos animales donde se encontró que la suplementación al 27% de tortillas elaboradas a partir de maíces blanco y pigmentados en la dieta ejercieron un efecto protector contra el desarrollo de cáncer de colon inducido con DMH en ratas. Los resultados fueron una disminución en la incidencia de adenocarcinomas del 77.5% para maíces blanco y amarillo y del 55% para maíces rojo y azul, así como una disminución en número promedio de adenocarcinomas del 66 al 88%. Resultados que demuestran el efecto benéfico del consumo de tortilla sobre el desarrollo de cáncer de colon, indicando que productos procesados del maíz retienen sus propiedades biológicas aún después de la pérdida de compuestos bioactivos, consecuencia del proceso de nixtamalización.

### III. JUSTIFICACIÓN

Del 2006 al 2012, se registró un incremento del 37% en la mortalidad por cáncer de colon (INEGI, 2012). El incremento en la incidencia de este cáncer se vincula con una adopción de una dieta anglosajona y una disminución en el consumo de alimentos mexicanos como el frijol, el nopal y maíz; éste último tiene en su composición compuestos bioactivos como flavonoides, polifenoles, carotenos y fibra, a los cuales se les ha atribuido actividad antimutagénica. Sin embargo son pocos los estudios del efecto de estos compuestos dentro de una matriz alimentaria y en modelos *in vivo*. La forma habitual de consumir maíz en México es mediante la tortilla, la cual se elabora por un proceso llamado nixtamalización, este proceso trae beneficios nutritivos aumentando la biodisponibilidad de compuestos como calcio y proteínas pero compuestos como la fibra se ven mermados. En los últimos años se han buscado alternativas para la elaboración de tortilla, tratando de mejorar la calidad nutricional y sensorial, y cuidando que los procesos sean amigables con el medio ambiente. El proceso propuesto por Figueroa *et al.*, 2011, sustituye el hidróxido de calcio utilizado en la nixtamalización por diferentes sales de calcio. Estos procesos dan como resultado, tortillas con una mayor cantidad de fibra dietaria. La fibra soluble es fermentada por las bacterias, lo que favorece la síntesis de ácidos grasos de cadena corta, cuyos efectos protectores contra el cáncer de colon ya han sido evaluados. Por otro lado, la fibra insoluble mejora el tránsito intestinal permitiendo que compuestos tóxicos sean fácilmente excretados. Es por esto que surge la necesidad de estudiar el efecto quimioprotector de la tortilla elaborada tanto por el proceso tradicional como el ecológico con y sin aditivos, en un modelo de cáncer de colon *in vivo*.

#### **IV. HIPÓTESIS**

En comparación con el método tradicional de nixtamalización, el método de nixtamalización ecológica sin incorporación de aditivos aumenta la cantidad de compuestos bioactivos teniendo un mayor efecto quimioprotector en un modelo de cáncer de colon.

## **V. OBJETIVO**

### **5.1. General**

Comparar las propiedades quimioprotectoras de tortillas de maíz (*Zea mays* L.) elaboradas por los procesos de nixtamalización tradicional y ecológico con y sin aditivos, en un modelo de cáncer de colon.

### **5.2. Específicos**

1. Determinar la composición nutrimental y de compuestos bioactivos de las tortillas elaboradas por los dos procesos de nixtamalización.
2. Evaluar en un modelo animal de cáncer de colon el efecto quimioprotector del consumo de tortillas de maíz obtenidas mediante los métodos tradicional y ecológico, con y sin aditivos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material

#### 6.1.1. Reactivos químicos

Hidróxido de calcio, propionato de sodio, goma xantana, ácido fumárico, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, etanol,  $\alpha$ -amilasa, proteasa, amiloglucosidasa, éter de petróleo, rojo de metilo, metanol, ácido ferúlico, reactivo de Folin-Ciocalteu,  $\beta$ -glucurónido-fenolfatelaína, 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y cloruro de sodio se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EUA). Cloruro de calcio, ácido nítrico, cloruro de estroncio, carbonato de sodio se compraron de la marca J.T. Baker (Edo. México). El sorbato de potasio se compró de la marca Paniplus (Querétaro, México).

Para la cuantificación de proteína, se utilizaron pastillas catalizadoras marca Keimate-EMsciense (MERCK KGAA-Darmstadt, Germany) y un kit BCA comercial de la marca Pierce (Rockford, IL, EUA).

#### 6.1.2. Tortillas

Para la elaboración de la tortilla de maíz con los procesos de nixtamalizado tradicional y ecológico se utilizó maíz blanco comercial (Distribuidora Gonzávila, Puebla, México). Se utilizó como control la harina marca MASECA.

#### 6.1.3. Animales

Se requirieron 100 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (SD) de cuatro semanas de edad del bioterio de la UNAM, Campus Juriquilla, Qro.

## 6.2. Métodos

### 6.2.1. Elaboración de las tortillas

Se elaboraron 96 kg de tortilla mediante las siguientes técnicas: para la tortilla obtenida de forma tradicional, por cada 12 kg de maíz se utilizó 24 L de agua y 1% de hidróxido de calcio cocidos a 90 °C por 30 min, se dejó reposar por 16 h, posteriormente se realizaron tres lavados para la elaboración de la masa, la cual se dividió en dos, a una mitad se le agregó una mezcla de aditivos, los cuales incluyeron 0.3% de propionato de sodio, 0.2% de goma xantana, 0.1% de ácido fumárico y 0.125% de sorbato de potasio.

Después, la masa se pasó por la troqueladora y ya elaborada la tortilla se secó y congeló, cuando se utilizó, se descongeló y se molió hasta obtener un tamaño de partícula aproximado de 8 mm con un procesador de alimentos.

Para la elaboración de la tortilla por el proceso de nixtamalización ecológica se aplicó el mismo procedimiento con 1% de carbonato de calcio sustituyendo el hidróxido de calcio y no se realizaron los lavados, únicamente se escurrió el agua de cocción.

Para la elaboración de las tortillas se siguieron buenas prácticas de manufactura, evitando contaminación cruzada de materias primas; los utensilios de cocina se lavaron previamente y los aditivos utilizados eran de grado alimenticio (NOM-251-SSA1-2009).

La cocción del nixtamal se realizó en el laboratorio de materias primas del CINVESTAV Campus Juriquilla y el troquelado y cocción de las tortillas en una tortillería comercial.

## **6.2.2 Análisis proximal de la tortilla de maíz**

Se realizaron las siguientes pruebas en las tortillas sometidas a los procesos de nixtamalización ecológico y tradicional, con y sin aditivos, y las tortillas obtenidas con la harina marca MASECA.

### **6.2.2.1. Porcentaje de humedad**

Se pesaron 2 g de muestra, se secaron en un horno a 130 °C durante 3 h y posteriormente se pesaron para calcular el % de humedad por diferencia de peso (AOAC 934.01/90).

### **6.2.2.2. Cenizas totales**

Se pesó 1 g de las muestras previamente secadas, posteriormente se carbonizaron al mechero para después ser llevadas a una mufla a 550 °C durante 4 h. El porcentaje de cenizas se calculó por diferencia de peso (AOAC 942.05/90).

### **6.2.2.3. Contenido de calcio**

Se obtuvieron cenizas por la metodología ya descrita con 3 g de muestra de tortilla seca, posteriormente se realizó la curva de contenido de calcio con cloruro de calcio; a las muestras se les adicionó 1 mL de ácido nítrico y el crisol se enjugó con agua destilada.

Las cenizas con ácido nítrico y el agua de enjuague se vertieron en un matraz de 100 mL, al cual se le añadió 10 mL de una solución de cloruro de estroncio 5 M, la lectura se realizó a una longitud de onda de 422.7 nm en un espectrofotómetro de absorción atómica.

#### 6.2.2.4. Análisis de fibra

El análisis de fibra se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Shiga *et al.*, (2003) por medio de la hidrólisis enzimática de las muestras de tortilla con  $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa. Para la extracción de fibra insoluble, se adicionó solución amortiguadora de fosfato 0.08 mM a pH 6 a la muestra desengrasada y tamizada en malla 60, se adicionó 0.1 mL de  $\alpha$ -amilasa; las muestras se protegieron de la luz y se incubaron en baño maría a 95 °C por 30 min, agitando cada 5 min; posteriormente se llevaron a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 7.5 con hidróxido de sodio 0.2 N.

Posteriormente, se adicionó 5 mg/mL de proteasa y se incubó en baño maría a 60 °C por 30 min con agitación continua. Transcurrido el tiempo, la muestra se llevó a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 4.6 con ácido clorhídrico 0.3 N. Posteriormente, se adicionó 0.1 mL de amiloglucosidasa y se incubó en baño maría por 30 min a 60 °C con agitación continua. Al término de la incubación, se filtró y se realizaron dos lavados con agua a 60 °C. El papel filtro se dejó secar en estufa a 60 °C para su posterior cálculo por diferencia de peso.

Para la fracción soluble, se adicionó etanol al 78% al sobrenadante obtenido de la parte insoluble y se dejó 24 h en refrigeración, posteriormente se filtró y se secó en estufa a 60 °C para su posterior cálculo por diferencia de peso.

#### 6.2.2.5. Contenido de grasa

Se efectuó siguiendo el método de Soxhlet, con éter de petróleo (30 - 60°) como reactivo extractor. Se pesó 2 g de muestra molida y seca y se colocó en el cartucho de extracción. Se calentó a través de un equipo Goldfish 2 h. Se evaporó el éter de petróleo a 100 °C en una campana de extracción y una vez seco y a temperatura ambiente se pesó para obtener el % de grasa por diferencia de peso (AOAC 920.39/90).

#### 6.2.2.6. Proteína total

Se determinó a través el método macro Kjeldahl, con 5 g sulfato de potasio, 0.15 g sulfato cúprico y 0.15 g dióxido de titanio, como pastilla catalizadora para la digestión. Se pesó 1 g de muestra molida y seca, se agregó una pastilla catalizadora y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y las muestras se trasladaron a un digestor. Se digirió hasta que las muestras quedaron del mismo color que los blancos por aproximadamente 4 h. Una vez que el digerido alcanzó la temperatura ambiente se agregaron 100 mL de agua destilada.

Para realizar la destilación se agregó 50 mL de hidróxido de sodio al 40%. Se introdujo en la unidad de destilación, se calentó hasta destilar todo el amoniaco. Esto se colectó en un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 15 mL de ácido sulfúrico 0.2 N y rojo de metilo.

El destilado se tituló con hidróxido de sodio 0.2 N, posteriormente se calculó el porcentaje de proteína siguiendo la siguiente fórmula (AOAC 991.20/90).

$$\%P = \left( \left( \frac{((V \text{ ácido sulfúrico})(N)) - ((V \text{ hidróxido de sodio})(N))}{\text{Peso de la muestra}} \times 0.014 \right) 100 \right) 6.25$$

#### 6.2.2.7. Determinación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales, se preparó un extracto metanólico añadiendo 10 mL de metanol a 1 g de muestra molida y tamizada por malla 60. La muestra se protegió de la luz y se colocó en agitación 24 h a 25 °C, posteriormente se centrifugó a 4000 g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante para la cuantificación de compuestos fenólicos (Cardador-Martínez *et al.*, 2002). Posteriormente, se tomó 500 µL de extracto metanólico y se adicionó reactivo de Folin-Ciocalteu. La reacción se neutralizó con carbonato de sodio (60 g/L) y se mantuvo 2 h en reposo en oscuridad. Posteriormente, se realizó la

lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 760 nm (Anexo 10.2) (Singleton y Rossi, 1965).

La concentración se determinó utilizando la ecuación de la recta o curva de calibración de ácido ferúlico, donde  $y$  es la absorbancia y  $x$  la concentración a calcular, teniendo un  $R^2$  de 0.994. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido ferúlico/ g de muestra (Jadhav *et al.*, 2012).

### **6.2.3. Modelo de carcinogénesis**

El presente protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. Se emplearon 100 ratas macho Sprague-Dawley (UNAM, Campus Juriquilla) de cuatro semanas de edad clínicamente sanas, al llegar se verificó el sexo de las ratas, el peso y la constancia de salud. Se alojaron 5 ratas por jaula (187  $\text{cm}^2$  de ancho y 18 cm de alto por rata de 100-300 g) de acero inoxidable, las cuales permitían la entrada de aire y luz y tenían un clip a prueba de escape. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad ( $50 \pm 10\%$ ), ciclos día/noche de 12/12 h, temperatura adecuada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ventilación constante y condiciones aceptables de limpieza; las cuales consistían en un lavado diario de bebederos, comederos, pisos y charolas de recolección; además de un lavado de jaulas y paredes cada tercer día (NOM-O62-200-199).

Semanalmente se pesaron los animales y se comparó el crecimiento con la curva de crecimiento para esta cepa (de acuerdo a las curvas de crecimiento publicadas por Harlan, Anexo 10.3).

Después de una semana de aclimatación con dieta estándar Rodent Lab Chow 5001 (Nupec, Querétaro) (13.49% de lípidos, 28.5% de proteína, 57.99 de carbohidratos y 6% de fibra) y agua potable *ad libitum*, las ratas se dividieron e identificaron aleatoriamente en 6 grupos experimentales ( $n=15$ ) y un control sano

(n=10). Cada jaula se identificó de acuerdo al grupo experimental y cada rata se marcó con un color diferente; el colorante se aplicó en la cola y no ha sido reportado que cause toxicidad en roedores.

Los tratamientos consistieron en una mezcla de 80% dieta estándar y 20% de tortilla (295 g, en base al consumo *per cápita* rural) los cuales se administraron a los grupos 3, 4, 5, 6 y 7 (Cuadro 2); 4 semanas antes, durante (8) y después (12) de la inducción con DMH; los grupos sano (grupo 1) y DMH (Grupo 2) (Figura 6) recibieron únicamente dieta comercial; la mezcla dieta-tortillas se preparó diariamente y se molió a través de una malla de 8 mm.

**Cuadro 2. Diseño experimental del modelo animal de cáncer de colon.**

No. Grupo	Grupo	Tratamiento	n
1	Sano	Solución salina + D	10
2	Control	DMH + D	15
3	DT	DMH + DT	15
4	DTA	DMH + DTA	15
5	DE	DMH + DE	15
6	DEA	DMH + DEA	15
7	DM	DMH + DM	15

#### **6.2.3.1. Inducción de cáncer de colon con DMH**

El periodo de inducción constó de 8 semanas (semana 5-12), cada semana se inyectó el carcinógeno DMH (21 mg/kg de peso) disuelto en EDTA (37 mg/ 100 mL) y solución salina 0.9% grado farmacológico a los grupos 2 al 7; al grupo sano se le inyectó únicamente el vehículo de la DMH. Las inyecciones se realizaron con jeringas tuberculinas de 1 mL desechables (Figura 6). Los animales se inyectaron sin ayuno previo de forma subcutánea, alternando flanco derecho y flanco izquierdo cada semana como se muestra en la Figura 7, y la solución se ajustó a pH de 6.5 (Reynoso-Camacho *et al.*, 2011).

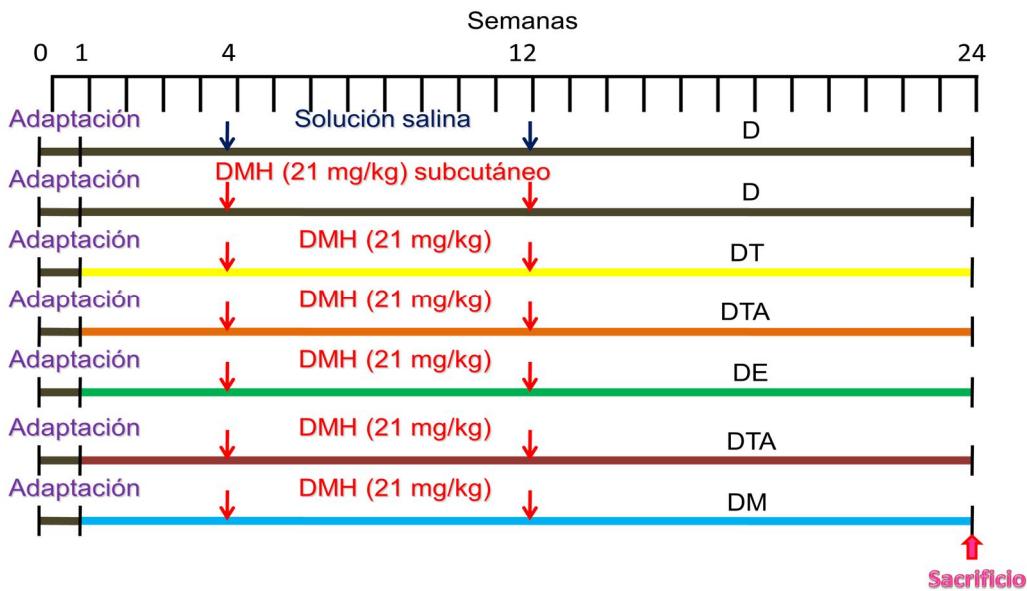


Figura 6. Diseño experimental del modelo animal de cáncer de colon. DMH: dimetilhidrazina; D: dieta estándar, DT: 20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar, DTA: 20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar, DE: 20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar, DEA: 20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar, DM: 20% tortilla con harina comercial MASECA + 80% dieta estándar.



Figura 7. Técnica de inmovilización para llevar a cabo la inyección subcutánea en ratas (<http://www.ahc.umn.edu/rar/handling.html>).

