



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

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

“Caracterización y evaluación del potencial antiinflamatorio de la fracción no digerible de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido”.

TESIS

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

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Iván Andrés Luzardo Ocampo

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Santiago de Querétaro, Qro., octubre, 2016



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

“Caracterización y evaluación del potencial antiinflamatorio de la fracción no digerible de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.)nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido”.

TESIS

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

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Iván Andrés Luzardo Ocampo

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

SINODALES:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente

Dra. Marcela Gaytán Martínez

Secretario

Dr. Ricardo Ernesto Preciado Ortiz

Vocal

Dra. Rocío Campos Vega

Suplente

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

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

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

RESUMEN

El incremento en el consumo de botanas ha obligado a generar propuestas saludables que permitan no sólo la saciedad sino el aporte de beneficios en la salud, especialmente en la prevención de las Enfermedades No Transmisibles (ENT). El uso de ingredientes de la dieta tradicional mexicana como el maíz y el frijol se perfila como alternativa gracias a sus compuestos bioactivos vinculados a la reducción del efecto de las ENT por su acción sobre inflamación celular, punto de partida de estas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue caracterizar y evaluar el potencial antiinflamatorio de la fracción no digerible (FND) de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido. Para ello, se caracterizaron química y nutracéuticamente las materias primas y la botana horneada y se obtuvo el extracto fermentado de la FND (EFFND) a través de una de digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro*. Los compuestos fenólicos (CF) se liberaron a lo largo del tracto gastrointestinal, variando su bioaccesibilidad y absorción (9 – 19 %), presentando concentraciones en el EFFND de 24 horas (EFFND24) mayores a los demás tiempos de fermentación y mayores valores de capacidad antioxidante (ABTS y DPPH). Los CF y oligosacáridos (OS) que no fueron absorbidos alcanzaron el colon donde fueron fermentados por la microbiota colónica generaron cambios en el pH y produjeron ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (acético, propiónico y butírico) como producto de la actividad fermentativa. El EFFND24 también mostró potencial antiinflamatorio al reducir la producción de óxido nítrico (hasta el 87%) de forma dosis-dependiente en macrófagos RAW 264.7 previamente estimulados con lipopolisacáridos. Estos hallazgos sugieren el uso potencial de botanas de maíz y frijol en la prevención de las ENT gracias a propiedades biológicas en procesos inflamatorios asociados a CF y AGCC.

Palabras Clave: Botanas, inflamación celular, ácidos grasos de cadena corta, compuestos fenólicos.

ABSTRACT

Increasing on world's snack consumption has led to generate healthy proposal that allow not only satiety but also health benefits, especially on non-transmissible diseases (NTD) prevention. Use of Mexican diet traditional ingredients like corn and beans profile has an alternative due their bioactive compounds linked to the reduction of NTD effects by its action over cell inflammation, the origin of many of them. Thus, the objective of this work was to characterize and evaluate the anti-inflammatory potential of the non-digestible fraction (NDF) from an oven-baked nixtamalized corn (*Zea mays* L.) and cooked common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) snack. Briefly, the raw materials and the oven-baked snack was chemical, nutraceutical characterized, and the fermented non-digestible fraction (FNDF) was obtained performing *in vitro* gastrointestinal and *in vitro* colonic fermentation. The phenolic compounds (PC) were released along the gastrointestinal tract, varying its bioaccessibility and absorption (9 – 19 %), where the FNDF of 24 hours (FNDF24) had the higher concentrations of them compared to the other fermentation times, and higher antioxidant capacity values (ABTS and DPPH). The PC and oligosaccharides that were not absorbed reached colon where they were fermented by colonic microbiota, producing pH changes and short-chain fatty acids (SCFA's) (acetic, propionic, butyric) as result of fermentative activity. The FNDF24 also exhibited anti-inflammatory potential by a dose-dependent decreasing of nitric oxide production (87%) on RAW 264.7 macrophages previously stimulated with lipopolysaccharides. These findings suggest the potential use of corn and bean snacks on the prevention of NTD related to biological properties on inflammatory processes associated to PC and SCFA's.

Keywords: Snacks, cell inflammation, short-chain fatty acids, phenolic compounds.

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres, Alma Lucía y Álvaro

A mis abuelos, Jorge Alirio y Belly

A mis hermanas, Ana María y Laura Juliana

A mis tíos, Walter y Adriana

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, pero especialmente a mi madre y hermanas, ya que gracias a ella pude iniciar estos estudios de maestría y me dio la fortaleza emocional para afrontar esta increíble experiencia académica lejos de mi país, Colombia. A mis tíos Walter y Adriana por su apoyo económico, moral y logístico que ha sido clave para continuar con mi formación académica, personal y profesional.

A mis amigos: Alexa Rincón y Alexa Jarro, Diego, Arturo, Laura, Astrid, Liceth, José Fernando, Diana Melo y Diana Amaya, Angélica, Cecilia, Adriana Cariño, Adriana Chico, Laura, Víctor, Luis Miguel, Bruno, Rafael, Karen, Gina, Erick, Javier, Chava, Carlos Duarte y por acompañarme en esta travesía académica, por hacer de mi trabajo y mis días un momento más agradable y por darme compañía en la distancia. Gracias por ser ejemplo de una bonita relación de amistad y unión, y por ser un ejemplo para mí.

A los demás compañeros del Laboratorio de Bioquímica Toxicológica (Sandra, Jonathan, Beatriz, Pablo, Áurea, Nataly, Jonathan, Kenia y Dra. Haydé) por el trabajo en equipo y todos sus aportes y colaboración.

A la Dra. Flavia Loarca por su apoyo constante, guía, ánimo y paciencia para la realización de este trabajo. Sin su paciencia y dedicación nada de esto habría sido posible. Muchas gracias por depositar su confianza en mí y por haberme abierto las puertas a todo este mundo que era nuevo para mí.

A la Dra. Rocío Campos Vega por su dedicación y acompañamiento constante en el trabajo con células. Gracias por su guía.

A la Dra. Sandra Mendoza por su ayuda en la consecución de material y equipamiento y su apoyo durante varias labores de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. A la Dra. Rosalía, Dr. Eduardo Castaño, Dra. Silvia Amaya, Dr. Edmundo Mercado, Dr. Montserrat López, Dr. Sofía Arvizu, Dr. Andrés Cruz, Dra. Estela Barrios y Dr. Sergio Romero por sus conocimientos impartidos durante los diferentes espacios académicos de la maestría realizada.

A la Dra. Marcela Gaytán por sus conocimientos y ayuda en la utilización de equipos, así como el apoyo logístico para la obtención de las materias primas.

Al Dr. Mario Rodríguez por su apoyo moral y acompañamiento durante estos dos años de estudios de maestría, así como su apoyo en la realización de trámites de visa y llegada a este grandioso país.

Al equipo del Laboratorio de Toxicología Molecular: Dra. Minerva Ramos, Luis Alberto, Lilian, Adriana y Diana por su apoyo logístico, el uso de sus instalaciones y equipos y el apoyo académico brindado.

Al equipo del Laboratorio de Nutraceuticos por su apoyo en la consecución de equipos y desarrollo de técnicas: Magaly, Adriana Blanco, Guillermo Aguilar, Cynthia y Guadalupe Aguilar.

Al equipo del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas por su apoyo en la utilización de equipos e instalaciones: Gina, Fanny y Celene.

Al equipo del Laboratorio de Biotecnología por su apoyo en utilización de equipos: Dra. Blanca García Almendárez, Dr. Carlos Regalado, Ángel, Ivana y Víctor.

Al equipo del Laboratorio de Innovación y Desarrollo de Alimentos (IDEA) por los equipos prestados: Adriana, Reyna, Gaby y Manuel.

Al equipo del Laboratorio de Bioquímica Molecular: Dra. Rosalía Reynoso, Diana, Gerardo y Sarahí por todo el apoyo logístico brindado.

A Carmelita, Laurita y Paulina por todo su apoyo y ayuda en documentación y labores administrativas de la Facultad de Química y la UAQ.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por recibirme en sus instalaciones para realizar mis estudios de posgrado y abrirme el campo de la ciencia e investigación mexicana.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto.

A México por recibirme con brazos abiertos y darme la oportunidad de conocer excelentes personas, darme una excelente formación académica y profesional y contribuir a mi bienestar y educación personal.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE CUADROS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. DIETA Y SALUD	3
II.2. MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.).....	4
II.2.1. Generalidades	4
II.2.2. Estructura y composición química.....	4
II.2.3. Compuestos bioactivos	6
II.2.3.1. Compuestos Fenólicos	6
II.2.3.2. Carotenoides	8
II.2.3.3. Antocianinas	9
II.2.3.4. Almidón Resistente	10
II.2.3.5. Saponinas	12
II.2.3.6. Fitosteroles.....	13
II.2.4. Nixtamalización	14
II.3. FRIJOL COMÚN (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	15
II.3.1. Generalidades	15
II.3.2. Composición Química y Valor Nutricional.....	16
II.3.3. Compuestos bioactivos	18
II.3.3.1 Compuestos Fenólicos	19
II.3.3.2. Flavonoides	19

II.3.3.3 Saponinas	20
II.3.3.4 Fitosteroles.....	21
II.3.3.5 Fibra Dietaria	22
II.3.3.6 Almidón Resistente	24
II.4. INFLAMACIÓN Y COMPUESTOS BIOACTIVOS	24
II.5. BOTANAS	26
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. OBJETIVOS	29
IV.1. Objetivo general:.....	29
IV.2. Objetivos específicos:	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS	30
V.1 Reactivos	30
V.2 Material Biológico	30
V.3 Materia prima	30
V.3.1 Acondicionamiento de la materia prima	31
V.3.1.1 Harina de Maíz.....	31
V.3.1.1.1 Proceso de Nixtamalización	31
V.3.1.2 Harina de Frijol.....	32
V.3.1.2.1 Proceso de cocción y secado.....	32
V.4 Elaboración de la botana	32
V.5 Composición química de harinas y totopos	32
V.5.1 Análisis proximal.....	33
V.5.1.1 Determinación de humedad (Método 925.10).....	33
V.5.1.2 Determinación del extracto etéreo (Método 920.39)	33
V.5.1.3 Determinación de proteínas (Método 954.01)	34

V.5.1.4 Determinación de cenizas (Método 923.03).....	35
V.5.2 Compuestos bioactivos.....	35
V.5.2.1 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos	35
V.5.2.1.1 Obtención del extracto metanólico	35
V.5.2.1.2. Análisis y Cuantificación de Compuestos Fenólicos por HPLC-DAD	36
V.5.2.2. Análisis y Cuantificación de Oligosacáridos por HPLC	36
V.5.2.3. Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por Microextracción en Fase Sólida (SPME) con análisis por Cromatografía de Gases acoplada a masas (GC-MS) en el extracto fermentado de la fracción no digerible (EFFND)	37
V.5.2.4. Fibra total dietaria y almidón resistente	38
V.5.2.4.1 Fibra insoluble	38
V.5.2.4.2 Fibra soluble.....	39
V.5.3 Digestión Gastrointestinal <i>in vitro</i> :	39
V.5.3.1 Simulación de las condiciones de la boca:.....	40
V.5.3.2 Simulación de las condiciones del estómago:.....	40
V.5.3.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado:	40
V.5.3.3.1 Técnica del saco intestinal invertido utilizando ratas	41
V.5.3.3.1.1 Manejo de los animales.....	41
V.5.3.3.1.2 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal	42
V.5.3.3.1.3 Manejo de los animales después del sacrificio....	43
V.5.3.3.2 Fermentación <i>in vitro</i> de la FND	43
V.5.3.3 Cálculos	44

V.5.3.3.1. Coeficiente de permeabilidad aparente (CP o P _{app}), Coeficiente de permeabilidad neta (CP _{neto} P _{app neto}) y Relación de Flujo de Salida	44
V.5.3.3.2. Flujo de Agua (FA)	45
V. 5.3.3.3. Bioaccesibilidad de compuestos	46
V.5.5. Capacidad Antioxidante	46
V.5.5.1. Método DPPH:	46
V.5.5.2. Método ABTS:.....	46
V.5.6 Cultivo Celular	47
IV.5.6.1. Ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) para viabilidad celular.....	47
IV.5.6.2 Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos (LPS) ...	49
V.6 Análisis Estadístico.....	50
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
VI.1. Contenido de proteína, lípidos, ceniza, humedad y carbohidratos en materia prima y totopos:.....	51
VI.2. Potencial Nutracéutico:	57
VI.2.1. Contenido de fibra dietaria:.....	57
VI.2.2. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en materia prima y harinas:.....	60
VI.2.3. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in vitro</i> del totopo horneado 70:30:.....	65
VI.2.4. Contenido de oligosacáridos en materia prima y harinas.	79

VI.2.5. Bioaccesibilidad de Oligosacáridos de los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in vitro</i> del totopo horneado 70:30.....	83
VI.3. Coeficiente de permeabilidad aparente, permeabilidad neta y relación de flujo de los compuestos fenólicos en los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> del totopo horneado 70:30.....	86
VI.4. Flujo de Agua del saco intestinal invertido durante el ensayo de permeabilidad <i>in vitro</i> del totopo horneado 70:30.	91
VI.5. Efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND del totopo horneado 70:30 sobre el pH del medio de incubación.	93
VI.6. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en la fermentación colónica <i>in vitro</i> del extracto fermentado de la FND del totopo horneado 70:30 (EFFND).....	95
VI.7. Efecto del EFFND en el modelo de macrófagos murinos.	100
VI.7.1 Efecto del EFFND sobre la viabilidad celular.....	100
VI.7.2 Efecto del EFFND de la botana horneada 70:30 sobre la producción de óxido nítrico (ON):.....	104
VII. CONCLUSIONES	109
VIII. BIBLIOGRAFÍA	111
ABREVIATURAS.....	144

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición química porcentual del maíz discriminado por fracciones.	6
2. Clasificación del almidón resistente por naturaleza.	11
3. Composición química del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	17
4. Contenido de proteína, lípidos, ceniza, humedad y carbohidratos de materia prima y totopo de mezcla de maíz y frijol.	51
5. Contenido de fibra dietaria total, soluble e insoluble y almidón resistente en materia prima y harinas de maíz, frijol y totopos.	57
6. Contenido de compuestos fenólicos de materias primas y harinas de totopos	60
7. Capacidad antioxidante de harinas de maíz, frijol y totopos.	62
8. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, cuantificados por HPLC, en los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in vitro</i> del totopo horneado 70:30	67
9. Capacidad antioxidante en los productos de la fermentación colónica.	76
10. Contenido de oligosacáridos cuantificados por HPLC-DAD-MS en harinas y totopos.	80
11. Bioaccesibilidad de oligosacáridos en los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y fermentación colónica <i>in vitro</i> del totopo horneado 70:30.	83
12. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}), permeabilidad neta ($P_{app\ Neta}$) y relación de flujo de salida de los compuestos fenólicos en los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> del totopo horneado 70:30.	88
13. Cambios en el flujo de agua durante la absorción en el yeyuno de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	92
14. Efecto de la Fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del totopo horneado 70:30 sobre el pH del medio de incubación.	93
15. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en los diferentes tiempos de fermentación colónica del totopo horneado 70:30	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Corte longitudinal (a) y transversal (b) del grano de maíz.....	5
2. Estructura típica de un flavonoide (Liu, 2004).....	7
3. Efecto del EFFND24 de la botana horneada sobre viabilidad celular en RAW 264.7 sin lipolisacáridos (LPS).....	100
4. Efecto del EFFND24 de la botana horneada 70:30 sobre viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 con LPS.	102
5. Efecto del EFFND24 de la botana horneada 70:30 sobre la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.	105

I. INTRODUCCIÓN

Es indiscutible el papel que han desempeñado el maíz y el frijol en la historia de Mesoamérica, llegando a convertirse en los dos alimentos más importantes de la nutrición de grandes grupos poblacionales de América Latina (Paredes-López *et al.*, 2006). Hoy en día el consumo de estos dos productos aporta importantes nutrientes, lo que hace relevante su ingesta, y más por el gran potencial nutracéutico que tienen, el cual ha sido asociado principalmente a la disminución de las Enfermedades No Transmisibles (ENT) como el sobrepeso, la obesidad, la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras, que tienen como punto de partida un origen inflamatorio a nivel celular (Hotamisligil *et al.*, 1993; Hotamisligil *et al.*, 1995; Pradham, 2007; Pradham *et al.*, 2003; Riordan *et al.*, 2009; Weisberg *et al.*, 2003).

El uso de la técnica alcalina de cocción de maíz, conocido como nixtamalización, se ha sugerido que surgió de modo accidental en las antiguas sociedades mesoamericanas y representó un procedimiento crucial en la preparación de productos a base de maíz porque ayudó a hacer más accesible el grano y a mejorar su calidad nutricional al incorporar calcio a la matriz alimenticia que representa el maíz y mejorar su calidad proteica (Bressani, 2008; Paredes-López *et al.*, 2006).

Estos productos a base de maíz han encontrado alta diversificación expresado en el consumo de tortillas y botanas que han alcanzado buena popularidad (como los totopos y las tostadas), aunque esto no las exime de su fama de ser consideradas de bajo valor nutrimental, papel relegado a los cambios fisicoquímicos y nutrimentales de sus componentes durante su proceso de transformación y las deficiencias nutricionales de los que parte la materia prima de elaboración (como son el bajo contenido de aminoácidos esenciales como lisina y triptófano), sin que ello implique descartar el alto aporte nutrimental de la nixtamalización como procedimiento que incrementa el contenido de minerales de estos productos y aumenta la digestibilidad proteica . Asimismo, los procesos de fritura y extrusión (que son los que principalmente se aplican en la elaboración de

botanas) añaden cantidades considerables de aceite y ácidos grasos saturados (en estos últimos, especialmente en la adición de sabores, ya que su alta hidrofobicidad requiere de vehículos lipídicos) que están relacionados con problemas para la salud (Capriles *et al.*, 2009)

La alta demanda mundial de botanas hace relevante la investigación y elaboración de las mismas cumpliendo las características nutrimentales y nutracéuticas que sean benéficas para la salud, lo que ha llevado a impulsar la utilización de materias primas que ofrezcan éstas características y que se conviertan en alternativas saludables que permitan, a largo plazo, el reemplazo de botanas poco saludables. Entre estas materias primas, las combinaciones de harinas de maíz y frijol conforman una mezcla importante porque presentan un perfil nutracéutico complementario, donde las deficiencias en aminoácidos esenciales del maíz son cubiertas por un mayor y mejor perfil de aminoácidos de frijol, así como el aporte conjunto de compuestos bioactivos (polisacáridos, compuestos fenólicos, oligosacáridos, etc.) (Bressani, 2008; Paredes-López *et al.*, 2006; Treviño-Mejía *et al.*, 2016).

Asimismo, evidencia ha indicado que gran parte de la patogénesis de las ENT se relaciona con el proceso de inflamación celular al haberse encontrado varios mediadores pro inflamatorios e incremento de la expresión de sus mRNA en muchas de estas enfermedades. La inflamación ha sido vinculada, tras evidencia derivada de estudios epidemiológicos y modelos animales, con la resistencia a la insulina (Pradham, 2007; Pradham *et al.*, 2003), con la obesidad al considerarse ésta marcada por una respuesta inflamatoria (Hotamisligil *et al.*, 1993; Hotamisligil *et al.*, 1995) y las patologías inflamatorias mucosas (Pradham, 2007; Monk *et al.*, 2015).

Finalmente, es importante también investigar los efectos significativos en la salud que puedan aportar estas nuevas alternativas nutricionales con el fin de validar sus referidas propiedades nutracéuticas y nutrimentales, por lo que el objetivo de este trabajo es la caracterización y evaluación de la actividad antiinflamatoria de la fracción no digerible de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido.

II. ANTECEDENTES

II.1. DIETA Y SALUD

Históricamente hablando, los sistemas alimenticios y los patrones en la dieta se han relacionado intrínsecamente con la vida social, cultural y económica, y han dotado a los individuos de determinadas comunidades de una identidad nacional. Estos patrones de dieta, si bien no eran nutricionalmente ideales, se relacionaban con bajas tasas de obesidad y enfermedades crónicas, ahora reconocidas como no transmisibles (Monteiro y Cannon, 2012). Desafortunadamente, el desplazamiento de los sistemas tradicionales de alimentación en África, Asia y Latinoamérica por productos ultra procesados ricos en azúcares, grasas o sales, comercializados por grandes corporaciones trasnacionales de alimentos y bebidas se ha incrementado rápidamente desde la década de 1980 y ello ha generado un incremento de las ENT como la obesidad (Monteiro & Cannon, 2012). Ésta última ha sido tal vez una de las enfermedades mayormente vinculadas a la dieta; Tanumihardjo *et al.* (2007) han descrito una paradoja que enlaza pobreza, inseguridad alimentaria y malnutrición a obesidad (o el estado de sobre nutrición), en la que indican que a pesar de que la dieta de muchas personas que viven en la pobreza tiene la cantidad adecuada de calorías que requieren para sus actividades diarias, la falta de calidad dietaria de su ingesta es insuficiente para promover un nivel de salud adecuado y prevenir las ENT.

Se considera que sólo en México, el sobrepeso y la obesidad se han convertido en el factor de riesgo modificable más importante, donde cerca del 71.3 % de los adultos mexicanos padecen una condición de éste tipo, especialmente en la cuarta y quinta década de vida (Barquera *et al.*, 2013). Se ha estimado que para el año 2017 las pérdidas por enfermedades atribuibles al sobrepeso y la obesidad llegará a los \$77,919 millones de pesos (Secretaría de Salud de México, 2010).

Por lo tanto, se ha propuesto la necesidad de incrementar los esfuerzos por estimular una alimentación saludable centrada en alimentos y preparaciones

tradicionales, buscando maneras de orientar a la población a realizar elecciones saludables en el consumo de alimentos industrializados. Adicional a la dieta, la actividad física y los estilos de vida que reduzcan el sedentarismo también se han planteado como alternativas importantes para la reducción de la incidencia de las enfermedades ya mencionadas (Barquera *et al.*, 2013; FAO-WHO, 2004).

II.2. MAÍZ (*Zea mays* L.)

II.2.1. Generalidades

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales más importantes en la dieta y nutrición de un amplio número de población en el mundo, proveyendo junto al trigo y la avena al menos el 30 % de las calorías a más de 4500 millones de personas en 94 países. El maíz también es un ingrediente clave en la alimentación animal y ha sido utilizado extensivamente en productos industriales, incluidos los biocombustibles (Arendt & Zannini, 2013; Shiferaw *et al.*, 2011). En América Latina, especialmente en México y Centro América, el maíz se consume principalmente en la población rural, más en la población femenina que en la masculina, encontrándose un incremento en su consumo en virtud de la reducción del ingreso económico (Bressani, 2008).

II.2.2. Estructura y composición química

El grano de maíz, botánicamente hablando, es una carióspside formado por cuatro estructuras principales: el pericarpio o cáscara, el germen o embrión, el endospermo y la piloriza (pedicelo o pedúnculo) como se muestra en la Figura 1 (Delcour & Hosney, 2010).

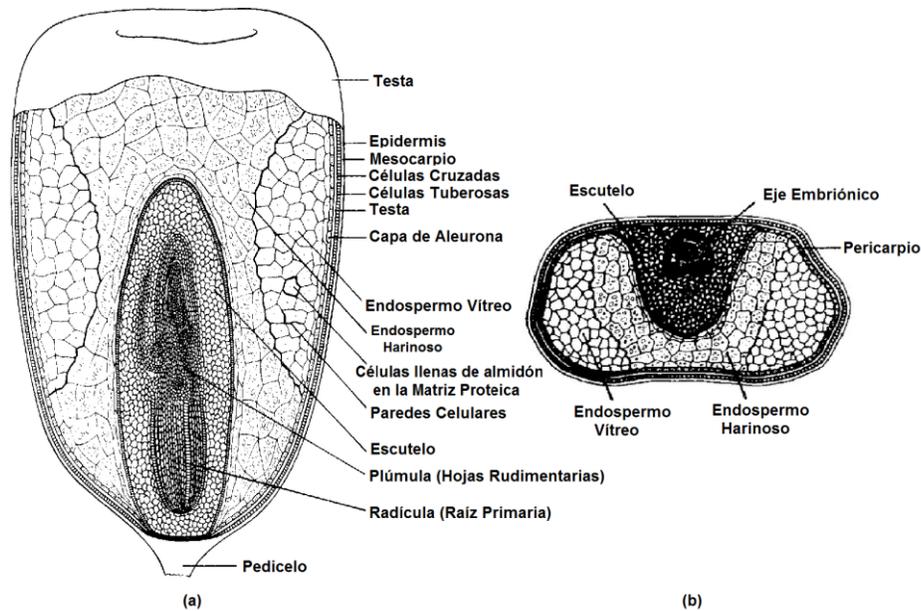


Figura 1. Corte longitudinal (a) y transversal (b) del grano de maíz.

(Delcour & Hosney, 2010)

El pericarpio, cáscara o salvado tiene un elevado contenido de fibra cruda (87 %) constituida fundamentalmente de hemicelulosa y celulosa que conforman una red que protege y contiene a las demás estructuras del grano. El resto de la composición química de la misma son cenizas, proteínas y azúcares (Benítez-Cardoza y Pfeiffer-Perea, 2006).

El germen del grano contiene aproximadamente 34 % de lípidos, 19 % de proteínas y 28 % de materiales solubles (azúcares, proteínas hidrosolubles, vitaminas y minerales) y algunos materiales insolubles en menor proporción. En ésta sección del grano se encuentra cerca del 65 % del contenido total de albúminas y el 25 % del total de globulinas (Eckhoff *et al.*, 2003). El endospermo se clasifica en: duro (córneo y vítreo) y suave (opaco y harinoso); en el primero de ellos los gránulos de almidón están densamente empaquetados por una gruesa matriz proteica, mientras que en el segundo la matriz proteica es delgada (Eckhoff *et al.*, 2003). Aproximadamente el 98 % del total del almidón del grano se encuentra en el endospermo (Arendt & Zannini, 2013). La piloriza es la

sección que conecta al grano con la mazorca, actuando como vía de paso de nutrientes de la mazorca al grano (Eckhoff *et al.*, 2003).

Esta conformación estructural del grano es responsable del contenido nutricional del maíz, que va a depender de la variedad y condiciones ambientales donde se cultive, aunque en términos generales la composición química del grano se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química porcentual del maíz discriminado por fracciones (%)

Fracción del Grano	Grano	Proteína	Carbohidratos		Lípidos	Cenizas
			Almidón	Azúcares		
Pilorriza (Pedúnculo, Pedicelo)	0.8	9.1	5.3	1.6	3.8	1.6
Pericarpio	5.3	3.7	7.3	0.3	1.0	0.8
Germen	11.5	18.8	8.2	10.8	34.5	10.1
Endospermo	82.3	9.4	86.4	0.6	0.8	0.3
Grano Entero	100	10.3	81.5	2.0	4.8	1.4

(Paredes-López *et al.*, 2006)

II.2.3. Compuestos bioactivos

Los fitoquímicos, definidos como compuestos vegetales bioactivos, han sido relacionados con la reducción del riesgo de ENT como: obesidad, diabetes tipo 2, cardiovasculares y cáncer (Boivin *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2002). Se estima que más de 5000 fitoquímicos han sido identificados en frutas, vegetales y granos, y un largo porcentaje sigue aún sin descubrir. Estos compuestos pueden clasificarse principalmente en compuestos fenólicos, carotenoides, alcaloides, compuestos nitrogenados y compuestos sulfurados, entre otros (Liu, 2004).

II.2.3.1. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son considerados como una de las más importantes fuentes de antioxidantes en cereales. La mayoría de los compuestos fenólicos conjugados son los flavonoides, donde los fenoles se

encuentran enlazados principalmente a ácidos fenólicos (Cuevas-Montilla *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos tienen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo y son generalmente clasificados como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas y taninos. Estos son productos del metabolismo secundario de las plantas y proveen funciones esenciales en la reproducción y crecimiento de las mismas; actúan como mecanismos de defensa contra diferentes patógenos, enfermedades, parásitos y depredadores y contribuyen al color de las plantas (Liu, 2004). De la Parra *et al.*, (2007) han reportado que el mayor contenido de compuestos fenólicos totales se encuentra en maíz amarillo, seguidos del azul y el blanco.

Entre los flavonoides, de los cuales se han identificado más de 4000, han sido descritos las flavonas (apigenina, luteolina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavononas (naringenina, herperidina), catequinas (epicatequina, galocatequina), antocianidinas (cianidina, pelargonidina) e isoflavonas (genisteína, daidzeína), cuya principal diferencia química es la estructura genérica del anillo C o anillo heterocíclico oxigenado que tienen todos los flavonoides en su estructura (Liu, 2004; Prior, *et al.*, 2006), como se muestra en la Figura 2.

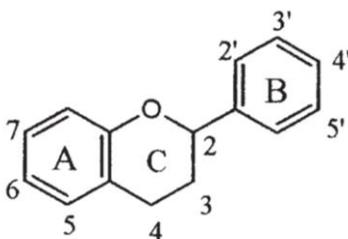


Figura 2. Estructura típica de un flavonoide (Liu, 2004)

En cuanto a los ácidos fenólicos, éstos pueden ser subdivididos en dos grandes grupos: ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Algunos derivados de los primeros son el ácido p-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico y gálico (Heleno *et al.*, 2014). Respecto al ácido hidroxicinámico están

derivados de importancia como el p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, presentes en forma esterificada y unidos a los componentes de la pared celular estructural como celulosa, lignina y proteínas (Liu, 2004).

El ácido ferúlico, o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico, es uno de los fitoquímicos importantes del maíz y otros cereales y está presente principalmente en forma ligada a la pared celular de la planta (De la Parra *et al.*, 2007; Luo & Wang, 2012), donde la mayoría del mismo está asociado al pericarpio del maíz (González *et al.*, 2004). Los mayores contenidos de ácido ferúlico se encuentran en el maíz rojo, seguido del azul y el blanco, y se conoce que éste compuesto inhibe la oxidación de lípidos y protege a las células del daño oxidativo (De la Parra *et al.*, 2007), es antiinflamatorio (Ou *et al.*, 2003) y se ha informado que tiene efectos antidiabéticos a través de la estimulación de la secreción de insulina (Nomura *et al.*, 2003). Tanto el ácido ferúlico como el ácido p-cumárico y sus derivados han sido relacionados con un amplio intervalo de bioactividad, entre los que destacan los efectos antioxidantes y anticarcinogénico (Cuevas-Montilla *et al.*, 2011). Gracias a la mayor permanencia del ácido ferúlico libre en la sangre que otros antioxidantes, es por ello que sus efectos benéficos son más duraderos y protege adecuadamente contra el ataque de radicales libres (Srinivasan *et al.*, 2007).

II.2.3.2. Carotenoides

Los carotenoides son los pigmentos más comunes en la naturaleza y han recibido especial atención por su papel como antioxidantes, como pro vitaminas y fuertes extintores de los singletes de oxígeno (Michaud *et al.*, 2000). Los carotenoides tienen un esqueleto formado por 40 unidades de isopreno, con estructuras que pueden estar cíclicas en uno o ambos finales, pueden tener diversos niveles de hidrogenación y pueden contener varios grupos funcionales oxigenados (Liu, 2004). Los mayores contenidos de luteína, zeaxantina y β -caroteno se registran en el maíz amarillo (siendo

responsables de su color amarillo), mientras que el maíz blanco presenta los mayores valores de β -criptoxantina (De la Parra *et al.*, 2007).

Algunos estudios han informado asociaciones inversas entre la ingesta de carotenos (β -caroteno, luteína, licopeno y criptoxantina) en relación al cáncer de pulmón, lo que sugiere que los carotenos son parcialmente responsables de conferir protección contra este tipo de cáncer (Michaud *et al.*, 2000). También se ha demostrado los efectos inhibitorios del β -caroteno en lesiones preneoplásicas inducidas por modelos de hepatocitos resistentes en ratas Wistar, por lo que el consumo prolongado de carotenoides puede conferir cierto grado de protección contra la neoplasia (Luo & Wang, 2012). Palozza *et al.* (2001) reportaron que a altas concentraciones de β -caroteno éste actúa como pro oxidante y ha sido probado que induce la apoptosis de ciertas células cancerígenas como las de colon, de melanoma y leucemia (Palozza *et al.*, 2003).

II.2.3.3. Antocianinas

Las antocianinas son el mayor grupo de pigmentos hidrosolubles en plantas y van desde el rojizo hasta el púrpura, conformando la clase más común de flavonoides. En las plantas, debido a cantidades y posiciones diferentes de los grupos hidroxilo, han sido clasificadas en seis grupos de antocianidinas. Entre los cereales, el maíz ha sido probado que es el cereal que contiene la segunda más alta concentración y en mayor diversidad de antocianinas, de las que se ha demostrado su capacidad antioxidante como compuestos anti inflamatorios y anti cancerígenos (Abdel-Aal *et al.*, 2006). La concentración total y los tipos de antocianinas depende del tipo de maíz; por ejemplo: el maíz morado contiene dos veces más que el maíz rojo (Luo & Wang, 2012). Las antocianinas más populares que han sido identificadas son la cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, pelargonidina-3-(63-malonilglucósido), cianidin-3-(63-malonilglucósido) y cianidin-3-(33,63-dimalonilglucósido). El 70% de los derivados de la cianidina se encuentran en el pericarpio y la capa de aleurona (Luo & Wang, 2012).

