

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y NUTRACÉUTICA DEL  
PISTACHE (*Pistacia vera* L.) TOSTADO, ASÍ COMO LA  
EVALUACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD *IN VITRO*,  
PERMEABILIDAD *EX VIVO* Y ANÁLISIS  
QUIMIOINFORMÁTICO *IN SILICO*”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARÍA DEL ROCÍO OLVERA BAUTISTA**

**DIRIGIDA POR**

**DRA. ROCIO CAMPOS VEGA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2022.**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y NUTRACÉUTICA DEL  
PISTACHE (*Pistacia vera* L.) TOSTADO, ASÍ COMO LA  
EVALUACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD *IN VITRO*,  
PERMEABILIDAD *EX VIVO* Y ANÁLISIS  
QUIMIOINFORMÁTICO *IN SILICO*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

MARÍA DEL ROCÍO OLVERA BAUTISTA

DIRIGIDA POR

DRA. ROCIO CAMPOS VEGA

SINODALES

Dra. ROCIO CAMPOS VEGA  
DIRECTOR

M. EN C. ELISA DUFOO HURTADO

SINODAL

Dra. MARCELA GAYTAN MARTÍNEZ

SINODAL

Dra. Ma. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

SINODAL

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis la Dra. Rocío, quien me brindo su orientación, paciencia, confianza y guía en el presente trabajo de investigación. Gracias por animarme a continuar y no darme por vencida. Pero sobre todo por el conocimiento bridado y ser un gran ejemplo a seguir tanto en lo personal como en lo profesional.

A Eli, por todo el apoyo, amistad, compañía y ayuda. Por ser mi guía en este proyecto y animarme a continuar siempre. Eres una gran persona que siempre realiza todo lo que se propone y está dispuesta ayudar en cualquier momento, gracias por todo.

En especial a todos los miembros de mi comité, la Dra. Marce y la Dra. Flavia a quienes agradezco por su valiosa contribución, conocimientos y retroalimentación para la realización y mejora del proyecto. Por la revisión y aportaciones hechas en la elaboración de la tesis.

A mis papás Raúl, Adela y hermanos Rosario y Humberto, que me bridaron su apoyo, comprensión, estímulos constantes y sus consejos en esta etapa de mi vida. Por alentarme a seguir en los momentos más difíciles. A quienes debo mi formación personal y profesional; además de brindarme su orientación y cariño.

A José Guadalupe por todo el amor, paciencia y ánimo para concluir esta etapa. Por estar siempre cuando te necesito y ser parte de este logro.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de estudiar la licenciatura y bridarme todo el apoyo durante mi estancia.

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
<b>1. ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
1.1 Nueces	1
1.2 Pistache ( <i>Pistacia vera</i> L.)	1
1.2.1 Generalidades	1
1.2.2 Producción en México	2
1.2.3 Composición química	2
1.2.4 Composición nutracéutica	3
1.2.4.1 Fibra dietética	3
1.2.4.1.1 Fibra soluble	5
1.2.4.1.2 Fibra insoluble	6
1.2.4.2 Compuestos fenólicos	6
1.2.4.2.1 Fenoles	7
1.2.4.2.2 Flavonoides	9
1.2.4.3 Capacidad antioxidante	10
1.2.5 Alfa amilasa pancreática	14
1.2.6 Digestión	16
1.2.6.1 Digestión gastrointestinal	16

1.2.6.2 Modelos de digestión gastrointestinal	17
1.2.6.3 Absorción	18
1.2.6.4 Bioaccesibilidad	18
1.2.7 Quimioinformática	19
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos particulares	21
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>22</b>
4.1 Materiales	22
4.1.1 Material biológico	22
4.1.2 Reactivos	22
4.2 Métodos	22
4.2.1 Análisis proximal	22
4.2.1.1 Humedad	22
4.2.1.2 Lípidos	23
4.2.1.3 Proteína	23
4.2.1.4 Cenizas	24
4.2.1.5 Carbohidratos	24
4.2.2 Análisis nutracéutico	24
4.2.2.1 Fibra dietética	24
4.2.2.1.1 Fibra insoluble	25
4.2.2.1.2 Fibra soluble	25
4.2.2.2 Extracción de compuestos fenólicos	26
4.2.2.3 Cuantificación de compuestos fenólicos totales	26