Las jeringas utilizadas se colocaron en un bote rojo de polipropileno especial para objetos punzocortantes con una leyenda que indicaba “residuos punzocortantes biológico-infecciosos” y se almacenaron en un congelador

(temperatura máxima 4°C) en un periodo máximo de 15 días hasta su debido transporte por la empresa Servicios Especializados en residuos S.A. de C.V. quienes garantizaron que el tratamiento sobre los residuos, elimina microorganismos que pueden causar daños a la salud, así mismo se comprometieron a manejar los residuos hasta su disposición final (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

#### **6.2.3.2. Determinación de glucosa**

En la semana 4 (antes de la inducción) y 16 (4 semanas después del periodo de inducción) se realizó la prueba de curva de tolerancia a la glucosa, la cual consistió en medir la glucosa en ayuno y después de 30, 60, 90 y 120 min de una administración de glucosa (2 g/kg de peso) vía intragástrica (Tze *et al.*, 1991). Para esta prueba, los animales se dejaron en ayuno de 12 h previo a la toma de muestra basal, se retiró el alimento a las 20:00 h para realizar la primera toma de sangre a las 8:00 h. Para la toma de sangre, se cortó un pedazo de cola con tijeras quirúrgicas esterilizadas sobre una mesa quirúrgica y con un campo estéril, antes y después del corte se usó azul de metileno como método antiséptico, colocándolo con un algodón en la punta de la cola. La medición de glucosa se realizó con un glucómetro marca Accu-chek performa.

Posteriormente, la administración de glucosa se efectuó por sonda intragástrica de acero inoxidable previamente sonicada y esterilizada; la forma en que se sujetaron los animales para la intubación fue de acuerdo a la Figura 8. Por último, para la toma de sangre de las mediciones restantes ya no se volvió a cortar, únicamente se removió la costra y se tomó como muestra la segunda gota que salió.

Los resultados se analizaron mediante el ABC (área bajo la curva), la cual es un valor numérico que se obtiene calculando la sumatoria de un rango comprendido entre dos puntos en función de la CTG (curva de tolerancia a la glucosa) realizada.

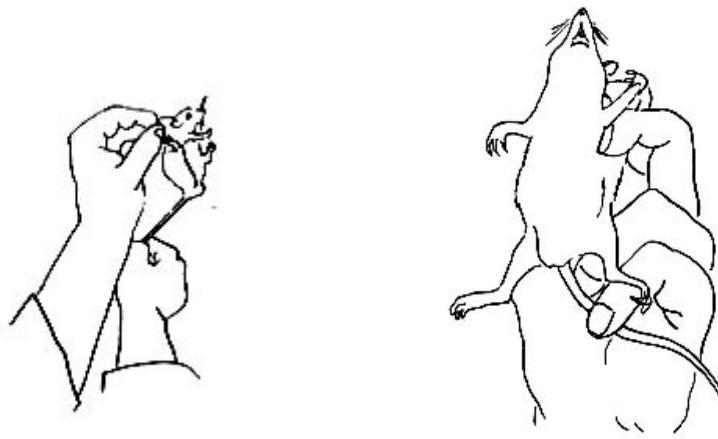


Figura 8. Técnica de inmovilización para llevar a cabo la intubación intragástrica en ratas (<http://www.ahc.umn.edu/rar/handling.html>).

#### **6.2.3.3. Sacrificio de animales y obtención de muestras**

El sacrificio de los animales se llevó a cabo utilizando una cámara de sacrificio con bióxido de carbono como método anestésico de los animales. Posteriormente, se realizó una incisión con bisturí esterilizado desde el tórax hasta el ano separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales; se realizó un corte de la vena porta para asegurar la muerte clínica con tijeras quirúrgicas esterilizadas.

Se extrajo el colon, se abrió longitudinalmente, se lavó con solución fisiológica y posteriormente se dividió en sección proximal (colon ascendente) y sección distal (colon descendente). Parte de las muestras obtenidas se fijaron con formaldehído al 4% en solución amortiguadora de sales (PBS) para los estudios histopatológicos. Adicionalmente, se recuperaron las heces cecales (localizadas en el ciego) y las contenidas en el resto del colon; se congelaron a -70 °C para su posterior análisis.

El material quirúrgico utilizado se remojó con cloro 12 h, posteriormente se lavó y se esterilizó para su posterior almacenamiento. Los restos de las ratas no requeridas para análisis y destinadas a desecho se almacenaron en una bolsa grande color amarillo, cuidando de no rebasar el 80% de su capacidad en un congelador (temperatura máxima 4°C), la bolsa se etiquetó con la leyenda “desechos patológicos”, éstas se almacenaron 7 días hasta su debido trasporte e incineración, los cuales estuvieron a cargo de la empresa Planta Incineradora de Residuos Bio-Infecciosos S.A. de C.V. autorizada por la SEMARNAT (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

#### 6.2.4. Análisis macroscópico

Se realizó la agrupación de los tumores u otras lesiones encontradas en el colon de las ratas, de acuerdo la clasificación realizada por Dukes en 1930 y modificada por Astler y Coller en 1954 (Figura 9).

Tumores sésiles A: masas que protruyen sobre la superficie mucosa y con un diámetro mayor que el de su unión a la mucosa y muy cercanos a la misma. Tumores pedunculados B: pólipos con tallo claramente visible. Tumores exofíticos C: tumores usualmente polipoides proyectando hacia la luz; presentan margen elevado con una cavidad central y una masa subyacente lobulada. Tumores endofíticos D: tumores en forma de meseta o ulcerativos con tendencia ligera o nula a abultar hacia la luz. Por lo regular son tumores constrictivos. Placas E: lesiones con una superficie relativamente plana, ligeramente por encima del nivel de la mucosa.

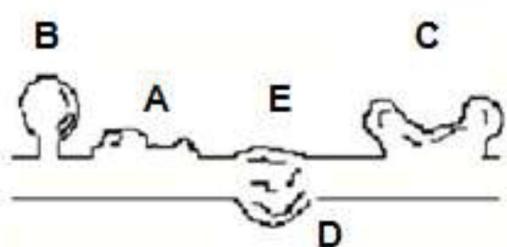


Figura 9. Clasificación de tumores (Extraído de Piñols, 1995).

### **6.2.5. Análisis histopatológico**

El colon completo (sección proximal y distal) se removió, se lavó con solución fisiológica estéril y se fijó con formaldehido al 4% amortiguado durante 12 h para una posterior inmersión en parafina, microdissección y tinción con hematoxilina-eosina. Finalmente, los tejidos se observaron al microscopio y se evaluó el grado de displasia, para así clasificar las muestras en tejido normal, inflamación, displasia y adenocarcinoma. Para el grado de displasia, la evaluación se realizó siguiendo la escala establecida por Riddell *et al.* (1983), clasificando la displasia como negativa y positiva (bajo grado, alto grado y carcinomas). Para el grado de inflamación se empleó la escala establecida por Cooper *et al.* (1993), (inflamación positiva y negativa o tejido normal). El análisis histopatológico estuvo a cargo del Dr. Alonso Gallegos Corona, profesor investigador encargado del laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina, UAQ.

### **6.2.6. Análisis del contenido cecal, colónico y fecal**

Se recolectaron heces en la semana 11 de experimentación para determinar su peso y se recuperó el contenido cecal y colónico en el sacrificio.

#### **6.2.6.1. Análisis de pH**

El contenido cecal, colónico y muestras fecales recolectadas en el sacrificio se suspendieron en agua (5 veces su volumen), se homogenizaron y se les midió el pH en un pH-metro (Nakanishi *et al.*, 2003).

#### **6.2.6.2. Determinación de la actividad de la enzima $\beta$ -glucuronidasa**

Se determinó la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa del contenido cecal, colónico y fecal de acuerdo al método descrito por Fishman *et al.* (1948). Se homogenizó 0.50 g de muestra con un politrón. Posteriormente, la muestra se sometió 3 min a

4 °C en un sonicador ultrasónico y se centrifugó a 500 g por 15 min. Se recolectó el sobrenadante y se determinó la actividad enzimática. Para la reacción se tomó 0.8 mL de PBS 0.002 M, 0.1 mL del sustrato  $\beta$ -glucorónido-fenolftaleína 1 nM y 0.1 mL del extracto cecal, colónico o de muestras fecales, . Se incubó por 1h a 37 °C y la reacción se detuvo con 2.5 mL de glicina alcalina y 1.5 mL de agua HPLC. Posteriormente, se realizó la lectura del color producido a 540 nm y se calculó la cantidad de fenolftaleína liberada mediante una curva estándar de fenolftaleína (Anexo A4).

#### **6.2.7. Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como las medias  $\pm$  la desviación estándar (DE) o error estándar (EE) según corresponda. Para todos los análisis se empleó el análisis de varianza (ANOVA), en cuanto al análisis proximal de tortilla, fibra, calcio, fenoles y heces fecales se empleó la prueba de comparación de medias Tukey. Se empleó la prueba de  $\chi^2$  para determinar las diferencias en la incidencia y grado del tumor por efecto del consumo de tortilla. Para el análisis de los datos de tumores (promedio y multiplicidad), consumo de alimento, ganancia de peso y tamaño de colon se empleó un ANOVA, seguida de la comparación de medias por la prueba de Dunnett. La correlación de Pearson se empleó para determinar la asociación entre los diversos parámetros evaluados, considerándose un nivel de significancia del 95%. Para la actividad enzimática y pH se realizó un ANOVA, seguida de una prueba de Dunn's. Las diferencias se consideraron como significativas si  $p<0.05$ . Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SigmaStat versión 11 y JMP 10.0.0.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

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

Se realizó el análisis químico (proteínas, lípidos, cenizas, humedad y carbohidratos) y nutracéutico (calcio, fibra dietaria y fenoles totales) de las tortillas de maíz elaboradas con masa obtenida por diferentes procesos de nixtamalización: tradicional (T), tradicional con aditivos (TA), ecológico (E), ecológico con aditivos (EA). De manera adicional, se elaboraron tortillas con masa obtenida de harina comercial MASECA (M). Los resultados se muestran en el Cuadro 3. En cuanto al contenido proteico, se encontró que las tortillas E y EA presentaron mayor porcentaje de proteína (8.23 y 8.26%, respectivamente), en comparación con las tortillas T, TA y M. Se puede observar que las tortillas T presentan menor porcentaje proteínico (7.83%). Esto podría explicarse a que la cocción alcalina, a diferencia del proceso ecológico (E), permite el desprendimiento del pericarpio del grano del maíz y su eliminación por los lavados, el cual además de ser rico en celulosa y hemicelulosa también posee nutrientes como proteínas (Bressani *et al.*, 1958). Maya-Cortés *et al.* (2010) encontraron un porcentaje de proteína ligeramente mayor (7.96%) en tortillas elaboradas por el proceso ecológico usando sulfato de calcio, que las elaboradas por el proceso tradicional (7.48%). Las diferencias con lo reportado y lo encontrado en este trabajo podrían deberse a la variedad del grano de maíz y a la diferente sal de calcio utilizada, es probable que el sulfato de calcio permita mayor remoción del pericarpio que el carbonato de calcio. El porcentaje de proteína encontrado en las tortillas M (8.04%) se encuentra entre lo reportado por Agama-Acevedo *et al.* (2004) (7.51%) y por Méndez-Albores *et al.* (2012) (8.91%). Las diferencias pudieron deberse a distintas formas de elaboración, así como diferente lote. Sin embargo, nuestros valores entran en los intervalos reportados por los mismos autores (7.51-8.63%) en tortillas elaboradas por harinas de otras marcas.

**Cuadro 3. Composición proximal de tortillas de maíz**

Muestra	Proteínas	Lípidos	Cenizas	Humedad	Carbohidratos
T	7.83 ± 0.08 <sup>b</sup>	3.02 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.55 ± 0.01 <sup>a</sup>	45.71 ± 0.85 <sup>b</sup>	41.89 ± 0.94 <sup>c</sup>
TA	7.92 ± 0.18 <sup>ab</sup>	2.95 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.59 ± 0.05 <sup>a</sup>	44.09 ± 0.30 <sup>c</sup>	43.45 ± 0.40 <sup>b</sup>
E	8.23 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.15 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.03 <sup>ab</sup>	40.24 ± 0.07 <sup>d</sup>	45.86 ± 0.15 <sup>a</sup>
EA	8.26 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.71 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.01 <sup>a</sup>	40.63 ± 0.08 <sup>d</sup>	45.8 ± 0.13 <sup>a</sup>
M	8.04 ± 0.12 <sup>ab</sup>	3.10 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.41 ± 0.02 <sup>b</sup>	50.09 ± 0.39 <sup>a</sup>	37.36 ± 0.23 <sup>d</sup>

T: tradicional, TA: tradicional con aditivos, E: ecológico, EA: ecológico con aditivos, M: harina comercial. Los resultados se expresan como la media ± DE (n=3). Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

Aún cuando el porcentaje proteínico encontrado se ve favorecido en el proceso E es importante realizar evaluaciones de biodisponibilidad, pues se ha reportado que el proceso de nixtamalización tradicional pudiera favorecer interacciones hidrofóbicas, desnaturalización de proteínas y el cruzamiento de éstas, lo que genera cambios de solubilidad y, por lo tanto, promueve la liberación de aminoácidos durante la digestión enzimática, incrementando la biodisponibilidad de nutrientes, cuestión importante que se tendría que evaluar en el proceso ecológico (Sanderson *et al.*, 1978; Paredes-López y Saharapulus, 1983; Ortega *et al.*, 1986).

Referente al contenido lipídico, de igual forma las tortillas obtenidas por el proceso E presentan mayor cantidad que las tortillas T y M. Maya-Cortés *et al.* (2010) también reportan el mismo comportamiento, aunque valores menores (3.06%) en comparación a lo encontrado en E (4.15%) y en EA (3.71%). Esta diferencia pudiera deberse a la variedad de grano puesto que ellos reportan un contenido de lípidos del 2.63% en tortillas elaboradas por el proceso tradicional a diferencia de lo encontrado en tortillas T (3.02%) y TA (2.95%). En las tortillas M el porcentaje de lípidos encontrado (3.10%) concuerda con lo reportado con Agama-Acevedo *et al.* (2004) (3.24%), pero difiere de lo encontrado por Méndez-Albores *et al.* (2012) (5.10%). Es probable que en el proceso T se tengan pérdidas parciales del germen durante la cocción; el germen es rico en lípidos por lo que esto pudiera explicar el mayor porcentaje de los mismos en las tortillas elaboradas por el proceso E (Pflugfelder *et al.*, 1988). El contenido menor de lípidos en las tortillas elaboradas con aditivos pudo deberse a la formación de emulsiones entre la goma xantana adicionada y las proteínas del maíz; por lo que al encapsular las grasas, éstas obstruyen la cuantificación de las mismas (Xu *et al.*, 2013).

En lo que respecta al contenido de cenizas, el cual representa el contenido de minerales, se puede observar que aunque no existe diferencia estadística entre los procesos T y E, éste es ligeramente mayor en T (1.55%) que en E (1.52%), lo que pudiera explicarse por el contenido de calcio, ya que se puede observar que

T tiene 0.58 mg/g de calcio a diferencia de E que presenta 0.47 mg/g (Cuadro 4). Varios autores han relacionado el aumento de cenizas con el incremento de calcio debido al proceso de nixtamalización, mismo que puede ser de 13 o 14 veces más dependiendo del nivel de cal utilizado, temperatura de cocción, tiempo de remojo, características físico-químicas del maíz, y método de cocción (Bressani, 2008). En este sentido, se encontró una correlación entre el porcentaje de cenizas y el contenido de calcio ( $r=0.334$ ,  $p<0.005$ ).

**Cuadro 4. Contenido de calcio (mg/g de materia seca) en tortillas de maíz.**

Muestra	Calcio (mg/g de materia seca)
T	0.58 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
E	0.47 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
M	0.18 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>

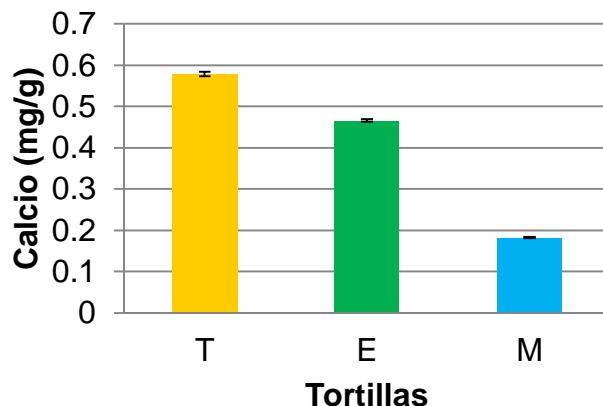


Figura 10. Contenido de calcio (mg/g). T: tradicional, E: ecológico, M: harina comercial. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DE ( $n=3$ ). Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

A pesar de que no existen diferencias estadísticas en el porcentaje de cenizas entre E (1.52%) y EA (1.60%), y T (1.55%) y TA (1.59%), si se encuentra mayor porcentaje tanto en TA como en EA. Esto es de esperarse ya que el propionato de sodio y el sorbato de potasio adicionados en estas tortillas pueden aumentar su contenido mineral. Las tortillas M presentaron estadísticamente menor contenido de cenizas (1.41%) y de calcio (0.18 mg/g) y, aunque se ven claras diferencias en el contenido de calcio de las diferentes tortillas, todas (T, E y M) se encuentran en los intervalos reportados por Rodriguez *et al.* (1996).

La absorción de calcio en el grano de maíz durante el proceso de nixtamalización sigue el mismo patrón de absorción de agua (Bressani, 2008), por

lo que los resultados obtenidos de humedad en T (45.71%) y E (40.24%) son de esperarse. Sin embargo, siguiendo esta misma lógica no se puede explicar el resultado obtenido en M (50.09%), el cual es estadísticamente mayor a los procesos anteriores, esto puede ser consecuencia de la mayor superficie de contacto que presentan al ser elaboradas por una harina.