A pesar de ser consideradas como no nutritivas, las antocianinas han sido asociadas a múltiples beneficios para la salud, ya que tienen alta actividad antioxidante (Prior *et al.*, 1998), reducen la presión sistólica en ratas hipertensas (Toyoshi & Kohda, 2004) y se ha sugerido que previenen la obesidad y diabetes en estos mismos animales (Tsuda *et al.*, 2003). Las antocianinas del maíz púrpura también han sido asociadas con la reducción de la mutación en células inducida por la 2-amino-1-metil-6-fenilimidazopirina (PhIP) e igualmente reducen químicamente la carcinogénesis colon rectal en ratas macho inducidas químicamente con 1,2-dimetilhidrazina (Hagiwara *et al.*, 2001)

II.2.3.4. Almidón Resistente

El Almidón Resistente (AR) es aquél que escapa de la digestión en el intestino delgado y potencialmente actúa como uno de los principales contribuyentes al contenido de carbohidrato fermentables en el intestino grueso. Se han reconocido diferentes clases de almidón resistente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación del almidón resistente por naturaleza y fuente:

Subtipo	Naturaleza	Fuente
Almidón resistente 1	Es atrapado en la matriz alimenticia, y es físicamente inaccesible a la enzima (amilasa)	Granos y semillas enteras o parcialmente molidas.
Almidón resistente 2	Resistente a la digestión por su estructura granular.	Papa cruda, plátano inmaduro, algunas legumbres y almidones altos en amilosa (del maíz).
Almidón resistente 3	Se retrograda a amilosa y amilopectina durante el procesado de alimentos.	Alimentos cocidos como papas, pan y hojuelas.
Almidón resistente 4	Es producido por modificaciones químicas	No se encuentra en la naturaleza, aunque tiene gran variedad de estructuras.

(Murphy *et al.*, 2008)

Se ha reportado que el consumo de almidón resistente tiene varios efectos benéficos en la salud como el mantenimiento de los niveles normales de colesterol sérico (Mikulíková *et al.*, 2008), mejora la excreción fecal del mismo (Silvester *et al.*, 1997), altera las poblaciones microbianas como lactobacillus y bifidobacterias del intestino e incrementa la formación de ácidos grasos de cadena corta en el mismo (Bird *et al.*, 2000); reduce los síntomas de diarrea y, conjugando los anteriores beneficios, reduce el riesgo de cáncer cecal, aterosclerosis y complicaciones relacionadas con la obesidad (Murphy *et al.*, 2008). Del mismo modo, como el almidón resistente modera la tasa de digestión (tarda de 5 a 7 horas en digerirse tras ser consumido), se ha encontrado su capacidad para reducir la glicemia postprandial y la insulinemia y tiene el potencial de incrementar el período de saciedad (Sajilata *et al.*, 2006).

II.2.3.5. Saponinas

Las saponinas son glicósidos ampliamente distribuidos en el reino vegetal e incluyen un grupo muy diverso de compuestos caracterizados por su estructura, que contiene una aglicona esteroidea o triterpenoide y una o más cadenas de azúcares (Mazza *et al.*, 2007), conformando una combinación de elementos estructurales polares y no polares que explican su comportamiento similar al jabón en soluciones acuosas (Vincken *et al.*, 2006).

Tradicionalmente las saponinas han sido consideradas como factores antinutricios (Thompson, 1993) y algunas veces se ha limitado su uso debido a su sabor amargo (Ridout *et al.*, 1991). A pesar de estas limitantes, las saponinas tienen amplias propiedades farmacológicas, medicinales, microbiológicas e insecticidas y son altamente termolábiles (Vincken *et al.*, 2006)

Evidencias de numerosos estudios confirman que la actividad biológica de las saponinas está influenciada tanto por la aglicona como por los residuos azucarados. La mayoría de la información existente en cuanto a las relaciones entre actividad y estructura viene de investigaciones realizadas en la acción hemolítica de las saponinas (Podolak *et al.*, 2010). Dentro de esto, la lisis de eritrocitos es una de las características biológicas de las saponinas mayormente consideradas, considerándose que ejercen dicho efecto al interactuar con la membrana de colesterol, provocando su desestabilización (Francis *et al.*, 2002).

Mingsan *et al.* (2007) evaluaron los efectos de las saponinas provenientes de un extracto de maíz común en un modelo de diabetes en ratones ocasionado por el suministro de aloxano y glucosa intragástrica, encontrando que a bajas dosis de estas dos sustancias, las saponinas del maíz común (*Zea mays* L.) ejercen buen efecto en la reducción de los niveles

de glucosa sanguíneos y en la prevención del daño ocasionado por medicamentos de las células β -pancreáticas.

Miao *et al.* (2008) reportaron que en ratas con diabetes inducida por estreptozocina, el tratamiento con saponinas del maíz común las mismas disminuye de forma significativa los niveles de glucosa sanguínea y podría prevenir el daño (inducido por estreptozocina) en células β -pancreáticas.

II.2.3.6. Fitosteroles

Los fitosteroles, conocidos como “esteroles vegetales”, son los constituyentes menores de los aceites vegetales pero, a pesar de ello, son componentes esenciales de las paredes y membranas celulares (Piironen *et al.*, 2000). Hasta el momento, se han encontrado más de 250 esteroides y compuestos relacionados diferentes en plantas y materiales marinos (Luo & Wang, 2012). Basado en el número de grupos metil en la posición C-4, los fitosteroides pueden clasificarse en tres tipos: el 4-desmetilesterol o esteroides simples, los 4,4-dimetilesteroides y el 4-monometilesterol (Grunwald, 1975).

Varios estudios han señalado que el aceite extraído del grano entero de maíz es muy rico en fitosteroides (Piironen *et al.*, 2000). La distribución de los fitosteroides y fitostanoles varía en las diferentes fracciones del grano de maíz, como endospermo, pericarpio y germen (Harrabi *et al.*, 2008). Los fitosteroides más comúnmente consumidos a partir de aceite de maíz son sitosterol, estigmasterol y campesterol, todos pertenecientes a la clasificación de los 4-desmetilesteroides. La estructura química de dichos fitosteroides es muy similar a la del colesterol, difiriendo únicamente en la cadena lateral (Luo & Wang, 2012).

Los efectos benéficos de los fitosteroides han sido evaluados y un consumo dietario de los mismos se ha visto negativamente relacionado con la absorción de colesterol y el colesterol sérico LDL (lipoproteína de baja densidad) total (Moghadasian & Frohlich, 1999; Jiang & Wang, 2005). Debido a su estructura con colesterol, los principales mecanismos involucrados en

los beneficios dietarios de los fitosteroles se dan por medio de la inhibición de la absorción de colesterol a través del intestino y su subsecuente estimulación compensatoria de síntesis de colesterol, resultando en una mejor eliminación de colesterol en las heces.

Un estudio realizado por Ostlund *et al.* (2002) comparó la absorción de colesterol en sujetos humanos sanos que consumieron aceite de maíz y el mismo aceite con remoción comercial de fitosteroles, encontrando que la absorción de colesterol fue 38 % mayor en el grupo que consumió aceite con remoción comercial de fitosteroles que aquellos que consumieron el aceite natural, por un período de dos semanas. Asimismo, cuando el aceite de maíz que contenía fitosteroles fue añadido a aquél que no los contenía (el comercial), la absorción de colesterol fue nuevamente significativamente reducida. Por lo tanto, el consumo de aceite de maíz por un largo período de tiempo podría reducir las concentraciones de colesterol y prevenir la enfermedad aterosclerótica.

II.2.4. Nixtamalización

Se denomina nixtamalización al proceso consistente en someter el maíz a un proceso térmico alcalino que lleva a la transformación del mismo en diversos productos, entre los que el más conocido es la tortilla, razón por la cual el proceso se realiza especialmente en los países que consumen ésta última. En algunas áreas de México y Centroamérica el procedimiento descrito se sigue llevando a cabo de manera doméstica, implicando un esfuerzo físico que requiere altas cantidades de energía y agua, proceso que permite obtener la apreciada tortilla, pero con un alto costo ambiental por el alto poder contaminante del proceso, lo que ha llevado a nivel industrial a buscar alternativas más eficientes como la producción de harinas nixtamalizadas de forma comercial (Bressani, 2008).

El proceso básico de nixtamalización parte de maíz entero, el cual se mezcla con dos partes de solución acuosa al 1% de hidróxido de calcio

(Ca(OH)₂). La mezcla luego es calentada a 80 °C durante 20 a 45 minutos (con agitación) y se deja reposar durante la noche por espacio de 8 a 14 horas. Al día siguiente, el agua de remojo del maíz (color amarillo lechoso) es descartada y el maíz remojado es lavado de dos a tres veces con agua limpia, removiendo la cáscara, la cápsula, eliminando el exceso de cal y posibles impurezas que pudiera haber tenido el grano. El agua de remojo se denomina “agua de nixtamal” (nejayote) y al maíz cocido obtenido “nixtamal”. Posteriormente, éste nixtamal es pasado por un proceso de molienda que permite obtener la harina, de la que se requieren sólo 50 g que al cocerse sobre un plato caliente o de barro (el “comal”) permite obtener las tortillas (Bressani, 2008).

El procedimiento antes descrito induce cambios en la estructura del grano del maíz, su composición química, propiedades funcionales y valor nutritivo. En términos generales, la nixtamalización permite el rompimiento parcial del pericarpio (facilitando el descascarado del grano e incrementando su suavidad y plasticidad), incrementa la concentración de calcio en el maíz a consecuencia de la ligadura entre el almidón y éste mineral y aumenta el porcentaje proteico (por la pérdida de la cáscara). Del mismo modo, produce pequeñas pérdidas de almidones y azúcares, pérdida del extracto etéreo del maíz, reducción del contenido de fibra cruda, pérdida de algunas vitaminas del complejo B e incremento del valor nutricional del maíz (por la liberación de aminoácidos y reducción del contenido de ácido fítico) (Bressani, 2008; Paredes-López *et al.*, 2009).

II.3. FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.)

II.3.1. Generalidades

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es ampliamente conocido y consumido en varias partes del mundo porque conforman una fuente rica y barata de proteínas (20 % al 25 %) y carbohidratos (50 % al 60 %). También es una fuente relativamente buena de vitaminas y minerales, principalmente en la

población de países desarrollados (Hnatuszko-Konka *et al.*, 2014 ; Rehman *et al.*, 2001).

II.3.2. Composición Química y Valor Nutricional

La composición química y nutricional del frijol común se muestra en el Cuadro 3. Los carbohidratos son los mayores componentes en las leguminosas (55-65%), donde el almidón y la fibra dietaria o polisacáridos no almidonados son los mayores constituyentes (Hoover & Zhou, 2003; Osorio-Díaz *et al.*, 2002). La fibra dietética se encuentra principalmente en las paredes celulares de la cascarilla y el endospermo (Paredes-López *et al.*, 2006).

Cuadro 3. Composición química del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

	Aspecto Indicador	Contenido
Composición Química (%)	Proteína	14.00 – 33.00
	Lípidos	1.50 – 6.20
	Total	14.00 – 19.00
	Fibra Soluble	3.10 – 7.60
	Insoluble	10.10 – 13.40
	Cenizas	2.90 – 4.50
Calidad de Proteína	Carbohidratos	52.00 – 76.00
	Digestibilidad	52.00 – 75.00
	Relación de Eficiencia Proteínica	0.70 – 1.50
	Fenilalanina + Tirosina	5.30 – 8.20
Aminoácidos Esenciales	Isoleucina	2.80 – 5.80
	Leucina	4.90 – 9.90
	Lisina	6.40 – 7.60
	Metionina + Cisteína	1.20 – 1.50
	Treonina	4.40 – 7.00
	Triptófano	-
	Valina	4.50 – 6.70
Vitaminas (mg/100 g.)	Tiamina (B1)	0.86 – 1.14
	Riboflavina (B2)	0.14 – 0.27
	Niacina (B3)	1.16 – 2.68
	Piridoxina (B6)	0.34 – 0.64
	Ácido Fólico	0.17 – 0.58
Minerales (mg/100 g.)	Calcio	9.00 – 200.00
	Fósforo	460.00
	Cobre	0.70 – 1.20
	Hierro	3.80 – 7.60
	Magnesio	200.00
	Zinc	2.20 – 4.40
Otros Componentes	Taninos (mgeq.cat/g) ^a	9.60 – 131.40
	Inhibidores de Tripsina (UIT/mg) ^b	13.00 – 29.00
	Ácido Fítico (%)	0.60 – 2.70

^a Miligramos equivalentes de catequina por gramo

^b Unidades de inhibición de tripsina por miligramo
(Paredes-López *et al.*, 2006)

Las proteínas del frijol común (Cuadro 3), tienen adecuada composición de aminoácidos aromáticos y algunos básicos pero es deficiente en algunos aminoácidos esenciales como son los azufrados (metionina, cistina y triptófano), situación que puede ser compensada al combinar los frijoles con cereales como el maíz o arroz. Otros componentes importantes del frijol lo constituyen las vitaminas del complejo B, algunos minerales como el hierro y otros componentes, considerados bioactivos, tales como antioxidantes y polifenoles (Paredes-López *et al.*, 2006).

II.3.3. Compuestos bioactivos

Al igual que otras leguminosas, las semillas de frijol común contienen cierto número de sustancias bioactivas entre las que se incluyen inhibidores enzimáticos, lectinas, fitatos, oligosacáridos y compuestos fenólicos que juegan un papel protector en seres humanos y animales que frecuentemente consumen estos productos (Champ, 2002).

Algunos compuestos bioactivos han sido considerados como factores anti nutricionales debido a su efecto en la calidad dietaria: los inhibidores enzimáticos, las lectinas, el ácido fítico y algunos compuestos fenólicos pueden reducir la digestibilidad proteica (Belitz & Weder, 1990; Liener, 1994) y disminuir la biodisponibilidad de minerales (Sandberg, 2002). Sin embargo, se ha informado que la mayoría de éstos compuestos son termolábiles y no todos actúan negativamente en el metabolismo: el ácido fítico tiene un efecto protector y antioxidante sobre el ADN (Midorikawa *et al.*, 2001), los compuestos fenólicos como los flavonoides y ácidos fenólicos tienen propiedades antioxidantes (Pietta, 2000; Yeh & Yen, 2003) y los galactooligosacáridos se han relacionado con actividad prebiótica (Rycroft *et al.*, 2001). En general, la presencia de compuestos bioactivos en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se ha relacionado con una disminución de las ENT (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008).

II.3.3.1 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son uno de los más importantes componentes bioactivos de los frijoles asociados a beneficios a la salud. El color de la cubierta de los frijoles se atribuye a la presencia y cantidad de polifenoles como los flavonoles, glicósidos, taninos condensados y antocianinas, y muchos de ellos dependen de los cultivares y las clases comerciales. Los frijoles blancos contienen significativamente menos compuestos fenólicos que los coloreados, los cuales tienen cantidades en orden decreciente: pequeño rojo, pinto, red kidney oscuro, negro, Great Northern y blanco (Oomah *et al.*, 2008).

Aparicio-Fernández *et al.* (2008) reportaron para en un extracto metanólico de frijol negro “Jamapa” una fuerte correlación entre su concentración de pro antocianidinas y su capacidad antiradical (medida por el método DPPH), así como su capacidad antiproliferativa de células HeLa (células de adenocarcinoma humano). Lo anterior fue atribuido a que los compuestos fenólicos presentes fueron capaces de incrementar la expresión de las proteínas de Caspasa 3 y Bax, indispensables para la formación del Apoptosoma y el inicio del proceso de apoptosis en células cancerígenas.

Mattei *et al.* (2011) reportaron que el contenido de compuestos fenólicos del frijol negro o caraota (*Phaseolus vulgaris*) lo perfilan como un alimento funcional. Otros autores han indicado que algunos compuestos fenólicos de las variedades negras de *P. vulgaris*, especialmente de ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, antocianinas y proantocianinas ayudan en la prevención de enfermedades crónicas tales como cáncer, afecciones cardiovasculares, obesidad y diabetes.

II.3.3.2. Flavonoides

Los flavonoides son los constituyentes monoméricos de los taninos condensados, aunque también es muy común encontrarlos como monómeros libres (Campos-Vega *et al.*, 2012b). Se ha reportado que los

compuestos flavonoides en frijol tienen actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo*. Los principales compuestos flavonoides extraídos de frijol son las antocianinas y proantocianidinas, que han mostrado actividad antioxidante (principalmente debido a su capacidad para formar complejos con metales) y antimutagénica. Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de alimentos ricos en flavonoides protege contra enfermedades asociadas al estrés oxidativo tales como enfermedad coronaria y cáncer (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005; Beninger & Hosfield, 2003).

La presencia de antocianinas ha sido reportada sólo en frijoles de coloraciones negra y azul-violeta (Aparicio-Fernández *et al.*, 2006). Los taninos condensados, también llamados protoantocianidinas, se encuentran principalmente en las cubiertas de las semillas (Aparicio-Fernández *et al.*, 2006) y han mostrado actividad antioxidante significativa en relación al BHT (Hidroxitolueno butilado), un antioxidante comúnmente utilizado de forma comercial en alimentos (Beninger & Hosfield, 2003). El ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante en frijoles comunes, así como niveles intermedios de ácidos *p*-cumárico y sinápico (Campos-Vega *et al.*, 2012b).

II.3.3.3 Saponinas

Se ha probado que las saponinas pueden ser valiosas promotoras anti-carcinogénesis gracias a su efecto antioxidante y sus efectos citotóxicos selectivos y directos contra células cancerígenas y regulación de la proliferación celular (Rao & Sung, 1995). Los efectos biológicos de las saponinas dependen de las estructuras químicas así como el número de contaminantes dentro del extracto de interés (Kaiser *et al.*, 2010). Asimismo, las concentraciones de las mismas dependen del nivel de germinación de la semilla y el tratamiento que recibe, ya que se ha encontrado que los brotes de frijoles negros (*Phaseolus vulgaris* L.) tienen mayores concentraciones de saponinas en comparación con los cotiledones o las cubiertas, y se incrementan con el remojo de la semilla (Guajardo-Flores *et al.*, 2012).

Guajardo-Flores *et al.* (2013) evaluaron la actividad antioxidante y antiproliferativa de extractos de saponinas y flavonoides provenientes de frijoles negros (*Phaseolus vulgaris* L.) germinados, encontrando que las saponinas de los mismos ejercen una inhibición de la proliferación de células cancerígenas de cáncer de colon y hepático (líneas celulares CaCo2 y HepG2, respectivamente).

Chavez-Santoscoy *et al.* (2014b) examinaron los efectos de saponinas y flavonoides de extractos metanólicos de cubiertas de semillas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el metabolismo de lípidos en células de hepatocitos primarios de ratones C57BL/6, encontrando que la soyasaponina A es la principal saponina encontrada en las cubiertas y que en conjunto con los demás componentes del extracto reducían significativamente la expresión de los genes *SREBP1c*, *FAS* (proteínas lipogénicas clave) y *HMGCR* y estimulaban la expresión de los transportadores reversos de colesterol *ABCG5/ABCG8* y *CYP7A1* en el hígado; del mismo modo, hubo un incremento en la expresión del gen *PPAR α* , una disminución de los depósitos lipídicos hepáticos y un incremento en la secreción de bilis, mostrando así el modo como el extracto podría incidir en la excreción de colesterol en parte por la vía de síntesis ácida de bilis.

II.3.3.4 Fitosteroles

En legumbres, los fitosteroles están en pequeñas cantidades, siendo los más comunes el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Campos-Vega *et al.*, 2012b). Ryan *et al.* (2007) reportaron que el contenido total de fitosteroles en leguminosas variaba alcanzaba valores aproximados de 134 mg/100 g (para frijol común *kidney*), siendo el contenido de β -sitosterol en *butter beans* de aproximadamente 85 mg/100 g y 86 mg/100 g. para frijol común *kidney*, y estas variedades tienen cantidades apreciables de escualeno, α y β -tocoferol, por lo que sugieren que tienen un perfil de ácidos grasos favorable desde una perspectiva cardioprotectora. Nyström *et al.*

(2012) establecieron que para frijoles negros el fitosterol más abundante es el sitosterol.

Chavez-Santoscoy *et al.* (2014a) identificaron y cuantificaron fitosteroles en las cubiertas de semillas de frijol negro común (*Phaseolus vulgaris* L.) por medio de HPLC con UV-Visible y detectores de dispersión de luz por evaporación. Asimismo, evaluaron el efecto de dichos fitosteroles en el metabolismo lipídico de hepatocitos primarios de ratas, encontrando que disminuyen la lipogénesis por la regulación negativa de proteínas lipogénicas como la proteína enlazante del elemento regulatorio de esterol 1 y la síntesis de ácidos grasos en los hepatocitos. Por otra parte, se encontró que en éstas células los fitosteroles regulan positivamente la expresión de carnitina palmitoiltransferasa I, promoviendo así la oxidación de ácidos grasos de cadena larga e inhibiendo la solubilidad micelar del colesterol y redujeron la activación del receptor X del hígado, expresándose en una disminución de la síntesis de ácidos grasos hepáticos y promoción de la oxidación β -hepática en ácidos grasos de cadena larga.

II.3.3.5 Fibra Dietaria

La fibra dietaria es definida por la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC) como las partes comestibles de plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión, conformando la fracción no digerible (FND) y absorción en el intestino delgado humano con una fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Está conformada de polisacáridos (como celulosa, hemicelulosa y pectinas), oligosacáridos, lignina, compuestos fenólicos y péptidos, entre otros. La celulosa es el mayor componente de la fibra cruda en frijoles (red kidney, navy, pinto, rosado y black-eye), mientras que el contenido de fibra dietaria total depende de la variedad de frijol que se considere (Campos-Vega *et al.*, 2012b).

La fibra, por su solubilidad, puede clasificarse en soluble o insoluble. La fibra soluble se constituye de gomas, pectinas, mucílagos, insulina,

almidón resistente y oligosacáridos como rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006). Al entrar en contacto con el agua conforma un retículo en donde queda atrapada, participando en la generación de soluciones de alta viscosidad (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006) que tiene importancia metabólica al ayudar en la estabilización de los niveles de glucosa en sangre y concentración de insulina postprandial, además de que contribuye a la reducción de colesterol sérico asociado a la pérdida de ácidos biliares a través de la materia fecal (Roberfroid, 2001; Queiroz-Monici *et al.*, 2005).

En su fermentación por la microbiota colónica, estas producen ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) que conforman nutrientes importantes para las células colónicas al ayudar a la absorción de agua y minerales y tienen efectos protectores en cáncer de colon (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008; Younes *et al.*, 2001).

Campos-Vega *et al.* (2012a), en un estudio realizado en un modelo *in vitro* de simulación de la fermentación colónica humana, encontraron que los productos de la fermentación de la fracción no digerible del frijol común cv. “Bayo Madero” cocido inhibieron la proliferación de células de adenocarcinoma colónico HT-29. Se demostró que los ácidos grasos de cadena corta, especialmente el propiónico y el butírico (producto de la fermentación simulada) eran los responsables de esta inhibición en un 35 %, siendo el efecto producido dosis-dependiente.

Además, se encontró que el extracto de la fermentación colónica estimulaba la apoptosis celular por medio de la inducción de la Caspasa 3 y reduciendo la mutación de la proteína supresora de tumores p53 (medida por la técnica de TUNEL). Asimismo, el estudio encontró evidencia significativa de mayor expresión de la molécula p21CIP1 (uno de los inhibidores de quinasas ciclino dependientes), inhibición de la actividad del factor de transcripción pro inflamatorio NF- κ B y de HDAC1 (Histona Deacetilasa,

involucrada en el crecimiento de las células HT-29 de cáncer de colon) (Campos Vega *et al.*, 2013).

Feregrino-Perez *et al.* (2014) evaluaron *in vivo* el efecto de la fracción no digerible de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Negro 8025 en ratas Sprague-Dawley alimentadas con esta variedad de frijol, encontrando que en aquellas con cáncer colónico inducido por Azoximetano (AOM por sus siglas en inglés) hubo un número significativamente bajo del total de Fosas Colónicas Aberrantes (ACF por sus siglas en inglés) con un notable incremento de las células presentes en la fase G1 (83.14 %), lo que indica una disminución del índice de proliferación celular y mayor número de células apoptóticas, sugiriendo que la fracción no digerible y sus componentes asociados actúan como un inductor de la apoptosis celular en células necróticas.

II.3.3.6 Almidón Resistente

Se define como la suma del almidón y sus productos de degradación que no se absorben en el intestino delgado de sujetos sanos. Éste tipo de almidón se fermenta en el colon por cerca de 400 tipos de bacterias de la llamada “flora intestinal”, ahora reconocida como microbiota, aunque una pequeña proporción suele escapar a dicho proceso degradativo y es excretado en las heces. La fermentación produce gases como metano y dióxido de carbono y otras sustancias como ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico), que contribuyen al estado general de salud del colon. Dependiendo del cultivar y el tipo de procesamiento (cocción), el contenido de almidón resistente en los frijoles varía ampliamente (del 21 % al 33 %) (Campos-Vega *et al.*, 2012b).

II.4. INFLAMACIÓN Y COMPUESTOS BIOACTIVOS

La inflamación es un proceso fisiológico que inicia como respuesta a la infección bacteriana o daño en tejidos. Los macrófagos son la primera línea de

defensa del sistema inmune contra el ataque de agentes nocivos en los que estímulos inflamatorios como los lipopolisacáridos (LPS) activan a estos para que produzcan citosinas variadas pro inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-1b o IL-6) así como mediadores pro inflamatorios como prostaglandina E₂ (PGE₂) y óxido nítrico (NO), que son sintetizados por la familias de ciclooxigenasas (COX) y la sintetasa inducible por óxido nítrico (iNOS), respectivamente (García-Lafuente *et al.*, 2014).

La producción de dichos mediadores ha sido demostrada en varios tejidos inflamados que junto a su expresión incrementada de sus mRNA, están involucrados en varias enfermedades como aterosclerosis, obesidad, síndrome metabólico, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y varios tipos de cáncer (Cardona *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2010).

Evidencia epidemiológica ha indicado que las dietas ricas en frutas y vegetales podrían reducir la incidencia de ENT que comparten un componente anti-inflamatorio, efecto atribuido parcialmente a la presencia de diversos componentes antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos, aunque gran parte de su actividad no puede ser explicada únicamente sobre la base de ésta capacidad antioxidante, ya que otras investigaciones han demostrado su acción como secuestrantes de radicales, modulando procesos de señalización celular durante la inflamación (García-Lafuente *et al.*, 2009).

García-Lafuente *et al.* (2014) evaluaron en un modelo *in vitro* de macrófagos murinos 264.7 estimulados por lipopolisacáridos (LPS) el efecto anti oxidante y anti inflamatorio de extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos provenientes de frijol *white kidney* (WKB) y *round purple* (RPB), encontrando que RPB (con altas cantidades de proantocianidinas, glucósidos de catequina y ácido sinápico) exhibía mayor capacidad antioxidante y mejor efecto anti inflamatorio que WKB (conformado principalmente por ácidos fenólicos) al reducir la producción de óxido nítrico (NO) y de interleucinas IL-1 β y IL-6, disminuían la expresión del dímero proteico NF- κ B p65 pero no ejercían efecto significativo en la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Moreno-Jiménez *et al.* (2014) evaluaron los efectos anti inflamatorios y antioxidantes de extractos metanólicos de cuatro variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Negro 8025, Bayo Victoria, Pinto Durango y Pinto Saltillo) al ser procesados por enlatado (*canning*) y ebullición en recipiente abierto, en un modelo *in vitro* de células de cáncer de colon (HT-29), encontrándose que éste proceso térmico en las variedades de frijol degrada parcialmente algunos compuestos fenólicos pero incrementa la producción de otros de un modo cultivar-dependiente. Asimismo, se encontró que los extractos reducen, de modo cultivar-dependiente, la expresión de la enzima COX-2 e inhiben la producción de las proteínas pro inflamatorias TNF- α , NF- κ B e IL-8 (especialmente en las variedades Negro 8025 y Pinto Saltillo), aunque también inducen la expresión de proteínas anti inflamatorias como IL-10 y COX-10 (principalmente Bayo Victoria).

II.5. BOTANAS

Las botanas pueden definirse como comidas pequeñas y ligeras que cumplen con condiciones como su fácil manipulación, facilidad de consumo, accesibilidad, tamaño pequeño, estar en raciones individuales y satisfacer la sensación de hambre momentánea (Pérez-Navarrete *et al.*, 2006).

El mercado de las botanas ha alcanzado alta complejidad en Norteamérica, especialmente en Estados Unidos de Norteamérica. Muchas compañías han estado fuertemente promoviendo el valor de sus productos como botana (*snack* por sus siglas en inglés) o incrementando la densidad de los mismos. A pesar de que los consumidores aún compran únicamente sus marcas favoritas, muchos buscan mejores opciones de precios o sabor. La Corporación Frito Lay es la que domina el sector de la botanas, con 6 de sus 10 marcas entre las más populares, donde los chips de tortilla/maíz conforman uno de ellas, con altos volúmenes de ventas, y de las que se estima que seguirán creciendo en los próximos 4 años hasta alcanzar la segunda posición (International Markets Bureau, 2011).

Las botanas saludables han ido incrementando su posicionamiento en el mercado, mostrando un aumento de cerca del 3 % en 2009 frente al año anterior, y

un crecimiento de más del 8 % desde 2005. Cerca del 83 % de los consumidores declaran que consumen botanas por sus beneficios nutricionales y el 40 % de los mismos buscan beneficios más allá de la nutrición básica. Sea como fuere, el sabor sigue siendo el parámetro determinante al momento de elegir una botana (International Markets Bureau, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

La industria de botanas tiene importancia a nivel mundial, ya que éstas son consumidas por todos los rangos de edades poblacionales y actualmente representa un considerable mercado en evolución, con ventas anuales estimadas en \$ 374 mil millones de dólares, distribuidos mayoritariamente en Europa (\$ 167 mil millones) y Norteamérica (\$ 124 mil millones). Si bien en América Latina, Asia-Pacífico y Medio Oriente/África las cantidades son mucho menores, representan las regiones que más crecieron en consumo respecto al año 2013, siendo América Latina la región que mostró cifras más elevadas (9 % de crecimiento) (The Nielsen Company, 2014).

Por ello, ha habido un especial interés en generar productos de éste tipo que puedan no sólo suplir las necesidades de saciedad sino también convertirse en alternativas de mayor valor nutricional y un beneficio para la salud. Tradicionalmente las botanas han sido asociadas con productos de bajo o nulo contenido nutricional y con altos aportes calóricos, lo que ha llevado a relacionarlas con la prevalencia de enfermedades no transmisibles como los problemas cardiovasculares, obesidad, diabetes y algunos cánceres.

Como alternativa saludable a los problemas anteriores, se propone la evaluación del potencial antiinflamatorio de una botana horneada a partir de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, ingredientes que fueron elegidos por ser de importancia en la alimentación tradicional de la población mexicana y debido a sus propiedades benéficas para la salud. Muchas de estas propiedades están relacionadas con los componentes con actividad biológica de la fracción no digerible, por lo que se propone la caracterización de estos, su fermentación y la evaluación del extracto de fermentación (EF) sobre la inducción de la inflamación en el modelo de macrófagos murinos RAW 264.7.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general:

Caracterizar y evaluar el potencial antiinflamatorio de la fracción no digerible de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido.

IV.2. Objetivos específicos:

1. Caracterizar los compuestos bioactivos de las materias primas y la botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido.
2. Evaluar en un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos presentes en la fracción no digerible de la botana.
3. Caracterizar los compuestos biodisponibles de la fracción no digerible de la botana.
4. Evaluar el potencial antiinflamatorio del extracto fermentado de la fracción no digerible en un modelo de macrófagos murinos RAW 264.7

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Reactivos

Se utilizaron α -amilasa, proteasa, amiloglucosidasa, (+)-catequina, ácido ferúlico, vainillina, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), Trolox, reactivo de Folin-ciocalteu, ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzzotiazolina-6-ácido sulfónico)) y kit de glucosa (GAGO20-KT) de la marca Sigma-Aldrich, medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, Estados Unidos), Albúmina Sérica Bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd.), Plasmina Sérica Bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd.); 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), Dimetil Sulfóxido (DMSO), Suero Fetal Bovino (SFB), antibióticos y antimicóticos de la marca Gibco (Gibco, Grand Island, New York); Proteasa, α -amilasa, pepsina, pancreatina y bilis bovina de la marca Sigma-Aldrich. Mouse Cytokine Antibody Array (R&D Systems), Pierce BCA Protein Assay Kit (Life Technologies).

Del mismo modo, se utilizaron acetona, etanol, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, éter etílico, éter de petróleo, ácido bórico, ácido sulfúrico, acetato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, fosfato monobásico de sodio monohidratado y metanol de la marca J.T. Baker.

V.2 Material Biológico

Se utilizaron seis ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 g., adquiridas del bioterio de la UNAM, Campus Juriquilla (Querétaro, México).

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, Estados Unidos).

V.3 Materia prima

Se utilizó maíz (*Zea mays* L.) y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) producidos por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y

Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Bajío. Asimismo, fue utilizado frijol común variedad Bayo Madero y maíz variedad PBN (Población Blanca del Noroeste), una población de grano blanco adaptada a regiones subtropicales e integrada con germoplasma resistente a enfermedades calidad de tallo; éste maíz tiene una textura de endospermo que varía de cristalina a semi-dentada y ha sido seleccionado para incrementar su contenido de aceite.

V.3.1 Acondicionamiento de la materia prima

V.3.1.1 Harina de Maíz

V.3.1.1.1 Proceso de Nixtamalización

Se llevó a cabo un proceso tradicional de nixtamalización de acuerdo a la metodología descrita por Serna-Saldívar *et al.*, (1990). Para la cocción, se utilizó una relación de maíz-agua de 1:2 (1 kg de maíz por cada 2 litros de agua). Se añadió una cantidad de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) equivalente a 1% en base al peso inicial del grano, con un tiempo de cocción aproximado de 40 minutos. Se dejó reposar por 8 horas y se lavará para eliminar los componentes orgánicos liberados y el exceso de calcio.