4.2.2.4 Capacidad antioxidante	26
4.2.2.4.1 DPPH•	26
4.2.2.4.2 ABTS• <sup>+</sup>	27
4.2.2.5 Actividad inhibitoria de alfa amilasa pancreática	28
4.2.3 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	28
4.2.3.1 Simulación de las condiciones de la boca	29
4.2.3.2 Simulación de las condiciones del estómago	29
4.2.3.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado	29
4.2.3.3.1 Técnica del saco intestinal invertido en ratas	30
4.2.3.3.1.1 Manejo de los animales	30
4.2.3.3.1.2 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal invertido	30
4.2.3.3.1.3 Manejo de los animales después del sacrificio	31
4.2.3.4 Simulación de las condiciones de fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND	31
4.2.4 Quimiometría y química medicinal	32
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
5.1. Composición química y nutracéutica del pistache con cáscara y sin cáscara	33
5.2 Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de fenoles y flavonoides	37
5.3. Coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) ex vivo de fenoles y flavonoides del pistache.	45
5.4. Capacidad antioxidante	48
5.5. Actividad inhibitoria de alfa amilasa pancreática	52
5.6. Quimioinformática	54

<b>6. CONCLUSIONES</b>	58
<b>7. REFERENCIAS /BIBLIOGRAFÍA</b>	59
<b>ANEXOS</b>	71
ANEXO 1. Glosario de abreviaturas	71
ANEXO 2. Carta consentimiento informado	73
ANEXO 3. Carta aprobación Comité de Bioética.	78

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición promedio del pistache ( <i>Pistacia vera</i> L.) en macro y micro nutrientes.	4
2. Clasificación de los compuestos fenólicos.	7
3. Composición química y nutracéutica del pistache ( <i>Pistacia vera</i> L.)	33
4. Bioaccesibilidad de fenoles y flavonoides totales del pistache con piel (PCP) y sin piel (PSP) durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .	41
5. Porcentaje de bioaccesibilidad de fenoles en las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica <i>in vitro</i> .	43
6. Coeficientes de permeabilidad aparente <i>ex vivo</i> ( $P_{app}$ ) de compuestos bioactivos de pistache.	47
7. Porcentaje de permeabilidad <i>in vitro</i> de fenoles y flavonoides del pistache ( <i>Pistacia vera</i> L.)	48
8. Capacidad antioxidante del pistache con piel (PCP) y sin piel (PSP) durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .	49
9. Porcentaje de inhibición capacidad antioxidante del pistache con piel (PCP) y sin piel (PSP) durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .	51
10. Efecto de las concentraciones de acarbosa en la actividad inhibitoria de alfa amilasa (%).	53
11. Valores de IC <sub>50</sub> y actividad inhibitoria (%) de pistache con y sin piel de la fracción digerible de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .	54
12. Quimioinformática molecular y bioactividad potencial de compuestos fenólicos de pistache ( <i>Pistacia vera</i> L.) en la semilla y piel.	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la molécula de los flavonoides	10
2. Reacción radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).	13
3. Oxidación del radical ABTS• <sup>+</sup> .	14
4. Bioaccesibilidad de fenoles y flavonoides del PCP y PSP.	37
5. Actividad inhibitoria (%) de acarbosa a diferentes concentraciones	53

## RESUMEN

En la actualidad las principales causas de muerte en nuestro país se deben a enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles como las cardiovasculares, diabetes, tumores, hipertensión, entre otras. Sin embargo, estas enfermedades pueden prevenirse con una dieta y estilo de vida saludable. Por lo tanto, es indispensable incluir en la dieta alimentos que además de ser ricos en nutrientes contengan compuestos capaces de producir efectos benéficos en el organismo, ayudando a prevenir enfermedades crónicas degenerativas asociadas al estrés oxidativo. El pistache (*Pistacia vera* L.) contiene compuestos fitoquímicos y nutraceuticos. En este trabajo, se evaluó el pistache con piel (PCP) y sin piel (PSP); se realizó una caracterización química, nutraceutica y se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro*. Se evaluó su potencial efecto inhibidor de la enzima alfa amilasa (*in vitro*) y sus propiedades de quimiometría molecular y bioactividad [absorción, distribución, metabolismo, extracción y toxicidad (ADEMT)] *in silico* de los compuestos fenólicos presentes en el pistache. Los componentes mayoritarios del PSP son los lípidos (51%), seguidos de proteína (24%); el PCP presentó un menor contenido de los mismos, pero un mayor contenido de fibra (13.03%). El PCP contiene más fenoles (3.34 vs 2.43 mg EAG/g) y más flavonoides (1.71 vs 1.08 mg ER/g) que el PSP. Ambas muestras presentaron una alta capacidad antioxidante (906-7058 vs 823-7452 mM TE/g, respectivamente), lo que se relaciona con su capacidad inhibitoria sobre la enzima alfa amilasa pancreática. La digestión mostró que los compuestos evaluados son bioaccesibles en las distintas etapas y permeables en el intestino (*Papp*) y el modelo *in silico* demostró que de acuerdo a sus características pueden ser absorbidos. En conclusión, el pistache es una buena fuente de fibra dietaria, fenoles y flavonoides que son bioaccesibles, permeables y llegan al colon. Estos compuestos exhiben capacidad antioxidante e inhibidora de alfa amilasa pancreática, además, de tener buenas propiedades ADEMT lo cual se relaciona a sus beneficios en la salud.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Nueces