El porcentaje de carbohidratos fue estadísticamente mayor en E y EA en comparación con T y TA; y los anteriores estadísticamente mayores a M. El porcentaje encontrado en T (41.89%) y TA (43.45%) correspondan con lo reportado por Bressani *et al.* en 1958 (43.90%). El mayor porcentaje de carbohidratos en las tortillas E (45.86%), EA (45.80%) y M (37.36%) pudo deberse al mayor porcentaje de fibra, ya que se encontró una correlación positiva entre ambos contenidos ( $r=0.868$ ,  $p<0.05$ ) (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Contenido de fibra dietaria en tortillas de maíz**

Muestra	Fibra insoluble		Fibra soluble		Fibra total	
T	8.70	± 0.46	b	0.50	± 0.05	a
TA	8.65	± 0.44	b	1.04	± 0.31	b
E	13.50	± 0.09	a	1.08	± 0.08	b
EA	13.44	± 0.29	a	1.18	± 0.10	b
M	7.62	± 0.75	b	1.08	± 0.18	b

Contenido de fibra dietaria soluble, insoluble y total. T: tradicional, TA: tradicional con aditivos, E: ecológico, EA: ecológico con aditivos, M: harina comercial. Los resultados se expresan como la media ± DE ( $n=2$ ). Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

Se sabe que el contenido de fibra insoluble disminuye tras el proceso de nixtamalización tradicional debido al desprendimiento del pericarpio (Bressani *et al.*, 1958) y que la fibra soluble aumenta gracias a las reacciones de Maillard (Reinhold *et al.*, 1979). El contenido de fibra total en T (9.20%), TA (9.69%) y M (8.70%) concuerda con lo reportado por Palacios-Fonseca *et al.* (2009), quienes encontraron un porcentaje de 7.74 a 9.03% de fibra total en tortillas comerciales nixtamalizadas.

El contenido de fibra insoluble (7.62%) y soluble (1.08%) en M concuerda con los valores encontrados por estos autores (6.04%-7.79% y 0.97%-1.7% respectivamente). Sin embargo lo encontrado de fibra en T (8.70% y 0.5% respectivamente) y TA (8.65% y 1.04% respectivamente) no concuerda con lo reportado por Mora-Escobedo *et al.* (2009), quienes encontraron 8.3% de fibra insoluble en tortillas de maíz nixtamalizado y 1% de fibra soluble. Esto pudo deberse a la variedad del grano de maíz y al método de elaboración de la tortilla empleado. En general se puede resaltar que en el presente estudio se encontró mayor porcentaje de fibra insoluble.

Los contenidos de fibra en E y EA fueron mayores a T, TA y M; esto era de esperarse ya que el proceso ecológico retiene mayor cantidad de pericarpio, por lo tanto mayor contenido de fibra. El mismo comportamiento fue reportado por Maya-Cortés *et al.* (2010); sin embargo, estos autores reportan un contenido de fibra menor (11.57%) a lo encontrado (14.59% en E y en 14.62% en EA). Esto pudiera deberse a diferencias en la variedad del grano de maíz y a la sal de calcio utilizada. El sulfato de calcio que ellos utilizaron para llevar a cabo la nixtamalización pudo facilitar mayor desprendimiento del pericarpio que el carbonato de calcio empleado en el presente estudio y por lo tanto favorecer el desprendimiento del pericarpio. No obstante, los resultados obtenidos en el proceso ecológico tanto de fibra total, fibra insoluble (13.50% en E y 13.44% en EA) y fibra soluble (1.08% en E y 1.18% en EA) son más cercanos a los obtenidos por Mora-Escobedo *et al.* (2009), quienes trabajaron con tortillas de maíz de una variedad mejorada, encontrando 14.2% de fibra total, 12.6% de fibra insoluble y 1.6% de fibra soluble.

La fibra dietaria es de gran importancia biológica, pues se ha encontrado que previene y ayuda a la mejora de muchos padecimientos tal es el caso de cáncer de colon o diabetes, por lo que el contenido que está presente en las tortillas E y EA es de gran impacto a la salud.

## 7.2. Contenido de compuestos fenólicos en tortillas de maíz nixtamalizada

Otros componentes importantes relacionados con la prevención y/o desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas son los polifenoles. El grano de maíz es rico principalmente en flavonoides y ácidos fenólicos (*p*-cumárico, ferúlico y cinámico). Los polifenoles se encuentran principalmente ligados a la hemicelulosa del pericarpio, los cuales tras la cocción alcalina son hidrolizados y liberados teniendo pocas pérdidas (Doner y Hicks, 1997).

Diversos estudios han reportado han demostrado que el ácido ferúlico es el polifenol más abundante en el maíz blanco (2480 mg/ kg de ácido ferúlico libre) (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006). Algunos autores han encontrado en mayor cantidad el ácido ferúlico en la tortilla que en el maíz, esto debido a la acción de la hidrólisis alcalina del proceso de nixtamalización (De la Parra *et al.*, 2007; Mora-Rochin *et al.*, 2010), por lo que se consideró importante tomarlo como estándar para la cuantificación de fenoles y reportarlos como mg equivalentes de ácido ferúlico (EAF) por g de muestra seca.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 11, siendo M, la muestra con el mayor contenido de fenoles totales (9.44 mg de EAF por g de muestra seca), comparado con el resto de los tratamientos. Los procesos ecológicos, E (3.80 mg de EAF por g de muestra seca) y EA (3.49 mg de EAF por g de muestra seca), presentaron el menor contenido de fenoles totales, los cuales pudieran estar principalmente ligados a la fibra disminuyendo su cuantificación. En este sentido se encontró una correlación inversa entre el contenido de fenoles totales y el contenido de fibra total ( $r=-0.623$ ,  $p<0.050$ ). El contenido encontrado en T y TA fue de 4.71 y 4.10 mg de EAF/ g de muestra seca, respectivamente. Todos los resultados son un poco mayores a lo encontrado por Sánchez-Ibarra (2012), quien reportó un contenido de compuestos fenólicos de 2.5 a 2.7 mg de EAF/ g de muestra seca en tortillas de harinas ecológicas nixtamalizadas, esto pudiera ser

por diferencias en el grano utilizado y por diferencias en el proceso de nixtamalización.

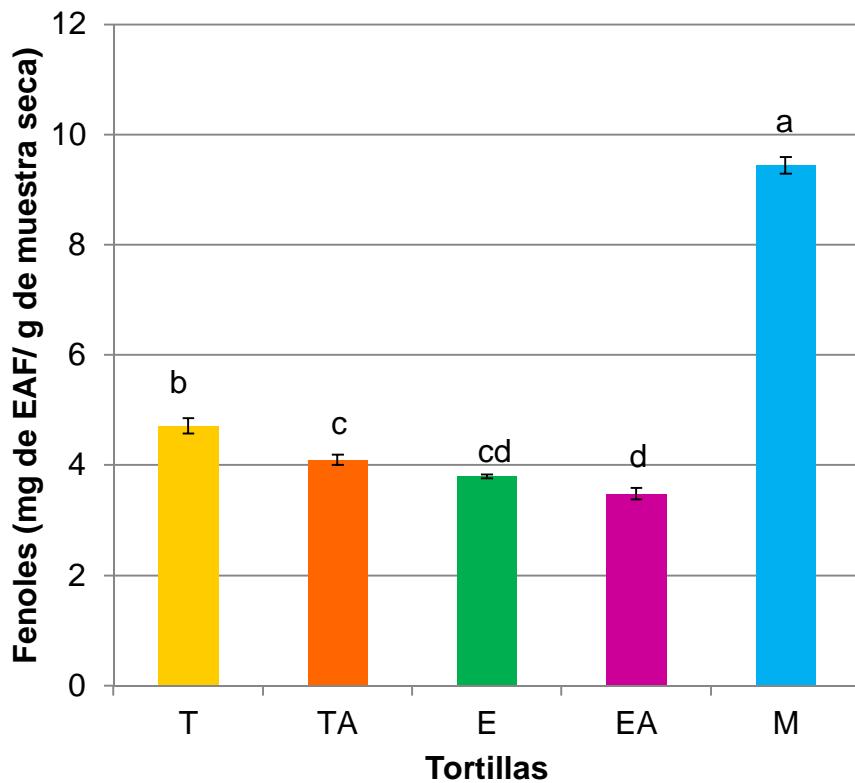


Figura 11. Contenido de fenoles totales en tortillas elaboradas por diferentes procesos, expresados en mg de EAF (equivalentes de ácido ferúlico) por g de muestra seca. T: tradicional, TA: tradicional con aditivos, E: ecológico, EA: ecológico con aditivos, M: harina comercial, Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DE ( $n=3$ ). Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

De manera similar, Rodríguez-Méndez *et al.* (2013) reportaron un contenido de fenoles totales mayor en tortillas elaboradas con hidróxido de calcio (351 mg de ácido gálico/100 g) que en tortillas elaboradas con carbonato de calcio (206 mg de ácido gálico/100 g). Por lo que, se podría sugerir que en las condiciones analizadas, los polifenoles forman complejos con la hemicelulosa del pericarpio y que los datos obtenidos en M ( $9.44 \pm 0.15$  mg de EAF) pudieran deberse al proceso realizado para obtener la harina o incluso al uso de algún aditivo.

### 7.3. Composición de la dieta suplementada con tortilla (20%) administrada en el modelo animal.

Se realizó el cálculo de la dieta total tomando en cuenta 100 g de consumo. La composición de nutrientes se presenta en el Cuadro 6, donde es importante resaltar que no existe diferencia de nutrientes entre las dietas con tortilla; no así con dieta estándar, la cual presenta mayor porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos. Todas las dietas con tortilla tienen mayor porcentaje de fibra soluble que la dieta estándar; además, las dietas suplementadas con tortilla ecológica presentan mayor porcentaje de fibra insoluble. También podemos observar que las dietas suplementadas con tortilla tienen mayor contenido de calcio.

**Cuadro 6. Porcentaje de nutrientes en las diferentes dietas proporcionadas en el modelo experimental.**

	D	DT	DTA	DE	DEA	DM
Lípidos	13.49	11.40	11.38	11.62	11.53	11.41
Proteína	28.50	24.37	24.38	24.45	24.45	24.41
Carbohidratos	57.99	52.93	53.14	52.65	52.59	52.12
Fibra soluble	ND	0.10	0.21	0.22	0.24	0.22
Fibra insoluble	6.00	6.54	6.53	7.50	7.49	6.32
Calcio	0.95	12.36	12.36	10.16	10.16	4.36
Humedad	12.00	18.74	18.42	17.65	17.73	19.62

D (dieta estándar), DT (20% tortillas tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortillas de harina comercial + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), DEA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), ND (no determinado).

Posteriormente, se calculó el aporte de nutrientes dependiendo del consumo promedio de alimento de cada grupo, mismos que se presentan en el Cuadro 7. El grupo tratado con tortilla nixtamalizada de forma tradicional (DT) tuvo una menor ingesta de lípidos (2.59% por rata), carbohidratos (12.04% por rata) y proteína (5.54% por rata), en comparación al resto de los grupos. Los grupos ecológicos tuvieron mayor aporte de fibra (1.85% y 1.91% por rata para DE y DEA,

respectivamente) que los grupos tratados con otras dietas (1.33-1.57% por rata). Todos los grupos que consumieron tortilla tuvieron mayor aporte de calcio (1.15-2.81%) que los grupos sano y control (0.21%).

**Cuadro 7. Nutrientes (g) consumidos dependiendo del grupo experimental.**

	Sano	Control	DT	DTA	DE	DEA	DM
Promedio de g consumidos	22.18	22.31	22.74	23.98	24.72	25.45	26.44
Lípidos	2.99	3.01	2.59	2.73	2.87	2.93	3.02
Proteína	6.32	6.36	5.54	5.85	6.04	6.22	6.45
Carbohidratos	12.86	12.94	12.04	12.74	13.01	13.38	13.78
Fibra soluble	ND	ND	0.02*	0.05*	0.05*	0.06*	0.06*
Fibra insoluble	1.33	1.34	1.49	1.57	1.85	1.91	1.67
Calcio	0.21	0.21	2.81	2.96	2.51	2.59	1.15
Humedad	2.66	2.68	4.26	4.42	4.36	4.51	5.19

DE (dieta estándar), DT (20% tortillas tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortillas de harina comercial + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), DEA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), ND (no detectable).

\*Solo se tomó en cuenta el contenido en las tortillas.

Como se muestra en la curva de crecimiento, el aporte nutrimental de las diferentes dietas no tuvo repercusión en el desarrollo de las ratas.

#### **7.4. Efecto quimioprotector de tortillas de maíz nixtamalizadas sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con DMH en ratas Sprague-Dawley.**

Se trabajó con un modelo de cáncer de colon inducido con DMH, empleando ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 4 semanas de edad. Los animales se dividieron en 7 grupos: un control sano (n=10), un grupo control alimentado con dieta estándar e inducido con DMH (n=15), y 5 grupos inducidos con DMH y tratados con diferentes tortillas, DT, DTA, DM, DE y DEA (n=15 por cada grupo) incorporadas en la dieta estándar. Durante el periodo experimental de 24 semanas (4 previas, 8 durante y 12 después de la inducción) se obtuvo una tasa de supervivencia del 100% en todos los grupos y se registró el consumo de alimento y la ganancia de peso.

#### 7.4.1. Ganancia de peso y consumo de alimento de ratas inducidas con DMH y tratadas con tortillas de maíz nixtamalizadas.

En cuanto al peso corporal registrado semanalmente no se encontraron diferencias estadísticas con respecto al grupo sano, con excepción del grupo control a la semanas 4 y 13, (Figura 12). A partir de la semana 4 se inició el periodo de inducción lo que pudo afectar el crecimiento de los grupos DTA, DE, DEA y DM que obtuvieron una ganancia de peso estadísticamente menor ( $25.00 \pm 7.32$  g,  $23.53 \pm 10.53$  g,  $20.53 \pm 6.99$  g y  $14.00 \pm 8.63$  g respectivamente) en comparación al grupo control ( $29.13 \pm 8.99$  g) y el grupo DT ( $31.40 \pm 10.53$  g), lo que muestra una mejor respuesta al estrés. En la semana 13, el grupo control presentó estadísticamente una mayor ganancia de peso ( $12.73 \pm 5.01$  g) en comparación al grupo sano ( $7.30 \pm 3.59$ ). En las últimas 4 semanas de experimentación ya no se observa crecimiento de ninguno de los grupos. Coincidiendo con lo reportado por Jia *et al.* (2000) y Ramos-Gomez *et al.* (20011), se puede resumir que el carcinógeno no afectó de manera significativa el crecimiento de los animales tratados

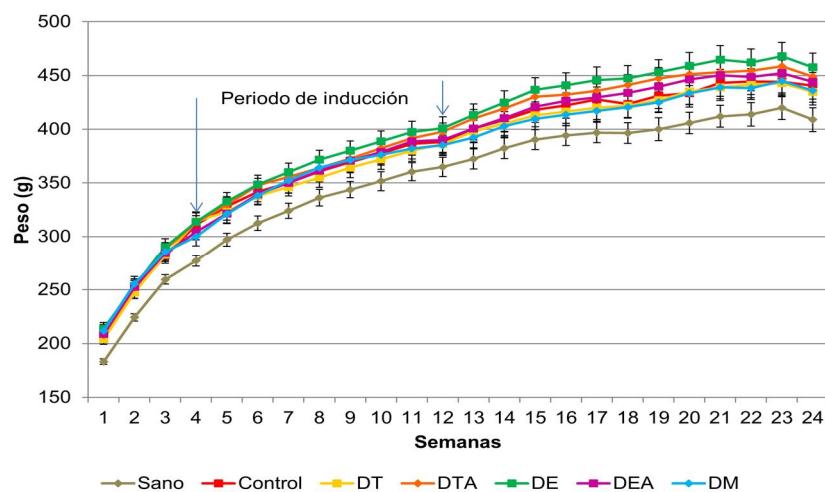


Figura 12. Curva de crecimiento (g) de las ratas durante el periodo de experimentación. Sano y Control (100% dieta estándar), DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE (sano=10, grupos restantes n=15).

El consumo de alimento registrado semanalmente se puede apreciar en la Figura 13. Al inicio del periodo experimental, el consumo fue de 20.21 a 24.03 g por rata. El grupo DM fue el que consumió estadísticamente mayor cantidad de alimento que el resto de los grupos. Esta tendencia se mantuvo durante las 24 semanas finalizando con un consumo entre 23.74 g y 28.82 g por rata. Cabe señalar que el grupo DM tuvo estadísticamente un mayor consumo en 9 de las 24 semanas, seguido del grupo DEA el cual presentó un mayor consumo en 5 semanas de las 24 y finalizando el grupo DTA el cual durante 2 semanas tuvo un mayor consumo respecto al grupo sano. La diferencia observada en el consumo no se reflejó en el peso, pero es posible que algún aditivo en común a los tres grupos antes mencionados influyera en el estímulo de saciedad del animal o que la fibra inhibiera la absorción de nutrientes. También se puede resaltar que el cancerígeno tampoco tuvo impacto directo con el consumo de alimento.

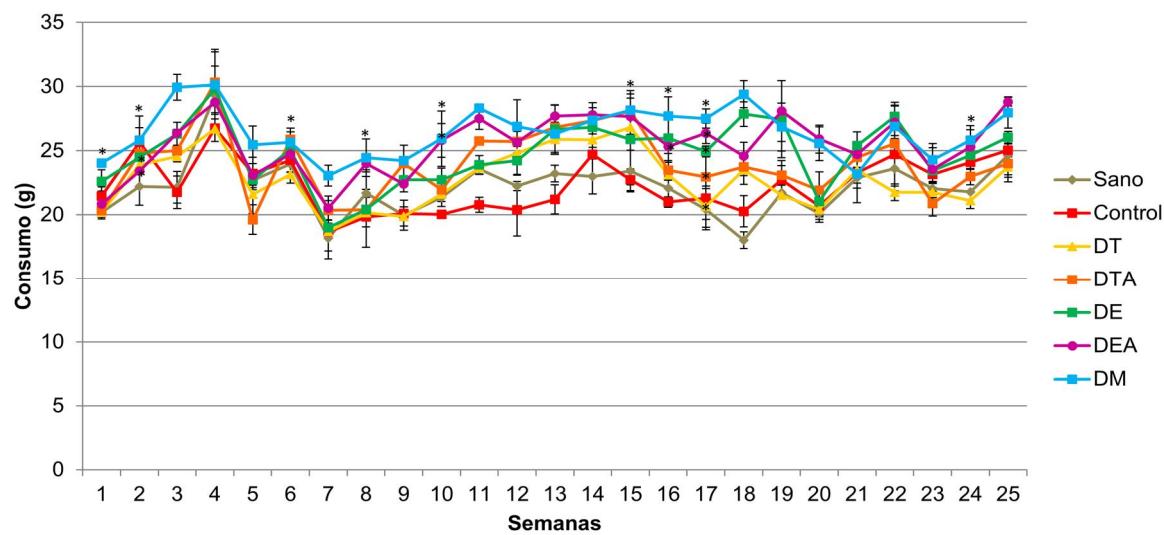


Figura 13. Consumo de alimento (g) por rata durante el periodo de experimentación. Sano y Control (100% dieta estándar), DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE (sano=10, grupos restantes n=15). \*Diferencia estadística en comparación con el grupo control de acuerdo a la prueba de Dunnett ( $p<0.05$ ).