El grano nixtamalizado fue sometido a molienda en un molino de piedras y se sometió a deshidratación en un secador tipo industrial Flash a una temperatura de $250 \pm 10^\circ\text{C}$ durante 10 segundos. La harina obtenida fue dividida a la mitad y cada una de las partes se molió con un molino de martillo con mallas de 0.5 mm y 0.8 mm respectivamente. Finalmente, se integraron las dos partes de la harina y se almacenaron a 4°C protegiéndola de la luz.

V.3.1.2 Harina de Frijol

V.3.1.2.1 Proceso de cocción y secado

Se siguió la metodología descrita por Aparicio-Fernández *et al.* (2005), para lo que se tomó una relación de frijol-agua de 1:4. Se realizó un proceso de cocción de 2.5 horas a 95 °C. Una vez realizada la cocción, el frijol junto al caldo de cocción se secaron en un horno por convección a 60 °C durante 4 horas y el producto obtenido se molió y tamizó. Para ello, se utilizó una malla 60 para la reducción del tamaño de partícula. La harina obtenida se almacenó a 4 °C, protegiéndola de la luz.

V.4 Elaboración de la botana

Estudios previos realizados por Cuéllar-Núñez, (2015), elaboraron una botana horneada de 70 % de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y 30 % de harina frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, encontrándose que el horneado eléctrico obtuvo la mayor aceptación entre el panel sensorial que evaluó la botana obtenida. Por cada 100 g de mezcla de harinas maíz nixtamalizado/frijol cocido se añadieron 100 mL de agua y 1.5 % de sal, y se formó una masa por medio de una amasadora (110 RPM/15 minutos), siendo laminada la masa con 1.5 ± 0.2 mm de espesor (Coutiño-Estrada *et al.*, 2008). Las piezas se cortaron usando un troquelador triangular para obtener la forma de totopos.

Finalmente, los totopos fueron horneados utilizando un horno eléctrico precalentado a $180 \pm 2^\circ\text{C}$ por un tiempo de 32 min (Cuéllar-Núñez, 2015).

V.5 Composición química de harinas y totopos

Para la composición química y nutracéutica de las materias primas y botanas se realizó un molido y tamizado uniforme de las mismas con el fin de homogeneizar el tamaño de partícula.

V.5.1 Análisis proximal

Las harinas de frijol y maíz fueron analizadas utilizando las técnicas oficiales de la AOAC (2002).

V.5.1.1 Determinación de humedad (Método 925.10)

Se pesaron 2 g de muestra en una cápsula de aluminio previamente tarada a peso constante. Posteriormente, se colocaron en una estufa (previamente calentada) a $130 \pm 3^\circ\text{C}$ por 2 horas. La cápsula fue colocada en un desecador y se registró su peso. Se obtuvo el porcentaje de humedad por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{w_0 - w_f}{w_0} \times 100\%$$

Siendo:

w_0 : Peso inicial de la muestra

w_f : Peso final de la muestra

V.5.1.2 Determinación del extracto etéreo (Método 920.39)

Se pesaron 2 g de muestra en base seca en cartuchos de celulosa, los cuales se colocaron dentro del aparato de extracción Soxhlet. Asimismo, se adicionaron 100 mL de éter de petróleo a los matraces, previamente colocados a peso constante. Los matraces fueron colocados por un tiempo que extracción que dependió de la cantidad de muestra.

Una vez transcurrido el período de extracción, se evaporó el éter de petróleo hasta su completa eliminación y se secaron en estufa a 50°C por 4 horas. Finalmente, se pesaron los cartuchos y se determinó el porcentaje de extracto etéreo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ EE} = \frac{w_E - w_B}{w_1} \times 100$$

Siendo:

w_E: Peso del extracto
w_B: Peso del blanco
w₁: Peso de la muestra

V.5.1.3 Determinación de proteínas (Método 954.01)

Se pesaron 1 g de muestra previamente desgrasada y se colocaron en un matraz Kjeldahl, a la que se le adicionó 1 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de potasio anhidro y 15 mL de ácido sulfúrico. Tras adicionar los reactivos, se colocaron en un digestor y se calentaron gradualmente hasta alcanzar los 400°C.

Una vez observado un cambio en la coloración a verde claro, se detuvo el calentamiento y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 15 mL de agua destilada para la disolución completa del residuo al interior del matraz y 50 mL de solución de hidróxido de sodio al 40 %. Por otra parte, en un matraz Erlenmeyer, se añadieron 50 mL de ácido bórico al 4 % previamente preparado (conteniendo como indicadores: rojo de metilo y verde de bromocresol). Éste último se destiló hasta recolectar un total de 300 mL, en el que se observó el cambio en la coloración de morado a verde oscuro, y se valoró al retirarse del destilador con ácido clorhídrico 0.1N.

Como factor de conversión de nitrógeno a proteína se utilizó el valor de 6.25 (5.85 para frijol común de acuerdo a lo reportado por Campos-Vega *et. al*, 2009), basado en la suposición de que la proteína promedio alcanza un valor del 16 % de nitrógeno por unidad de peso. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{\text{mL} \times 0.1N \text{ HCl} \times 0.014}{\text{g muestra}} \times 100$$

$$\%P = \%N \times 6.25$$

V.5.1.4 Determinación de cenizas (Método 923.03)

Se pesaron 2 g de muestra en una cápsula de porcelana previamente tarada y se dejó carbonizar sobre la flama de un mechero de alcohol. Posteriormente, se colocaron en mufla a 550 °C, proceso que fue suspendido cuando las cenizas se tornen blancas, en un tiempo que depende del tipo de muestra. Luego de ello, se colocaron las cápsulas en un desecador para enfriar hasta temperatura constante y registrar el peso. El contenido de cenizas se determinó por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{w_c}{w_1} \times 100\%$$

w_c : Peso de las cenizas

w_1 : Peso de la muestra

V.5.2 Compuestos bioactivos

V.5.2.1 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

V.5.2.1.1 Obtención del extracto metanólico

Para la extracción de los compuestos fenólicos se siguió la metodología descrita por Cardador-Martínez *et al.* (2002). Brevemente, se molieron finamente 1 g de muestra (tamizada por malla 60) y se colocaron en un matraz de 50 mL, al que se le adicionaron 10 mL de metanol. El matraz se protegió de la luz recubriéndolo de papel aluminio y se mantuvo en agitación por 24 horas a 25 °C. Tras finalizar éste proceso, se transfirieron las muestras a tubos Corning y se centrifugarán a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrífuga HERMLE Z323K (Wehningen, Alemania). Finalmente, se recuperó el sobrenadante, del que se extrajo una alícuota de 50 µL para análisis, que fue almacenado por 4°C.

V.5.2.1.2. Análisis y Cuantificación de Compuestos Fenólicos por HPLC-DAD

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se utilizó la metodología desarrollada por Ramírez-Jiménez *et al.*, (2014). Brevemente, se llevó a cabo una cromatografía líquida acoplada a un detector con arreglo de diodos (HPLC-DAD) en un equipo HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, 4.6 x 250 mm, 5 μ m). La columna se controló mediante un termostato a 35 ± 0.6 °C y la tasa de flujo fue ajustada a 1 mL/min. La fase móvil constó de dos disolventes; el disolvente A: agua acidificada con ácido acético al 1 % y el disolvente B: acetonitrilo 100 %. Un gradiente lineal se utilizó como sigue: 80 % - 83 % de disolvente A durante 7 min, 83 % - 60 % durante 5 min, 60 - 50 % durante 1 min y 50 % - 85 % durante 2 min. La detección se realizó a 280 nm. Se inyectó un volumen de 50 μ L y las muestras se analizaron por duplicado. La cuantificación se llevó a cabo siguiendo el método estándar externo con estándares comerciales de (+)-catequina, rutina, quercetina, vainillina, elágico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico, clorogénico y ácido sinápico.

V.5.2.2. Análisis y Cuantificación de Oligosacáridos por HPLC

Para la extracción de oligosacáridos se siguió la metodología descrita por Díaz-Batalla *et al.*, (2006), consistente en la colocación en baño María a 80 °C una solución compuesta de 0.5 g de muestra a analizar disuelta en 10 mL de agua destilada, durante una hora con agitación continua. Terminado el tiempo, la solución se atemperó hasta la temperatura ambiente.

Para la identificación y cuantificación de oligosacáridos en HPLC se siguió la metodología descrita por Muzquiz *et al.* (1999)

donde el extracto de oligosacáridos fue inyectado en un HPLC acoplado a índice de refracción (IR) con las siguientes condiciones: volumen de muestra de 20 μ L, velocidad de flujo de 1 mL/min, fase móvil de acetonitrilo-agua 50:50 y fase estacionaria de columna ZORBAX 4.6 x 250 mm y 5 micras de tamaño de partícula. Los estándares que se utilizaron para la identificación y cuantificación mediante el uso de curva de calibración de oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa).

V.5.2.3. Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por Microextracción en Fase Sólida (SPME) con análisis por Cromatografía de Gases acoplada a masas (GC-MS) en el extracto fermentado de la fracción no digerible (EFFND)

Para la cuantificación de los AGCC se realizó microextracción en fase sólida de las muestras (SPME) con análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) de acuerdo a la metodología por Zamora-Gasca *et al.* (2015). Para ello, se tomaron muestras de los recipientes de cultivo por lotes y se centrifugaron (Hermle Z 323 K; Wehinger, Alemania) a 3500 x g durante 15 min a 4°C. Del sobrenadante de 500 mg se pesaron en un vial 20 mL que se taparon y se colocaron en un automuestreador Gerstel MPS2. Se utilizó una fibra de 2 cm de polidimetilsiloxan-divinilbencen-carboxano para la microextracción en fase sólida (SPME) donde las condiciones de extracción fueron las siguientes: la temperatura de extracción de 45°C, el tiempo de incubación de 5 min, la velocidad de agitación de 250 rpm por 120 min de extracción, se utilizó una temperatura de desorción de 240°C durante 10 min. Lo anterior mencionado se realizó para tres extracciones repetidas independientes para cada muestra.

Las muestras fueron analizadas en un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (CG-MS) Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA)

equipado con un detector selectivo de masas Agilent 597C VL y un automuestreador de usos múltiples MPS2 XL (Gerstel). La separación de las muestras en el CG se llevó a cabo en una columna capilar DB-5MS (60 m x 250 μ m x 0.25 μ m; Agilent) utilizando helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min. La inyección se llevó a cabo a una temperatura de 250°C y el origen del espectrómetro de masas y cuadrupolo se mantuvo a 230°C y 150°C respectivamente. El inyector se utilizó en un modo de sin división. La temperatura del horno se inició a los 40°C durante 5 min y se programó a 5°C/min desde 40 a 200°C, se mantuvo a 200°C durante 2 min, luego se programó a 20°C/min hasta 230°C y se mantuvo durante 15 min. La cuantificación de las muestras se obtuvo a través de curvas de calibración de los ácidos acético, propiónico y butírico.

V.5.2.4. Fibra total dietaria y almidón resistente

V.5.2.4.1 Fibra insoluble

Para la determinación de la fibra insoluble se utilizó la metodología descrita por Shiga *et al.* (2004). En un envase de vidrio color ámbar se agregaron 1 g de la muestra pulverizada y previamente desgrasada, 50 mL de solución amortiguadora de fosfato 0.08 mM a pH 6 y 100 μ L de α -amilasa. Posteriormente se incubó a 95 °C por 30 min en baño María con agitación continua.

A continuación, ajustó el pH a 7.5 con la muestra atemperada y se adicionaron 100 μ L de proteasa (5 mg/mL), incubándose a 60 °C por 30 min con agitación continua. Una vez se ajustó el pH a 4 con la muestra atemperada, se adicionaron 300 μ L de aminoglucosidasa y se incubaron por 30 min a 60 °C con agitación continua. Tras la incubación, se filtró con papel filtro Whatman No. 42 y se realizaron dos lavados con

15 mL de agua destilada a 60 °C y 15 mL de etanol al 80 %. El papel filtro se dejó secar a 60 °C por 24 horas y se registró el peso obtenido. La diferencia de peso entre los papeles filtro se atribuyó como la fracción de fibra insoluble obtenida.

V.5.2.4.2 Fibra soluble

Basado en el método de determinación de fibra insoluble de Shiga *et al.* (2004), el residuo obtenido en el inciso anterior (IV.4.2.2.5.2) se conservó y se filtró nuevamente, adicionando un volumen igual de etanol al 80 % y se dejó reposar por 12 horas. Después, se filtró con papel filtro Whatman No. 42 previamente pesado y se realizaron dos lavados con 15 mL de etanol al 80 % y dos con 15 mL de acetona. Finalmente, se dejó secar el papel filtro durante 24 horas a 60 °C y se registró su peso. La diferencia de pesos fue interpretada como la fracción de fibra soluble.

V.5.3 Digestión Gastrointestinal *in vitro*:

Se simuló todo el proceso digestivo (desde la boca hasta su fermentación en el colon) de la botana horneada de maíz nixtamalizado y frijol común, mediante la técnica adaptada y modificada por Campos-Vega *et al.* (2015). A continuación se describe la metodología por etapas que fue utilizada, incluyendo la participación de individuos sanos e intestinos de ratas, previo análisis y aprobación de éste protocolo por el Comité de Bioética de Universidad Autónoma de Querétaro y tomando en cuenta las disposiciones para el tratamiento de los animales de acuerdo a las pautas de CIOMS, en donde se establece que el correcto uso de animales debe conformarse de acuerdo a investigación médica en seres humanos, buscando medidas que eviten o minimicen riesgos y supervisen la seguridad. Asimismo, se consideró que la evaluación científica está vinculada a la ética, siendo ésta última esencial en la

consideración de los aspectos científicos de una propuesta y así determinar su validez (CIOMS, 2002).

V.5.3.1 Simulación de las condiciones de la boca:

En esta etapa, participaron 4 voluntarios sanos, que debieron de haber consumido su último alimento al menos 90 min antes del ensayo. Se les pidió que se enjuagaran la boca con agua antes de masticar la muestra.

Posteriormente, se les pidió a los voluntarios que masticaran 1 g de botana horneada de maíz nixtamalizado y frijol cocido durante 15 veces por 15 segundos, y se requirió que descargaran el contenido en un vaso de precipitado que contendrá 5 mL de agua destilada. A continuación, cada individuo se enjuagó la boca por 60 segundos con 5 mL de agua destilada y depositaron dicho líquido en el vaso anterior. Luego de ello, se mezclaron las suspensiones de cada muestra en un único vaso y se preparó un blanco que contenía únicamente agua destilada, que fue igualmente sometida al procedimiento de masticación ya descrito.

V.5.3.2 Simulación de las condiciones del estómago:

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

V.5.3.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado:

Para la etapa del intestino delgado, se prepararon previamente una disolución de 3 mg de hiel de buey con 2.6 mg de pancreatina, que serán disueltos en 5 mL de solución amortiguadora de Krebs-Ringer [la cual contenía 118 mM de NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM Glucosa y 2.5 mM CaCl₂) a pH 6.8 y preparada 30

minutos antes de ser utilizada]. La solución anteriormente indicada se añadió a la muestra y al blanco, donde su suspensión (15 mL) fue transferida a un recipiente que contuvo un saco intestinal invertido, obtenido de acuerdo a como se describe en los siguientes puntos.

V.5.3.3.1 Técnica del saco intestinal invertido utilizando ratas

Ésta fue preparada de acuerdo a la metodología adaptada y ligeramente modificada a la descrita por Campos-Vega *et al.* (2015).

V.5.3.3.1.1 Manejo de los animales

Se emplearon 5 ratas macho de la cepa Wistar (peso entre 250 y 300 g), clínicamente sanas, a las que se les realizó la verificación del sexo, peso y constancia de salud. Las ratas fueron mantenidas por 24 horas en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla. Se alojaron dos ratas por jaula de acero inoxidable (187 cm de ancho por 18 cm de alto) que permitieron la entrada de aire y luz, incorporando un clip a prueba de escape. Las ratas igualmente fueron mantenidas bajo condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10 \%$), ciclos día/noche de 12/12 h, temperatura adecuada ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), condiciones aceptables de limpieza y ventilación constante (NOM-062-Z00-1999).

Las ratas fueron alimentadas con alimento comercial Rodent Lab Chow 5001 (Nupec, Querétaro) y agua potable *ad libitum*. Dieciséis horas antes del sacrificio, se les retiró el alimento y únicamente se les dejó el agua, puesto que la técnica del saco invertido requiere que los animales tengan un ayuno de 16 h.

V.5.3.3.1.2 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal

Para el sacrificio, las ratas fueron anestesiadas en una cámara de éter etílico. Una vez anestesiadas, se les realizó una incisión abdominal en la línea media y luego, corte en la aorta para su muerte instantánea. A continuación, se les expuso el intestino, y fue escindido un segmento de 20-25 cm del yeyuno proximal de cada rata, que fue colocado en una solución amortiguadora de Krebs-Ringer gasificado con CO₂ y mantenido a 37°C. El segmento de intestino removido se lavó con la misma solución amortiguadora para retirar residuos y posteriormente fue volteado suavemente sobre una varilla de vidrio y cortado en segmentos de 6 cm de longitud (aproximadamente), que se ligaron de un extremo (éste procedimiento se realizó con los segmentos de intestinos sumergidos en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer para evitar la pérdida de viabilidad del tejido).

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

Luego del período de incubación los sacos fueron retirados y la parte de las muestras contenida en el recipiente (posterior a retirar el saco intestinal), se denominó fracción no digerible (FND), que fue congelada a -80 °C para su posterior cuantificación. Asimismo, la fracción no absorbible o fracción indigerible (FI), fue sometida al mismo proceso descrito

(liofilización y almacenamiento a -80°C). Los experimentos se realizaron por triplicado.

V.5.3.3.1.3 Manejo de los animales después del sacrificio

Debido a que éste estudio sólo tiene como interés el estudio del intestino de los animales, los órganos y tejidos restantes fueron almacenados en bolsas color rojo y congelados a -70°C. Las bolsas se marcaron con la leyenda “desechos patológicos” y fueron almacenadas por un período máximo de 15 días hasta su debido transporte e incineración, como procede con las muestras biológicas (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

El material quirúrgico utilizado se dejó remojando con cloro por 12 h, se lavó posteriormente y esterilizó para su ulterior almacenamiento.

V.5.3.3.2 Fermentación *in vitro* de la FND

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

Se prepararon tubos estériles (15 mL) con 9 mL de medio de cultivo basal que contuvieron (g/L): agua peptonada 2.0, extracto de levadura 2.0, cloruro de sodio 0.1, fosfato dibásico de potasio 0.04, fosfato monobásico de potasio 0.04, sulfato de magnesio

heptahidratado 0.01, cloruro de calcio dihidratado 0.01, carbonato de sodio 2.0, cisteína HCl 0.5, sales biliares 0.5, Tween-80 2 mL y hematina 0.2 g (previamente diluida en 5 mL de NaOH). Se sellaron los tubos y se mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia que contenía una mezcla de gases (H₂- CO₂-N₂: 10:10:80, volumen) durante 12 horas. El inóculo fecal (3 g de materia fresca) se homogenizó con 27 mL de solución de fosfato de sodio 1 M pH 7.0. Los tubos que contenían el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 mL de homogenizado fecal y se adicionaron 0.250 mg y 0.25 mL de la FND, excepto para el control negativo. Se agitaron los tubos con vórtex durante 30 s y se incubaron en baño de agua a 37 °C. Se mantuvo un flujo continuo de la mezcla de gases hasta el término de la fermentación (24 h). Durante la fermentación, el pH y la producción de AGCC se determinaron a las 0, 6, 12 y 24 h. La fermentación se detuvo centrifugando y congelando las muestras a -70 °C hasta su análisis.

V.5.3.3 Cálculos

V.5.3.3.1. Coeficiente de permeabilidad aparente (CP o P_{app}), Coeficiente de permeabilidad neta (CP_{neto} P_{app neto}) y Relación de Flujo de Salida

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

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

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

de la mucosa (fuera del saco intestinal, es decir, la concentración del metabolito a calcular que provenía de la fase estomacal) y C_f es la concentración en el lado serosal luego de un tiempo determinado (en minutos).

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

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

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

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

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

V.5.3.3.2. Flujo de Agua (FA)

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

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

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

V. 5.3.3.3. Bioaccesibilidad de compuestos

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

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

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

V.5.5. Capacidad Antioxidante

V.5.5.1. Método DPPH:

Esta determinación se llevó a cabo de acuerdo a la técnica propuesta por Fukumoto & Mazza (2000), adaptado a microplaca. Se añadieron 20 μL de extracto metanólico o muestra de digestión y 200 μL de solución de DPPH en microplaca. Asimismo, se añadieron 20 μL de metanol y 200 μL de DPPH como solución control. Las muestras se prepararon por triplicado y la lectura se realizó cada 10 minutos durante 90 minutos a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro de UV-VIS (Thermo Scientific). La capacidad antioxidante fue calculada (en μmol equivalentes de Trolox/g de muestra), utilizando como comparación una curva estándar de Trolox previamente preparada.

V.5.5.2. Método ABTS:

La capacidad antioxidante del radical ABTS (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) se realizó de acuerdo a la metodología de Nenadis *et al.* (2004), en microplaca. Los radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$ fueron generados por la adición de 88 μL de una solución 140 mM de persulfato de potasio a 5 mL de una solución de sal diamonio ABTS (7 mM) al 98%, la cual fue

guardada en vial oscuro y se dejó actuar por al menos 12 horas a temperatura ambiente.

Pasadas las 12 horas, se mezclaron 500 μL de la solución de radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$ con la cantidad suficiente de etanol hasta que la absorbancia estuviera entre 0.7 y 1.0, la cual se verificó en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 734 nm. Una vez realizado este procedimiento, se procedió a adicionar en una placa de 96 pozos 20 μL de muestra y 230 μL de nueva solución etanólica de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, verificando de cubrir los pocillos con parafilm y papel aluminio para evitar la volatilización del metanol y la degradación por la luz del radical.

La capacidad antioxidante fue calculada (en μmol equivalentes de Trolox/g de muestra), utilizando como comparación una curva estándar de Trolox previamente preparada.

V.5.6 Cultivo Celular

La línea celular RAW 264.7 de macrófagos murinos se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10 %, Gibco, Grand Island, New York), antibióticos y antimicóticos (1 %), bicarbonato sódico (1.5 g/mL) y piruvato de sodio (0.1 %). El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada tercer día hasta alcanzar la confluencia. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C bajo una atmósfera humidificada de CO_2 (5%) en una incubadora Thermo Scientific 3100. Las células fueron manejadas en una cámara de bioseguridad (NuAire) (López-Barrera *et al.*, 2016)

IV.5.6.1. Ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para viabilidad celular

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por parte de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo así determinar la funcionalidad mitocondrial de

las células tratadas. El método ha sido muy utilizado para medición de supervivencia y proliferación celular, donde la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Castro de Pardo, 2006).

Las células RAW 264.7 se sembraron en cajas de 96 pozos (ρ : 1×10^4 células/pozo) en medio de cultivo DMEM, adicionado con suero fetal bovino (10%), antibióticos y antimicóticos (1%). A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por el mismo DMEM pero ahora suplementado con 0.5 % de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd.) conteniendo 0 % (control), 5, 7.5, 10, 15, 20 y 25 % del extracto fermentado de la fracción no digerible o EFFND, posterior a la fermentación colónica, del totopo de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido. Cada una de estas soluciones fue preparada mezclando el extracto fermentado con lipopolisacáridos (LPS) para estimular la inflamación, en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Un ensayo similar pero sin la adición de lipopolisacáridos se llevará a cabo para determinar el efecto del extracto solo sobre viabilidad celular.

Para ésta técnica se trabajó con luz apagada y protegiendo los reactivos y la placa de la luz. Como control positivo se utilizó una solución de sólo lipopolisacáridos (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Todos los tratamientos se incubaron por otras 24 h a 37°C en atmósfera humidificada de 5% CO_2 .

Transcurrido dicho tiempo, el medio gastado fue retirado y se apartó para la medición de la producción de óxido nítrico (NO). A las células tratadas de cada pocillo de la placa se les añadió 200 μL de una solución preparada previamente de MTT disuelto en medio DMEM a una concentración de 0.5 mg MTT/mL libre de suero fetal bovino. La placa se incubó durante 2 h.

Luego de la incubación, el colorante que quedó sin reaccionar se retiró y los cristales de formazán, formados a partir de MTT, fueron disueltos en DMSO. Una vez finalizado ello, la placa se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a $\lambda=570$ nm en un espectrofotómetro. La viabilidad de las muestras fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \cdot 100$$

Los experimentos se realizaron por duplicado para su posterior evaluación estadística. Del mismo modo, los resultados fueron utilizados para la elaboración de una curva dosis-respuesta, buscando calcular el IC₅₀ o la Concentración Inhibitoria Máxima Media de las células sometidas al ensayo con el extracto fermentado del EFFND

IV.5.6.2 Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos (LPS)

La acumulación de nitrito, un indicador de la producción de NO, se determinará en el sobrenadante del cultivo mediante el ensayo colorimétrico del reactivo de Griess. Los macrófagos RAW 264.7 se trataron de forma similar a la descrita en el numeral anterior de viabilidad celular. En resumen, las células fueron incubadas con medio base o LPS adicionado con el extracto fermentado de la fracción no digerible (EFFND) del totopo de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido a diferentes concentraciones conteniendo 0 (control), 10, 20, 30, 40 y 50 % durante el tiempo de fermentación que haya presentado la mayor concentración de compuestos bioactivos. Pasado este tiempo, se retiraron 100 µL del medio gastado con ayuda de una pipeta multicanal y se pasarán a una nueva placa de 96 pozos.

Posteriormente, a cada pozo de la placa que contenía el medio gastado se les añadió 100 µL de Reactivo de Griess [sulfanilamida al 1% disuelta en 5% de ácido fosfórico y 0.1% N (1-naftil) etilendiamina Dihidrocloreuro disuelta en agua] y se incubaron durante 10 min en la oscuridad. La cantidad total de nitrito presente se calculó sobre la base de la absorbancia de las muestras a λ=550 nm a partir de una curva estándar de nitrito de sodio. Los experimentos se hicieron por duplicado para su evaluación estadística.

V.6 Análisis Estadístico

Para el estudio nutrimental y nutracéutico los resultados que se obtuvieron se expresaron como la media \pm desviación estándar. Cada uno de los valores se obtuvo a partir de tres réplicas de manera independiente y aleatoria. Las diferencias entre medias se analizaron por el método de Tukey utilizando el programa JMP versión 8.1. Las diferencias entre medias del mismo tipo se analizaron por la prueba *t* de Student. Las diferencias entre las medias y un control se analizaron por la Prueba de Dunnett.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Contenido de proteína, lípidos, ceniza, humedad y carbohidratos en materia prima y totopos:

En el Cuadro 4 se presentan los resultados del análisis químico proximal de los granos crudos de maíz (*Zea mays* L., var. PBN) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L., var. Bayo Madero), harina de maíz nixtamalizado, harina de frijol cocido y totopo horneado con mezcla de 70 % harina de maíz nixtamalizado y 30 % harina de frijol cocido.

Cuadro 4. Contenido de proteína, lípidos, ceniza, humedad y carbohidratos de materia prima y totopo de mezcla de maíz y frijol.

Muestra	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	Humedad (%)	Carbohidratos (%)
MC	10.25 ± 0.23 ^a	7.90 ± 0.16 ^a	1.34 ± 0.01 ^a	10.95 ± 0.09 ^a	68.67 ± 0.24 ^a
HMN	12.69 ± 0.05 ^b	7.33 ± 0.06 ^b	1.58 ± 0.01 ^b	9.54 ± 0.05 ^b	69.43 ± 0.04 ^a
FC	21.17 ± 0.80 ^c	1.34 ± 0.02 ^c	3.98 ± 0.09 ^c	9.27 ± 0.02 ^c	62.79 ± 0.84 ^b
HFC	22.87 ± 1.72 ^c	1.40 ± 0.10 ^c	3.84 ± 0.13 ^c	6.85 ± 0.13 ^d	66.28 ± 1.93 ^c
T7030	17.08 ± 0.20 ^d	5.13 ± 0.34 ^d	3.57 ± 0.05 ^e	6.48 ± 0.04 ^e	70.34 ± 0.26 ^d
TC	8.11 ± 0.39 ^e	21.45 ± 1.45 ^e	1.67 ± 0.01 ^f	1.83 ± 0.14 ^f	66.94 ± 1.99 ^e

MC: Maíz Crudo; HMN: Harina de maíz nixtamalizado; FC: Frijol crudo; HFC: Harina de frijol cocido; T7030: Totopo horneado con mezcla de 70 % de harina de maíz nixtamalizado y 30 % de harina de frijol cocido; TC: Totopo comercial frito con mezcla frijol-maíz. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca, excepto la determinación de humedad). Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas en la Prueba *t* de Student para el mismo tipo de materia prima (MC y HMN; FC y HFC; HT y HTC).

De acuerdo con los valores obtenidos en el Cuadro 4, se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el contenido de proteínas entre el maíz crudo y la harina de maíz nixtamalizado, así como entre los dos tipos de totopos evaluados, pero no entre el frijol crudo y la harina de frijol cocido. El contenido de proteína para el maíz crudo fue de 10.25 %, por debajo de lo reportado por Vázquez-Carrillo *et al.* (2014) (13.1 %) y por encima de lo reportado por Cuéllar-Núñez (2015), (7.14 %), para la misma variedad de maíz. Estos contenidos de proteína son mayores a los encontrados en otras variedades de maíz comerciales, debido a que

en los mismos, para la variedad de maíz utilizada (PBN), el mayor tamaño del germen aumenta el contenido de proteína (White & Weber, 2003); en efecto, Preciado-Ortiz *et al.* (2013) reporta proporciones de germen respecto al total del grano de 8.08 % al 9.93 %. Los valores de proteínas encontrados para harina de maíz nixtamalizado son similares a los reportados por Cuéllar-Núñez, (2015), y Treviño-Mejía *et al.* (2013), (11.98 % y 9.43 %), y sus diferencias significativas en el contenido proteico respecto al maíz crudo pueden deberse al tiempo de remojo y cocción del maíz, ya que durante la nixtamalización la pérdida de material (pericarpio y porciones de germen) pudo incrementar la proporción proteica en la harina de maíz nixtamalizado (Rojas-Molina *et al.*, 2008).

Respecto al contenido de proteína en frijol crudo, los resultados coinciden dentro de lo reportado por Sánchez-Arteaga *et al.* (2014), para niveles de proteínas de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo (19.7 % - 23.6 %), aunque los valores son menores a los reportados por Cuéllar-Núñez (2015), y Campos-Vega *et al.* (2009), (29.58 % y 14.2 %, respectivamente) pero similares a los reportados por Meza-Rivera (2011), (21.60 %) para la misma variedad de frijol. Para los valores de proteína de frijol cocido, estos son menores a los reportados por Cuéllar-Núñez (2015), (29.65 %) y mayores a los reportados por Campos-Vega *et al.* (2009), (16.2 %), diferencias que podrían ser debidas al método de cocción utilizado donde hay cambios en las estructuras de las proteínas del frijol, modificando su solubilidad y provocando posible pérdida de las mismas en el agua de cocción, modificando los valores reportados (Ferreira *et al.*, 2014; Naozuka & Oliveira, 2012).

Mientras que el contenido de proteínas del totopo fue menor al reportado por Cuéllar-Núñez (2015) (15.36 %), resultado que puede deberse al menor contenido de proteína de la harina de frijol cocido utilizada en la elaboración de la botana, aunque son similares a lo reportado por Meza-Rivera (2011), que obtuvo un contenido de proteínas para una botana horneada de harina de maíz nixtamalizado comercial y harina de frijol cocido var. Bayo Madero de 10.15 %. Asimismo, estos valores de proteínas son superiores a los reportados por Anton *et al.* (2009) para

botanas extruidas de almidón de maíz adicionadas con 30 % harina de frijol común cocido, siendo del 6.88 % y 6.23 % cuando es adicionada la variedad *Navy* y *Small Red*, respectivamente. El totopo horneado presentó un contenido proteico mayor al comercial, explicado por los contenidos de proteína de sus materias primas originarias, considerando que para este totopo comercial gran parte de su constitución era maíz.

El contenido de lípidos en el maíz crudo presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) con la harina de maíz nixtamalizado, donde el contenido lipídico del maíz crudo fue superior al reportado por Vázquez-Carrillo *et al.* (2014), (5.5 %). Si bien estos contenidos de lípidos en la variedad utilizada son mayores a los reportados para variedades comerciales de maíz, que fluctúan entre 2 % y 6 % (Serna-Saldívar, 2010), es de destacar que el perfil de ácidos grasos para las variedades de maíz de alto contenido de aceite se caracteriza por contener del 78.92 % al 84.76 % del total de ácidos grasos conformado por ácido oleico (OLA) y Linoleico (LOA) (Preciado-Ortiz *et al.*, 2013). Por otra parte, la reducción en el contenido de lípidos entre la harina de maíz crudo y la harina de maíz nixtamalizado pueden deberse a la pérdida del pericarpio, el pedicelo o parte del germen durante el proceso de nixtamalización ya que éstas son las partes del grano en las que se concentra la mayor cantidad de lípidos (Paredes-López *et al.*, 2009). Es importante establecer que esta mayor riqueza en lípidos se buscó adicionar al totopo con el objetivo de aportar un contenido graso propio de la materia prima y no por parte del procedimiento de elaboración.