De acuerdo a la clasificación Europea “nueces de árbol” es el término atribuido a las nueces que crecen en los árboles, como las avellanas (*Corylus avellana*), nueces (*Juglans regia*), anacardos (*Anacardium occidentale*), almendras (*Amygdalus communis L.*), nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*) y pistache (*Pistacia vera L.*) (Robert, 2018).

Las nueces son ricas en macro y micronutrientes, ácidos grasos insaturados y polinsaturados como omega 3, proteínas vegetales de alta calidad, fibra, vitaminas, minerales y fitoesteroles. Las nueces también son fuente de tocoferoles y compuestos fenólicos con potentes efectos antioxidantes, efectos benéficos en la oxidación de lípidos y sobre la actividad enzimática antioxidante; además contienen fito-melatonina, contribuyendo a un efecto antioxidante significativo (Bes-Rastrollo y Sánchez-Tainta, 2018). Debido a estos compuestos bioactivos, las nueces tienen un impacto benéfico en la salud, lo cual se refuerza con estudios epidemiológicos posteriores, que han asociado el consumo de nueces con una menor incidencia de enfermedades coronarias y cálculos biliares. Además, tienen efectos positivos sobre la hipertensión, el cáncer y el estrés oxidativo, por lo que son un alimento rico en nutrientes que puede incorporarse a una dieta saludable (Ros, 2015).

En los países Occidentales las nueces se consumen como bocadillos, postres o como parte de una comida y se comen enteras; en productos para untar, como aceites, salsas, pasteles, helados y productos horneados (Ros, 2010; Ros, 2015; Bes-Rastrollo y Sánchez-Tainta, 2018).

### 1.2 Pistache (*Pistacia vera L.*)

#### 1.2.1 Generalidades

El pistache (*Pistacia vera L.*) pertenece a la familia de las *Anacardiaceae* (Arjeh y col., 2020), el género *Pistacia* consta de once especies comestibles que están

ampliamente distribuidas en EE. UU., África, Asia central y Oriente (Stephenson, 2003). El pistache (*Pistacia vera* L.) es originario de las regiones áridas de Asia central y occidental (Liu y col., 2014). La fruta del pistache se puede clasificar como una drupa semi-seca que contiene una sola semilla comestible, encerrada por la testa, la cual, consiste en una capa fina y suave, contenida por el endocarpio siendo una cáscara cremosa y lignificada, y rodeada por el mesocarpio y epicarpio que tiene un color que puede ir de verde a amarillo-rojo, dependiendo del grado de madurez (Arjeh y col., 2020).

En la actualidad el consumo del pistache ha tomado popularidad en todo el mundo debido a su uso tradicional, textura atractiva y sabor único. Además de que recientemente, los pistaches han sido reconocidos por su calidad nutricional y su posible contribución a la salud, dentro de la que destaca un efecto benéfico en el control de peso corporal, la reducción de colesterol en sangre, capacidad antioxidante, antiinflamatoria y gluco-reguladora (Arjeh y col., 2020).

### 1.2.2 Producción en México

De acuerdo a la Organización de Alimentos y Agricultura de los Estados Unidos (FAO por sus siglas en inglés, 2016) la producción mundial total de pistache se estimó en 1,057,566 toneladas, de las cuales el 68 % se produjo en EE.UU e Irán, seguido de Turquía (16 %), China (7.5 %) y Siria (5 %). En México se producen anualmente más de 37 mil toneladas de pistache, siendo los mayores productores Chihuahua, Baja California y Tamaulipas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018). Sin embargo, la mayor parte del pistache consumido en nuestro país es importado de Estados Unidos (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2019).