## 7.5. Peso de las heces de las ratas en experimentación

En la semana 11 de experimentación se recolectaron heces fecales de 24 h, las cuales se pesaron y posteriormente se secaron y se volvieron a pesar. Los resultados se pueden apreciar en el Cuadro 8, encontrando que no existen diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, las heces fecales de los grupos sano y control presentaron menor peso en comparación a los grupos restantes y de igual forma presentan menor pérdida de agua; esto pudo ser influencia de la dieta. Dentro de los grupos tratados con tortillas, los grupos alimentados con DE y DEA presentaron menor peso en las heces (10.43 y 11.17 g promedio de heces de 5 ratas, respectivamente) al igual que una menor pérdida de agua ( $E=3.78$  g por 5 ratas y  $DEA=3.23$  g de 5 ratas). Esto es importante ya que podría traer implicaciones biológicas, ya que el bajo peso de heces y la poca pérdida de agua indican estreñimiento. Se ha relacionado el estreñimiento con una mayor incidencia de cáncer de colon, porque promueve un mayor contacto con cancerígenos y el estreñimiento puede ser consecuencia de una baja ingesta de fibra o de un exceso en el consumo de fibra y bajo consumo de líquidos (Jacobs y Lupton, 1986; Kakino *et al.*, 2010; Simons *et al.*, 2010).

**Cuadro 8. Peso de heces fecales**

Grupo	Heces								Pérdida de agua			
	Peso en fresco				Peso en seco							
Sano	9.10	±	2.10	<sup>a</sup>	5.73	±	1.91	<sup>a</sup>	3.37	±	0.19	<sup>a</sup>
Control	12.64	±	2.88	<sup>a</sup>	9.69	±	1.81	<sup>a</sup>	2.95	±	1.66	<sup>a</sup>
DT	12.58	±	3.12	<sup>a</sup>	7.85	±	2.43	<sup>a</sup>	4.73	±	0.72	<sup>a</sup>
DTA	12.67	±	1.14	<sup>a</sup>	7.42	±	0.68	<sup>a</sup>	5.25	±	1.01	<sup>a</sup>
DE	10.43	±	0.81	<sup>a</sup>	6.66	±	0.73	<sup>a</sup>	3.78	±	0.25	<sup>a</sup>
DEA	11.17	±	1.95	<sup>a</sup>	7.93	±	1.06	<sup>a</sup>	3.23	±	0.98	<sup>a</sup>
DM	13.01	±	2.30	<sup>a</sup>	8.79	±	1.76	<sup>a</sup>	4.22	±	0.86	<sup>a</sup>

DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar). Los resultados se expresan como la media ± DE (sano=10, el resto de los grupos n=15). Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

## 7.6. Efecto del consumo de tortillas sobre la tolerancia de glucosa antes y después de la inducción con DMH.

Después de 4 semanas de consumo habitual de alimento comercial (80%) mezclado con tortilla (20%), se realizó la prueba de curva de tolerancia a la glucosa, la cual consistió en medir la glucosa en ayuno (12 h) y después de 30, 60, 90 y 120 min de una administración de glucosa (2 g/kg de peso) vía intragástrica (Tze *et al.*, 1991).

Los resultados se observan en las Figura 14A y B, e indican que el grupo DE presenta un área bajo la curva (ABC) estadísticamente menor (428 ABC) al grupo control (480 ABC), el cual fue tratado únicamente con alimento comercial (Figura 14b). Es importante resaltar que se encontró una correlación inversa entre la fibra total contenida en las diferentes tortillas y el ABC obtenida en los diferentes grupos ( $r=-0.719$ ,  $p<0.05$ ). Estos estudios indican que la fibra insoluble aumenta la sensibilidad a la insulina modulando receptores de la misma disminuyendo con ello la glucosa postprandial (Pereira *et al.*, 2002). De la misma manera la fibra soluble se ha relacionado con una disminución de glucosa postprandial, favoreciendo la viscosidad en el colon y un mejor atrapamiento de nutrientes (Vogel *et al.*, 2012). Además, la fibra soluble es fermentada por la microbiota colónica, favoreciendo la síntesis de AGCC, entre ellos el ácido propiónico, el cual se sugiere de acuerdo a la literatura que estimula la glucólisis y facilita la utilización de glucosa en el organismo (Todesco *et al.*, 1991; Song *et al.*, 2000).

Los grupos restantes no muestran diferencia estadística con respecto al grupo control; sin embargo, existen estudios epidemiológicos que relacionan el consumo habitual de granos integrales con una menor incidencia a presentar diabetes mellitus tipo 2 (Salmeron *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 2000, Meyer *et al.*, 2000, Pereira *et al.*, 2002, van Dam *et al.*, 2002), por lo que las diferentes tortillas pudieran tener un efecto en la disminución de glucosa.

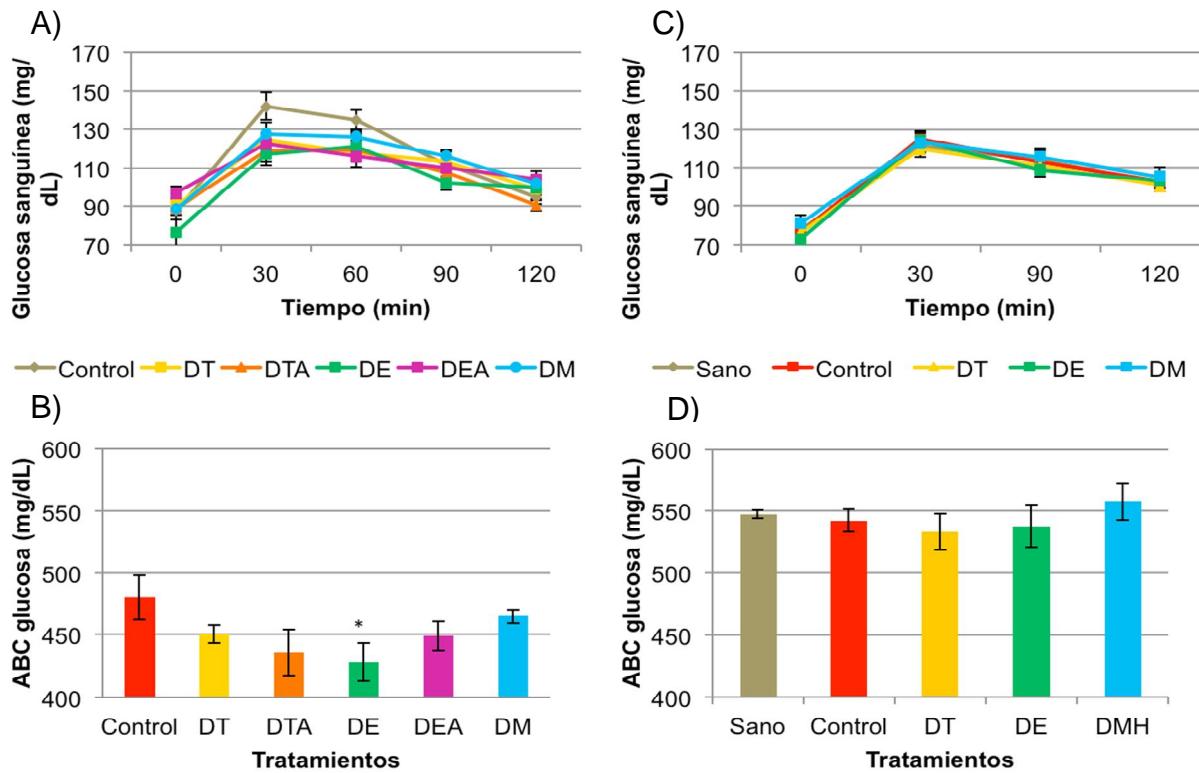


Figura 14. Concentración de glucosa sanguínea en ayunas de ratas con un consumo habitual de 4 semanas (A y B) y 18 semanas (C y D) de tortillas. A y C curva de tolerancia a la glucosa, B y D área bajo la curva (ABC).

Sano y Control (100% dieta estándar), DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar).

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE (n=6). \*Diferencia estadística en comparación con el grupo control de acuerdo a la prueba de Dunnett ( $p<0.05$ ).

La curva de tolerancia a la glucosa se realizó nuevamente 5 semanas después del periodo de inducción, es decir, en la semana 18 de experimentación. Los resultados se muestran en las Figuras 14C y D, y se observa que no existe diferencia estadística entre los grupos.

Entre el grupo sano y el grupo control se puede ver que, aunque no existe diferencia estadística, después de 60 min de suministrar el bolo de glucosa, el grupo sano presenta un pico más elevado de glucosa que el grupo control; esto podría ser porque se ha visto que en pacientes con cáncer, las demandas de

glucosa son casi 200 veces más que en una persona sana, por lo tanto la absorción de la misma es más rápida (Ferreira, 2010). También se puede observar que en todos los grupos inducidos con DMH después de 180 min de administración del bolo de glucosa, ésta no regresa a su nivel basal, lo que nos pudiera indicar resistencia a la insulina, la cual está relacionada con cáncer de colon ya que inhibe la apoptosis y promueve la proliferación celular (Muszyński *et al.*, 1990; Ehrmann-Josko *et al.*, 2006; Ortiz *et al.*, 2012).

### **7.7. Evaluación macroscópica de las lesiones del modelo de experimentación inducido con DMH y tratado con diferentes tortillas (T, TA, E, EA, M).**

Los resultados del tamaño del colon se detallan en el Cuadro 9, encontrando que todos los grupos son estadísticamente mayores al grupo control sano. Esto puede deberse por el tamaño de las ratas, ya que en este grupo el peso promedio fue de 408 g, en comparación a los otros grupos donde el peso promedio varió de 434 g a 457 g. Otra explicación es debido a la inducción con DMH, ya que algunos carcinógenos producen hipertrofia en el órgano blanco (Visek *et al.*, 1991).

**Cuadro 9. Tamaño relativo del colon de ratas Sprague-Dawley**

Grupo	Tamaño de colon (cm)
<b>Sano</b>	17.44 ± 0.17
<b>Control</b>	19.84 ± 0.42 *
<b>DT</b>	19.38 ± 0.38 *
<b>DTA</b>	20.46 ± 0.29 *
<b>DE</b>	20.42 ± 0.30 *
<b>DEA</b>	19.61 ± 0.40 *
<b>DM</b>	20.64 ± 0.43 *

DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar). Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (sano=10, el resto de los grupos n=15). \*Diferencia estadística en comparación con el grupo control de acuerdo a la prueba de Dunnett ( $p<0.05$ ).

Posteriormente, las lesiones visualizadas en los diferentes grupos se clasificaron de forma macroscópica (Figura 15). Se observaron lesiones o tumores llamados pólipos, los cuales son una descripción clínica de cualquier masa de células bien delimitada que se proyectan encima de la superficie de la mucosa, se caracterizan por tener una división celular aumentada y pueden ser lesiones benignas y asintomáticas o evolucionar a lesiones malignas. Principalmente se distinguen dos tipos de pólipos, los pedunculados que presentan un tallo de implantación e implican menos malignidad porque la degeneración cancerosa tarda en llegar a la base de sujeción, y los pólipos sésiles que tienen una base de implantación amplia sin tallo, lo que indica mayor malignidad ya que la degeneración cancerosa llega antes a la base (Tanaka, 2009).

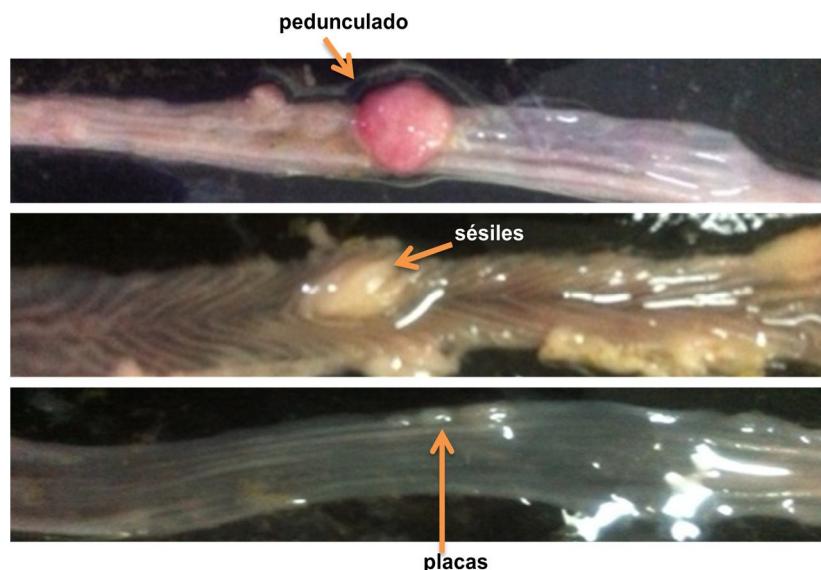


Figura 15. Clasificación macroscópica encontrada en el modelo de experimentación inducido con DMH.

Posteriormente, se realizó recuento total de tumores por grupo y los resultados indican diferentes tendencias en cuanto al tipo de tumor dependiendo del tratamiento (Cuadro 10). Todos los grupos tratados con tortillas exhiben mayor cantidad de tumores pedunculados en comparación a los tumores sésiles, a diferencia del grupo control el cual presenta mayor número de tumores sésiles (1

pedunculado y 4 sésiles). También se puede observar que los grupos tratados con tortillas con aditivos presentan menor número total de tumores (DTA=24 y DEA=16) a diferencia de aquellos grupos que fueron tratados con tortillas sin aditivos (DT=25 y DE=33). Todos los grupos presentan menor número de tumores totales que el grupo control (30) con excepción del grupo DE (33) y el grupo que presenta menor número de tumores que no son placas es el grupo DM (2 pedunculados). De acuerdo a la malignidad de la lesión (Tanaka, 2009), los resultados encontrados en el presente estudio sugieren que todos los grupos tratados con tortilla, presentan pólipos con menor malignidad en comparación al grupo control.

**Cuadro 10. Clasificación macroscópica de tumores encontrados en ratas inducidas con DMH y los grupos tratados con diferentes tortillas.**

Grupo	Placas	Pedunculados	Sésiles	Total
<b>Sano</b>	0	0	0	0
<b>Control</b>	26	1	4	31
<b>DT</b>	20	4	1	25
<b>DTA</b>	23	6	0	29
<b>DE</b>	27	4	1	32
<b>DEA</b>	12	5	0	17
<b>DM</b>	119	2	0	21

DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar).

También se determinó la zona del colon que presentó mayor número de tumores. Se identificaron tumores en la zona tanto proximal como distal del colon, mostrando un mayor porcentaje de tumores en la zona distal (68-100%) que en la zona proximal (0-32%) (Cuadro 11). La distribución de tumores concuerdan con lo reportado por Persê y Cerar (2011) quienes reportan que los modelos de cáncer de colon inducidos con DMH y AOM presenta por lo general mayor número de tumores en la zona distal en comparación a la zona proximal y éstos suelen ser pedunculados.

**Cuadro 11. Distribución por zona de tumores en ratas tratadas con diferentes tortillas.**

Grupo	Zona proximal	Zona distal	Total
<b>Sano</b>	0% (0)	0% (0)	0
<b>Control</b>	32% (10)	68% (21)	31
<b>DT</b>	12% (3)	88% (22)	25
<b>DTA</b>	0% (0)	100% (29)	29
<b>DE</b>	12% (4)	87% (28)	32
<b>DEA</b>	24% (4)	76% (13)	17
<b>DM</b>	0% (0)	100% (21)	21

DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar). Valores entre paréntesis indican cantidad total de tumores.

#### **7.8. Evaluación histopatológica del colon de ratas inducidas con DMH y tratadas con diferentes tortillas (T, TA, E, EA, M).**

La evaluación de los tumores se realizó en un microscopio Olympus PX40 con aumento de 40x y 100x; éstos fueron previamente teñidos con hematoxilina-eosina (HIE) y finalmente evaluados por el Dr. Gallegos a cargo del Laboratorio de patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. El grado de displasia se realizó de acuerdo al criterio descrito por Riddell *et al.* (1983). En la Figura 16 se muestra la histología de un colon normal donde se puede observar la estructura tubular característica de las fosas crípticas o criptas de Lieberkühn, además se aprecian en mayor cantidad las células caliciformes, las cuales presentan una forma de copa o de cáliz y son las encargadas de secretar mucinas. Estas células presentan generalmente un núcleo redondeado, con un nucléolo pequeño y regular. El núcleo se dispone en la base celular al quedar desplazado por las vacuolas de moco que ocupan el citoplasma. Las células caliciformes localizadas en la base y en el tercio inferior de la cripta se muestran bien formadas, numerosas y llena de moco; contrariamente, en la porción superior de las criptas, estas células son escasas pero más grandes y de forma alargada.

Existen diferentes tipos de células situadas en las criptas, como las columnares, endócrinas, vacuoladas, secretoras del fondo de la cripta y caveoladas; sin embargo, además de presentarse en menor cantidad, son menos visibles (Tanaka, 2009).