Por lo que respecta para el contenido lipídico de la harina de frijol crudo y cocido, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), habiéndose determinado mayores contenidos de lípidos en harina de frijol crudo que lo reportado por Cuéllar-Núñez (2015), (1.24 %) pero menores contenidos para la harina de frijol cocido para el mismo autor (1.99 %). Ambas cuantificaciones presentadas en este trabajo fueron mayores a las reportadas por Campos-Vega *et al.* (2009), para la misma variedad de frijol (0.8 % y 0.9 % respectivamente para frijol crudo y cocido), por lo que no hay diferencias significativas en el contenido lipídico de frijol crudo y

cocido. La importancia biológica de la presencia de lípidos en el frijol está relacionada con la formación de complejos entre estos y la amilosa que podrían desarrollarse durante la cocción de esta leguminosa y así afectar la disponibilidad de almidón (Carmona-García *et al.*, 2007).

Para el caso de la botana horneada, el contenido de lípidos es mayor al reportado por Cuéllar-Núñez (2015), (4.30 %) y menor a lo reportado por Meza-Rivera (2011), para botanas fritas de mezcla de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido (11.42 %), diferencias dadas por el procedimiento de obtención de la botana. Asimismo, el contenido de lípidos del totopo horneado presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) con el totopo comercial debido al proceso de elaboración de este último, considerando que la fritura añade alto contenido de aceite a los productos, cuyos porcentajes de grasa pueden variar entre el 24 % y 27 % para el caso de tostadas fritas (Morales y Vélez, 2010) y del 20 % al 25 % para los totopos fritos (Vélez, 2004).

En lo que respecta al contenido de cenizas presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la harina de maíz crudo y la harina de maíz nixtamalizado. El contenido de cenizas de la harina de maíz crudo y harina de maíz nixtamalizado fueron similares a los reportados por Cuéllar-Núñez (2015) (1.21 % y 1.53 %, respectivamente) para la misma variedad de maíz. Ullah *et al.* (2010) reportan valores de cenizas para diferentes variedades de maíz crudo entre 0.70 % y 1.20 %, por lo que el valor reportado en este trabajo se acerca a esta cuantificación. Flores-Farías *et al.* (2002) reportaron, para harinas comerciales de maíz nixtamalizado, porcentajes de minerales de 1.35 %, menores a los reportados en este trabajo. Estos resultados coinciden con el comportamiento del proceso de nixtamalización, el cual contribuye, entre otros beneficios, a la mejora de la calidad nutricional del maíz impidiendo la pérdida de nutrimentos por lixiviación durante la cocción, ya que la capa de aleurona permanece alrededor del grano y permite la incorporación de calcio de alta biodisponibilidad, incrementando la relación calcio: fósforo de 1:20 en el maíz hasta 1:1 en productos como las tortillas (Bressani, 2008). Sin embargo, ha sido reportado que el contenido de cenizas en el maíz puede

reducirse ligeramente (especialmente de los niveles de calcio), si se deja en reposo por un tiempo de 8 a 10 horas (Bressani *et al.*, 2004)

También se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el contenido de cenizas entre la harina de frijol crudo y la harina de frijol cocido, siendo el valor de éste último menor al reportado por Cuéllar-Núñez (2015), (1.99 %) y menor que el de la harina de frijol crudo. Este comportamiento es similar en comparación con los datos reportados por Campos-Vega *et al.* (2009), el contenido de cenizas de la harina de frijol crudo es similar (3.7 %), pero los valores para la harina de frijol cocido son menores al cuantificado por los autores en mención (3.7 %), diferencias que pudieron ser dadas por las diferencias de año de cosecha (Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014). Aunque Dueñas *et al.*, (2016) reportó posibles reducciones en los contenidos de minerales por la lixiviación de estos al agua de cocción, éste procedimiento no es del todo negativo puesto que ayuda a descartar factores antinutricios (Fernandes *et al.*, 2010). A pesar de ello, la integración del agua de cocción junto al frijol evitó tener reducciones importantes en su contenido de minerales.

El contenido de cenizas en la harina de totopo horneado fue menor a la reportada por Cuéllar-Núñez, (2015), (4.34 %), reducción que pudo haberse debido a la mayor pérdida de minerales de la harina de frijol cocido de partida en la elaboración de la botana. Por su parte, el contenido de cenizas en el totopo comercial frito fue menor, debido a la constitución del mismo, ya que de acuerdo a las indicaciones del fabricante, está constituido en su mayoría por maíz y contiene cantidades bajas de cuatro variedades de frijol: Azuki, Negro, Pinto y Rojo.

En el contenido de humedad se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la harina de maíz crudo y la harina de maíz nixtamalizado, entre la harina de frijol crudo y la harina de frijol cocido y los dos tipos de totopos evaluados ($p > 0.05$). Para la harina de maíz crudo, los resultados son similares a los reportados por Cuéllar-Núñez (2015), (10.05 %), donde las posibles diferencias pueden ser debidas al tipo de almacenamiento del maíz y la posibilidad de incorporar humedad con el paso del tiempo, puesto que se utilizó el mismo año de cosecha (2014). Para el caso de la harina de maíz nixtamalizado, el valor es mayor

al reportado por Cuéllar-Núñez (2015), diferencias debidas a las condiciones de secado de la harina y almacenamiento en refrigeración. Los contenidos de humedad de las harinas de frijol crudo y cocido son similares a los reportados por Cuéllar-Núñez (2015), (7.47 % y 9.73 %, respectivamente) y Meza-Rivera (2011), para frijol crudo (9.61 %). El contenido de humedad del totopo horneado fue mayor al reportado por Cuéllar-Núñez (2015), (3.53 %), diferencias obtenidas por modificaciones al método de cocción y las características del horno utilizado.

El contenido de carbohidratos de la harina de maíz crudo no presentó diferencias significativas con la harina de maíz nixtamalizado ($p > 0.05$) pero sí hubo diferencias entre la harina de frijol crudo y cocido. Para las harinas de maíz, los contenidos de carbohidratos se encuentran dentro de lo reportado por Cuéllar-Núñez (2015), (74.63 % y 70.27 %, respectivamente para MC y HMN, en la misma variedad de maíz). Autores como Vásquez-Carrillo *et al.* (2014) reportaron valores de almidón total equivalentes a 70.4 % para la misma variedad de maíz crudo, un valor que se aproxima al encontrado en este trabajo, aunque este fue de carbohidratos totales. Además, se ha reportado que los cambios en el contenido de carbohidratos durante el proceso de nixtamalización son bajos y estos son principalmente en el contenido de almidón, alcanzándose pérdidas cercanas al 5%, que son recuperadas en el agua del nixtamal (Bressani, 2008).

Frente al contenido de carbohidratos de las harinas de frijol, las diferencias encontradas se explican en que el proceso de cocción del frijol en agua provoca la pérdida de carbohidratos solubles, los cuales migran hacia el agua de cocción, especialmente los azúcares totales solubles, azúcares reductores y azúcares no reductores. Se ha reportado que las pérdidas de carbohidratos en frijol pueden variar en porcentajes que van del 2.5 % – 13.6 % para azúcares solubles y del 4.27 % - 39.50 % para almidón (Rehman *et al.*, 2001). El contenido de carbohidratos del totopo es similar al reportado por Cuéllar-Núñez (2015), (72.48 %) para la misma proporción de HMN y HFC.

VI.2. Potencial Nutracéutico:

VI.2.1. Contenido de fibra dietaria:

En el Cuadro 5 se presentan los resultados del contenido de fibra dietaria total, soluble e insoluble en materia prima y totopos evaluados:

Cuadro 5. Contenido de fibra dietaria total, soluble e insoluble y almidón resistente en materia prima y harinas de maíz, frijol y totopos.

	Fibra Total (%)	Fibra Insoluble (%)	Fibra Soluble (%)
MC	12.26 ± 1.40 ^a	10.46 ± 0.71 ^a	1.79 ± 0.70 ^a
HMN	7.99 ± 0.18 ^b	6.06 ± 0.17 ^b	1.93 ± 0.34 ^a
FC	17.68 ± 1.77 ^c	14.89 ± 1.00 ^c	2.79 ± 0.76 ^b
HFC	20.92 ± 0.76 ^d	15.99 ± 1.06 ^c	4.92 ± 0.76 ^c
T7030	17.13 ± 1.38 ^e	15.75 ± 1.22 ^d	1.39 ± 0.16 ^d
TC	14.06 ± 0.65 ^f	11.95 ± 0.52 ^e	2.11 ± 0.13 ^e

MC: Maíz Crudo; HMN: Harina de maíz nixtamalizado; FC: Frijol crudo; HFC: Harina de frijol cocido; T7030: Totopo horneado con mezcla de 70% de harina de maíz nixtamalizado y 30% de harina de frijol cocido; TC: Totopo comercial frito con mezcla frijol-maíz. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca). Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas en la Prueba *t* de Student para el mismo tipo de materia prima (MC y HMN; FC y HFC; HT y HTC).

De acuerdo a los valores del Cuadro 5, el contenido de fibra total presentó diferencias estadísticamente significativas entre las materias primas del mismo tipo y los dos tipos de totopo evaluados ($p > 0.05$). Cabe destacar que sólo para las harinas de maíz no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la fracción soluble de la fibra ($p > 0.05$); y para las harinas de frijol no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la fracción insoluble de la fibra ($p > 0.05$).

Los valores de fibra total e insoluble son menores a los reportado por Cuéllar-Núñez, (2015), para la misma variedad de maíz crudo (18.99% y 1.97 % respectivamente para maíz crudo) aunque similares para harina de maíz nixtamalizado (7.05 %, 6.02 % y 1.03 % respectivamente para fibra total, insoluble y soluble). Grajales-García *et al.* (2012) reporta contenidos menores de fibra total

digerible para masa de maíz nixtamalizado de alta calidad proteica (7.89 %) a los reportados en este trabajo, aunque cabe destacar que la variedad de maíz y el año de cosecha fueron diferentes (Maíz de alta calidad proteica var. Ancho, cosecha 2009). Otras alternativas que explican los cambios observados en los contenidos de fibra de las fracciones solubles e insolubles del maíz pueden ser atribuidas al tratamiento térmico alcalino, donde el desprendimiento del pericarpio provoca una reducción en la proporción total de fibra para el maíz (Bressani, 2008), explicándose así las diferencias encontradas en el contenido total de fibra de las harinas de maíz. Por otra parte, se ha reportado un incremento en la fibra soluble al reducirse el peso molecular de las sustancias solubles unidas a polisacáridos en la nixtamalización, comportamiento que también es observado en las harinas de frijol, donde se solubilizan algunos compuestos ligados a la fracción insoluble como los azúcares simples por la degradación de los polisacáridos pécticos y la celulosa (Cabrejas *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2007).

Los valores de fibra total, soluble e insoluble obtenidos para las harinas de frijol son menores a los reportados por Meza-Rivera, (2011), para la misma variedad de frijol, aunque es de destacar que en el caso de Meza-Rivera, (2011), el frijol fue sometido a un proceso de extrusión, del cual se ha reportado que ocasiona incremento en la fracción soluble de la fibra de frijol hasta en un 9.2 % (Martín-Cabrejas *et al.*, 1999, Campos-Vega *et al.*, 2009), para la misma variedad de frijol crudo, reportaron valores superiores de fibra insoluble a los encontrados en este trabajo (25.2 %) aunque menores de soluble (0.6 %); para el caso de la harina de frijol cocido, por la misma metodología, Campos-Vega *et al.*, (2009), reporta valores mayores de fibra insoluble y soluble (41 % y 14 %, respectivamente). La fibra insoluble dietaria constituye la mayor fracción de fibra en el frijol común, representando cerca del 79 % del total de fibra, mientras que la soluble representa hasta el 29 % aproximadamente en el frijol. El grado de solubilización de fibra va a depender de la polimerización de la fibra insoluble a soluble (Dueñas *et al.*, 2016). Por otra parte, las diferencias encontradas pueden ser atribuibles a que, aun tratándose de la misma variedad de frijol, los años de cosecha con diferentes,

tomando en cuenta que las condiciones ambientales varían considerablemente de un año a otro (Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014).

En el caso del totopo horneado, los contenidos de fibra insoluble son mayores a los reportados por Cuéllar-Núñez, (2015), para el mismo tipo de totopo (17.94 %), diferencias dadas por el mayor aporte de fibra de la harina de maíz nixtamalizado utilizada en relación a su mayor tiempo de cocción alcalina (14 horas contra 12 horas al que lo sometió Cuéllar-Núñez). Sin embargo, este totopo horneado no presentó diferencias estadísticamente significativas con el control comercial utilizado en los porcentajes de fibra total y fibra insoluble, pero sí en los de fibra soluble ($p > 0.05$), algo que pudiera ser explicado por el tipo de procesamiento de ambos tipos de totopo. Hasta donde se tiene revisado no hay datos para totopos y menos aún horneados, sin embargo, los valores de fibra total de la botana horneada son similares a los reportados por Mora-Avilés *et al.* (2007) para tortillas de maíz de calidad regular nixtamalizado, enriquecidas con harina de frijol común cocido (21 %) y menores para las mismas tortillas pero aquellas elaboradas con maíz de alta calidad proteica (34 %). En este mismo orden de ideas, Santiago-Ramos *et al.* (2015), para tortillas elaboradas 100 % maíz, reporta valores de fibra dietaria total para diferentes concentraciones de sales de calcio, similares a los reportados en este trabajo (12.2 % - 19.7 % de fibra total), e igualmente para valores de fibra insoluble (1.7 % - 3.2 %). Para frituras de papa, Thed & Phillips, (1995) reportaron que no existen diferencias significativas en los contenidos de fibra total y fibra soluble para procesos de fritura profunda y horneado, aunque sí para fibra insoluble, explicándolo a través del aumento en los contenidos de almidón resistente, el cual fue correlacionado con la fibra insoluble, por la formación de complejos amilosa-lípidos, que son resistentes a la ruptura de amilosa. Aunque el comportamiento descrito no coincide con los resultados obtenidos, pudieron deberse al método de cuantificación, que no contaba con las correcciones hechas por la AOAC hoy en día donde se incluyen valores de fibra dietaria de bajo peso molecular, componentes como inulina y polidextranos y algunos tipos de almidón resistente (Megazyme, 2016).

VI.2.2. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en materia prima y harinas:

En el Cuadro 6 se muestran los resultados de la cuantificación por HPLC de diferentes compuestos fenólicos:

Cuadro 6. Contenido de compuestos fenólicos de materias primas y harinas de totopos

	Ácido Gálico ¹	Ácido Clorogénico ¹	Ácido Cafeico ¹	Ácido p-Cumárico ¹	Ácido Ferúlico ¹
HMN	55.39 ± 0.51	24.86 ± 2.25	ND	65.02 ± 1.03	132.88 ± 11.39
HFC	37.67 ± 1.43	12.37 ± 3.12	ND	ND	ND
T7030	50.39 ± 2.93 ^a	ND	11.08 ± 0.50	19.59 ± 2.01 ^a	71.97 ± 8.31 ^a
TC	88.65 ± 10.91 ^b	ND	ND	6.50 ± 0.53 ^b	31.64 ± 2.54 ^b

HMN: Harina de maíz nixtamalizado; HFC: Harina de frijol cocido; T7030: Totopo horneado con mezcla de 70% de harina de maíz nixtamalizado y 30% de harina de frijol cocido; TC: Totopo comercial frito con mezcla frijol-maíz. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca). Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas en la Prueba *t* de Student para el mismo tipo de materia prima (HT y HTC).

¹ Contenido de compuestos fenólicos en µg compuesto/g de muestra.

De acuerdo a los resultados expresados en el Cuadro 6, el compuesto fenólico mayoritario en la harina de maíz nixtamalizado es el ácido ferúlico, uno de los tres ácidos mayoritarios en el grano de maíz (además del p-cumárico y el sinápico) (Salinas-Moreno *et al.*, 2007). El contenido de ácido ferúlico encontrado es mayor al reportado para variedades de maíz blanco (120 µg/g muestra) y amarillo (102 µg/g muestra) (Singh *et al.*, 2011) sin nixtamalizar, hallazgo que coincide con el comportamiento de éste compuesto en la cocción alcalina del maíz, la cual incrementa el contenido de ácido ferúlico libre y conjugado al presentarse una ruptura del enlace éster de los mismos a las heteroxilanas, que constituyen las hemicelulosas del maíz (Duodu *et al.*, 2003). Asimismo, estos hallazgos son similares a los reportados por De la Parra *et al.* (2007) para masa y chips de tortilla fritos elaborados a partir de harina de maíz nixtamalizado de otra variedad.

Respecto al ácido p-cumárico, se ha reportado su presencia en harina de maíz nixtamalizado aunque se ha indicado que la cocción térmico-alcalina provoca

una degradación de varios compuestos fenólicos, especialmente de los ácidos hidroxicinámicos que son liberados conforme avanza la nixtamalización (Salinas-Moreno *et al.*, 2007). También se ha reportado la presencia de ácido cafeico en maíz en forma de compuesto fenólico libre que le confiere a la planta protección contra plagas de insectos como *Sesamia nonagrioides* (Santiago *et al.*, 2005) y como uno de los principales compuestos fenólicos presentes en variedades pigmentadas de maíz junto al ácido clorogénico (Ramos-Escudero *et al.*, 2012)

En el caso de la harina de frijol cocido, para el contenido de ácido gálico de las muestras evaluadas, el contenido es menor al reportado por Ramírez-Jiménez *et al.* (2014) (128.18 µg/g muestra). Respecto al ácido clorogénico, su contenido es menor al reportado por Islas-Gómez (2015), (36.51 µg/g muestra). Tanto el ácido gálico como el ácido clorogénico son los dos ácidos fenólicos mayoritarios en frijol común, donde sus contenidos dependen del cultivar y las condiciones de crecimiento del mismo (Huber *et al.*, 2014). Se ha reportado que la cocción del frijol y procesos mecánicos favorecen la liberación de estos dos ácidos (Huber *et al.*, 2014; Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014) ya que en estos hay un rompimiento de las paredes celulares, mejorando su extracción (Aguilera *et al.*, 2011).

Para las harinas de totopo, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la harina de totopo horneado y el totopo control. Es importante establecer que el contenido de harina de frijol fue diferente en ambos totopos, siendo mayor en el totopo horneado que en el totopo frito tomado como control. La mayor riqueza en compuestos fenólicos del totopo horneado puede ser atribuida a al origen de la materia prima, así como a los procesos de cocción que afectan el contenido de compuestos fenólicos totales (18 – 54% de pérdida en trozos de calabaza), donde a mayor tiempo de exposición mayor pérdida (Azizah *et al.*, 2009), aunque la optimización de métodos de cocción rápida con poca pérdida de agua puede llevar a retener los mismos en la matriz alimentaria (Segev *et al.*, 2012).

Se ha relacionado el contenido de compuestos fenólicos de muchas matrices alimentarias con la capacidad antioxidante (Gorinstein *et al.*, 2010), por lo que en

ese trabajo se llevó a cabo la evaluación de la capacidad antioxidante de extractos metanólicos de las harinas (Cuadro 7)

Cuadro 7. Capacidad antioxidante de harinas de maíz, frijol y totopos.

	DPPH ¹	ABTS ¹
HMN	0.39 ± 0.003	0.77 ± 0.002
HFC	0.44 ± 0.17	0.69 ± 0.01
T7030	0.33 ± 0.01 ^a	0.60 ± 0.05 ^a
TC	0.46 ± 0.02 ^b	0.67 ± 0.01 ^b

HMN: Harina de maíz nixtamalizado; HFC: Harina de frijol cocido; HT: Totopo horneado con mezcla de 70% de harina de maíz nixtamalizado y 30% de harina de frijol cocido; TC: Totopo comercial frito con mezcla frijol-maíz. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca). Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas en la Prueba *t* de Student para el mismo tipo de materia prima (HT y HTC). ¹ Capacidad antioxidante expresada como µmol equivalentes de trolox / g muestra.

Se encuentran diferencias en los valores de actividad antioxidante en cada uno de los métodos utilizados, esto debido a las diferencias existentes en los mismos en cuanto a sus mecanismos de acción. Se presenta la misma tendencia en el incremento o decrecimiento de los valores en las dos metodologías utilizadas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre las capacidades antioxidantes de la botana horneada y la comercial frita, siendo mayores los valores en esta última. Si bien las dos técnicas utilizadas son similares, debido a que ambas han mostrado limitaciones en cuanto a su relevancia en sistemas biológicos, se utilizan como técnicas complementarias de observación de capacidad antiradical (Schaich *et al.*, 2015).

Tanto ABTS como DPPH involucran la reducción de un oxidante coloreado, donde específicamente ABTS se basa en la generación de un catión monoradical ABTS^{•+} de coloración azul/verde que puede ser reducido por antioxidantes (Floegel *et al.*, 2011). En este proceso, de transferencia de electrones, se presenta un ensayo de punto final donde cualquiera de los antioxidantes puede donar uno o dos electrones para reducir el catión monoradical pero, a pesar del potencial donante de los antioxidantes individuales, el tiempo de reacción varía para dar una medida de la capacidad antioxidante total al final del ensayo (Huang *et al.*, 2005).

Por su parte, el ensayo DPPH se basa en la reducción de la hidracina púrpura 1,1-difenil-2-picril, constituyendo una típica reacción tipo *HAT* (transferencia de átomos de hidrógeno, por sus siglas en inglés) y ocurre entre antioxidantes y radicales de nitrógeno, con los que algunos antioxidantes reaccionan más lentamente que si lo hicieran con los típicos radicales peroxilo de las reacciones *HAT* que ocurren en sistemas biológicos (Huang *et al.*, 2005). Por tanto, se ha reportado que productos que tienen alta capacidad antioxidante reaccionan rápidamente para inhibir los radicales, en tanto que los que tienen poca capacidad antioxidante, al ser más lentos en la reacción, pueden presentar diferencias en los valores de capacidad antioxidante (Wootton-Beard *et al.*, 2011). Thaipong *et al.*, (2006), en la medición de capacidad antioxidante de diferentes productos por ABTS y DPPH establecen que las diferencias entre sus valores, para el mismo extracto metanólico, refleja la diferente habilidad de los compuestos antioxidantes de reducir los radicales libres ABTS^{•+} y DPPH[•] generados.

Los valores de capacidad antioxidante en la harina de maíz nixtamalizado son menores a los reportados por Cuéllar-Núñez, (2015), (DPPH: 2 $\mu\text{mol Eq. Trolox/g}$ muestra, ABTS: 2.54 $\mu\text{mol Eq. Trolox/g}$ muestra) para la misma variedad de maíz. Estas diferencias pudieron ser dadas por el proceso de nixtamalización, donde a mayor tiempo de cocción existe mayor pérdida de algunos compuestos bioactivos responsables de conferir esta capacidad antioxidante. Mora-Rochin *et al.*, (2016), para granos de maíz (*Zea mays* L.) creole amarillo nixtamalizados por el proceso tradicional, reportan que si bien este tipo de procesamiento incrementa la biodisponibilidad de algunos compuestos bioactivos, puede generar pérdidas de capacidad antioxidante hidrofílica (ABTS y DPPH) en hasta un 50 %, atribuido a la pérdida de algunos componentes bioactivos presentes originalmente en la materia prima sin procesar.

Bello-Pérez *et al.* (2015) evaluaron la capacidad antioxidante en tortillas elaboradas con maíz (*Zea mays* L.) azul, reportando un valor de 0.375 $\mu\text{mol equivalentes trolox/g}$ de muestra por la técnica DPPH e indicando que la capacidad antioxidante de los granos de maíz pigmentados es mínimamente afectada por el

proceso de nixtamalización gracias a que sus compuestos fenólicos mantienen su actividad durante procesos de cocción. Del mismo modo, sugieren que la actividad antioxidante no puede ser atribuida exclusivamente a los compuestos polifenólicos del maíz ni a sus características químicas (presencia de dobles enlaces conjugados y número y posición de los grupos metil e hidroxilo) sino al efecto complejo de moléculas (efectos sinérgicos, aditivos o antagonistas) presentes en los extractos elaborados, así como la afinidad de las moléculas para inhibir radicales libres.

Para la harina de frijol cocido, los resultados son menores a los reportados, por ambas metodologías y para la misma variedad de frijol, por Ramírez-Jiménez *et al.*, (2014) (DPPH: 1.29 – 2.20 μmol equivalentes de trolox/g de muestra; ABTS: 2.30 – 2.99 μmol equivalentes de trolox/g de muestra), aunque dichos valores fueron reportados para las cosechas de 2008, 2010 y 2011; mientras que el presente experimento fue utilizado frijol de la cosecha 2014. Esto es relevante considerando que dependiendo del año de cosecha y las condiciones agronómicas del frijol, su contenido de polifenoles u otros compuestos bioactivos pueden variar y por tanto también capacidad antioxidante. Cardador-Martínez *et al.* (2014), evaluaron la capacidad antioxidante de diferentes cultivares de frijol por la técnica DPPH, reportando que para la variedad Bayo Madero cultivada por INIFAP los valores de DPPH se encuentran entre 0.289 y 0.320 μmol equivalentes de trolox/g de muestra. Estos mismos autores reportan valores diferentes para otros cultivares como Bayo (0.493 μmol equivalentes de trolox/g de muestra), Bayo Chilar (0.433 μmol equivalentes de trolox/g de muestra) y Bayo Gordo (0.426 μmol equivalentes de trolox/g de muestra), relacionando estas diferencias con contenidos variables de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos totales o flavonoides totales.

Asimismo, se han relacionado los procesos hidrotérmicos con reducciones de la capacidad antioxidante (pérdidas de hasta el 20 %), donde el remojo inicial y la pérdida del agua de cocción puede provocar lixiviaciones de compuestos bioactivos a los que presumiblemente se les atribuye la capacidad antioxidante (Gálvez *et al.*, 2009).

Respecto a los totopos, se encuentra un comportamiento similar entre los valores de DPPH y ABTS para ambos, donde el comercial presentó mayor capacidad antioxidante. Aunque la proporción de harina de frijol es mayor en el totopo horneado, el totopo comercial corresponde a un totopo elaborado con cuatro variedades de frijol (Azuki, Negro, Pinto y Rojo), que al ser variedades pigmentadas, confieren mayor capacidad antioxidante por su mayor contenido de compuestos fenólicos, tal como ha sido reportado (Cardador-Martínez *et al.*, 2014; Silva-Cristóbal *et al.*, 2010).

Sánchez-Madrigal *et al.* (2014), evaluaron la capacidad antioxidante de tortillas y totopos fritos elaborados con maíz azul nixtamalizado por la técnica DPPH, encontrando que existe una reducción considerable de la capacidad antioxidante (cuantificada en μmol equivalentes de trolox/g de muestra) debido al proceso de cocción cuando se comparan las harinas con las tortillas (reducciones de hasta el 60 %, hasta valores entre 0.5 y 0.7 μmol equivalentes de trolox/g de muestra). Las reducciones fueron explicadas debido a la severidad del proceso térmico-alcalino (nixtamalización), la cual ocasiona pérdida de algunos de los compuestos responsables de conferir capacidad antioxidante y la lixiviación de los mismos en el nejayote.

Bellail *et al.* (2012), evaluaron la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS de diferentes cultivares de batata (*Ipomoea batatas*) sometidas a procesos de cocción, encontrando que los procesos de fritura profunda exhibían los mayores valores de capacidad antioxidante por ambas metodologías debido a que este tipo de cocción incrementa el contenido de polifenoles totales.

VI.2.3. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del totopo horneado 70:30:

La bioaccesibilidad de compuestos bioactivos ha sido definida como aquella fracción de un compuesto que es liberada de la matriz del alimento en el tracto gastrointestinal y que es disponible para ser absorbida en el intestino (Tagliazucchi

et al., 2010), razón por la cual resulta relevante conocer la absorción de compuestos fenólicos en una simulación de la digestión *in vitro* de un individuo monogástrico. El rendimiento obtenido de fracción no digerible (FND), por cada gramo de totopo, es de aproximadamente el 90 % (45 % de FND sólida y 45 % de FND líquida) y de extracto fermentado de fracción no digerible (EFFND) es del 60%.

El Cuadro 8 muestra la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, determinados por HPLC, en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del totopo horneado 70:30.

Cuadro 8. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, cuantificados por HPLC, en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del totopo horneado 70:30

	ÁCIDOS FENÓLICOS ¹						FLAVONOIDES ¹		
	Ácido Gálico	Ác. Clorogénico	Vainillina	Ác. Ferúlico	Ácido Cafeico	Ác. Cumárico	(+)-Catequina	Rutina	Quercetina
EM	29.57 ± 2.95 ^a (100)	ND	ND	71.97 ± 8.30 ^a (100)	11.08 ± 0.51 ^a (100)	19.59 ± 2.01 ^a (100)	ND	ND	ND
Boca	19.02 ± 0.02 ^b (64)	13.64 ± 0.01 ^a	9.89 ± 0.01 ^a	1.81 ± 0.04 ^b (2.51)	3.69 ± 0.02 ^b (33)	ND	23.37 ± 0.02 ^a	ND	ND
Estómago	42.57 ± 0.03 ^c (144)	ND	ND	3.20 ± 0.03 ^c (4.45)	8.51 ± 0.31 ^c (77)	ND	99.81 ± 0.06 ^b	ND	ND
Intestino Delgado									
15 min	60.97 ± 0.29 ^A (206)	27.73 ± 0.07 ^A	13.87 ± 0.02 ^A	2.35 ± 0.01 ^A (3.26)	21.20 ± 0.08 ^A (191)	ND	43.82 ± 0.28 ^A	ND	14.31 ± 0.07 ^a
30 min	213 ± 0.56 ^B (720)	2.04 ± 0.01 ^B	12.51 ± 0.01 ^A	2.37 ± 0.01 ^A (3.29)	16.62 ± 0.24 ^B (150)	ND	20.76 ± 0.10 ^B	19.67 ± 0.02 ^a	10.40 ± 0.02 ^b
60 min	16.78 ± 5.07 ^C (56.75)	18.83 ± 3.63 ^C	10.04 ± 0.01 ^B	1.83 ± 0.18 ^B (2.54)	19.10 ± 0.01 ^C (172)	ND	36.19 ± 0.32 ^C	FLD	14.11 ± 3.14 ^{Aa}
120 min	255.08 ± 20.9 ^D (862)	19.81 ± 1.76 ^C	12.35 ± 0.01 ^B	1.83 ± 0.01 ^B (2.54)	17.67 ± 0.03 ^D (159)	ND	62.59 ± 9.13 ^D	FLD	8.09 ± 0.02 ^{Bc}
DID	55.90 ± 0.02 ^E (189)	40.03 ± 1.13 ^D	15.45 ± 0.01 ^C	1.66 ± 0.01 ^C (2.24)	11.12 ± 1.19 ^{E^d} (100)	ND	FLD	ND	1.95 ± 0.16 ^{Cd}
FND	545.80 ± 26.82 ^d	80.71 ± 6.53 ^E	64.22 ± 0.06 ^C	10.04 ± 0.22 ^{D^d} (14)	74.59 ± 0.36 ^{F^e} (673)	ND	163.36 ± 9.83 ^{E^c}	19.67 ± 0.02 ^a	48.86 ± 3.41 ^{D^e}
EFFND									
6h	90.94 ± 1.13 ^{A^e} (307)	ND	ND	ND	ND	ND	DLD	ND	ND
12h	16.03 ± 0.83 ^{B^f} (54.21)	ND	ND	ND	ND	ND	DLD	ND	ND
24h	52.45 ± 1.76 ^{C^g} (177)	ND	ND	ND	ND	0.16 ± 0.01 ^b (0.82)	3.68 ± 0.98 ^d	ND	ND

EM: Extracto Metanólico de Totopo Horneado 70:30; EFFND: Extracto fermentado de fracción no digerible; FND: Fracción no digerible. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca). Diferentes letras (minúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. Diferentes letras (mayúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba *t* de Student para el mismo tipo de muestra. Diferentes letras (mayúsculas) en negrita en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) por la Prueba *t* de Student para los diferentes tiempos de fermentación Colónica. DID: Dentro del Intestino Delgado; ND: No Detectado; DLD: Debajo del Límite de Detección. Los valores del intestino delgado a diferentes tiempos corresponden al lado apical. Entre paréntesis se muestran los valores de bioaccesibilidad (%). ¹ Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides en μg compuesto/g de muestra.

Considerando el comportamiento de los compuestos fenólicos a través del tracto gastrointestinal, respecto al ácido gálico se observa que hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre el extracto metanólicos (EM) de totopo horneado (como control de compuestos fenólicos libres en esta matriz alimentaria) y las demás etapas de la digestión, siendo el ácido fenólico en mayor concentración en todas las etapas de la digestión, exceptuando por el ácido ferúlico en las etapa de boca, comportamiento que coincide con lo reportado por Islas-Gómez (2015), para una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) completo cocido. Durante la fase de estómago, se han reportado bajas pérdidas de ácido gálico, aunque incrementos en su bioaccesibilidad, esto es, la liberación de compuestos a partir de matrices alimenticias sólidas (Tagliazucchi *et al.*, 2010), son debidas a la presencia de HCl en la etapa gástrica en el período de 10 a 60 minutos, con degradación de los mismos posterior a dicho tiempo (Olennikov *et al.*, 2015).

Se ha reportado que el ácido gálico, durante la digestión en la etapa intestinal, se libera de forma elevada determinada por el medio alcalino (Liu *et al.*, 2012) y que el incremento en su concentración se debe a la generación del mismo como un producto monomérico de taninos hidrolizables (Mosele *et al.*, 2015). Sin embargo, también podrían presentarse reducciones en su contenido a medida que avanza por el tracto gastrointestinal debido a la inestabilidad del compuesto en condiciones altamente alcalinas (Mosele *et al.*, 2015) o por la posible generación de ácido elágico a partir de derivados monogálicos (Tuominen & Sundman, 2013). En esta etapa, se encontraron valores de absorción de ácido gálico del 9.29 %, menores a los reportados por Islas-Gómez (2015), (34.37 %), para la misma simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* de harina de frijol cocido.