### 1.2.3 Composición química

El pistache (*Pistacia vera* L.) es reconocido como una buena fuente de ácidos grasos mono y poliinsaturados, fibra, proteína, magnesio y potasio, además de que contiene micronutrientes y compuestos bioactivos como los carotenoides, clorofila,

flavonoides, los cuales contribuyen en los mecanismos antioxidantes, antimicrobianos, fotoprotectores, antiinflamatorios y antimutagénicos (Liu y col., 2014). La composición química del pistache (*Pistacia vera* L.) se muestra en el Cuadro 1.

El pistache tiene un alto contenido de carbohidratos, de los cuales el 16 % corresponde principalmente a sacarosa, también es fuente de proteína vegetal con aproximadamente el 21 % de peso total. Además de que, una porción de pistache (20 a 30 g diarios) proporciona el 92 % del requerimiento diario de tiamina (Stephenson, 2003), es una buena fuente de niacina, vitamina B6, vitamina E y A, y minerales como magnesio, cobre, zinc, selenio, fósforo, calcio y potasio. Algunos de estos componentes (como la vitamina E y el selenio) tienen un alto efecto antioxidante, similar a otros compuestos fitoquímicos. La fibra también es importante en la composición de las nueces y confiere beneficios a la salud. Un consumo adecuado de fibra ayuda a mejorar y prevenir el estreñimiento, regular los niveles de glucosa y colesterol en la sangre (Bes-Rastrollo y Sánchez-Tainta, 2018).

#### 1.2.4 Composición nutracéutica

##### 1.2.4.1 Fibra dietética

La fibra dietaria se define como los polisacáridos vegetales y lignina que son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas del humano (Park, 2016). Por lo tanto, son los carbohidratos no digeribles durante la digestión y absorción del intestino delgado, por lo que, llegan al intestino grueso para su fermentación parcial o completa por la microbiota del colón (Wang y col., 2019).

La fibra dietaria está compuesta por celulosa, hemicelulosa, inulina,  $\beta$ -glucano, pectina, mucílago, lignina y almidones resistentes. Se clasifica como fibra soluble e insoluble (Park, 2016).

Cuadro 1. Composición promedio del pistache (*Pistacia vera* L.) en macro y micro nutrientes.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (por 100 g)</b>
Energía (kcal)	557
Grasa (g)	44.4
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	25.5
Ácidos grasos poliinsaturados (g)	13.5
Ácidos grasos saturados (g)	5.4
Carbohidratos (g)	29.7
Fibra (g)	10.7
Proteína (g)	21.0
Agua (g)	1.9
Cenizas (g)	3.0
Calcio (mg)	107
Magnesio (mg)	121
Sodio (mg)	1
Potasio (mg)	1025
Vitamina A (IU)	553
Vitamina E (mg)	2.3
Vitamina B6 (mg)	1.7
Polifenoles totales (mg)	1420

Adaptado de Ros, E., (2010); Hernández-Alonso y col. (2016) y Bes-Rastrollo y Sánchez-Tainta (2018)

La fibra dietaria se encuentra naturalmente presente en alimentos vegetales, como cereales, frutas, verduras y nueces (Esteban y col., 2017). El pistache tiene alrededor de 10.7 g de fibra por cada 100 g, comparado con otras nueces es la que tiene más fibra, al igual que las almendras que contienen 10.7 g de fibra (Bonku y Yu, 2019). El consumo de alimentos ricos en fibra tiene efectos benéficos a la salud (Esteban y col., 2017), debido a su gran participación en la regulación de diversas funciones

biológicas, tales como la disminución del colesterol en la sangre, mejora la movilidad en el tracto gastrointestinal, regula el metabolismo de glucosa y lípidos, estimulación de la actividad metabólica bacteriana, desintoxicación del contenido luminal del colon e integridad de la mucosa intestinal. Sin embargo, cuando los componentes de la fibra dietaria son consumidos en la dieta, también interactúan con los otros componentes alimenticios y potencialmente puede interferir con su metabolismo y absorción (Salas-Salvadó y col., 2006).