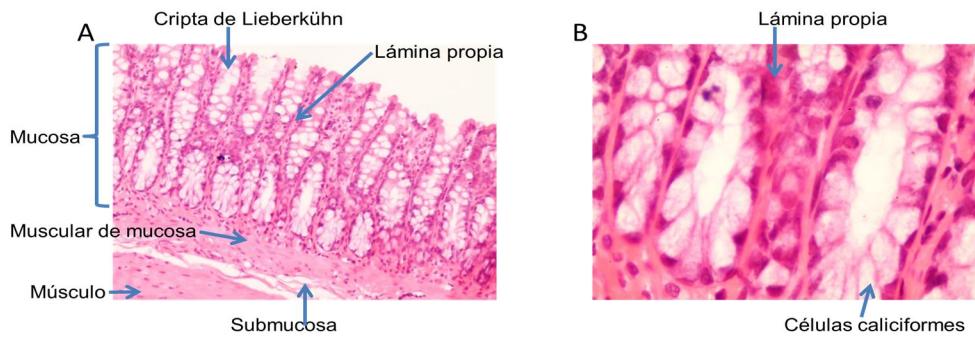


Figura 16. Características histopatológicas de un colon sano. A) Corte histopatológico transversal 40x. B) Corte histopatológico transversal 100x.

En la Figura 17 se muestra la histología de colon de los grupos DT (Figura 17 A) y Control (Figura 17 B), se puede observar tejidos con displasias de bajo y alto grado encontradas en los diferentes grupos experimentales; éstas se conocen comúnmente como focos de criptas aberrantes, las cuales se caracterizan por perder la estructura tubular y alineación celular de una cripta sana, además de presentar hipercromatismo, pseudoestratificación, alargamiento del núcleo, alto índice mitótico, pérdida de moco evidente y un aumento del tejido linfoide asociado en respuesta al daño causado (Tanaka, 2009). A medida que el grado de displasia aumenta, la deformación de las criptas es mayor y el espacio entre ellas es menor.

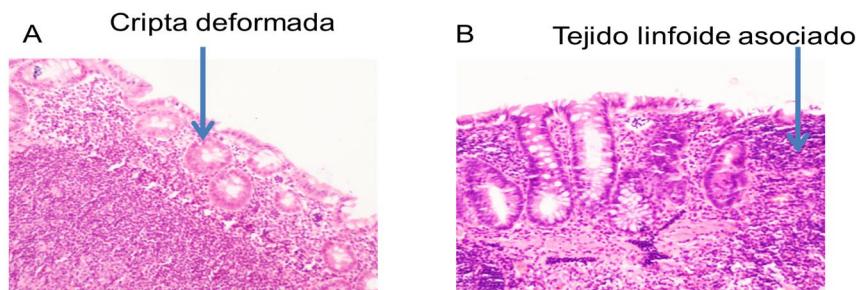


Figura 17. Focos de criptas aberrantes. A) Displasia de bajo grado 40x. B) Displasia de alto grado 40x.

En la Figura 18 podemos observar muestras de tejido con adenocarcinoma de los grupos DEA (Figura 18 A) y DE (Figura 18 B); estas muestras se caracterizan por presentar glándulas irregulares con secreción de moco; también se encontró un tipo de adenocarcinoma mucinoso llamado del tipo de células de anillo de sello, el cual está constituido por células con moco intracitoplasmático y núcleos localizados periféricamente, dispuestos individualmente o en forma de grupos sueltos y difusamente extendidos a lo largo de toda la pared (Figura 19 B).

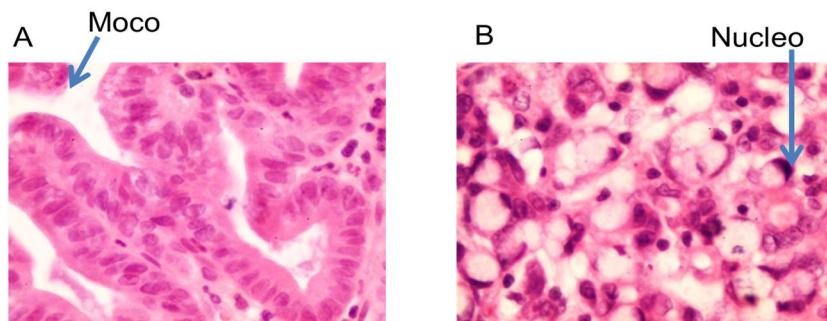


Figura 18. Muestras de tejido epitelial colónico A) Adenocarcinoma 100 x. B) Adenocarcinoma del tipo células anillo de sello 100 x.

En las muestras analizadas se encontró que el porcentaje del grado de displasia es estadísticamente diferente entre los grupos; los grupos control, DE y DEA no presentaron displasia de bajo grado; el grupo DM tiene mayor porcentaje de muestras con displasia de alto grado (62%); en contraste, el grupo DEA presenta el menor porcentaje de muestras con esta displasia (18%). El grupo DM tiene el menor porcentaje de muestras con adenocarcinoma (19%), seguido de DTA (41%) y DEA (82%) (Cuadro 12). Por lo anterior, se puede resaltar que los aditivos incorporados en el proceso de elaboración de estas tres tortillas, dentro de ellos las gomas (xantana, la cual es una fibra soluble), presentan un efecto biológico benéfico observado en el colon de los grupos tratados con estas tortillas. Sin embargo, las diferencias son muy grandes por lo que algún otro compuesto de las tortillas M como los fenoles pueden ser lo que presenten el mayor efecto protector.

**Cuadro 12. Porcentaje de displasia de bajo y alto grado y adenocarcinomas encontrados en el total de muestras analizadas por histopatología.**

Tratamiento	Total de muestras	Displasia		Adenocarcinoma
		Bajo grado	Alto grado	
<b>Sano</b>	10	0%	0%	0%
<b>Control</b>	31	0%*	26% (8)*	74% (23)
<b>DT</b>	25	16% (4)	24% (6)*	60% (15)
<b>DTA</b>	29	17% (5)	41% (12)	41% (12)*
<b>DE</b>	32	0%*	34% (11)	66% (21)
<b>DEA</b>	17	0%*	18% (3)*	82% (14)
<b>DM</b>	21	19% (4)	62% (13)	19% (4)*

DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar).\* Indica menor proporción de muestras con tumores a lo esperado de acuerdo a la prueba de  $\chi^2$   $p < 0.001$ . Valores entre paréntesis indican cantidad total de lesiones de acuerdo a la clasificación.

Estudios publicados describen el efecto del tipo y la cantidad de las fibras sobre el cáncer de colon. Algunas investigaciones resaltan un mayor efecto protector de las fibras solubles, como la goma xantana, ya que éstas promueven el crecimiento de bacterias acido-lácticas encargadas de fermentar la fibra, lo que aumenta la formación de AGCC, los cuales tienen un efecto protector (Jacobs y Lupton, 1986). Sin embargo, otros estudios rechazan esta teoría pues sustentan que este efecto sería únicamente en el ciego, lugar donde se lleva a cabo la síntesis de AGCC y afirman que las fibras insolubles son las que tienen mayor efecto protector ya que aumentan el tránsito intestinal acarreando sustancias cancerígenas (McIntyre *et al.*, 1993). En recientes estudios se ha comprobado que el consumo de una matriz alimentaria, principalmente cereales integrales y granos enteros, disminuyen el riesgo de cáncer de colon por presentar fibra dietaria, almidón resistente y oligosacáridos, además de tener vitaminas, minerales y otros fitoquímicos con propiedades biológicas (Aune *et al.*, 2011; Ben *et al.*, 2014).

En el presente estudio, el grupo DE (con mayor consumo de fibra principalmente insoluble) presentó un porcentaje de muestras con displasia de alto

grado (34%) mayor a lo esperado según la prueba de  $\chi^2$  y de igual forma de muestras con adenocarcinoma (66%) al igual que el grupo Control (74%). Esto concuerda con lo reportado por Sánchez-Ibarra (2012), quien no encontró diferencia estadística con respecto al control en la formación de criptas aberrantes en un modelo inducido con azoximetano y tratado con tortilla de harina ecológica (22%), concluyendo que el mayor porcentaje de fibra que presentaron las tortillas ecológicas (2.69 a 4.26% más que el método tradicional) no tuvo efecto protector contra el cáncer de colon.

Posteriormente, en el presente estudio se realizó el análisis de incidencia, inhibición, promedio y multiplicidad de los adenocarcinomas encontrados en los diferentes grupos experimentales (Cuadro 13). El grupo que presentó mayor incidencia fue el grupo control (86.7%) seguido de los grupos DT, DE y DEA (66.7% cada uno). Estos tres grupos presentaron adenocarcinomas del tipo de células de anillo de sello, el cual se caracteriza por ser más invasivo. Además, de estos tres grupos DE presentó un mayor promedio (2.10 adenocarcinomas por rata) y mayor multiplicidad (0.21) por lo que se puede suponer que la cantidad de fibra insoluble que consumía ente grupo repercutió negativamente en el desarrollo del adenocarcinoma.

Los resultados obtenidos confirman lo encontrado en estudios realizados en las mismas condiciones en el laboratorio. Guerrero-Villanueva (2007) encontró una menor incidencia en grupos tratados con tortillas de maíz blanco (12.5%) y azul (12.5%) en comparación al grupo control (55.5%), lo que nos indica un efecto quimioprotector de la tortilla. En el presente estudio también se encontró menor incidencia en los grupos tratados con tortilla en comparación al grupo control (86.7%), siendo estadísticamente menor para el grupo DM (20%). Es importante resaltar, que se encontró una correlación inversa entre los fenoles totales en las tortillas y la incidencia de adenocarcinomas encontrados en los diferentes grupos bajo estudio en el presente trabajo ( $r=-0.907$ ,  $p<0.50$ ). Los polifenoles son conocidos por sus propiedades protectoras contra el cáncer, dentro de ellos se

encuentra el ácido ferúlico, el cual es el fenol mayoritario en el maíz (Kawabata *et al.*, 2000). Sin embargo, es probable que en las tortillas T, TA, E y EA este fenol se encuentre menos biodisponible (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

**Cuadro 13. Porcentaje de incidencia e inhibición de adenocarcinomas, promedio y multiplicidad de tumores de ratas inducidas con DMH y tratadas con diferentes tortillas.**

Tratamiento	<sup>1</sup> Incidencia (%)	Inhibición (%)	<sup>2</sup> Promedio de adenocarcinomas/rata	<sup>3</sup> Multiplicidad
Control	86.7	-	1.77 ± 0.28	0.14 ± 0.02
DT	66.7	23.1	1.50 ± 0.34	0.15 ± 0.03
DTA	46.7	46.1	1.71 ± 0.47	0.24 ± 0.06
DE	66.7	23.1	2.10 ± 0.50	0.21 ± 0.05
DEA	66.7	23.1	1.40 ± 0.30	0.14 ± 0.03
DM	20.0 <sup>€</sup>	76.9	1.33 ± 0.33	0.44 ± 0.11*

<sup>1</sup>Relación del número de animales con tumores entre el total de ratas en el grupo.

<sup>2</sup>Relación del número total de tumores entre el número total de ratas en el grupo.

Los resultados se expresan como la media ± EE (n=15).

<sup>3</sup>Relación del número total de tumores entre el número de animales con tumores.

<sup>€</sup> Menor incidencia de tumores de acuerdo a la prueba de  $\chi^2$   $p < 0.01$ .

\*Diferencia estadística en comparación con el grupo control de acuerdo a la prueba de Dunn's ( $p < 0.05$ ). DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar).

## 7.9. Efecto de las tortillas (T, TA, E, EA, M) sobre el nivel de pH en el contenido cecal, colónico y fecal.

El valor del pH colónico se ha relacionado con la incidencia de tumores en el mismo; varios estudios avalan que un pH básico predispone a un mayor número de tumores que un pH ácido (Samelson *et al.*, 1985). Por otro lado, se ha señalado que la fermentación de la fibra mediada por la microbiota colónica promueve la síntesis de AGCC, los cuales tienen un efecto quimoprotector (McIntyre *et al.*, 1993; Le Leu *et al.*, 2009). El pH del contenido cecal, colónico y fecal obtenido en el presente trabajo se muestra en el Cuadro 14. Se puede observar que no existe

diferencia estadística en el pH de las muestras cecales y fecales, las cuales presentan intervalos de 7.27 a 7.62 y de 8.16 a 8.44 respectivamente.

En cuanto al contenido colónico, el grupo sano presenta un pH de 7.39, esto concuerda con lo reportado por Jacobs y Lupton (1986) y por Le Leu *et al.* (2009), quienes encontraron un pH de 7.3 y 7.4, respectivamente, en el contenido colónico de los grupos de ratas sanas. Sin embargo, en ambos estudios los tratamientos mostraron una disminución significativa del pH en los grupos tratados con fibra. Resultados que difieren con lo obtenido, ya que el pH encontrado en los grupos DT (7.52), DTA (7.48), DE (7.53) y DEA (7.48) son estadísticamente mayores que el grupo control (7.29); esta tendencia se presenta de igual manera en las muestras de los contenidos cecal y fecal. En este sentido, se encontró una correlación directa entre el valor de pH fecal y el contenido de calcio en las diferentes tortillas ( $r=0.816$ ,  $p<0.50$ ). Esto pudiera dar explicación a los resultados encontrados ya que algunos estudios reportados en humanos tratados con calcio han presentado un incremento del pH del contenido colónico.

En un estudio reportado por Trautvetter *et al.* (2012) se observó un incremento de 6.4 a 6.7 en el pH del contenido colónico tras una suplementación de 1807 mg/día de calcio por cuatro semanas. Gregoire *et al.* (1989) reportaron un aumento en el pH del contenido colónico de 6.8 a 7.1 después de una suplementación de 1200 mg/día de carbonato de calcio durante 30 días; es decir una suplementación promedio de 16.64 mg/kg de peso. En el presente estudio el grupo DT tuvo un consumo promedio de 12.36 mg de calcio/g de peso durante los 6 meses del periodo experimental, el grupo DE consumió 10.16 mg/g de peso corporal y el grupo DM 4.36 mg/g de peso corporal. Por lo que, el consumo de calcio presente en las tortillas pudo influir en el pH del contenido colónico.

**Cuadro 14. Valores de pH de muestras de colon de ratas tratadas con tortillas elaboradas por diferentes procesos (T, TA, E, EA, M).**

Grupo	pH		
	Cecal	Colónico	Fecal
Sanas	7.57 ± 0.06 <sup>a</sup>	7.39 ± 0.04 <sup>c</sup>	8.47 ± 0.09 <sup>a</sup>
Control	7.29 ± 0.13 <sup>a</sup>	7.45 ± 0.02 <sup>bc</sup>	8.24 ± 0.12 <sup>a</sup>
DT	7.32 ± 0.07 <sup>a</sup>	7.52 ± 0.12 <sup>ab</sup>	8.44 ± 0.19 <sup>a</sup>
DTA	7.37 ± 0.07 <sup>a</sup>	7.48 ± 0.06 <sup>ab</sup>	8.31 ± 0.09 <sup>a</sup>
DE	7.27 ± 0.12 <sup>a</sup>	7.53 ± 0.06 <sup>a</sup>	8.44 ± 0.06 <sup>a</sup>
DEA	7.54 ± 0.11 <sup>a</sup>	7.48 ± 0.04 <sup>ab</sup>	8.38 ± 0.09 <sup>a</sup>
DM	7.62 ± 0.11 <sup>a</sup>	7.44 ± 0.04 <sup>bc</sup>	8.16 ± 0.16 <sup>a</sup>

DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar). Los resultados se expresan como la media (n=8) ± EE de la media. Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

#### **7.10. Efecto de las tortillas (T, TA, E, EA, M) sobre la actividad de $\beta$ -glucuronidasa del contenido cecal, colónico y fecal de ratas SD inducidas con DMH.**

La inhibición de algunas enzimas como la  $\beta$ -glucuronidasa de la microbiota colónica se ha relacionado con un menor riesgo de padecer cáncer de colon, ya que esta enzima hidroliza compuestos que ya han sido excretados en forma conjugada vía hepatobiliar; por lo que promueve la reabsorción de los mismos, los cuales, en su mayoría son tóxicos o carcinogénicos. Los resultados de la actividad de esta enzima tanto en el contenido cecal, colónico y fecal de las ratas bajo estudio se pueden observar en las Figura 19 y 20. La actividad enzimática del grupo sano y control en contenido cecal no fue estadísticamente diferente de acuerdo a la prueba T de Student, (Figura 19), lo que concuerda con lo reportado por Freeman (1986). Sin embargo, el grupo sano presentó menor actividad en el contenido fecal y colónico que el resto de los grupos difiriendo de lo reportado con este autor.

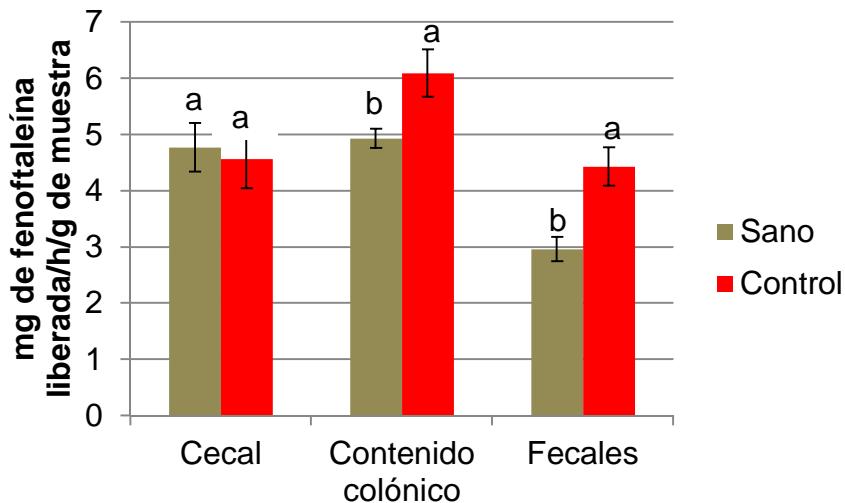


Figura 19. Actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa en muestras de contenido cecal, colónico y fecal de ratas de los grupos control y sano alimentadas con dieta estándar. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE ( $n=7$  por triplicado). Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de T de Student ( $p<0.05$ ).