En la fermentación colónica, los resultados son diferentes a los reportados por Mosele *et al.* (2015), quienes reportaron poca variabilidad en la liberación de ácido gálico en una fermentación colónica *in vitro* de jugo de granada, resultados similares a los reportados por Islas-Gómez (2015), donde en una fermentación colónica *in vitro* de frijol común cocido tampoco presentó diferencias significativas

en la liberación de ácido gálico a las 12 y 24 horas. Sin embargo, Mosele *et al.*, (2015), reporta un ligero incremento en la liberación de ácido gálico de 0 a 48 horas de fermentación, sugiriendo ésta como indicador de posible hidrólisis de elagitaninos como consecuencia de la actividad fermentadora microbiana (Saura-Calixto *et al.*, 2010).

En el caso del ácido ferúlico, las mayores concentraciones se dan en la etapa de boca, presentándose diferencias significativas en la concentración frente a las demás etapas de la digestión. Para la etapa estomacal, se ha sugerido que el ácido ferúlico se absorbe parcialmente en el estómago, explicado gracias al bajo peso molecular de este compuesto y el hecho de que la sustancia permanece en su forma neutra a pesar del pH ácido del estómago (Rondini *et al.*, 2004). Se han reportado bajos porcentajes de liberación del ácido ferúlico en la etapa estomacal para el caso de la digestión de salvado de trigo (Kroon *et al.*, 1997).

Para la etapa intestinal, Rondini *et al.* (2004), a partir de la cuantificación de ácido ferúlico en plasma sanguíneo en ratas alimentadas con salvado de trigo y dosis del compuesto puro (5 mg/kg), sugieren que posterior al estómago, cantidades adicionales de ácido ferúlico son liberadas de forma lenta gracias a la acción de enzimas intestinales que degradan componentes de polisacáridos a las que se encuentra adherido el compuesto (como esterasas o xilanasas), permitiendo un incremento del ácido ferúlico libre, el cual alcanza concentraciones plasmáticas que llegan a ser constantes entre 1.5 y 24 horas. En este estudio se encontró que el porcentaje de absorción en el lado basolateral del intestino de ácido ferúlico fue del 14.19 %, menor a lo reportado por Lafay *et al.* (2006), (56.1 %), aunque este autor realizó la medición en una perfusión intestinal del compuesto puro, sin considerar etapas previas de la digestión en la que podrían haber pérdida de este compuesto. Valores de bioaccesibilidad de ácido ferúlico fueron reportados por Anson *et al.* (2009), donde fue cuantificada a partir de una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* de diversas fracciones de trigo y pan.

Experimentos llevados a cabo por Poquet *et al.* (2008), utilizando inhibidores de transporte en un modelo *in vitro* de enterocitos (Caco-2) y células tipo

caliciformes (HT29-MTX), indicaron que el transporte de ácido ferúlico a nivel intestinal sigue un mecanismo de transporte de difusión pasiva transcelular en lugar de difusión paracelular como anteriormente se creía, donde menos del 20 % del mecanismo total de transporte utiliza transportadores.

Continuando con el proceso metabólico de este ácido fenólico, se ha indicado que el colon es el lugar de mayor potencial de absorción del ácido ferúlico debido a que ha sido liberado completamente de sus compuestos parentales o de la matriz alimenticia gracias a la acción de cinamoil esterases de origen bacteriano (Couteau *et al.*, 2001), liberándose el 95 % del total de compuestos feruloílicos según lo reportado en la digestión de salvado de trigo (Kroon *et al.*, 1997). Las cinamoil esterases se localizan principalmente en el lumen del intestino grueso (de origen microbiano) aunque algunas cantidades pequeñas se encuentran en la mucosa del intestino delgado y probablemente en las secreciones pancreáticas (Andreasen *et al.*, 2001). Se ha reportado que, siendo el ácido ferúlico un metabolito del cafeico, es secretado de regreso al lumen por parte de las células intestinales tras la metilación del ácido cafeico por una catecol-O-metiltransferasa (Lafay *et al.*, 2006).

Para los contenidos de ácido clorogénico y cafeico, se observa que los mayores contenidos de ácido cafeico y clorogénico fueron detectados en la fracción no digerible. A nivel intestinal, el porcentaje de absorción de ácido clorogénico fue del 33.15 %, mucho mayor al valor reportado a nivel intestinal para secciones de yeyuno en ratas a partir de perfusiones directas del compuesto puro (8 %) (Lafay *et al.*, 2006). El mayor porcentaje de absorción puede ser debido a que en la matriz alimenticia el ácido clorogénico se encuentra ligado a otros componentes y se ha sugerido que la biodisponibilidad de algunos compuestos fenólicos es mayor en la digestión este tipo de matrices que de los compuestos puros (Kroon *et al.*, 1997). Bouayed *et al.* (2012), confirmaron que en seres humanos el ácido clorogénico puede ser absorbido de manera intacta en el intestino delgado al igual que el cafeico y que éstos son hidrolizados a nivel colónico por medio de esterases propias de la microbiota asociada.

Experimentos llevados a cabo por Lafay *et al.* (2006), realizando perfusiones de ácido cafeico en ratas, encontraron que del total de ácido cafeico sometido a digestión, cerca de un 80.9 % pasa al colon y solo un 19.5 % es absorbido para luego volver al intestino delgado (el 0.4 %) junto a la secreción de sales biliares, contribuyendo al paso de este ácido fenólico al colon. Este resultado de absorción intestinal es mayor al valor de absorción que se calculó (12.97 %), diferencias que pudieron ser dadas por el tipo de matriz acarreadora del compuesto utilizada. A medida que atraviesa la barrera intestinal, se incrementa el proceso de O-metilación, pasando a ser ácido ferúlico. Asimismo, como el ácido cafeico es un metabolito del clorogénico (el cual, al romperse el enlace éste, produce ácido cafeico y quínico), es de esperarse que varíe su concentración a través del tracto gastrointestinal.

En otro estudio realizado por Omar *et al.* (2012) en ratas macho Sprague-Dawley alimentadas con ácido *trans*-cafeico, se reportó que el 62 % del ácido cafeico es se encuentra a nivel estomacal (76 % fue cuantificado para la digestión del totopo), el 7.9 % en el duodeno, 9.1 % en el yeyuno, 16 % en el íleon y 6.6 % alcanza el colon y 1.4 % se recolecta en las heces. Este metabolismo del ácido cafeico a lo largo del tracto gastrointestinal ha sido explicado por la posesión de un residuo de catecol, lo que favorece la formación de muchos metabolitos (Rice-Evans & Parker, 2003). Gonthier *et al.* (2006) llevaron a cabo una fermentación colónica *in vitro* de estándares puros de ácido cafeico, ácido clorogénico y caftárico, reportando que luego de 2 horas de fermentación colónica estos compuestos ya no pueden ser cuantificados debido a la acción de esterazas microbianas que hidrolizan los ésteres del ácido cafeico, produciendo metabolitos el ácido 3-hidroxifenilpropiónico (3-HHP) y ácido benzoico (BA); esto explicaría por qué no pudieron ser cuantificados ácido clorogénico y ácido cafeico durante la fermentación colónica en este estudio.

Se ha reportado que la vainillina es uno de los metabolitos producidos a partir del ácido ferúlico (Gasson *et al.*, 1998), por lo que su liberación puede relacionarse con el ácido clorogénico. No se reportaron contenidos de vainillina en el extracto metanólico de la botana horneada ni tampoco a nivel estomacal pero sí en contenidos bajos a nivel de boca y con diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los

30 y 60 minutos de incubación intestinal, aunque igualmente los contenidos cuantificados en esta etapa son bajos. Estos resultados no coinciden con lo reportado por Ortega *et al.* (2009), los cuales para una digestión gastrointestinal *in vitro* de polifenoles de polvo y licor de chocolate reportaron para la etapa gástrica contenidos variables para cada forma de presentación de chocolate mayores a los reportados en este trabajo (3.60 µg de vainillina/g licor y 3.67 µg de vainillina/g de polvo). Sin embargo, los autores reportan valores similares a los encontrados en este trabajo para la etapa de digestión duodenal también para ambas presentaciones de chocolate (7.76 µg de vainillina/g licor y 10.7 µg de vainillina/g de polvo). A pesar de que hay ciertas similitudes, es importante considerar que las condiciones de digestión gastrointestinal *in vitro* fueron diferentes a las realizadas en este trabajo, aunque las aproximaciones sugieren liberaciones similares de este compuesto fenólico de diferentes matrices alimentarias. Igualmente, cabe destacar que el porcentaje de absorción de vainillina (19.39 %) fue el segundo más alto de todos los compuestos fenólicos cuantificados. Sin embargo, contrario a lo que se pensaría por sus bajas tasas de absorción, no se detectaron contenidos de vainillina a nivel de colon. Marín *et al.* (2015) han informado que el ácido vanílico, una forma oxidada de la vainillina, es uno de los principales metabolitos producidos por la microbiota colónica a partir de la degradación de antiocianinas.

Para el ácido p-cumárico, éste sólo pudo ser cuantificado en el extracto metanólico y en el mayor tiempo de fermentación colónica (24 horas), presentándose diferencia estadísticamente significativa entre estos dos valores ($p > 0.05$). El ácido p-cumárico, al igual que el ferúlico, son conjugados de ácidos libres que experimentan la ruptura de sus grupos éster naturalmente presentes, a lo largo del avance de la digestión gastrointestinal (Rechner *et al.*, 2002). El metabolismo del ácido p-cumárico generalmente involucra conjugación con ácido glucurónico o glicina en el hígado o epitelio del intestino delgado, reducción del doble enlace residual del ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico y β -oxidación del producto de reducción del ácido 4-hidroxibenzoico (Rice-Evans & Parker, 2003). Garrait *et al.* (2006), en experimentos realizados *in vitro* con el tracto gastrointestinal extraído de ratas macho Wistar alimentadas con dieta estándar comercial y ácido p-cumárico

comercial, lograron cuantificarlo en varios órganos relacionados con la digestión, excepto en el estómago, reportando un incremento progresivo de la absorción en la etapa intestinal siguiendo un transporte activo y pasivo. En este estudio se reportó que para el modelo *in vivo* ensayado, el compuesto pasa rápidamente al torrente sanguíneo y es distribuido a lo largo del cuerpo, ayudado por su hidrosolubilidad, lo que podría explicar por qué este compuesto no fue detectado en algunas etapas de la digestión *in vitro* del totopo.

Ningún flavonoide fue detectado en el extracto metanólico, aunque sí pudieron ser cuantificados en diferentes etapas del tracto gastrointestinal. Para la catequina, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en las etapas de boca y estómago, aunque sí hubo entre los diferentes tiempos de absorción intestinal. La absorción y el metabolismo de las proantocianidinas han sido ampliamente investigadas; se sabe que muchos de estos componentes están presentes en la dieta en forma de β -glicósidos, de los cuales se creía que en su hidrosolubilidad no podían pasar por difusión pasiva a nivel intestinal, pero ya se ha encontrado que en sus formas agliconadas pueden ser absorbidos en el intestino delgado participando una lactasa-floricin-hidrolasa (LPH), una β -glucosidasa presente en la membrana externa del intestino delgado (Hollman, 2004).

Tagliazzuchi *et al.* (2010), en una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* de uvas rojas (Red Globe grapes, por sus siglas en inglés), reportaron una liberación de 34.88 mg de catequina/100 g uvas, constituyendo el 49.7 % del total de polifenoles obtenidos por extracción química. Estos resultados son mayores a los encontrados en este trabajo, aunque es de considerar que el contenido de polifenoles en uvas de pigmentación oscura es mayor que en la botana horneada que fue sometida a digestión en este reporte.

Se ha sugerido que la catequina es resistente al paso del fluido gástrico, extraído gracias al uso de una sonda nasogástrica introducida en pacientes a los que se les suministró una bebida de chocolate rica en polímeros de prociandinas (Rios *et al.*, 2002). En ratas macho Wistar alimentadas con catequina (ingesta de 62.3 μ mol (+)-catequina/día) se ha reportado que gran parte de ésta es excretada

por el cuerpo, junto con su derivado 3'-O-metilado (Gonthier *et al.*, 2003). Tagliazucchi *et al.* (2010), reportaron un incremento en el contenido de catequina del 21.9 % de la etapa de boca hacia la de estómago, menor al encontrado en este trabajo (337 %), y este incremento continúa conforme pasa el tiempo de digestión estomacal hasta alcanzar un valor del 88 %, según lo reportado por estos autores.

A nivel intestinal, se encontraron reducciones significativas ($p > 0.05$) en los contenidos de catequina, comportamiento que coincide con lo reportado por Tagliazucchi *et al.* (2010), quienes explican que este fenómeno puede ser debido a la transición de un ambiente ácido hacia un ambiente alcalino, provocando reducción en la bioaccesibilidad de varios compuestos fenólicos, entre ellos la catequina.

Gonthier *et al.* (2003), llegaron a identificar, como metabolitos producidos por la acción de la microbiota colónica sobre catequina, ácido *m*-Cumárico, un precursor del ácido ferúlico y probable contribuyente a los valores encontrados del mismo a nivel intestinal. Siendo la catequina una proantocianidina, se ha encontrado que es pobremente absorbida en el tracto gastrointestinal debido a su alto peso molecular, aunque ello no impide que sean degradadas en metabolitos aromáticos a nivel del colon (como los ácidos 3,4-hidroxifenilpropiónico, 3-hidroxifenilpropiónico y 3-hidroxibenzoico) gracias a la microbiota asociada (Déprez *et al.*, 2000), lo que podría explicar los bajos contenidos de este compuesto que fueron cuantificados en el tiempo de fermentación de 24 horas.

Aunque se ha reportado bajo nivel de actividad metabólica a nivel del colon para catequina, Schantz *et al.* (2010), en un modelo *ex vivo* para fluido del íleon proveniente de mujeres al que fue suministrado extractos puros de catequina y algunos derivados de la misma, mostró cierto nivel de absorción en el colon tras 24 horas de proceso fermentativo.

Bouayed *et al.* (2012), reportó el metabolismo de varios polifenoles identificados y cuantificados a partir de una extracción hidro-metanólica de varios cultivares de manzana, donde al ser sometidos en una simulación de digestión

gastrointestinal *in vitro* mediante el uso de enzimas y ajustes de pH para las diferentes etapas de la digestión, concluyeron que, frente a la cuantificación de catequina por medio de UPLC, que su estabilidad a pH altos como los que se encuentran en el intestino es baja, al igual que todos los monómeros de flaván-3-ol, lo que podría explicar igualmente los bajos niveles de este compuesto que se cuantificaron en las etapas iniciales de intestino cuando hubo el cambio de pH del medio gástrico al intestinal, aunque los resultados encontrados en este trabajo difieren con la sugerencia del autor de que a las 2 horas existe una degradación de casi el 50% de la catequina total, puesto que fue en este tiempo cuando se cuantificaron los valores más altos del compuesto.

Los flavonoides rutina y quercetina no fueron detectados en boca, estómago y fermentación colónica, pero sí se cuantificaron diferentes contenidos de los mismos en las etapas de intestino delgado. Experimentos realizados en ratas luego de perfusión de íleon y yeyuno de ratas (15 nmol/min) de rutina y quercetina, se ha indicado que una alta proporción de quercetina (dos terceras partes) es transferida de forma rápida a través de la pared intestinal, absorbiéndose aproximadamente un 66.7% de la quercetina suministrada por perfusión, aunque es secretada nuevamente en el lumen en forma de conjugados de quercetina (Crespy *et al.*, 1999). Lo que podría explicar los bajos niveles de este compuesto cuantificados a nivel intestinal, su bajo porcentaje de absorción (3.84 %) y su reducción a través que se incrementa el tiempo de incubación. Para el mismo experimento de Crespy *et al.* (1999), se reportó bajo nivel de absorción de rutina a través de la pared intestinal.

Dada la relación que hay entre contenido de compuestos fenólicos (parentales y metabolitos) y la capacidad antioxidante, como se explicó anteriormente, se procedió a evaluar la capacidad antioxidante en las diferentes etapas de la digestión *in vitro* del totopo horneado 70:30 por los métodos DPPH y ABTS (Cuadro 9).

Cuadro 9. Capacidad antioxidante en los productos de la fermentación colónica.

	DPPH TEAC ¹	ABTS TEAC ¹
EM	0.33 ± 0.01 ^h	0.60 ± 0.05 ^g
Boca	0.82 ± 0.02 ^{ef}	1.31 ± 0.06 ^{cde}
Estómago	0.94 ± 0.04 ^d	1.08 ± 0.07 ^{ef}
Intestino Delgado		
(Apical)		
15 min	1.18 ± 0.03 ^{ab}	1.88 ± 0.08 ^a
30 min	1.11 ± 0.03 ^{bc}	1.87 ± 0.16 ^a
60 min	1.06 ± 0.03 ^c	0.85 ± 0.02 ^{fg}
120 min	1.17 ± 0.02 ^{ab}	1.40 ± 0.09 ^{cd}
Intestino Delgado		
(Basolateral)		
15 min	0.83 ± 0.01 ^{ef}	1.35 ± 0.03 ^{cd}
30 min	1.08 ± 0.08 ^c	1.89 ± 0.01 ^a
60 min	1.08 ± 0.03 ^c	1.27 ± 0.02 ^{cde}
120 min	1.16 ± 0.12 ^a	1.31 ± 0.01 ^{cde}
EFFND		
6h	0.79 ± 0.04 ^f	1.48 ± 0.15 ^{bc}
12h	0.67 ± 0.05 ^g	1.24 ± 0.07 ^{de}
24h	0.85 ± 0.05 ^e	1.67 ± 0.002 ^{ab}

EM: Extracto Metanólico de Totopo Horneado 70:30; EFFND: Extracto fermentado de fracción no digerible. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar. Diferentes letras (minúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. ¹ Capacidad antioxidante expresada como μmol equivalentes de trolox/g de muestra.

La falta de un método validado y estandarizado que pueda permitir la evaluación de capacidad antioxidante en alimentos obliga a la necesidad de utilizar más de un método analítico de evaluación de la misma, donde se considera que las principales aproximaciones para determinar actividades antioxidantes *in vitro* de muestras puede ser por medio de la inhibición de oxidación lipídica en diferentes sistemas o la habilidad de secuestrar radicales libres (Bahloul *et al.*, 2016), siendo esta última aproximación la utilizada en este trabajo.

Generalmente, el ensayo de ABTS^{•+} se prefiere sobre el de DPPH porque da resultados consistentes en un amplio intervalo de pH, mientras que la viabilidad del método DPPH es dependiente del pH (Lemańska *et al.*, 2001). Además, ABTS puede trabajar igualmente bien tanto en medios orgánicos como acuosos y su eficiencia, entre otros factores, depende del sistema de solvente empleado, a diferencia de DPPH. En comparación, la velocidad de reacción de DPPH es mucho menor (Awika *et al.*, 2003).

En la etapa de boca hay un aumento de forma significativa ($p > 0.05$) respecto al extracto metanólico en valores similares para ambas metodologías, y se presenta un comportamiento similar a lo largo de las diferentes etapas tracto gastrointestinal. Aunque no existen reportes del comportamiento de la capacidad antioxidante a lo largo del tracto gastrointestinal para una botana horneada, se han reportado varios estudios que han explicado este proceso en diferentes matrices alimentarias. Campos-Vega *et al.* (2015), reportó incrementos en la capacidad antioxidante de muestras de café usado en la etapa de boca, siguiendo la misma metodología de digestión gastrointestinal *in vitro* realizada en este trabajo, donde los valores de bioaccesibilidad son menores a los encontrados (DPPH: 171 % y 84 %; ABTS: 47 % y 105 % respectivamente para café usado proveniente de tostado medio y oscuro).

Si bien el contenido de algunos compuestos fenólicos se reduce durante la etapa de boca, como se muestra en el Cuadro 8, se ha reportado que el consumo de algunos polifenoles de forma oral pueden ejercer actividad a pesar de los cambios que puedan sufrir en el tracto digestivo, sugiriéndose que su actividad antioxidante potencial depende principalmente del grado de desprotonación del resto de radical y no la cantidad de compuestos fenólicos presentes (Lemńska *et al.*, 2001), propuesta que podría ser confirmada con este trabajo para las etapas de boca y estómago. Sin embargo, existen varios reportes en la literatura que indican que el incremento en la biodisponibilidad de varios compuestos fenólicos podría relacionarse con el incremento en la capacidad antioxidante (Campos-Vega *et al.*,

2015), tal como es observado en las etapas de estómago, intestino y fermentación colónica para algunos compuestos fenólicos del Cuadro 8.

Para la etapa de estómago, aunque existe un incremento en la capacidad antioxidante, es menor en la técnica de ABTS, resultado que es consistente con el comportamiento para el café usado de tostado medio sometido a digestión por Campos-Vega *et al.* (2015). Para la técnica de DPPH, el incremento en el valor de capacidad antioxidante de forma significativa ($p > 0.05$) en comparación con la etapa de boca y, relacionando con el incremento en los valores de algunos compuestos fenólicos del Cuadro 8 podrían sugerir que este aumento podría ser responsable por dichos compuestos que, al ser en general ácidos fenólicos, se ha sugerido que estos podrían ser responsables de la capacidad antioxidante presente en algunos alimentos (Campos-Vega *et al.*, 2015).

Rodríguez-Roque *et al.* (2013) en una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* de sustituto de leche de soya comercial, encontraron un incremento del 30 % en la etapa de estómago para la inhibición de DPPH, atribuido a la liberación de algunos compuestos fenólicos en esta etapa donde las condiciones ácidas podrían mejorar la liberación de compuestos antioxidantes de los alimentos, comportamiento que coincide con el incremento en los valores de DPPH y ABTS presentados en este trabajo.

De modo general, los mayores valores de capacidad antioxidante se obtuvieron en la etapa intestinal para ambas técnicas, así como las mayores bioaccesibilidades. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2015), para la misma simulación gastrointestinal *in vitro* pero utilizando una matriz diferente (café usado), la cual podría ser consecuencia de la liberación de determinados compuestos fenólicos en esta etapa como se indicó en el Cuadro 8 para ácidos fenólicos como gálico, cafeico y clorogénico y flavonoides como (+)-catequina. Sin embargo, para los primeros 15 minutos los valores son menores a los de la etapa gástrica, comportamiento que fue reportado por Rodríguez-Roque *et al.* (2015), sugiriendo que algunos compuestos fenólicos que podrían conferir

actividad antioxidante son sensibles a las condiciones alcalinas del medio intestinal y por tanto, podrían cambiar sus estructuras químicas.

Finalmente, para la etapa de fermentación colónica, se observó una reducción significativa ($p > 0.05$) de las 6 horas hasta las 12 horas de fermentación colónica, pero un incremento igualmente significativo ($p > 0.05$) de 12 a 24 horas, por ambas técnicas, alcanzándose los mayores valores en este último tiempo de medición. Este comportamiento coincide de acuerdo con lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2015), para la misma simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* de café usado en el caso del café con tostado medio para la técnica de ABTS^{•+}, aunque los valores de bioaccesibilidad encontrados en este trabajo fueron menores en esta etapa para el mismo trabajo (el cual indica bioaccesibilidades de 235 – 242 % y 798 – 866 % para DPPH y 302 – 368.6 % y 373.6 – 390.9 % para ABTS, en ambos tipos de café usado evaluados). Los valores de capacidad antioxidante encontrados podrían ser atribuibles a los compuestos fenólicos, que no atraviesan la barrera intestinal y quedan en la fracción no digerible, alcanzando el colon para ser fermentados por la microbiota colónica y producir compuestos que ejerzan actividad antioxidante (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

VI.2.4. Contenido de oligosacáridos en materia prima y harinas.

Se ha reportado que los oligosacáridos constituyen ingredientes no digeribles o prebióticos (resistentes a la digestión en el tracto gastrointestinal) que tienen potencial nutracéutico porque estimulan el crecimiento de microbiota colónica específica (Laparra & Sanz, 2010). Por lo que resulta interesante saber el contenido de estos en el totopo horneado 70:30 (maíz nixtamalizado:frijol común cocido). El Cuadro 10 muestra el contenido de oligosacáridos de las materias primas y la harina de totopo horneado 70:30.

Cuadro 10. Contenido de oligosacáridos cuantificados por HPLC-DAD-MS en harinas y totopos.

	Rafinosa ¹	Estaquiosa ¹	Verbascosa ¹
HMN	ND	0.96 ± 0.20 ^a	4.59 ± 0.18 ^a
HFC	ND	5.69 ± 0.19 ^b	4.64 ± 0.21 ^a
T7030	ND	2.50 ± 0.26 ^c	5.41 ± 0.03 ^b

HMN: Harina de maíz nixtamalizado; HFC: Harina de frijol cocido; T7030: Totopo horneado con mezcla de 70% de harina de maíz nixtamalizado y 30% de harina de frijol cocido. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca). Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas en la Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) entre HMN y HFC respecto a HT. ¹ Contenido de oligosacáridos en mg Compuesto/g de muestra.

No se detectó rafinosa en ninguna de las muestras, pero sí estaquiosa y verbascosa, presentándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los contenidos de estaquiosa y verbascosa entre la harina de frijol cocido y la harina de maíz nixtamalizado respecto a la harina de totopo. Se ha reportado que las leguminosas y cereales contienen oligosacáridos indigeribles, constituyentes de la fibra soluble, como rafinosa, estaquiosa y verbascosa que pueden ocasionar meteorismo, diarrea y problemas digestivos (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006; Holzapfel, 2002).

Los contenidos cuantificados de estaquiosa para HMN están por encima de los reportados por Treviño-Mejía *et al.* (2016), (1.50 mg/g de muestra) aunque para este último no se utilizó la misma variedad de maíz sino harina de maíz nixtamalizado comercial. Las diferencias en el contenido pueden deberse en el tratamiento térmico alcalino, del que se ha reportado para lúpulo (variedades: *L. campestris*, *L. angustifolius* y *L. kiew*) reducciones del 70 al 90 % respecto a la materia prima original tras un período de 6 horas de cocción en estas condiciones (Jiménez-Martínez *et al.*, 2001). La eliminación de oligosacáridos de la familia de la rafinosa se considera un proceso adecuado porque ayuda a eliminar estos factores tradicionalmente considerados como antinutricios ya que son causa de meteorismo en animales monogástricos por la ausencia de la enzima α -galactosidasa (Adeyemo & Onilude, 2014). Sin embargo, se ha reportado que la presencia de estos componentes en la fracción no digerible y su posterior fermentación gracias a la

microbiota colónica favorece la formación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), de los que se han reportado beneficios en la salud gracias a su papel clave en la prevención y el tratamiento del síndrome metabólico, trastornos intestinales y algunos tipos de cáncer, además de su efecto positivo en tratamientos de colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y diarrea asociada a antibióticos (den Besten *et al.*, 2013).

Se detectaron contenidos de verbascosa en la harina de maíz nixtamalizado (4.59 mg/g muestra), resultado diferente a lo reportado por Treviño-Mejía *et al.* (2016), donde, para una variedad diferente de maíz, no pudo detectar este oligosacárido, al igual que en tortillas de maíz suplementadas con harina de frijol cocido. La verbascosa es el oligosacárido de mayor peso molecular de los de la familia de la rafinosa e igual que los demás, también es fermentada por la microbiota colónica para producir AGCC. Se ha reportado que la verbascosa sólo puede ser acumulada en las vacuolas vegetales de algunas plantas, principalmente dicotiledóneas y su presencia obedece a condiciones específicas de estrés al que ha sido sometida la planta (Peters *et al.*, 2010).

Similar a los resultados de Ramírez-Jiménez *et al.* (2014), la estaquiosa fue el oligosacárido en mayor cantidad identificado en la harina de frijol común cocido para la misma variedad de frijol y la misma metodología de extracción y cuantificación, aunque el contenido encontrado en este trabajo es mucho menor al reportado por Ramírez-Jiménez (42.41 mg/g muestra y 37.68 mg/g muestra para harina de frijol cocido de la misma variedad), sin embargo, es similar al reportado por Campos-Vega *et al.* (2009), (5.4 mg/g muestra). Del mismo modo, Ramírez-Jiménez *et al.*, (2014), cuantificó rafinosa (2.42 mg/g de muestra y 4.33 mg/g muestra) y Campos-Vega *et al.* (2009), (0.5 mg/g de muestra), contrario a los resultados de este trabajo en los que no pudo ser detectada, similar a Treviño-Mejía *et al.* (2016). Brummer *et al.* (2015), para frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) pinto sometido a cocción, reportaron en sus extractos metanólicos contenidos de rafinosa (3.40 mg/g muestra), estaquiosa (18.89 mg/g muestra) y verbascosa (0.69 mg/g muestra).

Se ha reportado que la cocción favorece el incremento en el contenido de oligosacáridos posiblemente debido a la interacción existente de éstos con macromoléculas y el grado de maduración del grano puesto que las condiciones de germinación afectan el contenido de oligosacáridos donde la enzima α -galactosidasa hidroliza primero estaquiosa, seguido de rafinosa en los enlaces α -1,6 (Martín-Cabrejas *et al.*, 2008). Del mismo modo, se ha informado que los diferentes procesos de cocción y temperatura provocan variaciones en el contenido de α -galactósidos, esto es, los productos de la acción enzimática de la α -galactosidasa. Por ejemplo, en un experimento de cocción y deshidratación de lentejas (*Lens culinaris* L.) y garbanzos (*Cicer arietinum*) se encontraron reducciones drásticas en el contenido de carbohidratos solubles (85 % en el caso de lentejas y 57 % en el caso de chícharos), incluyendo oligosacáridos dentro de esta contabilización (Martín-Cabrejas *et al.*, 2006). Mientras que Cruz-Bravo *et al.* (2011), sugieren, a partir de la cuantificación de oligosacáridos en la fracción no digerible de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Negro 8025 crudo y cocido, un incremento en el contenido de oligosacáridos en el cocido, explicado gracias a que en la cocción existe un incremento en la lixiviación de componentes solubles y la liberación de oligosacáridos ligados a la matriz original.

Respecto a los contenidos de verbascosa, los resultados obtenidos son mayores a los reportados por Campos-Vega *et al.* (2009), (0.2 mg/g muestra) para la misma variedad de frijol y sometido bajo el mismo procedimiento de cocción, las diferencias pueden deberse a que fue diferente fecha de cultivo y por tanto de condiciones ambientales que lleven a diferentes contenidos de compuestos o agentes bioactivos. Estos valores cuantificados de oligosacáridos confirman lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2009), de que el frijol es una adecuada fuente de oligosacáridos.

Para el totopo, hubo reducciones estadísticamente significativas en su contenido de estaquiosa respecto a la harina de frijol ($p > 0.05$) pero no de verbascosa, datos que pudiesen ser explicados por el proceso de deshidratación al que fue sometido en su proceso de horneado, resultados que coinciden con lo

reportado por Martín-Cabrejas *et al.* (2006). Ramírez-Jiménez *et al.* (2014), discute que, para deshidratación de harina de frijol, que este proceso no ocasiona pérdidas importantes en el contenido de oligosacáridos respecto a las materias primas originales.

VI.2.5. Bioaccesibilidad de Oligosacáridos de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del totopo horneado 70:30.

El Cuadro 11 muestra la bioaccesibilidad de oligosacáridos de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del totopo horneado 70:30, cuantificados por HPLC.

Cuadro 11. Bioaccesibilidad de oligosacáridos en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro* del totopo horneado 70:30.

	Rafinosa ¹	Estaquiosa ¹	Verbascosa ¹
EM	ND	2.50 ± 0.26 ^c (100)	5.41 ± 0.03 ^c (100)
Boca	ND	ND	0.65 ± 0.20 ^b (12)
Estómago	ND	ND	ND
Intestino Delgado			
15 min	104.26 ± 0.35 ^A	ND	0.47 ± 0.21 ^A (9)
30 min	ND	0.73 ± 0.12 ^A (29)	0.14 ± 0.02 ^B (2)
60 min	43.74 ± 4.69 ^B	4.32 ± 1.47 ^A (172)	ND
120 min	ND	0.38 ± 0.14 ^B (15)	2.86 ± 0.03 ^C (53)
DID	ND	ND	ND
FND	7.39 ± 0.25 ^C	5.43 ± 1.73 ^{Ad} (217)	3.47 ± 0.26 ^{Ce} (64)
EFFND			
6h	ND	ND	ND
12h	ND	0.51 ± 0.07 ^{ab} (20)	4.11 ± 0.08 ^{ad} (76)
24h	ND	0.17 ± 0.05 ^{ba} (7)	0.25 ± 0.02 ^{ba} (5)

EM: Extracto Metanólico de Totopo Horneado 70:30; EFFND: Extracto fermentado de fracción no digerible. Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca). Diferentes letras (minúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. Diferentes letras (mayúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba *t* de Student los diferentes tiempos de incubación intestinal. Diferentes letras (mayúsculas) en negrita en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) por la Prueba *t* de Student para los diferentes tiempos de fermentación Colónica. ND= No Detectado. Los valores del intestino delgado a diferentes tiempos corresponden al lado apical. ¹ Contenido de oligosacáridos en mg Compuesto/g de muestra

En la etapa de boca sólo se cuantificó verbascosa, presentando una reducción estadísticamente significativa ($p > 0.05$) respecto al extracto metanólico. Estos resultados no son consistentes con lo indicado por Winchienchot *et al.* (2010), quienes reportaron en una simulación *in vitro* de oligosacáridos de pitaya (*Selenicereus megalanthus* y *Hylocereus monacanthus*) sometidos a la acción de α -amilasa salival de origen humano a diferentes pH (de 4 hasta 8), bajos grados de hidrólisis de los mismos (pH 4: 5.72 %, pH 5: 8.03 %, pH 6: 7.39 %, pH 7: 12.32 % y pH 8: 16.22 %), por lo que gran parte de ellos alcanzan el estómago (sólo un 16 % es hidrolizado en la boca, 2.5 % en el estómago y 30 % en el intestino delgado). Estos resultados de Winchienchot *et al.* (2010), también fueron similares a un estudio previo realizado por Gnoth *et al.* (2000), donde para oligosacáridos aislados de muestras de leche humana y sometidos a la acción de 1 minuto de incubación con amilasa salival de origen humano *in vitro* a pH 7 y 5.5, se encontró que existía mínima degradación de estos oligosacáridos en este procedimiento. Las diferencias encontradas en estos estudios respecto a los resultados obtenidos pueden deberse a las diferencias en el uso de oligosacáridos aislados y las condiciones, puesto que para este trabajo se reporta una etapa *in vivo* de boca.