#### 1.2.4.1.1 Fibra soluble

La fibra soluble representa el 2.91 % de la fibra dietética (Hernández-Alonso y col., 2016) y se define como la dispersante en agua, dando lugar a geles viscosos en el tracto gastrointestinal (Pangestuti y Kim, 2014), esto se debe a la formación de un retículo cuando la fibra soluble interactúa con el agua dejándola atrapada, teniendo como resultado soluciones de alta viscosidad (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006). La fibra soluble está constituida de polisacáridos no celulósicos como pectinas, gomas, mucílagos (Dai y Chau, 2017),  $\beta$ -glucano, *Psyllium*, arabinosilanos, inulinas (Cruz-Requena y col., 2019) y otros polisacáridos viscosos relacionados con las plantas (Wang y col., 2020). Su consumo se asocia a efectos benéficos en la salud como la disminución del vaciado gástrico y el tiempo de tránsito del intestino delgado, efectos probióticos, aumento del volumen fecal y reducción de los niveles de colesterol (Cruz-Requena y col., 2019). La reducción de los niveles de colesterol se debe a una disminución en su absorción, así como la disminución de los niveles de azúcares por la alta viscosidad de la fibra soluble que espesa el contenido en la luz intestinal y ralentiza la migración de nutrientes (vitaminas y minerales) a la pared intestinal (Dai y Chau, 2017). Otra de las características de la fibra soluble es que se fermenta fácilmente en el intestino grueso por bacterias específicas, dando como resultado la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como: ácido acético, propiónico y butírico (Nakajima y col., 2020). Además de que provoca cambios notorios en el colon, mejorando la salud del huésped (Dai y Chau, 2017).

#### 1.2.4.1.2 Fibra insoluble

En el pistache, la fibra insoluble representa un 97.09 % en peso de la fibra dietética (Hernández-Alonso y col., 2016). La fibra insoluble se compone principalmente de componentes de la pared celular como celulosa, hemicelulosa, pectina, lignina, almidón y glucanos (Dhingra y col., 2011; Cruz-Requena y col., 2019; Wang y col., 2020). La fibra insoluble tiene propiedades como insolubilidad en agua, poco fermentable y aumento del volumen de heces (Dhingra y col., 2011; Cruz-Requena y col., 2019), mediante la formación de partículas. También está relacionada con una disminución del tiempo de tránsito intestinal, ayudando a prevenir y aliviar el estreñimiento (Dai y Chau, 2017). Además de que exhibe una alta retención de agua, hinchazón y capacidad de retención de aceites, así como capacidad de unión y prevención de enfermedades como cáncer de colon, obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Wang y col., 2020).

#### 1.2.4.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son fitoquímicos que se encuentran en la mayoría de los alimentos vegetales como frutas, verduras, granos integrales, nueces y especias (Domínguez-Ávila y col., 2017; De la Rosa y col., 2019). Aportan particularmente color, sabor y astringencia (Swanson, 2003). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios (Domínguez-Ávila y col., 2017) sintetizados a través de la ruta del ácido Shikímico y fenilpropanoide (Tarko y col., 2013; De la Rosa y col., 2019). Dichos compuestos tienen anillos aromáticos hidroxilados, estando el grupo hidroxilo unido directamente al fenilo, fenilo sustituido u otro grupo arilo (Swanson, 2003; Vernerris y Nicholson, 2008). Actualmente se han identificado más de 8000 estructuras de compuestos fenólicos. Se pueden clasificar en varias clases como se muestra en el Cuadro 2.

Los compuestos fenólicos más importantes que se encuentran presentes en la dieta humana incluyen ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenceno, lignanos y taninos (Domínguez-Ávila y col., 2017; Vuolo y col., 2019).

Debido a la gran diversidad de compuestos fenólicos, su estructura se relaciona con su capacidad de captar radicales libres y quelante de metales (Vuolo y col., 2019); otorgando así sus propiedades antioxidantes, que juegan un papel muy importante en la salud. El consumo de una dieta rica en compuestos fenólicos esta inversamente relacionado con el riesgo de estrés oxidativo comúnmente asociado a enfermedades crónicas no transmisibles, como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, cáncer, obesidad, enfermedades degenerativas, entre otras. (Tarko y col., 2013; Domínguez-Ávila y col., 2017; Shahidi y col., 2018; De la Rosa y col., 2019).

Cuadro 2. Clasificación de los compuestos fenólicos.