También se puede observar que en el contenido cecal, los grupos DE, DEA y DM presentaron estadísticamente menor actividad de la enzima (2.08, 2.12 y 3.5 mg de fenolftaleína/h/g de muestra, respectivamente) en comparación al resto de los grupos (4.45 a 5.14 mg de fenolftaleína/h/g de muestra) (Figura 20). Esto podría correlacionarse con la cantidad de fibra insoluble en los tratamientos ( $r=-0.677$ ,  $p<0.05$ ), ya que se ha relacionado el consumo de dietas altas en fibra (10% a 41%) con un equilibrio en la microbiota colónica, lo que favorece la disminución de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (Manoj *et al.*, 2001; Vergara-Castañeda *et al.*, 2010; Verna *et al.*, 2013). En el contenido colónico, los grupos DTA, DEA y DM presentaron menor actividad (2.53, 3.23 y 3.11 mg de fenolftaleína/h/g de muestra, respectivamente) al resto de los grupos (4.66 a 6.09 mg de fenolftaleína/h/g de muestra). Los tratamientos de estos grupos tienen gomas en su formulación, por lo que la fermentación de éstas por efecto de la microbiota pudo tener un efecto directo en la disminución de la actividad de esta enzima, reduciendo el riesgo de cáncer de colon como ya se ha reportado (Ohashi

et al., 2012). En cuanto a las muestras fecales, el grupo DEA presentó menor actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (3.11 y 2.96 mg de fenolftaleína/h/g de muestra, respectivamente) al resto de los grupos (3.37 a 6.12 mg de fenolftaleína/h/g de muestra). Así mismo, se encontró una correlación positiva entre la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa con el promedio de adenocarcinomas ( $r=0.799$ ,  $p<0.050$ ), lo que sustenta la teoría de que la actividad de esta enzima es importante en el desarrollo de cáncer de colon (Cheng et al., 2013).

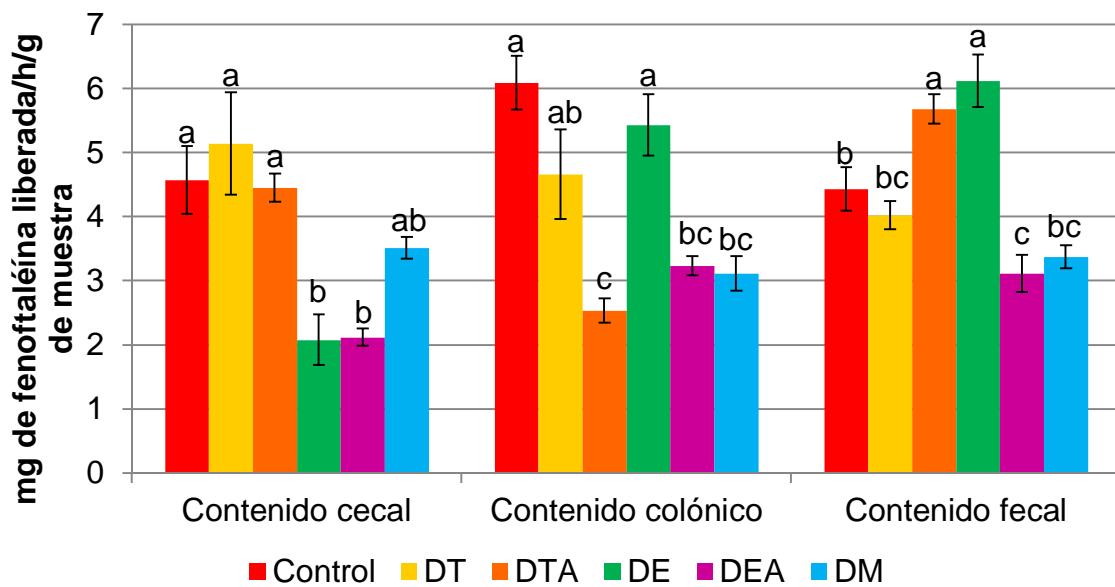


Figura 20. Actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en muestras de contenido cecal, colónico y fecal de ratas tratadas con diferentes tortillas. Control (dieta estándar), DT (20% tortilla tradicional + 80% dieta estándar), DTA (20% tortilla tradicional con aditivos + 80% dieta estándar), DE (20% tortilla ecológica + 80% dieta estándar), EA (20% tortilla ecológica con aditivos + 80% dieta estándar), DM (20% tortilla comercial + 80% dieta estándar). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE ( $n=7$  por triplicado). Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

## VII. CONCLUSIÓN

De manera contraria al proceso de nixtamalización tradicional, el proceso ecológico no facilita el desprendimiento del pericarpio y parte del endospermo del maíz, por lo que se obtiene una tortilla con mayor cantidad de fibra y lípidos y menor cantidad de calcio.

En tortillas elaboradas por el proceso ecológico, los compuestos fenólicos se encuentran en menor cantidad de forma libre en comparación al proceso tradicional. La tortilla elaborada con la harina comercial presenta más del doble de compuestos fenólicos libres que la tortilla tradicional.

Se encontró una correlación negativa entre el contenido de la fibra insoluble en las tortillas y la actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa en el contenido cecal, lo que pudiera deberse al efecto modulador de la fibra sobre la microbiota colónica y, como consecuencia, de una menor actividad de ésta enzima en el ciego. Sin embargo, no se encontró una correlación inversa entre el contenido de fibra insoluble con la incidencia de adenocarcinomas ya que se observa que los grupos alimentados con tortillas E y EA tienen menor peso en heces y una menor pérdida de agua, lo que indica estreñimiento, por lo tanto un mayor contacto con el cancerígeno.

Los grupos alimentados con tortillas que tienen aditivos en su formulación (DTA, DEA Y DM) presentan los menores porcentajes de incidencia de adenocarcinoma, por lo que las gomas presentes en Estas formulaciones pudieran tener un efecto protector. El consumo de gomas (fibra soluble) se ha relacionado con un aumento de la fermentación colónica mediada por la microbiota, lo que trae como consecuencia la disminución del pH; sin embargo, esta disminución no se observó en el presente estudio probablemente por el contenido de calcio en la tortillas.

Existe una correlación negativa entre la cantidad de fenoles libres y la incidencia de adenocarcinoma, por lo que el efecto quimioprotector de los fenoles no sólo depende de la cantidad si no de la disponibilidad de los mismos.

Todos los grupos tratados con dietas suplementadas con tortillas (20%) tienen menor incidencia de adenocarcinoma que el grupo control, por lo que se pudiera decir que la tortilla de maíz tiene un efecto protector; sin embargo el proceso de su elaboración si afecta dicho efecto.

Por todo lo anterior se concluye que la tortilla elaborada con la harina comercial tiene mayor efecto protector debido a la gran cantidad de fenoles libres que posee y a las gomas (posiblemente goma guar) que tiene en su formulación.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adom, K.K., and Liu, R.H. 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agr. Food Chem.* 50:6182-6187.
- Agama-Acevedo, E., Rendón-Villalobos, R., Tovar, J., Paredes-López, O., Islas-Hernández, J.J., Bello-Pérez, L. 2004. *In vitro* starch digestibility changes store of maize flour tortillas. *Nahrung*. 48:38-42.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2011. *Introducción a la Biología Celular*. 3a. Ed. Editorial Médica Panamericana. p 718. México.
- Análisis de la cadena de valor maíz-tortilla: situación actual y factores de competencia local. Secretaría de Economía.2012. [www.economia.gob.mx](http://www.economia.gob.mx). Consultado mayo 2013
- Anilakumar, K.R., Khanum, F., Sudarshanakrishna, K.R., Viswanathan, K.R., Santhanam, F. 2000. Effect of dehydrated carrot on the antioxidant enzymes and microcronuclei formation in rats challenged with dimethylhydrazine. *Nutr. Res.* 6:893-897.
- AOAC. 1990 *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th edition. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists, Methods 934.01/90, 942.05/90, 920.39/90, 991.20/90
- Astler, V.R and Coller, F.A. 1954. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann. Surg.* 139 6:846-852
- Augusto, O., Du-Plessis, L.R., Weingrill, C. 1985. Spin-trapping of methyl radical in the oxidative metabolism of 1,2-dimethylhydrazine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2:853-858.
- Aune, D., Chan, D.S.M., Lau, R., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampan, E., Norat, T. 2011. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *B.M.J.* 343: 1-20.
- Ayala-Soto, F.E., Serna-Saldívar, S.O., García-Lara, S., Pérez-Carillo, E. 2014. Hydroxycibbamic acid, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food. Hydrocolloid.* 35:471-475.
- Baskar, A.A., Al-Numair, K.S., Gabriel-Paulraj, M., Alsaif, M.A., Maumar, M.A., Ignacimuthu, S. 2012.  $\beta$ -sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *J. Med. Food.* 15:335-345.

- Ben, Q., Sun, Y., Chai, R., Quian, A., Xu, B., Yuan, Y. 2014. Dietary fiber intake reduces risk for colorectal adenoma: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 146: 689-699.
- Boffa, L.C., Bolognesi, C. 1986. *In vitro* DNA and nuclear proteins alkylation by 1,2-dimethylhydrazine. *Mutat. Res.* 173:157-162.
- Bressani, R., Paz, R., Scrimshaw, N.S. 1958. Chemical changes in corn during preparation of tortillas. *J. Agric. Food Chem.* 6:10.
- Bressani, R. 1972. La importancia del maíz en la nutrición humana en América Latina y otros países. En: *Mejoramiento Nutricional del Maíz*. Bressani, R., Brraham, E.J. y Béhar, M. (Eds). INCAPL-3. p 5. Guatemala.
- Bressani, R. 2008. Cambios nutrimentales en el maíz inducidos por el proceso de nixtamalización. En: *Nixtamalización del maíz a la tortilla. Aspectos nutrimentales y toxicológicos*. Rodríguez-García, M.E., Serna-Saldivar, S.O., Sánchez-Sinencio, F. (Eds.) Universidad Autónoma de Querétaro. p 19. Querétaro, México.
- Bultman, S.J. 2014. Molecular pathways: Gene-enviroment interaction regulating dietary fiber induction of proliferation and apoptosis via butyrate for cancer prevention. *Clin. Cancer Res.* 20: 799-803.
- Calderillo-Ruiz, G., Ruiz-Molina, J.M., Zamora, J., Trejo-Durán, G.E., Padilla-Rosciano, A. 2010. Cáncer colorectal. En: *Manual de oncología. Procedimientos médico quirúrgicos*. 4a. Ed. Granados-García, M., Herrera Gómez, A. (Eds.) McGrawHill. p 595. DF., México.
- Campechano-Carrera, E.M., Figueroa-Cárdenas, J.D., Arámbula-Villa, G., Martínez-Flores, H.E., Jiménez-Sandoval, S.J., Luna-Bárcenas, J.G. 2012. New ecological nixtamalisation process for tortilla production and its impact on the chemical properties of whole corn flour and wastewater effluents. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 47:564-571.
- Cardador-Martínez A, Castaño-Tostado E, Loarca-Piña G. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus Vulgaris L.*) against aflatoxin B1. *Food Addit. Contam.* 19: 62–69.
- Cheng, C.M., Chen, F.M., Lu, Y.L., Tzou, S.C., Wang, J.Y., Kao, C.H., Liao, K.W., Cheng, T.C., Chuang, C.H., Chen, B.M., Roffler, S., Cheng, T.L. 2013. Expression of b-glucuronidase on the surface of bacteria enhances activation of glucuronide prodrugs. *Cancer Gene Ther.* 20:276-281.
- Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., and Sedergran, D.J. 1993. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 69:238-249.

- De la Parra, C., Serna, S.S., Hai, R.L. 2007. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas and tortilla chips. *J. Agric. Food Chem.* 55:4177-4183.
- Del Pozo-Insfran, D.H., Brenes C., Serna-Saldivar, S.O., Talcott, S.T. 2006. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) *Food Res. Int.* 39:696-703.
- Doner, L.W. and Hicks. 1997. Hemicelluloses from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. *Cereal Chem.* 74:176-181.
- Dukes C.E. 1932. The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol. Bacteriol.* 35:323-332.
- Ehrmann-Jóska, A., Siemińska, J., Górnicka, B., Ziarkiewicz-Wróblewska, B., Ziółkowski, B., Muszyński, J. 2006. Impaired glucose metabolism in colorectal cancer. *Scand. J. Gastroenterol.* 41:1079-1086.
- ENSANUT (Encuesta nacional de salud y nutrición) Disponible en: [ensanut.insp.mx](http://ensanut.insp.mx). Consultado en febrero 2014.
- Fiala, E.S., Reddy, B.S., Weisburger, J.H. 1995. Naturally occurring anticarcinogenic substances in foods stuffs. *Annu. Rev. Nutr.* 5:295-321.
- Figueroa-Cárdenas, J.D. and Aguilar, G.R. 1997. El origen del Maíz. *Avance y perspectiva* 16:91-98.
- Figueroa-Cárdenas, J.D., Acero-Godínez, M.G., Quezada-Tristán, T., Rebollar Figueroa-Cárdenas, J.D., Serrano, E. 2004. Effect of nutritionally fortified tortillas on growth and physical development in the pig. *Nutr. Res.* 25: 711-716.
- Figueroa-Cárdenas, J.D., Rodríguez-Chong, A., and Vélez-Medina, J.J. 2006. Proceso ecológico de nixtamalización para la producción de harinas masas y tortillas integrales. Mexican Patent PA/a/2005/011797.
- Fishman, W.H., Springer, B., Brunetti, R. 1948. Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood. *J. Biol. Chem.* 173:449.
- Fortificación de la tortilla. Figueroa-Cárdenas, J.D. [www.maiztortilla.com](http://www.maiztortilla.com). Consulta mayo 2013.
- Freeman, H.J. 1986. Effects of differing purified cellulose, pectin, and hemicellulose fiber diets on fecal enzymes in 1,2-Dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 46:5529-5532.
- Glauert, H.P. and Bennink, M.R. 1983. Metabolism of 1,2-dimethylhydrazine by cultured rat colon epithelial cells. *Nutr. Cancer.* 5:78-86.

- Gregoire, R.C., Stern, H.S., Yeung, K.S., Stadler, J., Langley, S., Furrer, R., Bruce, W.R. 1989. Effect of calcium supplementation on mucosal cell proliferation in high risk patients for colon cancer. *Gut*. 30:376-382.
- Guyton, A., Hall, J.E. 2001. Tratado de fisiología médica. 10a. Ed., McGrawHill Interamericana. p 883. España.
- Harlan, Curvas de crecimiento de ratas cepa Sprague Dawley (SD). [http://www.harlan.com/products\\_and\\_services/research\\_models\\_and\\_services/research\\_models/sprague\\_dawley\\_outbred\\_rat.html](http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models/sprague_dawley_outbred_rat.html). Consultado mayo de 2013.
- Herrera-Gómez, A., Garza- Salazar, J.G., Granados-García, M., 2010. Cáncer. En: Manual de oncología. Procedimientos médico quirúrgicos. 4a. Ed. Granados-García, M., Herrera-Gómez, A. (Eds.) McGrawHill. p 1. DF., México
- Herrera-Montalvo, L.A., Andonegui, M.A., 2010. Carcinogénesis. En: Manual de oncología. Procedimientos médico quirúrgicos. 4a. Ed. Granados-García, M., Herrera-Gómez, A., (Eds.) McGrawHill. p 21. DF., México.
- Hijová, E., Bomba, A., Bertková, I., Strojní, L., Szabadosová, V., Šoltésová, A. 2012. Prebiotics and bioactive natural substances induce changes of composition and metabolic activities of the colonic microflora in cancerous rats. *Acta Biochim Pol.* 59:271-274.
- Illescas, R. 1943. La teoría química de la formación del nixtamal. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 4:129-132.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). Disponible en [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). Consultado en febrero 2014.
- Jackson, D.S., Rooney, L.W., Kuncze, O.R., Waniska, R.D. 1988. Alkaline processing properties of stress cracked and broken corn (*Zea mays* L.). *Cereal Chem.* 60:509-514.
- Jadhav, A.P., Kareparamban, J.A., Nikam, P.H., Kada, V.J. 2012. Spectrophotometric estimation of ferulic acid from ferula asafetida by Folin-Ciocalteu's reagent. *Der Pharmacia Sinica*, 3(6):680-684.
- Jacobs, L.R. and Lupton, J.R. 1986. Relationship between colonic luminal pH, cell proliferation, and colon carcinogenesis in 1,2-Dimethylhydrazine treated rats fed high fiber diets. *Cancer Res.* 46:1727-1734.
- Jia, X.D., Han, C.H. 2000. Chemoprevention of tea on colorectal cáncer induced by dimethylhydrazine in wistar rats. *Word J. Gastroenterol.* 6:699-703.
- Jingushi, E., Takahashi-yanaga, F., Yoshihara, T., Shiraishi, F., Watanabe, Y., Hirata, M., Morimoto, S. 2011. DIF-1 inhibits the Wnt/b-catenin signaling

pathway by inhibiting TCF7L2 expression in colon cancer cell lines. *Biochem. Pharma.* 83:47-57.

Jones, PJ., MacDougall, DE., Ntanios, F., Vanstone, CA. 1997. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:217-227

Kakino, M., Tazawa, S., Maruyama, H., Tsuruma, K., Araki, Y., Shimazawa, M., Hara, H. 2010. Laxative effects of agarwood on low-fiber diet-induced constipation in rats. *BMC Complement Altern. Med.* 15:10-68

Kawabata, K., Yamamoto, T., Hara, A., Shimizu, M., Yamada, Y., Matsunaga, K., Tanaka, T., Mori, H. 2000. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Lett.* 157: 15-21.