Para la sección del estómago, no se detectaron ninguno de los oligosacáridos tomados como estándares. Estos resultados son diferentes a los reportados por Winchienchot *et al.* (2010), donde para una simulación *in vitro* de la digestión gástrica encontraron alta resistencia de oligosacáridos a las condiciones ácidas estomacales, superiores a un control de inulina, permitiendo que el 96 % de los mismos alcanzaran el intestino. Gdala *et al.* (1997), para lechones canulados con lupino, se encontró que luego de tres horas de digestión, cerca del 39 % de los alfa-galactósidos (derivados de rafinosa) desaparecieron del estómago e intestino delgado, atribuido a la presencia de posibles enzimas de origen vegetal aportadas por la alimentación o α -galactosidasa de origen vegetal. Esto podría explicar las notorias reducciones en verbascosa y estaquiosa luego de 120 minutos de incubación intestinal encontrados en este trabajo (85 % y 47 %, respectivamente).

En el intestino, se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las diferentes etapas, alcanzándose la mayor concentración de estaquiosa y verbascosa al final de las dos horas de incubación, mientras que los valores de rafinosa fueron los más bajos. Cummings & Macfarlane, (2002), reportaron que hasta un 88 % de los fructo-oligosacáridos e inulina alcanzan el colon, en un modelo de ileostomía e intubación de pacientes. Se ha reportado el efecto prebiótico de los oligosacáridos puesto que de forma selectiva estimulan el crecimiento y la actividad de un limitado número de microorganismos en el colon que promueven beneficios a la salud como: lactobacilos y bifidobacterias, microorganismos que han sido vinculados con una resistencia incrementada a padecer enfermedades infecciosas y diarrea, estimulación de la actividad del sistema inmune y protección contra cáncer (Macfarlane *et al.*, 2008). Para que haya efecto prebiótico se requiere un consumo diario de al menos 0.8 g/100 mL, aunque estos valores pueden cambiar dependiendo de los requerimientos poblacionales por país y la edad, ya que en algunos países los valores son más bajos; por ejemplo, en Japón se recomienda un consumo de 2.5 g/100 mL para población de la tercera edad (Macfarlane *et al.*, 2008).

Los valores encontrados en este trabajo indican que a medida que se incrementa el tiempo de incubación intestinal, existe un aumento en la bioaccesibilidad de estos oligosacáridos, indicando que los mismos pasan en porcentajes variables al colon para ser fermentados por la microbiota colónica. No se detectaron contenidos de estos oligosacáridos dentro del intestino delgado, confirmando la posibilidad de que los mismos pasen al colon para ser fermentados por la microbiota colónica. En efecto, la reducción en el contenido de oligosacáridos a las 24 horas de fermentación podría ser un indicador de que los mismos están siendo transformados en otros metabolitos, siendo uno de ellos los ácidos grasos de cadena corta.

VI.3. Coeficiente de permeabilidad aparente, permeabilidad neta y relación de flujo de los compuestos fenólicos en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* del totopo horneado 70:30.

Se ha sugerido que los coeficientes de permeabilidad aparente a nivel intestinal se relacionan con la biodisponibilidad de algunos compuestos, entre ellos los medicamentos, y reflejan de forma directa su absorción, en mayor o menor proporción (Ma *et al.*, 2014). Por ello, se decidió tener en cuenta estos cálculos para algunos componentes, razón por la cual el Cuadro 12 muestra el cálculo de los coeficientes de permeabilidad aparente, permeabilidad neta y la relación de flujo de salida para algunos compuestos fenólicos en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* de acuerdo a los valores cuantificados por HPLC.

La permeabilidad aparente (P_{app}) se define como la tasa de acumulación de compuesto en la cámara receptora normalizado por el área superficial del tejido y es una medida utilizada en experimentos *ex vivo* (Volpe, 2012) ya que se correlaciona de forma adecuada con coeficientes de absorción humanos (Palumbo *et al.*, 2008). Por su parte, la permeabilidad neta (P_{app}) se refiere a la tasa real de compuesto acumulado al interior del intestino (Palumbo *et al.*, 2008). Este cálculo no fue realizado para oligosacáridos considerando que no pudo determinarse la concentración inicial en el que se encontraba cada oligosacárido al principio de la digestión intestinal.

Asimismo, en las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, se considera que el lado correspondiente al flujo sanguíneo es el basolateral y el lumen corresponde al apical (Ito *et al.*, 2005). La acumulación de componentes o el paso de los mismos del lado apical al basolateral y viceversa tiene relación con el grado de absorción de los mismos y el modo como podrían acumularse en los organismos. Por ejemplo, Walgren *et al.* (1998) reportaron para monocapas de células Caco-2 sometidas a flujos de quercetina (50 μM), que el flujo de este compuesto del lado apical al basolateral podría sugerir, dependiendo de la velocidad, transporte paracelular del mismo o transporte pasivo. Asimismo, muchos de estos compuestos pueden verse relacionados con la expresión de transportadores específicos de

membrana hacia el lado basolateral o el metabolismo de los mismos a nivel sistémico y su regreso al lumen intestinal (Lafay *et al.*, 2006).

En el Cuadro 12, sólo se presentan los datos de aquellos compuestos fenólicos que pudieron ser detectados y cuantificados en el sector apical y basolateral, si bien sólo el ácido gálico para 60 minutos de digestión, quercetina y ácido ferúlico para 120 minutos de digestión y ácido cafeico en todos los tiempos de digestión intestinal *ex vivo*, siguiendo la técnica del saco intestinal invertido. Dependiendo del compuesto cuantificado, sus relaciones de flujo de transporte entre los lados apicales y basolaterales varía, mostrándose una reducción en los valores a medida que se incrementa el tiempo de incubación intestinal para ácido cafeico.

Cuadro 12. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}), permeabilidad neta (P_{app} Neta) y relación de flujo de salida de los compuestos fenólicos en los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* del totopo horneado 70:30.

Compuesto Fenólico	Tiempo de Incubación ¹	AP → BL ² P_{app} (x 10 ⁻³)	BL → AP ² P_{app} (x 10 ⁻³)	P_{app} neta ² (x 10 ⁻³)	Relación de Flujo
Ácido Gálico	15	ND	1.390 ^a	-	-
	30	ND	0.002 ^b	-	-
	60	0.319	0.096 ^c	0.415	0.30
	120	ND	0.729 ^d	-	-
Ácido Cafeico	15	0.096 ^a	0.634 ^a	0.730 ^b	6.58 ^a
	30	0.077 ^b	0.063 ^b	0.140 ^a	0.30 ^b
	60	0.071 ^b	0.108 ^c	0.179 ^c	1.52 ^c
	120	0.048 ^d	0.057 ^d	0.105 ^a	1.19 ^d
Ácido Ferúlico	15	ND	0.330 ^a	-	-
	30	ND	0.166 ^b	-	-
	60	ND	0.064 ^c	-	-
	120	0.005	0.032 ^d	0.037	6.77
Quercetina	15	ND	0.327 ^a	-	-
	30	ND	0.119 ^b	-	-
	60	ND	0.081 ^c	-	-
	120	0.006	0.023 ^d	0.029	4.14

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

Para el flujo de apical a basolateral, se mostró una progresiva reducción en los valores para el ácido cafeico, el único que pudo ser cuantificado para este cálculo. De acuerdo con lo reportado por Artusson *et al.*, (2001), los valores de flujo $P_{app} < 1 \times 10^{-7}$ cm/s y $P_{app} > 1 \times 10^{-6}$ cm/s corresponden a baja y alta permeación, respectivamente, para evaluaciones de absorción de medicamentos en monocapas de células Caco-2; otros autores reportan valores diferentes ($P_{app} < 5 \times 10^{-6}$ para

baja permeabilidad y $P_{app} > 14 \times 10^{-6}$ cm/s para alta permeabilidad) (Volpe *et al.*, 2007). Asimismo, Artusson *et al.*, (2001), sugieren que cuando existen altas permeabilidades, el modelo *in vivo* se asemeja al modelo propuesto por ellos de Caco-2, donde un incremento en la magnitud de 10^1 indica un incremento del 100% de la permeabilidad para un sistema *in vivo*.

Tomando en consideración que las permeabilidades encontradas para el ácido cafeico de apical a basolateral son altas, pudiendo sugerir que existe alta semejanza con un modelo *in vivo*, así como reducciones en su absorción intestinal conforme se incrementa el tiempo de digestión. Este comportamiento es similar al reportado por Campos-Vega *et al.*, (2015), para coeficientes de permeabilidad calculados para fenoles totales, taninos condensados y flavonoides en una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* de café usado.

Hubatsch *et al.* (2007), en un protocolo propuesto de permeabilidad de drogas y predicción de su absorción *in vitro* utilizando un modelo de monocapas de células Caco-2, sugieren que relaciones de flujo menores a 0.5 y mayores a 2.0 corresponden a transporte activo o mecanismos de absorción, por lo que para ácido cafeico se estaría presentando entre 15 y 30 minutos de digestión un transporte activo, pasado luego a ser pasivo de entre 60 y 120 minutos de digestión. Este comportamiento sólo pudo ser calculado para todos los tiempos de digestión intestinal para ácido cafeico, ya que se cuenta con todos los valores de permeabilidad aparente. Sin embargo, los valores de relación de flujo de ácido ferúlico y quercetina a 120 minutos y ácido gálico a 60 minutos indican transportes de tipo activo, siendo notoriamente altos los correspondientes a ácido ferúlico (120 minutos) y cafeico (15 minutos). Estos resultados difieren de lo reportado por Anson *et al.*, (2009), que sugieren un transporte pasivo para ácido ferúlico en una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* de fracciones de trigo y pan, aunque Poquet *et al.*, (2008), sugiere un transporte de difusión pasiva transcelular.

Los comportamientos para el flujo de basolateral a apical son variables; si bien ácido gálico y ácido cafeico muestran similitudes en el comportamiento, iniciando con un valor que progresivamente disminuye entre los 15 y 30 minutos de

digestión, éste se incrementa de 30 a 120 minutos, sin llegar a alcanzar valores mayores al flujo inicial en 15 minutos. En cambio, ácido ferúlico y quercetina sí muestran una marcada reducción del flujo desde los 15 hasta los 120 minutos de digestión. Los valores encontrados muestran alta permeabilidad de los compuestos de la membrana basolateral a la apical, mayores que en el sentido contrario, sugiriendo que estos compuestos fenólicos de la botana horneada podrían ser sustrato para algún transportador de flujo para ser llevados de forma activa de regreso al lumen intestinal, comportamiento similar a lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2015).

Específicamente para ácido gálico, las velocidades de flujo de apical a basolateral y viceversa son mayores a las reportadas por Jiamboonsri *et al.*, (2015), en el que para una simulación de permeabilidad *in vitro* de compuestos fenólicos extraídos del interior de la semilla de mango en lisados celulares de Caco-2, cuantificaron entre un tiempo de 180 y 240 minutos valores de $P_{app\ A\rightarrow B}$: 1.02×10^{-6} cm/s y $P_{app\ B\rightarrow A}$: 1.02×10^{-6} cm/s para una concentración de ácido gálico 20 μ M (relación de flujo de 1.00), $P_{app\ A\rightarrow B}$: 0.35×10^{-6} cm/s y $P_{app\ B\rightarrow A}$: 1.87×10^{-6} cm/s (relación de flujo de 5.34) para el ácido gálico mezclado con metil galato y pentagalolil glucopiranososa; y $P_{app\ A\rightarrow B}$: 1.46×10^{-6} cm/s y $P_{app\ B\rightarrow A}$: 8.04×10^{-6} cm/s (relación de flujo de 5.51) en la semilla de mango. Las diferencias encontradas en los coeficientes de permeabilidad sugieren que cuando el ácido gálico se encuentra dentro de una matriz compleja, su absorción intestinal se incrementa, confirmado por los mayores valores de permeabilidad presentes en el ácido gálico en la semilla de mango que de forma aislada o mezclado con otros estándares puros. En complemento, las mayores relaciones de flujo reportadas por estos autores sugieren que a mayor tiempo de tránsito intestinal el ácido gálico mejora su absorción intestinal y reduce su regreso al lumen.

Frente al ácido ferúlico, se presentaron bajos valores de permeabilidad, coincidiendo con el comportamiento reportado por Chen *et al.*, (2011), en el que estándares puros de curcumina, epicatequina, ácido ferúlico, ácido gálico, quercetina, resveratrol, ácido rosmarínico y rutina fueron incubados en una

simulación *in vitro* de fluido gástrico (pH 1.2) por 1 hora y posteriormente se sometieron a un modelo de fluido intestinal *in vitro* (pH 6.8) por 3 horas. Estos autores reportaron un coeficiente de permeabilidad $P_{app\ neta}$ de 8.57×10^{-7} cm/s, menor al reportado en este trabajo, variabilidad que puede ser dada en función de si el compuesto es sometido puro a digestión gastrointestinal *in vitro* o si se encuentra en una matriz alimenticia.

Por último, para quercetina se encontraron igualmente bajos valores de permeabilidad, comportamiento igualmente reportado previamente por Chen *et al.*, (2011), los cuales sugieren que junto a resveratrol, el transporte es considerablemente pobre frente a otros compuestos fenólicos. Lund & Pantuso (2014), en un modelo de monocapas de células Caco-2, reportaron bajos valores de permeabilidad intestinal para quercetina del lado apical al basolateral, reportando $P_{app\ A \rightarrow B}$: 10×10^{-6} cm/s para quercetina pura, para la combinación de quercetina y resveratrol de $P_{app\ A \rightarrow B}$: 12×10^{-6} cm/s y un $P_{app\ A \rightarrow B}$: 11×10^{-6} cm/s de quercetina en combinación con curcumina. Los autores sugieren que estos valores corresponden a la baja estabilidad de quercetina a pH fisiológicos, aunque muestran que la quercetina en combinación con otros componentes exhibe mayor permeabilidad, lo que podría explicar los mayores valores reportados en este trabajo para este flavonoide.

VI.4. Flujo de Agua del saco intestinal invertido durante el ensayo de permeabilidad *in vitro* del totopo horneado 70:30.

El efecto del flujo de agua en el sistema de saco gastrointestinal invertido de acuerdo a la metodología modificada por Campos-Vega *et al.*, (2015), se muestra en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Cambios en el flujo de agua durante la absorción en el yeyuno de la digestión gastrointestinal *in vitro*

Tiempo de Incubación	Blanco ¹	Totopo Horneado 70:30 ¹
15 min	0.06 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.02 ^a
30 min	0.08 ± 0.02 ^{ab}	0.67 ± 0.08 ^b
60 min	0.09 ± 0.006 ^b	0.07 ± 0.02 ^a
120 min	0.14 ± 0.02 ^c	0.06 ± 0.001 ^a

Los resultados representan la media de tres réplicas ± desviación estándar (expresados en base seca). Diferentes letras (minúsculas) en la misma columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Tukey. El blanco corresponde a fluido salival sometido a digestión colónica *in vitro* de los voluntarios sanos. ¹ Flujo de agua medido como g agua / g de intestino fresco.

Los resultados encontrados reflejan, para el blanco sometido a digestión gastrointestinal *in vitro*, incrementos significativos ($p < 0.05$) en el flujo de agua entre 60 y 120 minutos, comportamiento similar al reportado por Campos-Vega *et al.*, (2015), para una digestión gastrointestinal *in vitro* de café usado con tostado medio y oscuro. Estos incrementos en el flujo de agua corresponden a un aumento en la humectabilidad del intestino y su capacidad de absorción (Campos-Vega *et al.*, 2015).

Respecto a la botana horneada, el comportamiento fue dispar, puesto que se presentaron incrementos significativos ($p < 0.05$) en el flujo de agua de 15 a 30 minutos de digestión intestinal, pero luego se presenta una progresiva reducción del mismo hasta los 120 minutos de digestión, sin ser estadísticamente significativa entre 60 y 120 minutos. Esto podría sugerir que conforme pasa el tiempo de incubación, para la botana horneada, se presenta una reducción no significativa ($p < 0.05$) en la capacidad de absorción del segmento intestinal, indicando de modo general que de 15 a 120 minutos el segmento mantiene sus condiciones de humedad y capacidad de absorción de compuestos.

La variabilidad en la capacidad de absorción fue reportada por Khemiss *et al.*, (2005), los cuales para una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando la técnica del saco invertido con perfusiones del extracto acuoso de hojas de *Prasium majus* L. a diferentes velocidades de flujo (8 g/L y 16 g/L) explicaron que

las variaciones en el flujo de agua en las diferentes secciones del intestino son debidas a la cantidad y distribución variable de acuaporinas y canales proteicos presentes en el epitelio intestinal.

VI.5. Efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la FND del totopo horneado 70:30 sobre el pH del medio de incubación.

Experimentos llevados a cabo por Farmer *et al.*, (2014), en el que pacientes ingirieron una cápsula inalámbrica de movilidad (WMC o wireless motility capsule, por sus siglas en inglés), han sugerido que la medida del pH del medio de fermentación es un adecuado biomarcador indirecto de fermentación colónica, resaltando la relevancia de la medida de este parámetro.

El Cuadro 14 muestra el efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del totopo horneado 70:30 sobre el pH del medio de incubación, siguiendo la metodología desarrollada por Campos-Vega *et al.* (2009).

Cuadro 14. Efecto de la Fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del totopo horneado 70:30 sobre el pH del medio de incubación.

Muestra	pH			
	0 h	6 h	12 h	24 h
T7030	6.54 ± 0.02 ^{Aa}	5.21 ± 0.20 ^{Ba}	5.24 ± 0.31 ^{Ba}	5.44 ± 0.52 ^{Ca}
Control (+)	6.83 ± 0.25 ^{Ab}	4.31 ± 0.07 ^{Bb}	4.30 ± 0.65 ^{Bb}	4.17 ± 0.38 ^{Bb}
Control (-)	6.91 ± 0.22 ^{Ab}	6.42 ± 0.22 ^{Bc}	6.57 ± 0.21 ^{ABc}	6.67 ± 0.16 ^{ABc}

T7030= Totopo horneado 70% harina de maíz nixtamalizado y 30% harina de frijol cocido. El control (+) corresponde a medio de fermentación con Rafinosa (100 mg) e inóculo fecal humano (1 mL de inóculo fecal); el control (-) corresponde a medio de fermentación con inóculo fecal humano (1 mL de inóculo fecal). Los resultados representan la media de tres experimentos ± desviación estándar. Diferentes letras (mayúsculas) por renglón expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) por la Prueba de Tukey entre los diferentes tiempos de fermentación para el mismo tipo de muestra. Diferentes letras (minúsculas) por columna expresan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) por la Prueba de Tukey para el mismo tiempo de fermentación.

Los valores de pH disminuyeron a medida que se incrementó el tiempo de fermentación tanto en el totopo como en los controles, aunque no se presentaron diferencias significativas entre la reducción del tiempo de 6 h y 12 h ($p > 0.05$). De

modo general, la mayor reducción de pH para el control positivo (rafinosa) se presenta en el tiempo de 6 h, comportamiento similar al reportado por Campos-Vega *et al.*, (2009), aunque el porcentaje de caída de pH de este trabajo (20.34 %) es mayor al reportado por Campos-Vega *et al.*, (2009) (4.82 % a 8.03 %). Mikkelsen *et al.* (2004) reportaron una caída del pH en las primeras seis horas desde 6.5 hasta valores por debajo de 5.8 para una fermentación *in vitro* de fructo-oligosacáridos y transgalacto-oligosacáridos utilizando poblaciones bacterianas del tracto gastrointestinal de lechones, resultados que son similares a los reportados en este trabajo. Los autores igualmente sugieren que estas reducciones en el pH, junto a la producción de ácidos orgánicos como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son indicadores de actividad fermentativa por parte de la microbiota a nivel del colon. Sin embargo, las diferencias que puedan presentarse en los valores de pH pueden ser dadas por la naturaleza de los polisacáridos constituyentes de la materia prima sometida a fermentación, donde a mayor contenido de α -galactósidos, mayor es la reducción de pH durante el proceso fermentativo (Campos-Vega *et al.*, 2009).

Para el control negativo, los resultados son similares a los reportados por Campos-Vega *et al.*, (2012a) para el período de 0 a 12 horas para inóculo fecal humano y utilizando la misma metodología de fermentación colónica *in vitro*, pero el resultado cuantificado en este trabajo para 24 horas es mayor al reportado por los autores indicados (5.82), aunque las mayores diferencias de pH se presentaron entre 6 y 12 horas, coincidiendo con el comportamiento reportado por estos autores para un inóculo fecal humano. Asimismo, los autores reportaron que no existen diferencias estadísticamente significativas respecto a la influencia de la fracción no digerible de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido en el pH de fermentación al comparar inóculo fecal humano con mezclas de microorganismos comerciales, razón que valida y justifica la posibilidad del uso de inóculo humano para este experimento. Sayar *et al.* (2007) atribuyen los incrementos de pH luego de 6 horas a la producción de metabolitos básicos como amoníaco.

Para el período de 12 h a 24 h de fermentación, se observa un incremento en el pH (excepto para el control (+) de rafinosa), comportamiento que no coincide

con lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2009), donde en el período de 12 a 24 horas hubo una nueva caída en el pH para diferentes cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), si bien algunos de estos no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los dos tiempos de fermentación tomados en consideración en este apartado. Sin embargo, los resultados coinciden con lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2012a), donde se experimentó una elevación no significativa ($p < 0.05$) del pH de 5.79 a 5.82. Walker *et al.* (2005) sugieren que la reducción en el pH del sustrato de fermentación en el colon por parte de la microbiota induce a la producción de ácido butírico, reducen las de ácido acético y estimula poblaciones de bacterias productoras de este ácido graso. Zamora-Gasca *et al.* (2015), para el mismo procedimiento de fermentación colónica *in vitro* llevado a cabo en este trabajo en ingredientes aislados de agave (*Agave tequilana* Weber var. *azul*), reportaron también ligeros incrementos en los valores de pH vinculados a los cambios en la producción de ácidos grasos de cadena corta.

Es importante destacar que la reducción del pH, además de su relación con la generación de ácidos grasos, se han asociado con la mayor prevalencia de diferentes familias microbianas, especialmente de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Pallin *et al.*, 2016), algunas de las cuales han sido relacionadas con efectos benéficos en la salud como *Lactobacillus reuteri*, reportado prebiótico que reduce los días de padecimiento de diarrea en niños y mejora los síntomas de esta condición (Weizman *et al.*, 2005).

VI.6. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en la fermentación colónica *in vitro* del extracto fermentado de la FND del totopo horneado 70:30 (EFFND).

En términos de su importancia fisiológica, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), en particular el acético, propiónico y butírico, son los mayores productos finales de los procesos de fermentación microbiana en el intestino grueso (comprenden más del 90 % de los ACGCC) (Ríos-Covián *et al.*, 2016); a partir de polisacáridos, oligosacáridos, proteínas, péptidos y precursores de glicoproteínas. Los polisacáridos son los principales progenitores de los AGCC y muchos tipos de

enzimas hidrolíticas bacterianas son sintetizadas por la microbiota colónica para digerir estas sustancias y facilitar la ingesta de sus componentes azucarados. En términos cuantitativos, el almidón resistente y los polisacáridos propios de la pared celular vegetal (celulosas y polisacáridos no celulósicos como arabinogalactanos, xilanos, pectinas, gomas y mucílagos) son los principales sustratos de fermentación en el intestino grueso (Macfarlane *et al.*, 2008).

El Cuadro 15 muestra la producción de AGCC (acético, propiónico y butírico) cuantificados por cromatografía de gases acoplada a detector de masas (GC-MSI) en los diferentes tiempos de fermentación colónica, así como la producción total y las relaciones molares de estos ácidos.

Cuadro 15. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en los diferentes tiempos de fermentación colónica del totopo horneado 70:30

EFFND	Ác. Acético ¹	Ác. Propiónico ¹	Ác. Butírico ¹	AGCC Totales ²	Relaciones Molares de AGCC ³
6h	650.50 ± 26.04 ^{a*}	257.37 ± 97.67 ^{a*}	487.32 ± 24.32 ^a	1395.19 ± 148.03 ^{a*}	47:18:35
12h	693.99 ± 45.49 ^{a**}	232.28 ± 17.11 ^{a**}	463.27 ± 15.65 ^{a**}	1389.54 ± 78.25 ^{a**}	50:17:33
24h	829.52 ± 1.96 ^{b***}	628.28 ± 0.01 ^{b***}	515.42 ± 82.60 ^{a***}	1973.22 ± 84.57 ^{b***}	42:32:26
RAFINOSA					
6h	1042.62 ± 187.16 ^{a*}	859.19 ± 20.45 ^{a*}	506.64 ± 50.76 ^a	2408.45 ± 258.37 ^{a*}	44:31:25
12h	1383.11 ± 111.75 ^{a**}	1355.46 ± 0.06 ^{b**}	625.02 ± 43.70 ^{a**}	3363.59 ± 155.51 ^{a**}	41:41:18
24h	4474.67 ± 369.26 ^{b***}	4258.09 ± 881.95 ^{c***}	811.57 ± 150.75 ^{b***}	9544.33 ± 1410.93 ^{b***}	47:45:8

EFFND: Extracto fermentado de fracción no digerible. Los resultados representan la media de dos experimentos ± desviación estándar. Diferentes letras por el mismo tipo de columna (ácido graso: acético, propiónico o butírico) expresa diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba *t* de Student para para el mismo tipo de muestra (EFFND y Control). *Expresa diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la Prueba de Dunnett, para cada tipo de ácido acético y tiempo de fermentación. AGCC: Ácidos grasos de cadena corta. ¹ Contenido de ácidos grasos de cadena corta en mmol compuesto/mL de muestra por cada 500 µg de muestra y 100 mg de rafinosa, respectivamente. ² Este valor se ha expresado como la suma cuantitativa de los contenidos de ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico, en mmol/L. ³ Las relaciones se han expresado como ácido acético:propiónico:butírico.

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la producción de AGCC entre el tiempo de 6 h y 12 h, aunque sí hubo diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre estos tiempos y el control de rafinosa para los tres AGCC cuantificados en este trabajo. En los tres tiempos de fermentación el control de rafinosa tuvo mayor producción de ácido acético, seguida de propiónico y

butírico, comportamiento que coincidió con lo reportado por Ferguson & Jones (2000) y Campos-Vega *et al.* (2009), para el mismo control de rafinosa. Smiricky-Tjardes *et al.* (2003), luego de 12 horas de fermentación *in vitro* con microbiota de origen porcino de sólidos de soya que contenían polisacáridos no solubles y oligosacáridos reportaron producciones de ácido acético, propiónico y butírico menores a los cuantificados en este trabajo (2.4 mmol/g muestra/hora, 1.9 mmol/g de muestra/hora y 0.7 mmol/g de muestra/hora, respectivamente). Los resultados de este trabajo muestran que en cualquiera de los tiempos de fermentación evaluados, el ácido acético es el que se encuentra en mayor proporción, coincidiendo con numerosos estudios reportados por otros autores (Louis *et al.*, 2007; Ríos-Covián *et al.*, 2016)

Para el tiempo entre 12 y 24 horas, sólo hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la producción de ácido propiónico. Ferguson & Jones (2000) reportaron, luego de una fermentación colónica *in vitro* para 10 mg de rafinosa, estaquiosa y verbascosa producciones de ácido acético, propiónico y butírico en porcentajes del 96 % al 114 % respecto a un control de 10 mg de rafinosa, lo que indicaría que las producciones deberían ser muy semejantes al control luego de 24 horas de fermentación, comportamiento que de acuerdo a lo cuantificado en este trabajo sería similar en la producción de ácido butírico. Sin embargo, hay que considerar que las cantidades de oligosacáridos presentes en la muestra sometida a fermentación fueron variables, sin ser iguales en cantidad al control sometido a fermentación.

Los resultados de AGCC producidos a partir del control son menores a los reportados por Campos-Vega *et al.* (2009) para la misma cantidad de rafinosa pero con modificaciones a la metodología de fermentación colónica *in vitro* utilizada, indicando una producción de 30 mmol/mL, 8 mmol/mL y 2 mmol/mL, respectivamente para ácido acético, propiónico y butírico, al finalizar el tiempo de fermentación de 24 horas. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la mayor concentración de inóculo fecal utilizada por Campos-Vega *et al.* (2009) (2 g de

inóculo fecal humano en 18 mL de solución amortiguadora de fosfatos) la cual permitió mayor producción de estos ácidos grasos.

Mikkelsen *et al.*, (2004), reportaron tasas de producción variables de ácido propiónico, acético y butírico (producción en el ciego: 4 mmol/kg-hora, 6.5 mmol/kg-hora y 1.7 mmol/kg-hora, respectivamente; producción en el colon medio: 12.7 mmol/kg-hora, 10.6 mmol/kg-hora y 8.3 mmol/kg-hora), a partir de fructo-oligosacáridos y transgalacto-oligosacáridos fermentados por parte de microbiota colónica extraída del tracto gastrointestinal de lechones. Estas producciones son menores, siendo importante considerar que los resultados reportados en por estos autores al cabo de 24 horas de fermentación parten de una materia prima diferente. Además, sugieren que la producción de ácido butírico es típica en procesos fermentativos de oligosacáridos en monogástricos, donde el incremento en su producción ha sido aceptado como positivo gracias a los efectos específicos que tiene en la salud como servir de energía de sustrato para los colonocitos, aunque se metaboliza principalmente en el hígado (Dersjant-Li *et al.*, 2010).

De modo general, se ha reportado que los AGCC tienen diferentes propiedades, entre ellas el incremento en la absorción de agua y sodio en el colon, ayudan en la proliferación y diferenciación de células de la mucosa, provocan acidificación del ambiente luminal (lo que reduce la actividad de la enzima bacteriana 7- α -dehidroxilasa, evitando así la conversión de ácidos biliares primarios en secundarios, más tóxicos), proveen energía a los colonocitos, ayudan en la inhibición de la síntesis de colesterol, mejora el flujo sanguíneo colónico, mejoran la función inmune y tienen efectos tróficos preventivos en la generación de poblaciones de células anormales (Gropper & Smith, 2013; Macfarlane *et al.*, 2008). Las diferencias pueden ser debidas a la naturaleza de polisacáridos sometidos a fermentación colónica.

En el Cuadro 15 igualmente se observa un incremento en la producción de AGCC conforme aumenta el tiempo de fermentación, coincidente a lo reportado por varios autores frente al incremento en la producción de ácido propiónico y butírico, pero con reducciones de ácido acético que vienen a ser compensadas por el

incremento en los otros dos AGCC (Walker *et al.*, 2005). Campos-Vega *et al.*, (2009), para la misma metodología de fermentación colónica *in vitro* en diferentes cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocidos reporta incrementos en la producción de los AGCC.

En lo que respecta a las relaciones molares, se encontraron relaciones variables en los diferentes tiempos de fermentación, mostrándose una reducción en la relación molar de ácido propiónico, comportamiento que fue igual tanto en la muestra como los controles, conforme aumenta el tiempo de fermentación. Este comportamiento también fue reportado por Campos-Vega *et al.* (2009), para el mismo control y metodología de fermentación, si bien las relaciones molares del control son diferentes, indicando una relación de 75:20:5 para ácido acético:propiónico:butírico a las 24 horas de fermentación. Asimismo, los autores reportan relaciones molares variables para harinas de diferentes cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido (Negro 8025, 65:15:20; Bayo Madero, 64:16:20; Pinto Durango, 68:13:18 y Azufrado Higuera, 58:21:21, si bien las diferencias son porque los resultados de este trabajo corresponden a una matriz alimenticia diferente.

Varios estudios han sugerido que muchas de las propiedades de los productos naturales, en relación a su capacidad antioxidante, están relacionadas con su contenido de polifenoles por la capacidad que tienen estos de secuestrar radicales libres originarios de diferentes especies reactivas de oxígeno y nitrógeno tales como el anión Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el singlete de oxígeno (1O_2), radical peroxilo (ROO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}), ión hipoclorito ($ClO^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$) (Kasanga *et al.*, 2015). Por ello, se consideró relevante calcular la correlación existente entre el comportamiento de algunos de los compuestos fenólicos cuantificados a lo largo del tracto gastrointestinal y su capacidad antioxidante en las diferentes etapas del mismo proceso.

VI.7. Efecto del EFFND en el modelo de macrófagos murinos.

Para el ensayo celular fue evaluada primero la posible citotoxicidad (viabilidad celular) del extracto de fermentación (EFFND) de 24 horas (EF24) sobre el modelo de macrófago murinos RAW 264.7 a diferentes concentraciones y de esta manera poder evaluar su potencial como antiinflamatorio en la reducción de la producción de óxido nítrico. Se utilizó este extracto porque fue aquél que presentó el mayor contenido detectable de compuestos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta, así como los mayores valores de capacidad antioxidante.

VI.7.1 Efecto del EFFND sobre la viabilidad celular

Se evaluó el efecto del EFFND24 de la botana horneada 70:30 por medio del ensayo MTT para determinar la posible citotoxicidad de dicho extracto en macrófagos murinos RAW 264.7. En la Figura 3 y se muestran el efecto del EFFND24 sobre la viabilidad celular.