Kim, E., Coelho, D., Blachier, F. 2013. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutr. Res.* 12:983-994.

Klaassen, C.D. 2007. Cassarett and Doull's Toxicology: The basic science of poison. Capítulo 8. Chemical Carcinogens, 8a. Ed. Klaunig J. and Kamendulis L. (Eds.) McGrawHill. p 329. New York.

Le Leu, R.K., Hu, Y., Brown, I.L., Young, G.P. 2009. Effect of high amylase maize starches on colonic fermentation and apoptotic response to DNA-damage in the colon of rats. *Nutr. Metab. (Lond)*. 7:6-11.

London, F.J., Clapp, N.K., Henke, M.A. 1981. Effects of dietary bran and the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine on faecal  $\beta$ -glucuronidase activity in mice. *Food Cos. Toxicol.* 19:707-711.

Manning, T.S. and Gibson, G.R. 2004. Microbial-gut interaction in health and disease. *Prebiotics Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18:287-298.

Manoj, G., Thampi, B.S., Leelamma, S., Menon, P.V. 2001. Effect of dietary fiber on the activity of intestinal and fecal beta-glucuronidase activity during 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Plant Foods Hum. Nutr.* 56:13-21.

Mattos-Arruda, L., Dienstmann, R., Tabernero, J. 2011. Development of molecular biomarkers in individualized treatment of colorectal cancer. *Int. J. Colorectal.* 10:279-289

Maya-Cortés, D.C., Figueroa-Cárdenas, J.D., Garnica-Romo, M.G., Cuevas-Villanueva, R.A., Cortés-Martínez, R., Vélez-Medina, J.J., Martínez-Flores, H.E. 2010. Whole-grain corn tortilla prepared using an ecological nixtamalisation process and its impact on the nutritional value. *Int. J. Food Tech.* 43:23-28.

- McIntyre, A., Gibson, P.R., Young, G.P. 1993. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. Gut. 34:386-391.
- Menchu, M.T., Lara, M.Y., Flores, M. 1973. Efecto del nivel socioeconómico de la familia sobre la dieta del niño pre-escolar. Arch. Latinoam. Nutr. 23:305-323.
- Méndez-Albores, A., Martínez-Morquecho, R.A., Moreno-Martínez, E., Vázquez-Durán, A. 2012. Technological properties of maize tortillas produced by microwave nixtamalization with variable alkalinity. Afr. J. Biotechnol. 11:15178-15187.
- Mendoza-Díaz, S., Ortiz-Valerio., MDC., Castaño-Tostado, E., Figueroa-Cárdenas, JDD., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G. 2012. Antioxidant capacity and Antimutagenic Activity of Anthocyanin and Carotenoid Extracts from Nixtamalized Pigmented Creole Maize Races (*Zea Maiz L.*) Plant Foods Hum. Nutr. 67:442-449.
- Moore, K. and Dalley, A. 2005. Anatomía con orientación clínica. 4a. Ed., Editorial médica Panamericana. p 253. Madrid, España.
- Moore, W.E. and Moore, L.H. 1995. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. Appl. Environ. Microbiol. 61:3202-3207.
- Mora-Escobedo, R., Osorio-Díaz., García-Rernández-Unzón, H. osas M.I., Bello-Pérez, A., H.2009. Cambios en nutrientes seleccionados y microestructura del maíz mejorado “Costeño” y el maíz común durante la preparación y el almacenamiento de tortillas. J.Food Sci. Tech. Int. 10:79-85.
- Mora-Rochin, S., Gutiérrez-Uribe, J.A., Serna-Saldivar, S.O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J.M. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. Cereal Sci. 52:502-508.
- Muñoz, M., Ledesma, J.A., Chávez, A., Pérez-Gil, F., Mendoza, E., Castañeda, J., Calvo, C., Castro, I., Sánchez, C., Avila,, A. 2002. Tablas de valor nutritivo de alimentos. Edición internacional. MacGrawHill Interamericana. p 38. México, DF.
- Muszyński, J., Jóźwicka, E., Szadkowski, A., Stepka, M. 1990. Glucose tolerance disorders in patients with cancer of the colon. Pol. Tyg. Lek. 45:1005-1007.
- Nakanishi, S., K. Kataoka, T. Kuwahara, and Y. Ohnishi. 2003. Effects of high amylosa maize starch and clostridium butyricum on metabolism in colonic microbiota and formation of Azoymethane induced aberrant crypt foci in the rat colon. Microbiol Immunol. 47:951-958.
- Nava. G.M., Friedrichsen, H.J, Stappenbeck, T.S. 2011. Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. ISME J. 5: 627-638.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx). Consultado mayo 2013.

Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx). Consultado mayo 2013.

Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx). Consultado diciembre 2013.

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx). Consultado mayo 2013.

Ohashi, Y., Harada, K., Tokunaga, M., Ishihara, N., Okubo, T., Ogasawara, Y., Raj-Juneja, L., Fujisawa, T. 2012. Faecal fermentation of partially hydrolyzed guar gum. *J. Funct. Foods.*, 4:398-402.

Ortega, E.I., Villegas, E., Vasal, S.K. 1986. A comparative study of protein changes in normal and quality protein maize during tortilla making. *Cereal Chem.* 63:446-451.

Ortiz, A.P., Thompson, C.L., Chak, A., Berger, N.A., Li, L. 2012. Insulin resistance, central obesity, and risk of colorectal adenomas. *Cancer.* 118:1774-1781.

Palacios-Fonseca, A.J., Vázquez-Ramos, C., Rodríguez-García, M.E., 2009. Physicochemical characterizing of industrial and traditional nixtamalized corn flours. *J. Food Eng.* 93:45-51.

Panlasigui, L.N., Bayaga, C.L., Barrios, E.B., Cochon, K.L. 2010. Glycaemic response to quality protein maize grits. *J. Nutr. Metab.* Article ID 687842, 6 pages. doi:10.1155/2010/697842

Paredes-López, O. and Saharapulus, M.E. 1983. Maize. A review of tortilla production technology. *Baker Digest.* 13:16-25.

Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., Bello-Pérez, L.A. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Capítulo 2. Fondo de Cultura Económica. p 16. DF., México.

Pedreschi, R. and Cisneros-Zerall, L. 2006. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fraction from Andean purple corn (*Zea mays L.*) *J. Agric. Chem.* 4:4557-4557.

Pereira, M.A., Jacobs, D.R., Pins, J.J., Raatz, S.K., Gross, M.D., Slavin, J.L., Seaquist, E.R. 2002. Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 75:848-55

Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México, 2011. Secretaría de Salud (SSA). Subsecretaría de prevención y promoción de la salud. Dirección general de epidemiología. [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx). Consultado mayo 2013.

Persé, M. and Cerar, A. 2011. Morphological and molecular alterations in 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed. Biotechnol.* doi: 473964

Pflugfelder, R.I., Rooney, L.W., Waniska, R.D. 1988. Fractionation and composition of commercial corn masa. *Cereal Chem.* 65:262-266.

Piñols, C. 1995. Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-Dimetilhidracina. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias. Universidad de Lleida. Barcelona, España. 31-50, 86-95.

Radika, M.K., Viswanathan, P., Anuradha, C.V. 2013. Nitric oxide mediates the insulin effects of  $\beta$ -sitoesterol in high fat diet fed rats. *Nitric Oxide*. 32:43-53.

Raicht, R.F., Cohen, B.I., Fazzini, E.P., Sarwal, A.N., Takahashi, M. 1980. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res.* 40:403-405.

Ramos-Gomez, M., Fernández Correa J., Hernández Rivera E., Arvizu Espinosa MG, Mendoza-Díaz S, Reynoso-Camacho R, Loarca-Piña MGF, Gallegos-Corona MA. 2011. Efecto de plantas comestibles mexicanas sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas Sprague-Dawley. *CIENCIA@UAQ*. 4(2), 56-69.

Reinhold, J.G. and García, J.S. 1979. Fiber of the maize tortilla. *Amer. J. Clin. Nut.* 32:1326-1329.

Reynoso-Camacho, R., González-Jasso, E., Ferriz-Martínez, R., Villalón-Corona, B., Loarca-Piña, G.F., Salgado, L.M., Ramos-Gomez, M. 2011. Dietary supplementation of lutein reduces colon cancer in DMH-treated rats by modulating K-ras, PKB, and  $\beta$ -catenin proteins. *Nutr. Cancer*. 63:39-45.

Riddell, R.H., Goldman, H., Ransohoff, D.F., Appelman, H.D., Fenoglio, C.M., Haggitt, R.C., Ahren, C., Correa, P., Hamilton, S.R., Morson, B.C. 1983. Dysplasia inflammatory bowel disease: standarized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol.* 14:931-968.

Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., Palva, A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of

- pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J.Appl. Microbiol.* 97:1166-1177.
- Rodríguez-Méndez, L.I., Figueroa, J.D.C., Ramos-Gómez, M., Méndez-Lagunas, L. 2013. Nutraceutical Properties of flour and Tortillas Made with and Ecological Nixtamalization Process. *J. Food Sci.* 78:1529-1534.
- Rodriguez, M.E., Yañez-Limon, M., Alvarado-Gil, J.J., Vargass, H., Sanchez-Sinecnio, F., Figueroa, J.D.C., Martinez-Bustos, F., Martinez-Montes, J.L., Gozalez-Hernandez, J., Silva, M.D., Miranda, L.C. 1996. Influence of the structural changes during alkaline cooking on the thermal, rheological, and dielectric properties of corn tortillas. *Cereal Chem.* 75:593-60.
- Rooney, L.W., and Serna-Saldivar, S.O. 2003. Food uses of whole corn and dry milled fractions. Chapter 13. In: *Corn Chemistry and Technology*, 2a Ed., White, P., and Johnson, L. (Eds.) American Association of Cereal Chemist. p 495. St. Paul, MN, EUA.
- Saeed, F., Pasha, I., Anjum, F.M., Sultan, M.T. 2011. Arabinoxylans and arabinogalactans: a comprehensive treatise. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51:467-476.
- Salmeron, J., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C. 1997. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent mellitus in women. *JAMA*, 277: 472-477.
- Samelson, S.L., Nelson, R.L., Nyhus, L.M. 1985. Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogenesis. *J. R. Soc. Med.* 78:230-233.
- Sánchez-Ibarra, C. 2012. Comparación de la composición química y la capacidad antioxidante de harinas comerciales de maíz nixtamalizadas y evaluación de su potencial quimioprotector sobre el estadio temprano de cáncer de colon. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAQ. Querétaro, México.
- Sanderson, J.J., Wall, S., Donaldson, G.L., Gavine, J.F. 1978. Effect of alkaline processing of corn on its amino acids. *Cereal Chem.* 55:204-2013.
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: result with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.* 519: 103-119.
- Saura-Calixto F, Goñi I, Bravo L, Mañas E. 1993. Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *J Food Sci* 58:642-643.
- Saura Calixto F, Serrano J, Goñi I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem* 101:492-501.
- Serna-Saldivar, S.O., and Amaya-Guerra, C.A. 2008. El papel de la tortilla nixtamalizada en la nutrición y alimentación. En: *Nixtamalización del maíz a*

- la tortilla. Aspectos nutrimentales y toxicológicos. Rodríguez-García, M.E., Serna-Saldivar, S.O., Sánchez-Sinencio, F., Eds. Universidad Autónoma de Querétaro. p 105. Querétaro, México.
- Servicio de Información Agrolimentaria y Pesquera. 2011. [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). Consultado febrero 2014.
- Setchell, K.D.R., and Aedin, C. 1999. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* 3:758-767.
- Shiga, T.M., Lajolo, F.M., Filisetti, T.M.C.C. 2003. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Cienc Tecnol Aliment* 23:141-148.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. 2013. Cancer Statistics. *CA. cancer J. Clin.* 63:11-30.
- Simons, C.C., Schouten, L.J., Weijenberg, M.P., Goldbohm, R.A., Van-Den-Brandt, P.A. 2010. Bowel movement and constipation frequencies and the risk of colorectal cancer among men in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am. J. Epidemiol.* 12: 1404-1414.
- Singleton V.L. and Rossi JA Jr. 1965. Colorumetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic and reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
- Song, Y.J., Sawamura, M., Ikeda, K., Igawa, S., Ramori, Y. 2000. Soluble dietary fibre improves insulin sensitivity by increasing muscle Glut-4 content in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27:41-45.
- Tanaka, T. 2009. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog.* 8:5.
- Takahashi-Monroy, T., García-Osogobio, S., 2006. Cáncer de colon y recto. En: *Fisiopatología quirúrgica del aparato digestivo*. 3a. Ed. Gutiérrez-Samperio, C., Arrubarrena-Aragón, V. M., Campos-Campos, S.F. (Eds.) *Manual Moderno*. p 347. DF. México.
- Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M. 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 138:2101-2114.
- The scientific association dedicated to analytical excellence. 1990. [www.aoac.org](http://www.aoac.org). Consultado mayo 2013.
- Todesco, T., Rao, A.V., Bosello, O., Jenkins, D. 1991. Propionate lowers blood glucose and alters lipid metabolism in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:860-865.
- Torroella-Kourí, M., Villa-Treviño, S. 1998. *Bases genéticas del cáncer*. Fondo de Cultura Económica. p 11. D.F., México.

- Trautvetter, U., Ditscheid, B., Kiehntopf, M., Jahreis, G. 2012. A combination of calcium phosphate and probiotics beneficially influences intestinal lactobacilli and cholesterolmetabolism in humans. *Clin. Nutr.* 31:230-237.
- Truant, S., Gouyer, V.P., Leteurtre, E.A., Zerimech, F., Huet, G., Pruvot, F.R. 2007. E-Cadherin and b-catenin mRNA levels throughout colon cancer progression. *J. Surg. Res.* 150:212-218.
- Tze, W.J., Tai, J., Murase, N., Tzakis, A., Starzl, T.E., 1991. Effect of FK on glucose metabolism and insulin secretion in normal rats. *Transplant Proc.* 23:3158-3160.
- Uneyama, C., Shibutani, M., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M. 2002. Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected, paraffin-embedded tissue specimens. *J. Histochem Cytochem.* 50:1237-1245.
- Van Dam, R.M., Rimm, e.b., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Hu, F.B. 2002. Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in US men. *Ann. Intern. Med.*, 136: 201-209.
- Vergara-Castañeda, H.A., Guevara-González, R.G., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, H., Feregrino-Pérez, A.A., Oomah, B.D., Loarca-Piña, G. 2010. Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food Funct.* 1:294-300.
- Verghese, M., Rao, DR., Chawan, CB., Williams, LL., Shackelford, L. 2002. Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colon tumors at the promotion stage in young Fisher 344 rats. *J Nutr.* 132:2809-2813.
- Verna, A. and Shukla, G., 2013. Administration of prebiotic inulin suppresses 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride induced procarcinogenic biomarkers fecal enzymes and preneoplastic lesions in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *J. Funct. Food.* 5: 991-996.
- Viñas-Salas, J., Biendicho-Palau, P., Piñol-Felis, C., Miquelsanz-García, S., Perez-Holanda, S. 1998. Calcium inhibits colon carcinogenesis in an experimental model in the rat. *Eur. J. Cancer* 12:1941-1945.
- Visek, W.J., Clinton, S.K., Imrey, P.B., Thrusht, D.R., Truex, C.R., Alster, J.M., Anderson, P.A., Mabry, F.J., Nandkumar, S., Simon, J. 1991. Dietary protein and chronic toxicity of 1,2-dimethylhydrazine fed to mice. *J. Toxicol. Environ. Health.* 32:383-413.
- Vogel, B., Gallaher, D.D., Bunzel, M. 2012. Influence of cross-linked arabinoxylans on the postprandial blood glucose response in rats. *J. Agric. Food Chem.* 60:3847-3852.

- Wachtershauser, A. and Stein, J. 2000. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur. J. Nutr.* 39:164-171.
- Xu, L., Xu, G., Liu, T., Chen, Y., Gong, H. 2013. The comparison of rheological properties of aqueous welan gum and xanthan gum solutions. *Carbohydr. Polym.* 92:516-522.
- Ziegler, R.G. 1989. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J. Nutr.* 119:116-122.
- Zilic, S., Sepen, A., Akillioglu, G., Gokhan, U., Vanetovic, J. 2012. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays L.*) kernels. *J. Agric. Food Chem.* 60:1224-1231
- Zoran, D.L., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., Chapkin, R.S., Lupton, J.R. 1997. Diet and carcinogen alter luminal butyrate concentration and intracellular pH in isolated rat colonocytes. *Nutr. Cancer.* 27:222-230.

## X. ANEXOS

### 10.1. Aditivos autorizados por la NOM-187-SSA1/SCFI-2002

Cuadro A1. Uso de aditivos para la tortilla de maíz a granel

Nombre	Límite máximo (mg/kg)
Alginato de calcio	BPF
Almidón acetilado	BPF
Almidón oxidado	BPF
Beta-apo-8-carotenal	30
Carboximetilcelulosa de sodio	BPF
Carragenato de calcio	BPF
Carragenato de potasio	BPF
Carragenato de sodio	BPF
Carrageninas	BPF
Cúrcuma <sup>1</sup>	BPF
Dióxido de titanio	BPF
Estearoil-2-lactilato de calcio	1600
Estearoil-2-lactilato de sodio	1600
Ésteres de glicerol y ácidos grasos del ácido diacetil tartárico	4000
Ésteres de poliglicol y ácidos grasos	2000
Goma arábiga	BPF
Goma guar	BPF
Goma xantano	BPF
Hidroxipropilmelcelulosa	BPF
Mono y diglicéridos	BPF
Pectinas	BPF

<sup>1</sup> Sólo para estandarizar el color cuando se agregue como ingrediente chiles.  
BPF: Buenas prácticas de fabricación.