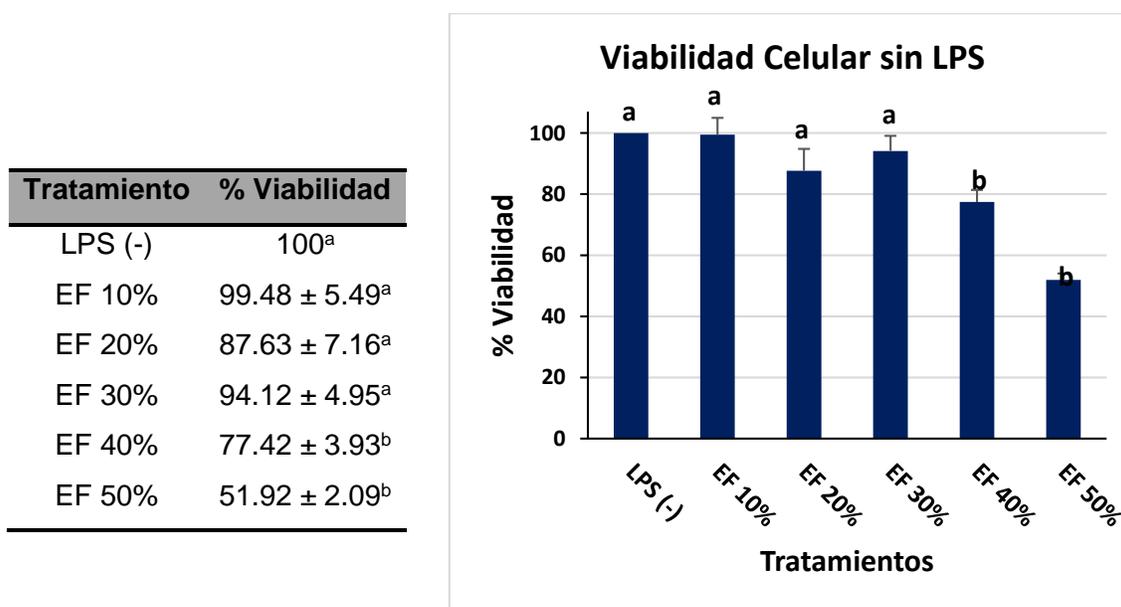


Figura 3. Efecto del EFFND24 de la botana horneada sobre viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 sin lipopolisacáridos (LPS).

EF: Extracto de la fracción no digerible de la botana horneada de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido de 24 horas; LPS: Lipopolisacáridos. Cada valor representa la media de dos experimentos independientes ± desviación estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa respecto a LPS (-) por la Prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Los resultados muestran que sólo se presentó citotoxicidad en los tratamientos con el extracto fermentado al 40% y 50%, por lo que se podría concluir que sólo los tratamientos que van del 10% al 30% son aquellos que podrían ser utilizados en este modelo celular sin producir citotoxicidad. Estos resultados de viabilidad dependen del extracto a utilizar, ya que como tiene una composición compleja, su efecto sobre citotoxicidad es variable. López-Barrera (2016), para una evaluación del extracto fermentado de la fracción no digerible de café usado, tras ser sometido a la misma metodología seguida en este trabajo de digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro*, utilizando un modelo de macrófagos RAW 264.7, determinaron que las concentraciones que no producían citotoxicidad eran aquellas que iban del 5% al 25% para macrófagos sin estimulación por lipopolisacáridos (LPS).

Del mismo modo, se evaluó el efecto del EFFND24 de la botana horneada de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido por medio del ensayo MTT para determinar la citotoxicidad de dicho extracto en macrófagos murinos RAW 264.7 previamente estimulados con lipopolisacáridos (LPS) (Figura 4).

Tratamiento	% Viabilidad
LPS (-)	100 ^a
LPS (+)	88.07 ± 3.39 ^a
EF 10%	99.22 ± 1.72 ^a
EF 20%	85.17 ± 3.03 ^a
EF 30%	86.95 ± 0.89 ^a
EF 40%	85.97 ± 0.38 ^a
EF 50%	82.99 ± 6.56 ^a

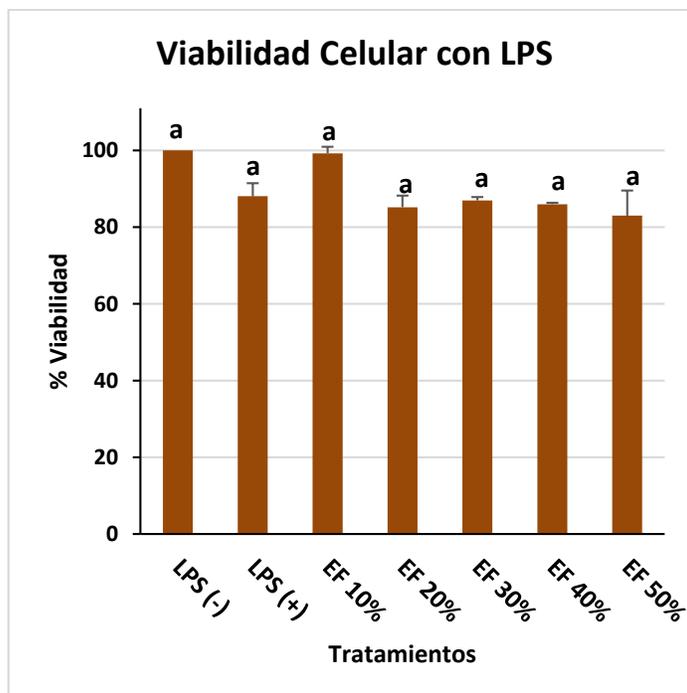


Figura 4. Efecto del EFFND24 de la botana horneada 70:30 sobre viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 con LPS.

EF: Extracto fermentado de la fracción no digerible de la botana horneada de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido de 24 horas; LPS: Lipopolisacáridos. Cada valor representa la media de dos experimentos independientes ± desviación estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa respecto a LPS (-) por la Prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

La estimulación por medio del uso de LPS en macrófagos murinos es uno de los modelos *in vitro* más utilizados para la simulación de inflamación. Su estímulo se da gracias a la participación de los Receptores Similares a Toll (TLR), que son una familia de proteínas de membrana que sirven como patrón de reconocimiento de una gran variedad de moléculas derivadas de microorganismos. Se han identificado una gran variedad de TLR como los que identifican Lipopolisacáridos de bacterias gram negativas (TLR4); los que reconocen péptidoglicanos, ácido lipoteicoico y lipoarabinomananos de bacterias gram positivas (TLR2), flagelina (TLR5) y motivos no metilados de islas CpG (TLR9) (Fujiwara & Kobayashi, 2005).

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer reporte del efecto del extracto fermentado de la fracción no digerible de una botana horneada de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido (EF) sobre viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Los resultados mostrados en la Figura 4 sugieren

que todos los tratamientos ensayados no provocan citotoxicidad celular al no presentar diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control de viabilidad (células sin estimulación con lipopolisacáridos). Los valores obtenidos son similares a los reportados por López-Barrera *et al.*, (2016), donde para una evaluación del extracto fermentado de la fracción no digerible de café usado, tras ser sometido a la misma metodología seguida en este trabajo de digestión gastrointestinal *in vitro* y fermentación colónica *in vitro*, utilizando un modelo de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Estos autores determinaron que las concentraciones que no producían citotoxicidad correspondían a aquellas que iban del 5 % al 25 %, reportando valores de viabilidad entre el 87 % y 91.9 %. Mientras que Torres-Rodríguez *et al.*, (2016), para macrófagos estimulados con LPS y sometidos a diferentes concentraciones de extracto acuoso de hojas secas de *C. urticifolia* (10, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$) reportaron viabilidades por medio del ensayo MTT del 99.6 al 144.6%. Estos valores de viabilidad pudieron ser debidos a las características de la materia prima ensayada en los macrófagos y la composición química de la misma.

El incremento en la viabilidad de macrófagos estimulados por LPS ha sido reportado por Zhuang & Wohan (1997), los cuales argumentaron que la exposición de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS o interferón gamma recombinante (IFN- γ) y expuestos a bajas concentraciones de óxido nítrico (ON) por largos períodos de tiempo genera respuestas metabólicas celulares de protección como agentes detoxificantes celulares como glutatión, proteínas de choque térmico. Asimismo, varios autores han reportado que los ensayos que buscan medir viabilidad celular por medio de MTT, a pesar de su aplicación extensiva y practicidad, pueden tener variaciones importantes dependiendo de la actividad metabólica o los tratamientos químicos a los que son sometidos las células (Wang *et al.*, 2010).

Wang *et al.* (2010) en células de adenocarcinoma de próstata humano LNCaP y células MCF-7, reportaron que la medición de viabilidad celular con MTT puede presentar diferencias importantes debido al principio de funcionamiento de la reacción; considerando que MTT es una sal tetrazolio que es reducida a cristales

púrpuras de formazán principalmente debido a la acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, y que en teoría la intensidad del color se correlaciona con el número de células viables. Se ha informado que algunos fitoquímicos pueden cambiar la actividad de succinato deshidrogenasa o interactuar de forma directa con MTT, generando los cambios y dificultades en la reproducibilidad del ensayo. Asimismo, estos cambios en la actividad enzimática pueden provocar una mayor formación de cristales de formazán que en la cuantificación superan en coloración al control negativo, ocasionando viabilidades superiores al 100%.

VI.7.2 Efecto del EFFND de la botana horneada 70:30 sobre la producción de óxido nítrico (ON):

Se ha reportado que el óxido nítrico (ON) es una molécula importante de respuesta defensiva de un organismo frente al ataque de varios patógenos como bacterias, virus, hongos y parásitos. Bajo condiciones fisiológicas normales, la producción de ON a niveles basales ayuda a la vasodilatación y tiene efectos antiinflamatorios (ya que inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio vascular (modulando las moléculas de adhesión endotelial) y secuestra los aniones superóxido al reaccionar con ellos por su baja vida media al tener un par de electrones desapareado). Sin embargo, su producción irregular provoca cambios en la adhesión de dichos leucocitos, en la producción de moléculas de adhesión asociadas y estimula el proceso inflamatorio (Fujiwara & Kobayashi, 2005). Estos efectos son debidos a que el ON producido por los macrófagos actúa como un radical libre y por tanto es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales ya que tiene la capacidad de oxidar grupos sulfhidrilos de las proteína, así como reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno (NO₂) y radical hidroxilo (OH[•]), sustancias fuertemente oxidantes (Pérez-Ruíz *et al.*, 1997). Por tanto, la medida de la producción de óxido nítrico y su inhibición constituye una medida del potencial antiinflamatorio de compuestos y matrices alimentarias.

La Figura 5 muestra la producción de óxido nítrico (en % de LPS) para diferentes concentraciones del extracto fermentado de la fracción no digerible de 24

horas de la botana horneada en un modelo de inflamación *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 previamente estimulados con LPS.

Tratamiento	Producción de ON (% LPS)
LPS (+)	100
LPS (-)	11.73 ± 0.11
EF 10%	41.05 ± 0.97
EF 20%	32.30 ± 1.39
EF 30%	28.21 ± 0.23
EF 40%	12.97 ± 0.23
EF 50%	15.40 ± 0.40

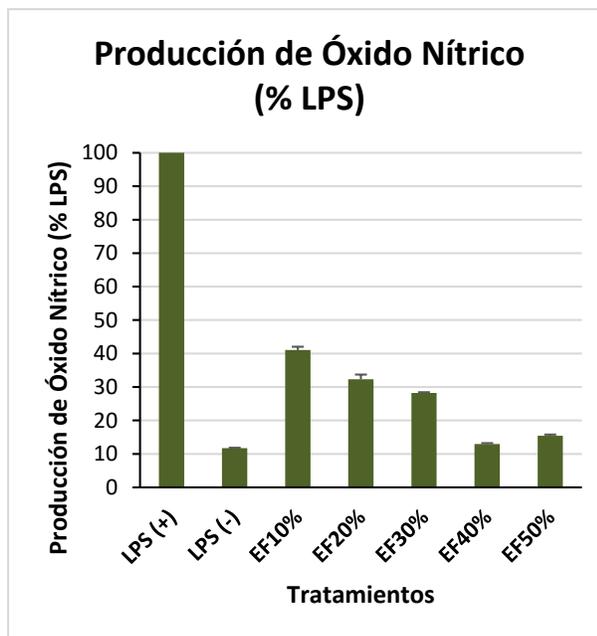


Figura 5. Efecto del EFFND24 de la botana horneada 70:30 sobre la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

EF: Extracto fermentado de la fracción no digerible de la botana horneada 70:30 de 24 horas; LPS: Lipopolisacáridos. Los resultados corresponden a la media de dos experimentos independientes ± desviación estándar.* Indica diferencia significativa con respecto al tratamiento LPS (+) por la Prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Hasta lo revisado en la literatura este es el primer reporte del efecto del extracto fermentado de la fracción no digerible de una botana horneada de harina de maíces nixtamalizado y frijol común cocido sobre la producción de ON en un modelo de inflamación *in vitro* empleado macrófagos RAW 264.7 previamente estimulados con LPS. Los resultados reportados en la Figura 5 muestran una reducción dosis-dependiente de la concentración del extracto fermentado, mostrándose una reducción máxima en la producción de ON para el EFFND 40 %. Sin embargo, se observa un incremento en la producción de óxido nítrico para EFFND 50 %. Este comportamiento corresponde a una respuesta no monotónica, que fue extensivamente revisada por Vandenberg *et al.* (2012); quienes proponen que varias líneas celulares tienen respuestas diferentes al mismo tipo de sustancia debido a que expresan diferentes receptores que tienen respuestas diferentes a

sustancias como las hormonas que podrían estar naturalmente presente en las materias primas de las matrices alimentarias.

López-Barrera *et al.* (2016), para macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS y sometidos al efecto del extracto fermentado de la fracción no digerible de café usado, reportaron menor efecto en la producción de ON en términos de porcentaje de LPS, donde la mayor reducción fue cuantificada en el extracto al 50 % de concentración (casi el 50 %). Estas diferencias pueden ser dadas por la naturaleza del extracto fermentado utilizado que por proceder de una matriz diferente y por tanto diferente composición química.

Para los resultados presentados, se sugiere el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), ya que esta permitiría determinar la concentración de extracto necesaria para inhibir hasta el 50 % de la producción de óxido nítrico y así cuantificar las concentraciones de compuestos fenólicos y AGCC que pudiera producir un efecto fisiológico de reducción de óxido nítrico, pudiendo corroborar *in vitro* el potencial antiinflamatorio de la fracción no digerible de la botana horneada de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido. Respecto al potencial antiinflamatorio de los AGCC, se ha reportado que su incremento en el colon como parte de los metabolitos de fermentación de la microbiota colónica podría tener influencia en el proceso de inflamación.

Liu *et al.* (2012), en el mismo modelo macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, reportaron reducciones dosis dependiente de óxido nítrico al someter los macrófagos a diferentes concentraciones (0 $\mu\text{mol/L}$ hasta 1200 $\mu\text{mol/L}$) de acetato de sodio, propionato de sodio y butirato de sodio de 39.83 %, 70.74 % y 57.12 %, respectivamente. Para el mismo estudio, los autores también reportaron reducciones en la producción de factores pro-inflamatorios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e inhibición de la viabilidad de la sintetasa inducible por óxido nítrico (iNOS), además que mejoraron la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10.

Respecto a los compuestos fenólicos, se ha sugerido que algunos de estos tienen la capacidad de producir efectos antiinflamatorios gracias a su capacidad

antioxidante y modulación en diferentes vías de inflamación (Messaoudene *et al.*, 2011). García-Lafuente *et al.*, (2014), evaluaron en un modelo *in vitro* de macrófagos murinos 264.7 estimulados por lipopolisacáridos (LPS) el efecto anti oxidante y anti inflamatorio de extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos provenientes de frijol *white kidney* (WKB) y *round purple* (RPB), encontrando que RPB (con altas cantidades de proantocianidinas, glucósidos de catequina y ácido sinápico) obteniendo mayor capacidad antioxidante y mejor efecto anti inflamatorio que WKB (conformado principalmente por ácidos fenólicos) al reducir la producción de óxido nítrico (NO) y de interleucinas IL-1 β y IL-6, disminuían la expresión del dímero proteico NF- κ B p65 pero no ejercían efecto significativo en la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Jung *et al.* (2014), evaluaron los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de extractos metanólicos *Brassica oleracea* var. *gongylodes* sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos, reportando que gran parte de los efectos inhibitorios de la producción de iNOS y proteína COX-2, dos marcadores de inflamación, eran debidos a la riqueza en compuestos fenólicos de los extractos, especialmente de quercetina y ácido ursólico.

López-Barrera *et al.* (2016), para un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* de café usado reportaron, para un IC₅₀ de una mezcla de AGCC equivalente a 7.35 mmol/L de ácido acético, 2.64 mmol/L de ácido propiónico y 1.97 mmol/L de ácido butírico se cuantificó una inhibición del 72.6 % en la producción de óxido nítrico de macrófagos RAW 264.7 previamente estimulados con LPS, sugiriendo que esta mezcla de AGCC eran los principales responsables de la reducción de este biomarcador de inflamación.

Los resultados sugieren que los compuestos fenólicos y los ácidos grasos de cadena corta presentes en el extracto fermentado de la fracción no digerible pudieran tener potencial en la reducción de algunos marcadores de inflamación. Por lo tanto, se sugieren más estudios que ahonden en la reducción de más marcadores de inflamación con el fin de tener más certeza en el potencial antiinflamatorio de la botana horneada de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido.

VII. CONCLUSIONES

La botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, en la proporción 70:30 (maíz:frijol) es una alternativa nutritiva y funcional de un refrigerio hipocalórico por su alto contenido de proteína y minerales. No obstante, el contenido lipídico que presentó es proveniente de la variedad de maíz empleada y no es de alarmar pues presenta un perfil de ácidos grasos predominantemente insaturados, lo que contribuye con las apropiadas características químicas de este producto.

Asimismo, la botana presentó una buena composición nutracéutica al tener altos contenidos de fibra insoluble y fibra total y de compuestos bioactivos tales como: oligosacáridos (estaquiosa y verbascosa) y compuestos fenólicos (especialmente ácido ferúlico y ácido gálico), siendo éstos últimos contribuyentes de los valores de capacidad antioxidante (medidos por ABTS y DPPH).

Hasta el momento este es el primer reporte de la evaluación del comportamiento de compuestos bioactivos en una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* para una botana horneada, los cuales presentaron diversa bioaccesibilidad de oligosacáridos y compuestos fenólicos (especialmente ácidos fenólicos: gálico, clorogénico, ferúlico y cafeico; y flavonoides como (+)-catequina y quercetina), así como de capacidad antioxidante (medida por ABTS y DPPH), mayores a los reportados por algunos autores en otras matrices alimentarias y siendo el primer reporte de esta evaluación a lo largo del tracto gastrointestinal para una botana horneada. Esto indica capacidad de los mismos de aumentar su liberación conforme atraviesan el tracto intestinal debido a la acción de las enzimas o acomplejamientos para ser absorbidos en el intestino delgado o llegar intactos al colon.

La baja absorción a nivel intestinal de algunos de estos compuestos fenólicos (principalmente ácidos fenólicos, en porcentajes del 3.84 % al 33.15 %) indica que éstos, junto con los oligosacáridos, pasan casi en su totalidad al colon, donde fueron fermentados por la microbiota colónica (expresados en las reducciones de pH) y

produjeron ácidos grasos de cadena corta. El EFFND (40%), que contiene estos compuestos bioactivos, redujo la producción de óxido nítrico alrededor del 87 % sin producir efecto citotóxico en las células, en el modelo de inflamación *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

Estos resultados indican que la botana, por ser fuente de compuestos bioactivos y el comportamiento de los mismos en el modelo de digestión utilizado, así como la generación de metabolitos que en conjunto tienen potencial antiinflamatorio en la reducción de los niveles de óxido nítrico, es alternativa de botana hipocalórica para ser introducida en la industria de alimentos y así potenciar el uso de los ingredientes de la dieta tradicional mexicana en un producto que no sólo genere saciedad sino que lleve consigo un beneficio a la salud.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E. S. M., Young, J. C., & Rabalski, I. (2006). Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4696-4704.
- Adeyemo, S.M. & Onilude, A.A. (2014). Reduction of oligosaccharide content by the action of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented cereals. *African Journal of Biotechnology*, 13 (37), 3790-3796.
- Aguilera, Y., Estrella, I., Benítez, V., Esteban, R. M. & Martín-Cabrejas, M. (2011). Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International*, 44, 774-780.
- Andreasen, M. F., Kroon, P.A., Williamson G. & Garcia-Conesa, M. T. (2001). Enterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 5679-5689.
- Anson, N. M., van den Berg, R., Havenaar, R., Bast, A. & Haenen, G. R. M. M. (2009). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, 49(2), 296 – 300.
- Anton, A. A., Fulcher, R. G. & Arntfield, S. D. (2009). Physical and nutritional impact of fortification of corn starch-based extruded snacks with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour: Effects of bean addition and extrusion cooking. *Food Chemistry*, 113, 989 – 996.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists (2002). Official Methods of Analysis. 17th Ed.; Arlington, VA. Métodos: 920.39, 920.85, 920.105, 923.03, 925.10, 925.23, 954.01, 991.43
- Aparicio-Fernández, X. García-Gasca, T., Yousef, G. G., Lila, M. A., González de Mejía, E., & Loarca-Piña, G. (2006). Chemopreventive activity of

- polyphenolics from Black Jamapa Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2116-2122.
- Aparicio-Fernández, X., Reynoso-Camacho, R., Castaño-Tostado, E., García-Gasca, T., González de Mejía, E., Guzmán-Maldonado, S. H., Loarca-Piña, G. (2008). Antiradical Capacity and Induction of Apoptosis on HeLa Cells by a *Phaseolus vulgaris* Extract. *Plant Foods Human Nutrition*, 63 (1), 35-40.
- Aparicio-Fernández, X., Yousef, G. G., Loarca-Piña, G., De Mejía, E., & Lila, M. A. (2005). Characterization of polyphenolics in the Seed Coat of Black Jamapa Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(11), 4615-4622.
- Arendt, E. K., & Zannini, E. (2013). Maizes. En: *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries* (pp. 67–115e). Woodhead Publishing.
- Awika, J.M.; Rooney, L.W.; Wu, X.; Ronald, L.; Cisneros-Zevallos, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 51, 6657-6662.
- Azizah, A. H., Wee, K. C., Azizah, O. & Azizah, M. (2009). Effect of boiling and stir-frying on total phenolic, carotenoids and radical scavenging activity of pumpkin (*Cucurbita moschato*). *International Food Research Journal*, 16, 45-51.
- Bahloul, N., Bellili, S., Aazza, S., Chérif, A., Faleiro M. L., Antunes, M. D., Miguel, M. G. & Mnif, W. (2016). Aqueous extracts from tunisian *Diploaxis*: Phenol content, antioxidant and anti-acetylcholinesterase gastrointestinal fluids. *Antioxidants*, 5(12), 2-15.
- Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza, A., & Rivera-Dommarco, J. A. (2013). Prevalence of obesity in Mexican adults 2000-2012.
- Belitz, H. D., & Weder, J. K. P. (1990). Protein inhibitors of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Reviews International*, 6(2), 151–211.

- Bellail, A. A., Shaltout, O. E., Youssef, M. M & El Gamal, A. M. A. (2012). Effect of home-cooking methods on phenolic compounds and antioxidant activity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L. Lam) cultivars grown in Egypt. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 490-499.
- Bello-Pérez, L.A., Flores-Silva, P. C., Camelo-Méndez, G. A., Paredes-López, O. & Figueroa-Cárdenas, J. D. (2015). Effect of the nixtamalization process on dietary fiber content, starch digestibility and antioxidant capacity of blue maize tortilla. *Cereal Chemistry Journal*, 92(3), 265-270.
- Beninger, C. W., & Hosfield, G. L. (2003). Antioxidant activity of Extracts, Condensed Tannins Fractions and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. coat color genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27): 7879-7883.
- Benítez-Cardoza, C. y Pfeiffer-Perea, H. (2006). El maíz: Origen, composición química y morfología. *Materiales Avanzados*(7), 15-20.
- Bird, A. R., Brown, I. L., & Topping, D. L. (2000). Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(1), 25–37.
- Boivin, D., Lamy, S., Lord-Dufour, S., Jackson, J., Beaulieu, E., Côté, M., Béliveau, R. (2009). Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*, 112(2), 374–380.
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L. & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialyzable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131, 1466-1472.
- Bressani, R. (2008). Cambios nutrimentales en el maíz inducidos por el proceso de nixtamalización. En M. E. Rodríguez-García *et al.* (Edits.), *Nixtamalización del maíz a la tortilla. Aspectos Nutrimentales y toxicológicos* (Primera ed.,

- págs. 19-52). Santiago de Querétaro, Querétaro, México: Editorial de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).
- Bressani, R., Turcios, J. C., De Ruiz, A. S. C. & De Palomo, P. (2004). Effect of processing conditions on phytic acid, calcium, iron and zinc contents of lime-cooked Maize. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 1157-1162.
- Brummer, Y., Kaviani, M. & Tosh, S. (2015). Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Research International*, 67, 117-125.
- Campos-Vega, R., García-Gasca, T., Guevara-González, R., Ramos-Gómez, M., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2012a). Human Gut Flora-Fermented Nondigestible Fraction from Cooked Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Modifies protein Expression associated with Apoptosis, Cell Cycle Arrest and Proliferation in Human Adenocarcinoma Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (51), 12443-12450.
- Campos-Vega, R., Oomah, B. D., Loarca-Piña, G., & Vergara-Castañeda, H. A. (2013). Common Beans and Their Non-Digestible Fraction: Cancer inhibitory Activity - An overview. *Foods J*, 2(3), 374-392.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzmán-Maldonado, S. H., Paredes-López, O., Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), 59-62.
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., Oomah, B.D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 1-6.
- Campos-Vega, R., Vergara-Castañeda, H. A., & Oomah, B. D. (2012b). Functional Food Sources: Beans in sight. En E. Popescu, I. Golubev, E. Popescu, & I.

- Golubev (Edits.), *Beans. Nutrition, Consumption and Health* (págs. 3-58). New York, Estados Unidos: Nova Science Publishers.
- Capriles, V., Soares, R., & Arêas, J. (2009). Storage stability of snacks with reduced saturated and trans fatty acids contents. *Food Science and Technology*, 29(3), 690-695.
- Cardador-Martínez, A., Jiménez-Martínez, C., Amaya-Llano, S., Pedrosa, M. M., Cuadrado, C. & Muzquiz, M. (2014). Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), En: Mora-Escobedo, R., De J. Berrios, J. & Gutiérrez-López, G., *Seeds as functional foods and nutraceuticals*. Nova, 115-126.
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., Oomah, B.D. (2002). Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 6975-6980
- Cardona, S. M., Garcia, J. A., & Cardona, A. E. (2013). The fine balance of chemokines during disease: trafficking, inflammation, and homeostasis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1013, 1–16.
- Carmona-García, R., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., Bello-Pérez, L. A. (2007). Composition and effect of soaking on starch digestibility of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Mayacoba. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 296–302.
- Castro de Pardo, C. (2006). *Determination of the cytotoxic effects of extracts fractions, or substances, by means of the MTT Test*. Recuperado el 24 de Mayo de 2015, de IUPAC: http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf
- Champ, M. M. J. (2002). Non-nutrient bioactive substances of pulses. *The British Journal of Nutrition*, 88 (3), 307–319.
- Chavez-Santoscoy, R. A., Tovar, A. R., Serna-Saldivar, S. O., Torres, N., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2014a). Conjugated and free sterols from black bean

(*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors and their effect on lipid metabolism and cholesterol transport in rat primary hepatocytes. *Genes & Nutrition*, 9(1), 367.

Chavez-Santoscoy, R. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Granados, O., Torre-Villalvazo, I., Serna-Saldivar, S. O., Torres, N., Tovar, A. R. (2014b). Flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats modulate lipid metabolism and biliary cholesterol secretion in C57BL/6 mice. *British Journal of Nutrition*, 112(6), 886-899.

Chen, W., Mbadinga, B., Hamman, J. & Viljoen, A. (2011). Assessing the *in vitro* gastric stability and intestinal transport of selected natural molecules. *Planta Medica*, 77, PF92.

CIOMS (2002). Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Recuperado de http://www.ub.edu/rceue/archivos/Pautas_Eticas_Internac.pdf.

Couteau, D., McCartney, A. L., Gibson, G. R., Williamson, G. & Faulds, C. B. (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyze chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 873-881.

Coutiño-Estrada, B., Vásquez-Carrillo, G., Torres-Morales, B. y Salinas-Moreno, Y. (2008). Calidad de grano, tortillas y botanas de dos variedades de maíz de raza comiteca. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31, 9-14

Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C. & Remesy, C. (1999). Part of quercetina absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *American Journal of Physiology*, 277(1), 120-126.

Cruz-Bravo, R. K., Guevara-González, R., Ramos-Gómez, M., García-Gasca, T., Campos-Vega, R., Oomah, B. D. & Loarca-Piña, G. (2011). Fermented nondigestible fraction from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivar

- Negro 8025 modulates HT-29 cell behavior. *Journal of Food Science*, 76(2), 41-47.
- Cuéllar-Núñez, M. L. (2015). Desarrollo y evaluación nutrimental y nutracéutica de una botana horneada a partir de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido. Proyecto de tesis de Maestría. Programa de Posgrados del Centro de la República, PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Cuevas-Montilla E., Hillebrand, S., Antezana, A., & Winterhalter, P. (2011). Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian Purple Corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7068-7074.
- Cummings, J. H. & Macfarlane, G. T. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87 (2), 145-151.
- D'Antuono, I., Garbetta, A., Linsalata, V., Minervini, F. & Cardinali, A. (2015). Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* L.) subsp. *scolymus* Hayek: *in vitro* bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability. *Food and Function*, 6, 1268 – 1277.
- De la Parra, C., Serna-Saldivar, S. O., & Liu, R. H. (2007). Effect of processing on the Phytochemical profiles and Antioxidant Activity of Corn for Production of Masa, Tortillas, and Tortilla Chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4177-4183.
- Delcour, J.A. y Hosney, R.C. (2010). Structure of Cereals. In *Principles of Cereal Science and Technology* (Tercera, pp. 1–22). Leuven: AACC International.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. & Bakker, B. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325-2340.

- Déprez, S.; Brézillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapiere, C. & Scalbert, A. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by a human colonic microflora into low molecular weight phenolic acids. *Journal of Nutrition*, 130: 2733-2738.
- Dersjant-Li, M. C., McLeish, J. M. & Peisker, M. (2010). Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: a review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(10), 1386 - 1398.
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J.M., Castaño-Tostado, E. y Paredes-López, O. (2006). Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2045-2052.
- Dueñas, M., Sarmiento, T., Aguilera, Y., Benítez, V., Mollá, E., Esteban, R. M. & Martín-Cabrejas, M. A. (2016). Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). *Food Science and Technology*, 66: 72-78.
- Duodu, K., Taylor, J., Belson, P. & Hamaker, B. (2003). Factor affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Sciences*, 38, 117-131.
- Eckhoff, S. R., Paulsen, M. R., & Yang, S. C. (2003). MAIZE. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*: 3647–3653.
- Escudero-Álvarez, E. y González-Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutr. Hosp.*, 21, 61-72.
- FAO-WHO. (2004). Fruits and Vegetables for Health. WHO Publications.
Recuperado de: <http://www.fao.org/ag/magazine/fao-who-fv.pdf>
- Farmer, A. D., Mohammed, S. D., Dukes, G. E., Scott, S. M. & Hobson, A. R. (2014). Caecal pH is a biomarker of excessive colonic fermentation. *World Journal of Gastroenterology*, 20(17), 5000 – 5007.

- Feregrino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., García-Alcocer, G., Guevara-González, R., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Loarca-Piña, G. (2008). Composition and Chemopreventive effect of polyssacharides from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-Induced colon cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8737-8744.
- Feregrino-Pérez, A. A., Piñol-Felis, C., Gómez-Arbones, X., Guevara-González, R. G., Campos-Vega, R., Acosta-Gallegos, J., & Loarca-Piña, G. (2014). A Non-digestible Fraction of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induces cell cycle Arrest and Apoptosis during early carcinogenesis. *Plants Food Human Nutrition*, 69(3), 248-254.
- Ferguson, M. & Jones, G. P. (2000). Production of short-chain fatty acids following *in vitro* fermentation of saccharides, saccharide esters, fructo-oligosaccharides, starches, modified starches and non-starch polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 166 – 170.
- Fernandes, A. C., Nishida, W. & da Costa P., R. (2010). Influence of soaking on the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cooked with or without the soaking water: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 2209-2218.
- Ferreira, A., Naozuka, J., Kelmer, G. & Oliveira, P. (2014). Effect of domestic cooking on elemental chemical composition of beans species (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Processing*, 1-6.
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. & Chun, O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043 – 1048.
- Flores-Farías, R., Martínez-Bustos, F., Salinas-Moreno, Y. & Ríos, E. (2002). Caracterización de harinas comerciales de maíz nixtamalizado. *Agrociencia*, 36(5), 557-567.

- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88(6), 587-605.
- Fujiwara, N. & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets: Inflammation & Allergy*, 4(3), 281 – 286.
- Fukumoto, L. R. & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Gálvez R., L., Genovese, M. I. & Lajolo, F. M. (2009). Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5734-5742.
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M., & Martínez, J. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9), 537-552.
- García-Lafuente, A., Moro, C., Manchón, N., Gonzalo-Ruiz, A., Villares, A., Guillamón, E., Mateo-Vivaracho, L. (2014). In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chemistry*, 161, 216-223.
- Garrait, G., Jarrige J., Blanquet, S., Beyssac, E., Cardot, J. & Alric, M. (2006). Gastrointestinal absorption and urinary excretion of *trans*-cinnamic and *p*-coumaric acids in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2944-2950.
- Gasson, M., Kitamura, Y., Russel M., W., Narbad, A., Parr, A. J., Parsons, E. L. H., Payne, J., Rhodes, M. J. C. (1998). A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *The Journal of Biological Chemistry*, 13, 4163 – 4170.