Cuadro A2. Uso de aditivos para la harina de tortilla de maíz o tortilla pre-empacada establecidos por la NOM-187-SSA1/SCFI-2002

Nombre	Límite máximo (mg/kg)	Observaciones
Ácido acético glacial	BPF	
Ácido ascórbico	BPF	
Ácido benzoico <sup>1</sup>	2000	En harinas de maíz nixtamalizado
	1000	En tortillas
Ácido cítrico	BPF	
Ácido D-L-tartárico	BPF	
Ácido fosfórico	BPF	
Ácido fumárico	BPF	
Ácido láctico	BPF	
Ácido málico	BPF	
Ácido propiónico <sup>1</sup>	BPF	
Ácido sóblico <sup>1</sup>	3300	En harinas de maíz nixtamalizado
	2000	En tortillas
Alginato de calcio	BPF	
Almidón acetilado	BPF	
Almidón oxidado	BPF	
Amarillo ocaso FCF <sup>2</sup>	200	En tortillas
Azul brillante FCF <sup>2,3</sup>	250	Sólo en tortillas
Benzoato de sodio <sup>1</sup>	2000	En harinas de maíz nixtamalizado
	1000	En tortillas
Beta-apo-8-carotenal	30	En tortillas
Beta-caroteno sintético	30	En tortillas
Carboximetilcelulosa de sodio	BPF	
Carragenato de calcio	BPF	

Carragenato de potasio	BPF	
Carragenato de sodio	BPF	
Carrageninas	BPF	
Celulosa microcristalina	BPF	
Citrato tripotásico	BPF	
Citrato trisódico	BPF	
Color caramelo clase I	BPF	
Color caramelo clase II	3200	En tortillas
Color caramelo clase III y IV	4000	En tortillas
Cúrcuma	BPF	
Dióxido de titanio	BPF	
Estearoil-2-lactilato de calcio	2000	
Estearoil-2-lactilato de sodio	2000	
Ésteres de glicerol y ácidosgrasos del ácido diacetil tartárico	4000	
Ésteres de poliglicol y ácidos grados <sup>1</sup>	2000	
Etil maltol	40	Sólo en tortillas
Extracto de innato	20	
Fosfato de calcio hidrogenado	5600	Sólo en tortillas
Glicerol	BPF	Sólo en tortillas
Goma arábiga	BPF	
Goma guar	BPF	
Goma xantano	BPF	
Hidroxipropilmethylcelulosa	BPF	
Indigotina <sup>2,3</sup>	30	En tortillas
Lactato de calcio	BPF	
Lactato de sodio	BPF	
Lecitina	BPF	

Metabisulfito de sodio	70	En tortillas
Metil <i>p</i> -hidroxibenzoato <sup>1</sup>	2000	En harinas de maíz nixtamalizado
	1000	En tortillas de maíz nixtamalizado
Mono y diglicéridos	BPF	
Monoestearato de sorbitánpolioxietileno <sup>4</sup>	2000	
Oleoresina de paprika	BPF	
Óxido de calcio	BPF	
Pectinas	BPF	
Ponceau 4R <sup>2</sup>	320	En tortillas
Propil <i>p</i> -hidroxibenzoato <sup>1</sup>	2000	En harinas de maíz nixtamalizado
	1000	En tortillas
Propionato de calcio	BPF	
Propionato de sodio	BPF	
Rojo allura AC	50	
Sorbato de potasio	2000	En tortillas
Sorbitol	120 g/kg	Sólo en tortillas
Tartrazina <sup>2</sup>	600	En tortillas
Triestearato de sorbitánpolioxietileno <sup>4</sup>	2000	

<sup>1</sup> Solo o combinado con otros conservadores permitidos.

<sup>2</sup> Cuando se use una mezcla de colorantes artificiales, la suma de éstos no debe exceder de 500 mg/kg de producto.

<sup>3</sup> Sólo para efectos de estandarizar el color del maíz azul que se emplee para elaborar tortillas.

<sup>4</sup> Cuando se utilicen mezclas de monoestearato de sorbitán y triestearato de sorbitán polioxietileno, la suma de éstos no debe exceder de 1%.

## 10.2. Curva de calibración de fenoles

### 10.2.1. Soluciones para la determinación de fenoles.

- 1.- Reactivo Folin Ciocalteu
- 2.- Carbonato de sodio al 20%
- 3.- Solución estándar de ácido ferúlico (10 mg de ácido ferúlico y aforar con 10 mL de metanol, realizar una segunda dilución tomando 1 mL de la solución y aforarlo con 10 mL de metanol).

Cuadro A3. Curva de calibración de ácido ferúlico

Tubo	Solución de ácido ferúlico ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	Reactivos de folin ( $\mu\text{L}$ )	Carbonato de sodio 20% ( $\mu\text{L}$ )
1	0	500	250	1250
2	20	480	250	1250
3	40	460	250	1250
4	60	440	250	1250
5	80	420	250	1250
6	100	4200	250	1250
7	120	380	250	1250
8	140	360	250	1250
9	160	340	250	1250

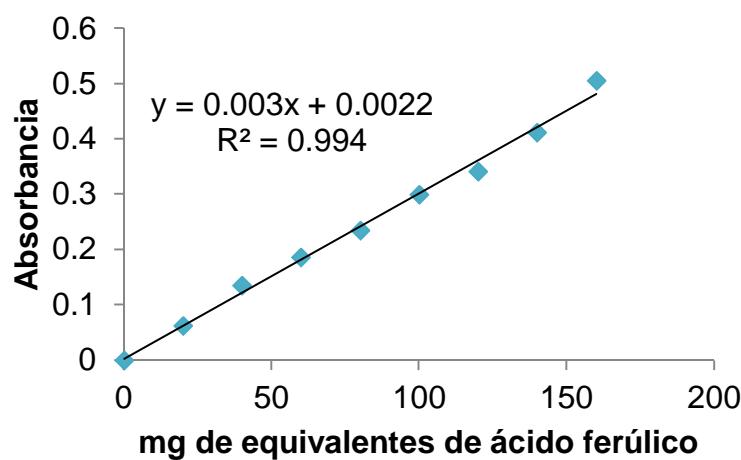


Figura A1. Curva de calibración de ácido ferúlico para la cuantificación de polifenooles libres

### 10.3. Curvas de crecimiento de ratas SD reportadas por Harlan

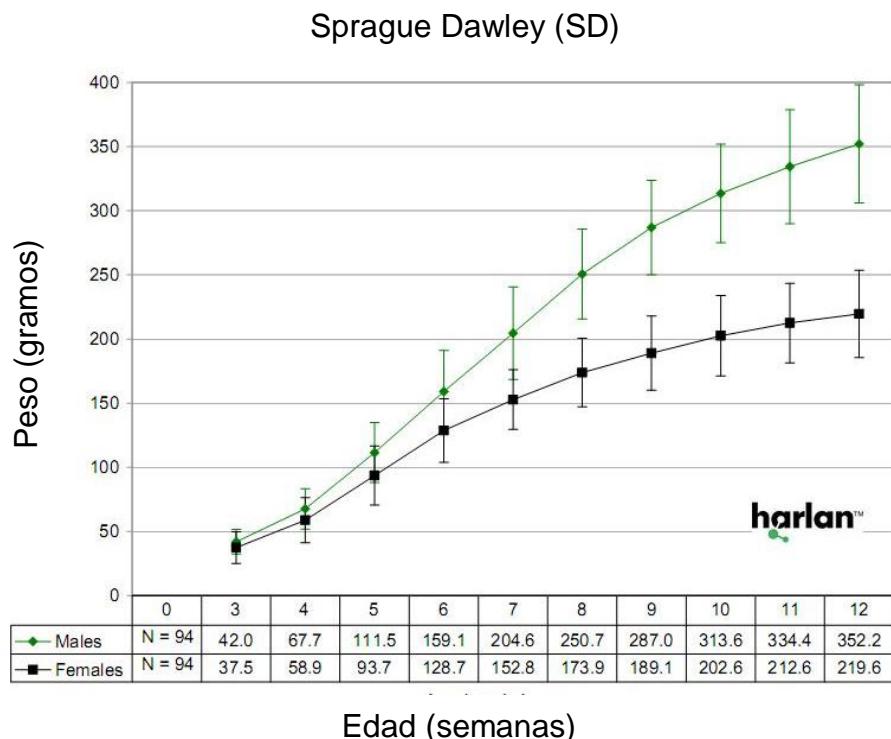


Figura A2. Curva de crecimiento de ratas Sprague- Dawley

### 10.4. Curva de calibración de fenolftaleína

#### 10.4.1. Reactivos para la curva de calibración de fenolftaleína

- 1.- PBS 0.02 M
- 2.- Glicina alcalina
- 3.- Fenolftaleína (260 mg/mL)

Cuadro A4. Curva de calibración de fenolftaleína

Tubo	Solución stock de fenolftaleína ( $\mu$ L)	PBS ( $\mu$ L)	Glicina alcalina ( $\mu$ L)	Agua ( $\mu$ L)
1	0	50	125	125
2	5.77	44.2	125	125
3	11.5	38.5	125	125
4	17.3	32.5	125	125
5	23.1	26.9	125	125

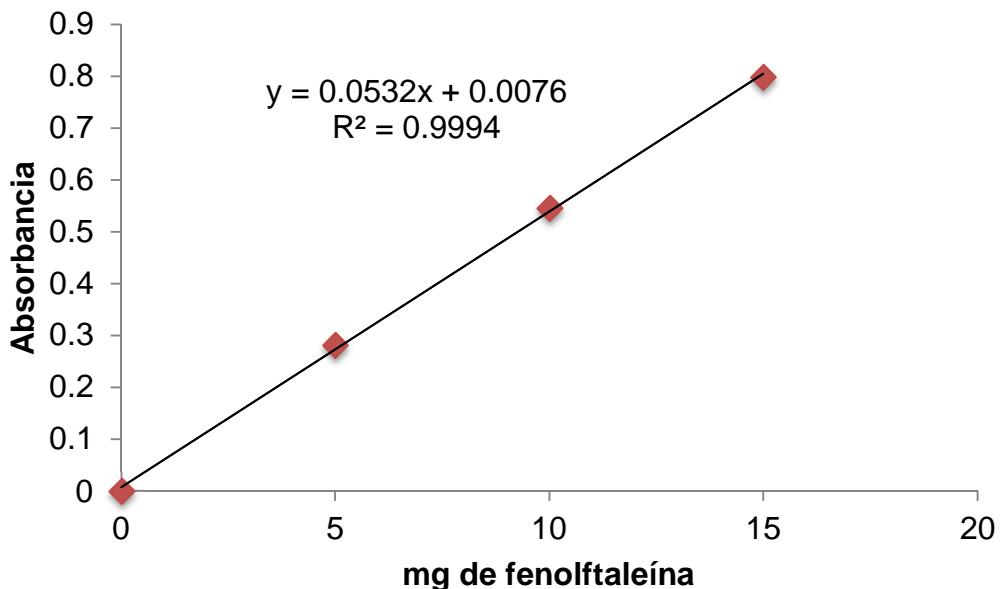


Figura A3. Curva de calibración de fenolftaleína para la determinación de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa.

### Análisis de correlación de Pearson

Los análisis se muestran con el siguiente formato:

Coeficiente de correlación

Valor de  $p$

Número de muestras

$p < 0.050$  Correlación estadísticamente significativa. Coeficiente de variación positiva, ambas variables incrementan. Coeficiente de variación negativa, una variable aumenta y la otra disminuye.

Cuadro A4. Análisis de correlación de Pearson

	<b>Calcio</b>	<b>Humedad</b>	<b>Carbohidratos</b>	<b>Fibra total</b>	<b>Fenoles</b>	<b>Fibra sol.</b>	<b>Fibra inso.</b>	<b>AUC 1</b>	<b>AUC 2</b>	<b>Incidencia</b>	<b>̄ adeno</b>
<b>Cenizas</b>	0.83	-0.61	0.66	0.23	-0.81	-0.02	0.25	-0.22	-0.35	0.86	0.37
	0.01	0.02	0.01	0.52	0.00	0.95	0.49	0.44	0.36	0.06	0.54
	9.00	15.00	15.00	10.00	15.00	10.00	10.00	15.00	9.00	5.00	5.00
<b>Calcio</b>		-0.64	0.70	0.31	-0.91	-0.69	0.40	-0.32	-0.32	0.95	0.42
		0.06	0.04	0.55	0.00	0.13	0.44	0.41	0.41	0.19	0.73
		9.00	9.00	6.00	9.00	6.00	6.00	9.00	9.00	3.00	3.00
<b>Humedad</b>			-0.99	-0.91	0.90	-0.30	-0.92	0.40	0.70	-0.82	-0.60
			0.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.14	0.04	0.09	0.29
			15.00	10.00	15.00	10.00	10.00	15.00	9.00	5.00	5.00
<b>Carbohidratos</b>				0.87	-0.93	0.24	0.88	-0.41	-0.70	0.85	0.59
				0.00	0.00	0.50	0.00	0.13	0.04	0.07	0.29
				10.00	15.00	10.00	10.00	15.00	9.00	5.00	5.00
<b>Fibra total</b>					-0.63	0.44	1.00	-0.43	-0.72	-0.01	0.16
					0.05	0.20	0.00	0.17	0.04	0.99	0.77
					10.00	10.00	10.00	12.00	8.00	6.00	6.00
<b>Fenoles</b>						0.05	-0.66	0.36	0.55	-0.91	-0.51
						0.88	0.04	0.19	0.12	0.03	0.38
						10.00	10.00	15.00	9.00	5.00	5.00
<b>Fibra sol.</b>							0.36	-0.17	-0.19	0.03	0.02
							0.31	0.63	0.72	0.97	0.98
							10.00	10.00	6.00	5.00	5.00
<b>Fibra inso.</b>								-0.04	-0.69	0.68	0.45
								0.90	0.13	0.20	0.45
								10.00	6.00	5.00	5.00
<b>AUC 1</b>									0.59	0.03	-0.33

	Calcio	Humedad	Carbohidratos	Fibra total	Fenoles	Fibra sol.	Fibra inso.	AUC 1	AUC 2	Incidencia	̄x adeno
<b>AUC 1</b>								0.00		0.95	0.52
								24.00		6.00	6.00
<b>AUC 2</b>										0.51	0.16
										0.49	0.84
										4.00	4.00
<b>Incidencia</b>											0.47
											0.34
											6.00

	Multiplicidad	Peso heces	β-Glucosidasa Fecal	β-Glucosidasa cc	β-Glucosidasa cecal	pH fecal	pH cc	pH cecal
<b>Cenizas</b>	-0.92	0.00	0.34	-0.09	0.02	0.51	0.18	-0.15
	0.03	1.00	0.26	0.80	0.95	0.06	0.52	0.60
	5.00	15.00	13.00	10.00	13.00	14.00	15.00	14.00
<b>Calcio</b>	-0.99	0.02	0.20	0.10	-0.69	0.82	0.16	-0.26
	0.07	0.95	0.66	0.86	0.09	0.01	0.67	0.53
	3.00	9.00	7.00	6.00	7.00	8.00	9.00	8.00
<b>Humedad</b>	0.75	0.05	-0.16	-0.30	0.53	-0.62	-0.59	0.31
	0.14	0.85	0.61	0.40	0.06	0.02	0.02	0.29
	5.00	15.00	13.00	10.00	13.00	14.00	15.00	14.00
<b>Carbohidratos</b>	-0.81	-0.05	0.20	0.29	-0.47	0.67	0.55	-0.32
	0.10	0.87	0.52	0.42	0.10	0.01	0.03	0.27
	5.00	15.00	13.00	10.00	13.00	14.00	15.00	14.00
<b>Fibra total</b>	-0.15	-0.01	0.11	0.08	-0.58	0.34	0.49	-0.32

	Multiplicidad	Peso heces	β-Glucosidase Fecal	β-Glucosidase cc	β-Glucosidase cecal	pH fecal	pH cc	pH cecal
	0.78	0.99	0.75	0.81	0.08	0.28	0.11	0.32
	6.00	12.00	11.00	11.00	10.00	12.00	12.00	12.00
<b>Fenoles</b>	0.93	-0.02	-0.25	-0.05	0.28	-0.74	-0.43	0.28
	0.02	0.94	0.41	0.89	0.35	0.00	0.11	0.33
	5.00	15.00	13.00	10.00	13.00	14.00	15.00	14.00
<b>Fibra sol.</b>	0.02	-0.12	0.32	0.40	-0.10	-0.21	0.48	0.04
	0.97	0.74	0.37	0.28	0.80	0.56	0.17	0.90
	5.00	10.00	10.00	9.00	9.00	10.00	10.00	10.00
<b>Fibra inso.</b>	-0.56	-0.10	0.04	0.60	-0.68	0.55	0.48	-0.13
	0.32	0.78	0.92	0.09	0.05	0.10	0.16	0.73
	5.00	10.00	10.00	9.00	9.00	10.00	10.00	10.00
<b>AUC 1</b>	-0.06	0.11	-0.14	0.16	0.26	0.04	-0.15	0.12
	0.91	0.68	0.47	0.43	0.17	0.83	0.39	0.50
	6.00	18.00	29.00	26.00	30.00	33.00	36.00	33.00
<b>AUC 2</b>	-0.31	-0.31	-0.30	-0.01	0.25	-0.15	-0.34	0.57
	0.69	0.33	0.22	0.98	0.31	0.50	0.11	0.01
	4.00	12.00	18.00	17.00	19.00	22.00	24.00	21.00
<b>Incidencia</b>	-0.93	-0.57	0.12	0.47	-0.41	0.15	-0.27	0.05
	0.01	0.23	0.83	0.35	0.42	0.78	0.61	0.92
	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
<b>Σ adeno</b>	-0.32	-0.86	0.80	0.71	-0.48	-0.13	-0.12	-0.55
	0.54	0.03	0.06	0.11	0.34	0.80	0.83	0.26
	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
<b>Multiplicidad</b>		0.37	-0.06	-0.21	0.26	-0.41	0.42	0.11
		0.47	0.91	0.69	0.61	0.42	0.41	0.84