- Gdala, J., Jansman, A. J. M., Buraczewska, L., Huisman, J. & van Leeuwen, P. (1997). The influence of α -galactosidase supplementation on the ileal digestibility of lupine carbohydrates and dietary protein in young pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 67, 115 – 125.
- Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. & Rudloff, S. (2000). Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *Journal of Nutrition*, 130 (12), 3014 – 3020.
- Gonthier, M., Donovan, J., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C. & Scalbert, A. (2003). Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free radical biology & Medicine*, 35 (8), 837-844.
- Gonthier, M., Remesy, C., Scalbert, A., Cheynier, V., Souquet, J., Poutanen & K., Aura, A. (2006). Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota *in vitro*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60(9), 536-540.
- González, R., Reguera, E., Mendoza, L., Figueroa, J. M., & Sánchez-Sinencio, F. (2004). Physicochemical changes in the Hull of Corn grains during their alkaline cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3831-3837.
- Gorinstein, S., Haruekit, R., Poovarodom, S., Vearasilp, S., Ruamsuke, P., Namiesnik, J., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Suhaj, M. & Sheng, G. P. (2010). Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochemical Analysis*, 21, 355 – 362.
- Gropper, S. S., & Smith, J. L. (2013). *Advanced Nutrition and Human Metabolism* (Tercera ed.). Washington: Wadsworth.
- Grunwald, C. (1975). Plant Sterols. *Annual Review of Plant Physiology*, 26(1), 209-236.

- Guajardo-Flores, D., García-Patiño, M., Serna-Guerrero, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2012). Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chemistry*, *134*(3), 1312-1319.
- Guajardo-Flores, D., Serna-Saldívar, S. O., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2013). Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, *141*(2), 1497-1503.
- Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Shirai, T. (2001). Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Letters*, *171*(1), 17–25.
- Harrabi, S., St-Amand, A., Sakouhi, F., Sebei, K., Kallel, H., Mayer, P. M., & Boukhchina, S. (2008). Phytosterols and phytosterols distributions in corn kernel. *Food Chemistry*, *111*(1), 115-120.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, *173*, 501–513.
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., & Kononowicz, A. K. (2014). *Phaseolus vulgaris* — Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances*, *32*(7), 1205–1215.
- Hollman, P. (2004). Absorption, bioavailability and metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, *42*, 74-83.

- Holzapfel, W.H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 197-212.
- Hoover, R., y Zhou, Y. (2003). *In vitro* and *in vivo* hydrolysis of legume starches by α -amilase and resistant starch formation in legumes - a review. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 401-417.
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., & Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2409–15.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87–92.
- Huang, D., Ou, N. & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841 – 1856.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. & Artusson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2(9), 2111 – 2119.
- Huber, K., Brigide, P., Bolis-Bretas, E. & Caniatti-Brazaca, S. (2014)., X., Effect of thermal processing and maceration on the antioxidant activity of white beans. *PLoS One*, 9(7).
- International Markets Bureau (2011). *Consumer Trends: Salty snacks Food in the United States*. Recuperado el 1 de Noviembre de 2014, de Market Indicador Report : http://www.gov.mb.ca/agriculture/market-prices-and-statistics/trade-statistics/pubs/us_snack_food_consumer_trends_en.pdf

- Islas-Gómez, E. (2015). Caracterización del perfil de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido y evaluación de su actividad antiinflamatoria *in vitro*. Proyecto de tesis de Maestría. Programa de Posgrados del Centro de la República, PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Ito, K., Suzuki, H., Horie, T. & Sugiyama, Y. (2005). Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharmaceutical Research*, 22(10), 1559 – 1577.
- Jamboonsri, P., Pithayanukul, P., Bavovada, R., Leanpolchareanchai, J., Yin, T., Gao, S. & Hu, M. (2015). Factors influencing oral bioavailability of Thai mango seed kernel extract and its key phenolic principles. *Molecules*, 20, 21254 – 21273.
- Jiang, Y., & Wang, T. (2005). Phytosterols in cereal by-products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(6), 439-444.
- Jung, H. A., Karki, S., Ehom, N., Yoon, M., Kim, E., & Choi, J. S. (2014). Anti-diabetic and anti-inflammatory effects of green and red kohlrabi cultivars (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(4), 281-290.
- Jiménez-Martínez, C., Hernández-Sánchez, H., Álvarez-Mantilla, G., Robledo-Quintos, N., Martínez-Herrera, J. & Dávila-Ortiz, G. (2001). Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 421-428.
- Kaiser, S., Pavei, C., & Ortega, G. G. (2010). Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(3), 300-309.

- Kasanga, P. B., Haddad, P. S. & Stevanovic, T. (2015). Study of polyphenol content and antioxidant capacity of *Myrianthus Arboreus* (Cecropiaceae) Root Bark Extracts. *Antioxidants*, 4, 410 – 426.
- Khemiss, F., Ahmadi, S., Massoudi, R., Ghoul-Mazgar, S., Safta, S., Moshtaghie, A.A. (2009). Effect of *in vitro* exposure to *Vibrio vulnificus* on hydroelectrolytic transport and structural changes of sea bream (*Sparus aurata* L.) intestine. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), 541–549.
- Khemiss, F., Saidane, D. & Moshtaghie, A. A. (2005). Effect of aqueous extract of *Prasium majus* L. leaves on water and electrolytes transport in rat intestine. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(10), 1424 – 1429.
- Kroon, P.A., Faulds, C.C., Ryden, P., Robertson, J. A. & Williamson, G. (1997). Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 661-667.
- Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C. & Scalbert, A. (2006). Adsorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, 96, 39-46.
- Laparra, J. M. & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61, 219 – 225.
- Lassoued, M.A., Khemiss, F., & Sfar, S. (2011). Comparative study of two *in vitro* methods for assessing drug absorption: sartorius SM 16750 apparatus versus everted gut aac. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 117–127.
- Lee, Y.-J., Han, S. B., Nam, S.-Y., Oh, K.-W., & Hong, J. T. (2010). Inflammation and Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 21(3), 383-341.
- Lemańska, K., Szymusiak H., Tyrakowska B., 'Nski R., Soffers A., Rietjens I.M. (2001). The Influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology Medicine*, 31, 869-881.

- Liener, I. E. (1994). Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(1), 31–67.
- Liu, B., Li, W., Hu, W. & Zhao, J. (2007). Mid alkaline hydrolysis is an efficient and low-cost method for improving the free phenolic content and health benefit of pomegranate peel extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37 (5), 694-701.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of Phytochemicals in Cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134(12), 3479-3485.
- Liu, T., Li, J., Liu, Y., Xiao, N., Suo, H., Xie, K., Yang, C. & Wu, C. (2012). Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B pathway in RAW 264.7 cells. *Inflammation*, 35(5), 1676-1685.
- López-Barrera, D. (2015). Composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (*Coffea arabica* L.) utilizado y la actividad de los productos de su fermentación colónica *in vitro* en un modelo de inflamación. Proyecto de tesis de Maestría. Programa de Posgrados del Centro de la República, PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro.
- López-Barrera, D., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, M.G. & Campos-Vega, R. (2016). Spent coffee grounds inhibit inflammatory mediators *in vitro*. *Food Chemistry*, 212(1), 282-290.
- Lund, K. C. & Pantuso, T. (2014). Combination effects of quercetin, reveratrol and curcumin on *in vitro* intestinal absorption. *Journal of Restorative Medicine*, 3(1), 112-120.
- Louis, P., Scott, K. P., Duncan, S. H. & Flint, H. J. (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, 102, 1197 – 1208.
- Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Bioactive Compounds in Corn. En Y. Luo, Q. Wang, L. Yu, R. Tsao, & F. Shahidi (Edits.), *Bioactive compounds in corn, cereal and*

pulses: Nutraceutical Properties and Health benefits (Primera ed., págs. 85-103). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Ma, B., Wang, J., Sun, J., Li, M., Xu, H., Sun, G. & Sun, X. (2014). Permeability of rhyngophylline across human intestinal cell *in vitro*. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 7(5), 1957 – 1966.

Macfarlane, G. T., Steed, H. & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 305-344.

Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J. & Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*, Art. ID 905215, 8 p.

Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., Benítez, V., Mollá, E., López-Andréu, J. F., & Esteban, R. M. (2006). Effect of industrial dehydration on the soluble carbohydrates and dietary fiber fractions in legumes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 7652–7658.

Martín-Cabrejas, M. A., Felicia-Díaz, M., Aguilera, Y., Benítez, V., Mollá, E. & Esteban R. M. (2008). Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chemistry*, 107, 1045–1052.

Martín-Cabrejas, M. A., Jaime, L., Karanja, C., Downie, A. J., Parker, M. L., López-Andreu, F. J., Maina, G., Esteban, R. M., Smith, A. C., & Waldron, K. W. (1999). Modifications to physicochemical and nutritional properties of hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by Extrusion Cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1174-1182.

Mattei, J., Hu, F., Campos, H. (2011). A higher ratio of beans to white rice is associated with lower cardiometabolic risk factors in costa rican adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94(3), 869-876.

- Mazza, G., Güçlü-Ustündağ, O. (2007). Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews on Food Science and Nutrition*, 47(3), 231-258.
- Messaoudene, D., Belguendouz, H., Ahmedi, M. L., Benabdekader, T., Otmani, F., Terahi, M., Touil-boukoffa, C. (2011). *Ex vivo* effects of flavonoids extracted from *Artemisia herba alba* on cytokines and nitric oxide production in Algerian patients with Adamantiades-Behçet's disease. *Journal of Inflammation* (8) 35. doi:10.1186/1476-9255-8-35
- MEGAZYME (2016). Measurement of Dietary Fiber. Recuperado de <https://www.megazyme.com/technical-support/dietary-fiber/measurement-of-dietary-fiber>.
- Meza-Rivera, C. D. (2011). Elaboración, evaluación nutrimental y nutracéutica de una botana a partir de harinas extruidas maíz/frijol. Proyecto de tesis de Maestría. Programa de Posgrados del Centro de la República, PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Miao, M.-S. S., Zhang, G.-L. L., Miao, Y.-Y. Y., Shi, J.-J. J., & Liu, H.-L. L. (2008). [Influence of *Zea mays* L. saponin (ZMLS) on ultrastructure of kidney and pancreas in diabetes rats induced by streptozocin]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 33(10), 1179–1183.
- Michaud, D. S, Feskanich, D., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Willett, W. C., & Giovannucci, E. (2000). Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(4), 990-997.
- Mikkelsen, L. L., Knudsen, K. E. B. & Borg, B. (2004). *In vitro* fermentation of fructo-oligosaccharides by adapted and unadapted bacterial populations from the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 116(3), 225-238.
- Mingsan, M., Yanhong, S., Xiaoning, J., Huili, L. (2007). Effects of saponin extracted from *zea mays* L. (ZMLS) on pathogenic diabetes mouse model caused by

administration of alloxan and glucose. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 3.

Midorikawa, K., Murata, M., Oikawa, S., Hiraku, Y., & Kawanishi, S. (2001). Protective Effect of Phytic Acid on Oxidative DNA Damage with Reference to Cancer Chemoprevention. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(3), 552–557.

Mikulíková, D., Masár, Š., & Kraic, J. (2008). Biodiversity of Legume Health-promoting Starch. *Starch - Stärke*, 60(8), 426–432.

Moghadasian, M. H., & Frohlich, J. J. (1999). Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *The American Journal of Medicine*, 107(6), 588-594.

Monk, J. M., Zhang, C. P., Wu, W., Zarepoor, L., Lu, J. T., Liu, R., . Power, K. A. (2015). White and dark kidney beans reduce colonic mucosal damage and inflammation in response to dextran sodium sulfate. *Journal of Nutritional Biochemistry*(26), 752-760.

Monteiro, C. A., & Cannon, G. (2012). The Impact of Transnational “Big Food” Companies on the South: A View from Brazil. *PLoS Med*, 9(7).

Mora-Avilés, A., Lemus-Flores, B., Miranda-López, R., Hernández-López, D., Pons-Hernández, J. L., Acosta-Gallegos, J. A., & Guzmán-Maldonado, S. H. (2007). Effects of common bean enrichment on nutritional quality of tortillas produced from nixtamalized regular and quality protein maize flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 880 – 886.

Mora-Rochin, S., Corrales-Bañuelos, A. B., Angulo-Serrano, D. M., Cuevas-Rodríguez, E. O., Reyes-Moreno, C. & Milán-Carrillo, J. (2016). Carotenoid profile and antioxidant activity of tortillas elaborated from yellow creole maize

- (*Zea mays* L.) by conventional nixtamalization process. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(1), 689-675.
- Moreno-Jiménez, M. R., Cervantes-Cardoza, V., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Estrella, I., García-Gasca, T. de J., Rocha-Guzmán, N. E. (2014). Phenolic composition changes of processed common beans: their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells. *Food Research International*. Article in Press.
- Mosele, J., Macià A., Romero, M., Motilva M. & Rubió L. (2015). Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 14, 529-540.
- Murphy, M. M., Douglas, J. S., & Birkett, A. (2008). Resistant Starch Intakes in the United States. *Journal of American Dietetic Association*, 108(1), 67-78.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Pedrosa, M., Folkman, W. & Gulewicz, K. (1999). Lupin as a potential source of raffinose family oligosaccharides. Preparative method for their isolation and purification. *Industrial Crops and Products*, 9, 183-188
- Naozuka, J. & Oliveira, P. V. (2012). Cooking effects on iron and proteins content of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by GF AAS and MALDI-TOF MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(1), 156-162.
- Nenadis, N., Wang, L., Tsimidou, M. & Zhang, H. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669-4674.
- Nomura, E., Kashiwada, A., Hosoda, A., Nakamura, K., Morisihita, H., & Tsuno, T. (2003). Synthesis of amide compounds of ferulic acid and their estimulatory effects in insulin secretion *in vitro*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(17), 3807-3813.

- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción. Cuidado y uso de los animales de laboratorio. www.senasica.gob.mx. Consultada en mayo de 2015.
- Nyström, L., Schär, A., Lampi, A. M. (2012). Steryl glycosides and acylated steryl glycosides in plant foods reflect unique sterol patterns. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(6), 656-669.
- Omar, M. H., Mullen, W., Stalmach, A., Auger, C., Rouanet, J., Teissedre, P., Caldwell, S., Harley, R. & Crozier, A. (2012). Absorption, disposition, metabolism and excretion of [3-¹⁴C] Caffeic acid in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (20), 5205-5214
- Olennikov, D., Kashchenko, N. & Chirikova, N. (2015). *In vitro* bioaccessibility, Human Gut Microbiota metabolites and hepatoprotective potential of Chebullic Ellagitannins: A case of Padma Hepaten Formulation. *Nutrients*, 7(10): 8456-8477.
- Oomah, B. D., Blanchard, C., & Balasubramanian, P. (2008). Phytic Acid, Phytase, Minerals and Antioxidant Activity in Canadian Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11312-11319.
- Ortega, N., Reguant, J., Romero, M., Macià, A. & Motilva, M. (2009). Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5743 – 5749.
- Osorio-Díaz, P., Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Vargas-Torres, A., Tovar, J., & Paredes-López, O. (2002). *In vitro* digestibility and resistant starch

- content of some industrialized commercial beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 78(3), 333-337.
- Ostlund, R. E., Racette, S. B., Okeke, A., & Stenson, W. F. (2002). Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(6), 1000–1004.
- Ou, L. Kong, L. Y., Zhang, X. M., & Niwa, M. (2003). Oxidation of ferulic acid by *Momordica charantia* peroxidase and related anti-inflammation activity changes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(11), 1511-1516.
- Pallin, A., Agback, P., Jonsson, H. & Roos, S. (2016). Evaluation of growth, metabolism and production of potentially bioactive components during fermentation of barley with *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*, 57, 159 – 171.
- Palozza, P., Calviello, G., Serini, S., Maggiano, N., Lanza, P., Ranelletti, F. O., & Bartoli, G. M. (2001). β -carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(9), 1000-1007.
- Palozza, P., Serini, S., Torsello, A., Di Nicuolo, F., Maggiano, N., Ranelletti, F. O., Calviello, G. (2003). Mechanism of activation of caspase cascade during beta-carotene-induced apoptosis in human tumor cells. *Nutrition and Cancer*, 47(1), 76-87.
- Palumbo, P., Picchini, U., Beck, B., van Gelder, J., Delbar, N. & DeGaetano, A. (2008). A general approach to the apparent permeability index. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 35, 235 – 248.
- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., & Bello-Pérez, L. A. (2006). *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas* (Vol. 1). Fondo de Cultura Económica.

- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., & Bello-Pérez, L. A. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. (C. Carrillo Trueba, Ed.) *Ciencias* (92), 60-70.
- Pérez-Navarrete, C., Cruz-Estrada, R. H., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2006). Caracterización Física de Extruidos preparados con mezclas de harinas de maíz (*Zea mays* L.) y frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 5, 145-155.
- Pérez-Ruíz, A., Rodríguez-Calzadilla, A., Sanjurjo-Gómez, V. & Padrón-Chacón, R. (1997). El papel del óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*, 34(2), 84-86.
- Peters, S., Egert A., Stieger B., Keller F. (2010). Functional identification of Arabidopsis AT5G57520 as an alkaline α -galactosidase with a substrate specificity for raffinose and an apparent sink-specific expression pattern. *Plant Cell Physiol.* 51, 1815–1819.
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.
- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., & Lampi, A.-M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7): 939-966.
- Podolak, I., Galanty, A., & Sobolewska, D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9(3), 425–474.
- Poquet, L., Clifford, M. M. & Williamson, G. (2008). Transport and Metabolism of Ferulic Acid through the colonic epithelium. *Drug metabolism and Disposition*, 36, 190-197.
- Pradhan, A. (2007). Obesity , Metabolic Syndrome , and Type 2 Diabetes : *Nutrition*, 2007, 152–157.

- Pradhan, A. D., Cook, N. R., Buring, J. E., Manson, J. E., & Ridker, P. M. (2003). C-reactive protein is independently associated with fasting insulin in nondiabetic women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4), 650–655.
- Preciado-Ortiz, R.E., Garcia-Lara, S., Ortiz-Islas, S., Ortega-Corona, A. & Serna-Saldivar, S. O. (2013). Response of current selection on yield, kernel oil content and fatty acid composition of subtropical maize populations. *Field Crops Research*, 142, 27-35.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Mainland, C. M. (1998). Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of Vaccinium Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2686–2693.
- Prior, R. L., Wu, X., & Gu, L. (2006). Flavonoid metabolism and challenges understanding mechanism of health effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(15), 2487-2491.
- Queiroz-Monici, S., Costa G. E., da Silva, N. Reis, S. M. & de Oliveira, A. C. (2005). Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota in rats. *Nutrition*, 21: 602-608.
- Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Functional and technological potential of dehydrated Phaseolus vulgaris L. flours. *Food Chemistry*, 161, 254–60.
- Ramos-Escudero, F., Muñoz, A. M., Alvarado-Ortíz, C., Alvarado, A. & Yáñez, J. A. (2012). Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *Journal of Medicinal Food*, 15(2), 206-215.
- Rao, A., & Sung, M. (1995). Saponins as anticarcinogens. *The Journal of Nutrition*, 125(3 Suppl), 717S–724S.

- Rechner, A., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G., Moore, K. & Rice-Evans, C. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 33 (2), 220-235.
- Rehman, Z. U., Salariya, A. M., y Zafar, S. I. (2001). Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 73(3), 351-355.
- Rice-Evans, C. & Parker, L. (2003). *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, Inc.: 459 p.
- Ridout, C. L., Price, K. R., Dupont, M. S., Parker, M. L., & Fenwick, G. R. (1991). Quinoa saponins—analysis and preliminary investigations into the effects of reduction by processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(2), 165-176.
- Riordan, N. H., Ichim, T. E., Min, W.-P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., Minev, B. (2009). Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*, 7, 29.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, 7, 185.
- Rios, L. Y., Bennet, R. N., Lazarus, S. A., Révész, C., Scalbert, A. & Williamson, G. (2002). Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1106-1110.
- Roberfroid, M. B. (2001). Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *Journal of Clinical Nutrition*, 73, 406-409.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P. & Martín-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206-2012.

- Rojas-Molina, I., Gutiérrez, E., Cortés-Acevedo, M.E., Falcón, A., Bressani, R., Rojas, A., Ibarra, C., Pons-Hernández, J. L., Guzmán-Maldonado, S. H., Cornejo-Villegas, A., Rodríguez, M. E. (2008). Analysis of quality protein changes in nixtamalized QPM flours as a function of the steeping time. *AACC International*, 85(3), 409-416.
- Rondini, L., Peyrat-Maillard, M., Marsset-Balieri, A., Fromentin, G., Durand, P., Tomé, D., Prost, M. & Berset, C. (2004). Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4338-4343.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T. P., Maguire, A. R., & O'Brien, N. M. (2007). Phytosterol, Squalene, Tocopherol Content and Fatty Acid Profile of Selected Seeds, Grains, and Legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(3), 85-91.
- Rycroft, C. e., Jones, M. r., Gibson, G. r., & Rastall, R. a. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 878–887.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2006). Resistant Starch—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(1), 1–17.
- Salinas-Moreno, Y., López-Reynoso, J. J., González-Flores, G. B. y Vázquez-Carrillo, G. (2007). Compuestos fenólicos del grano de maíz y su relación con el oscurecimiento de masa y tortilla. *Agrociencia*, 41, 295-305
- Sánchez-Arteaga, H. M., Urías-Silvas, J. E., Espinosa-Andrews, H. y García-Márquez, E. (2014). Effect of chemical composition and thermal properties on the cooking quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Cyta-Journal of Food*, 13(3), 385-391.
- Sánchez-Madrigal, M.A., Quintero-Ramos, A., Martínez-Bustos, F., Meléndez-Pizarro, C. O. & Ruíz-Gutiérrez, M. G. Effect of different calcium sources of antioxidant stability of tortilla chips from extruded and nixtamalized blue corn (*Zea mays* L.). *Food Science and Technology*, 34(1), 143-150.

- Sandberg, A. S. (2002). Bioavailability of minerals in legumes. *The British Journal of Nutrition*, 88 (3), 281–285.
- Santiago, R., Malvar R., Baamonde M., Revilla P. & Souto X. (2005) Free phenols in maize pith and their relationship with resistance to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) attack. *J. Econ. Entomol.* 98:4 1349-1356.
- Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, J., Véles-Medina, J. J., Mariscal-Moreno, R. M., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Gaytán-Martínez, M., & Morales-Sánchez, E. (2015). Resistant starch formation in tortillas from and ecological nixtamalization process. *AACC International*, 92(2), 185-192.
- Saura-Calixto, F., Goñi, I., Bravo, L. y Mañas, E. (1993). Resistant starch in foods: Modified method for dietary fiber residues. *Journal of Food Science*, 58(3), 642-643.
- Saura-Calixto, F., Pérez-Jiménez, J., Touriño, S., Serrano, J., Fuguet, E., Torres, J. L. & Goñi, I. (2010). Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre form *in vitro* colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Molecular nutrition and food research*, 54(7), 939-946.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J. & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total phenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492-501.
- Sayar, S., Jannink, J.L. & White, P. J. (2007). Digestion residues of typical and high β -glucan oat flours provide substrates for *in vitro* fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5306-5311.
- Schaich, K. M., Tian, X. & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH and ORAC assays". *Journal of Functional Foods*, 14, 111-125.
- Schantz, M., Erk, T. & Richling, E. (2010). Metabolism of green tea catechins by the human small intestine. *Biotechnology Journal*, 5, 1050-1059.

- Secretaría de Salud de México. (2010). Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria: Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad. Recuperado de: <http://activate.gob.mx/Documentos/ACUERDO%20NACIONAL%20POR%20OLA%20SALUD%20ALIMENTARIA.pdf>
- Segev, A., Badani, H., Galili, L., Hovav, R., Kapulnik, Y., Shomer, I. & Galili S. (2012). Effects of baking, roasting and frying on total polyphenols and antioxidant activity in colored chickpeas seeds. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 369-376.
- Serna-Saldívar S., Gómez M. H., Rooney L. W. (1990). Technology, chemistry and nutritional value of alkaline-cooked corn products, *Advances in Cereal Science and Technology*, 10,243-307.
- Serna-Saldívar, S. (2010). Cereal Grains: Properties, Processing and Nutritional Attributes. CRC Press, Boca Raton FL (USA).
- Shiferaw, B., Prasanna, B. M., Hellin, J., & Bänzinger, M. (2011). Crops that feed the world. 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*, 3(3), 307-327.
- Shiga, T. M., Lajolo, F., M. y Filisetti, T. M.C.C. (2004). Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans. *Food Chemistry*, 84(1), 53-64.
- Silva-Cristóbal, L., Osorio-Díaz, P., Tovar, J. & Bello-Pérez, L. A. (2010). Chemical composition, carbohydrate digestibility and antioxidant capacity of cooked black bean, chickpea and lentil mexican varieties. *CyTA Journal of Food*, 8(1), 7-14.
- Silvester, K. R., Bingham, S. A., Pollock, J. R., Cummings, J. H., & O'Neill, I. K. (1997). Effect of meat and resistant starch on fecal excretion of apparent N-nitroso compounds and ammonia from the human large bowel. *Nutrition and Cancer*, 29(1), 13–23.
- Singh, S., Gamlath, S. & Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 916-929.

- Singh, N., Singh, S. & Shevkani, K. (2011). Maize: composition, bioactive constituents and unleavened bread, in: Preedy, V. R., Watson, R. R. and Patel, V. B. (Edit): Flour and Breads and their fortification in health and disease prevention (p. 89-99).
- Smiricky-Tjardes, M. R., Flickinger, E. A., Grieshop, M., Bauer, L. L., Murphy, M. R. & Fahey, G. C. (2003). *In vitro* fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine-fecal microflora. *Journal of Animal Sciences*, 81, 2505 – 2514.
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R. , & Menon, V. P. (2007). Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *Journal of Chemical Biochemistry and Nutrition*, 40(2), 92-100.
- Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449–7454.
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D. & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120 (2), 500-606.
- Tanumihardjo, S. A., Anderson, C., Kaufer-Horwitz, M., Bode, L., Emenaker, N. J., Haqq, A. M., ... Stadler, D. D. (2007). Poverty, Obesity, and Malnutrition: An International Perspective Recognizing the Paradox. *Journal of the American Dietetic Association*, 107(11), 1966–1972.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisnero-Zevallos, L. & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669 – 675.
- Theed, S. T. & Phillips, R.D. (1994). Changes in dietary fiber and starch composition of processed potato products during domestic cooking. *Food Chemistry*, 52, 301-304.

- The Nielsen Company (2014). Snack Attack: What consumers are reaching for around the world. Recuperado el 24 de mayo de 2015 de: <http://www.nielsen.com/content/dam/niensenglobal/kr/docs/global-report/2014/Nielsen%20Global%20Snacking%20Report%20September%202014.pdf>
- Thompson, L. U. (1993). Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International*, 26(2), 131-149.
- Toyoshi, T. & Kohda, T. (2004). Antihypertensive Activity of Purple Corn Color in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Food Ingredients*, 209(8), 671–679.
- Torres-Rodríguez, M. L-, García-Chávez, E., Berhow, M. & González de Mejía, E. (2016). Anti-inflammatory and anti-oxidant effect of *Calea urticifolia* lyophilized aqueous extract on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 266 – 274.
- Treviño-Mejía, D., Luna-Vital, D., Gaytán-Martínez, M., Loarca-Piña, G. (2016). Fortification of commercial nixtamalized maize (*Zea mays* L.) with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) increased the nutritional and nutraceutical content of tortillas without modifying sensory properties. *Journal of Food Quality*, Article in Press.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2125–2130.
- Tuominen A. & Sundman, T. (2013). Stability and oxidation products of hydrolysable tannins in basic conditions detected by HPLC/DAD-ESI/QTOF/MS. *Phytochemical Analysis*, 24, 424-435.
- Ullah, I., Ali, M. & Farooqi, A. (2010). Chemical and nutritional properties of some maize (*Zea mays* L.) varieties grown in NWFP, Pakistan. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(11), 1113-1117.

- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J., Jacobs, D. R., Lee, D., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T. & Peterson M., J. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378 – 455.
- Vázquez-Carrillo, M. G., Santiago-Ramos, D., Salinas-Moreno, Y., López-Cruz, J., Tbarra-Moncada, M. C., & Ortega-Corona, a. (2014). Oil content in maize (*Zea mays* L.) genotypes and its relationship with quality and texture of tortilla. *Agrociencia*, 48(2), 159–172.
- Véles M., J. J. (2004). Caracterización de tostadas elaboradas con maíces pigmentados y diferentes métodos de nixtamalización. Proyecto de tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA). Instituto Politécnico Nacional (IPN)
- Vincken, J.-P., Heng, L., Groot, A. de, & Gruppen, H. (2006). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3), 275-297.
- Volpe, D.A., Faustino, P. J., Ciavarella, A. B., Asafu-Adjaye, E. B., Ellison, C. D., Yu, L. X., Hussain, A. S. (2007). Classification of drug permeability with a Caco-2 cell monolayer assay. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24(1), 39 – 47.
- Volpe, D. (2012). Application of method suitability for drug permeability classification. *Journal of American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(4), 670 - 678
- Wahlang, B., Pawar, Y. B., Bansal, A. K. (2011). Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77, 275 – 282.

- Wang, P., Henning, S. M. & Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS-Based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS ONE*, 5(4), e10202, doi: 10.1371/journal.pone.0010202.
- Walgren, R. A., Walle, U. K. & Walle, T. (1998). Transport of Quercetin and its Glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology*, 55, 1721 – 1727.
- Walker W, Duncan HS, Leitch McWCE, Child WM, Flint JH. (2005). pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Applied Environmental Microbiology*, 71(7), 3692-3700.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–808.
- Weizman, Z., Asli, G. & Alsheikh, A. (2005). Effect of a probiotic infant formula on infection in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Food Microbiology*, 115 (1), 5 -9.
- White, P. J. & Weber, E. J. (2003). Lipids of the Grain. En: Corn: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists (AACC Ed.), pp. 355-405.
- Winchienchot, S., Jatupornpipat, M. & Rastall, R. A. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, 120, 850-857.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A. & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable

- juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44, 217-224.
- Yeh, C.-T., & Yen, G.-C. (2003). Effects of Phenolic Acids on Human Phenolsulfotransferases in Relation to Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1474–1479.
- Younes, H., Coudray, C., Bellanger, J. Demigné, C., Rayssiguier Y & Rémésy, C. (2001). Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*, 86: 479-485.
- Zamora-Gasca, V. M., Loarca-Piña, G., Vázquez-Landaverde, P. A., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, J. & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). *In vitro* colonic fermentation of food ingredients isolated from *Agave tequilana* Weber var. *azul* applied on granola bars. *Food Science and Technology*, 60, 766-772.
- Zhuang, J. & Wogan, G. (1997). Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produce nitric oxide. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (22), 11875 – 11880.

ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
ABTS	Ácido 2,2' – amino – bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AP	Apical
AR	Almidón Resistente
BL	Basolateral
cm	Centímetro
cv	Cultivar
DAD	Diode Array Detection (Detección con Arreglo de Diodos)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2,- difenil-1-picrilhidrazil
EF	Extracto de Fermentación
EFFND24	Extracto fermentado de la fracción no digerible de 24 horas de fermentación
ENT	Enfermedades no transmisibles
Et al.	Et alia (y otros).
FC	Frijol crudo
FID	Flame Ionization Detector (Detector de Ionización de Flama)
FND	Fracción no digerible
g	Gramo
GC	Gas chromatography (Cromatografía de Gases)
h	Hora
HFC	Harina de frijol cocido
HMN	Harina de maíz nixtamalizado
HPLC	High Performance Liquid Cromatography (Cromatografía Líquida de Alto Desempeño)
IL	Interleucina
Kg	Kilogramo
L	Litro

LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPH	Lactasa Floricin Hidrolasa
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
mARN	Ácido ribonucleico (ARN) mensajero
MC	Maíz crudo
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
MS	Masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
ND	No Detectado
nm	Nanómetro
ON	Óxido Nítrico
P_{app}	Coefficiente de Permeabilidad
PBN	Población Blanca del Noroeste
pH	Potencial de Hidrógeno
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazopina
RPM	Revoluciones por minuto
T7030	Totopo horneado con 70 % harina de maíz nixtamalizado y 30 % harina de frijol cocido
TC	Totopo comercial maíz-frijol frito
TNF	Factor de necrosis tumoral
UIT	Unidades de inhibición de tripsina
λ	Longitud de Onda
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μmol	Micromol



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

C.U., 03 de noviembre de 2015
No. de oficio. DIP/669/2015

I.A. Iván Andrés Luzardo Ocampo
Presente

En reunión del Comité de Bioética nombrado *Ad Hoc* por la Directora de Investigación y Posgrado celebrada el 27 de octubre del año 2015, con objeto de llevar a cabo la revisión de su protocolo titulado "Caracterización y evaluación de la actividad antiinflamatoria de la fracción no digerible de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays*L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido", fue **aprobado**, con las siguientes *recomendación*:

Aclaración que el tratamiento de los animales es conforme a las pautas de CIOMS.

Los miembros que integraron el Comité antes mencionado fueron: Coordinador, Dr. Robert T. Hall; Secretario, Dr. Bernardo García Camino; Vocales, Dra. Pamela Garbus, Dra. Hilda Romero Zepeda, L. en D. cMtra. Paulina Pérez Audiffred, Dra. Donna Terry Jackson Lembark y Dra. María Laura Sandoval Aboytes.

Sin más por el momento, reciba saludos.

Dr. Bernardo García Camino
Secretario del Comité de Bioética *ad hoc*