Clase	Estructura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C <sub>6</sub>
Ácido hidroxibenzoico	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Ácido hidroxinámico, fenilpropanoide	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>
Acetofenona, ácido fenilacético	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>
Xantonas	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>
Stilbenes, antraquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>
Flavonoides, isoflavonoides	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>
Lignanós, neolignanós	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Ligninas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Taninos condensados (proantocianidinas o flavolanos)	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

Adaptado de Vuolo y col. (2019)

#### 1.2.4.2.1 Fenoles

Los fenoles son metabolitos secundarios que protegen a las plantas de la radiación ultravioleta (Murthy y Naidu, 2012). Su estructura molecular contiene al menos un grupo fenol y un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional. Se agrupan en diferentes clases de acuerdo con su estructura química básica, es decir el tipo y número de anillos de fenol, en diferentes subclases, de acuerdo con sustituciones específicas en la estructura, la asociación básica con hidratos de carbono y formas polimerizadas (Manach y col., 2004; Cheynier, 2005).

Dentro de los compuestos fenólicos se encuentran los fenoles simples que tienen al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático como esqueleto básico. Dentro de la clase de los fenoles simples se encuentran fenol, catecol, resorcinol y fluroglucinol (Koungan y col., 2013). Otro grupo son los ácidos fenólicos que contienen un grupo carboxílico unido a un anillo de benceno. Dependiendo de su estructura se pueden distinguir dos principales clases los derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico (Padmanabhan y col., 2016). Rara vez se encuentran de manera libre y frecuentemente se encuentran unidos a ésteres (Koungan y col., 2013; Kumar y Geol, 2019), amidas o glucósidos. En humanos, los ácidos fenólicos se metabolizan después de su absorción en el tracto gastrointestinal seguida de reacciones de metilación, glucuronidación y sulfatación que producen cambios en su estructura (Kumar y Goel, 2019).

Los fenoles son potentes antioxidantes, que previenen a las moléculas de sufrir daño oxidativo a través de reacciones mediadas por radicales libres (Vuolo y col., 2019), teniendo un efecto protector contra enfermedades degenerativas incluyendo las cardiovasculares, cáncer, diabetes, inflamación, entre otras, dicho efecto se debe a su capacidad antioxidante (Kumar y Goel, 2019). Además de que ofrecen actividad antibacterial, antiviral, antiinflamatoria y anticancerígena (Souza y col., 2004; Vuolo y col., 2019). Sin embargo, su actividad depende de algunos factores como la matriz alimentaria, pH, temperatura, presencia de inhibidores o potenciadores de la absorción, presencia de enzimas, huésped (Tagliazucchi y col., 2010), así como su bioaccesibilidad, absorción, digestión y metabolismo después de ingresar al sistema circulatorio (Kumar y Goel, 2019).

Debido a su importancia se han desarrollado diferentes métodos para la cuantificación de fenoles totales, destacando los métodos espectrofotométricos como Folin-Ciocalteu y Folin-Denis. Dichos métodos se basan en la reducción de tungsteno y molibdeno, respectivamente, y los productos finales muestran una coloración azul a una longitud de onda de 760 nm en presencia de compuestos fenólicos (Kumar y Goel, 2019).

#### 1.2.4.2.2 Flavonoides

El pistache y las nueces son una buena fuente de flavonoides como quercetina, miricetina, kaempferol, resveratrol (Jun-Yang y col., 2009; Dreher, 2012), y miricetina (Panche y col., 2016). Los flavonoides son compuestos polifenólicos que son metabolitos secundarios de bajo peso molecular y de origen vegetal. Surgen de la biosíntesis combinada del ácido Shikímico y de la vía acetato-malato. Se caracterizan por su núcleo flavónico, están compuestos por 15 carbonos, con una estructura C6-C3-C6. Se derivan de benzo- $\gamma$ -pirona que consiste en dos anillos aromáticos (A y B), unidos por un puente de tres carbonos, frecuentemente con una forma de un anillo heterocíclico (C), que es el principal responsable de las variaciones de clases de los flavonoides (Figura 1) (Heim y col., 2002; Castellano y col., 2013).

El grupo de los flavonoides comprende más de 6000 compuestos dentro de los compuestos fenólicos, como los flavonoles, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas, flavanonas y antocianinas (Vuolo y col., 2019). Se encuentran distribuidos en las hojas, semillas, corteza y flores de las plantas (Heim y col., 2002).

Sus efectos benéficos en la salud se atribuyen a su capacidad antioxidante y quelante. Por lo que, sus efectos protectores se deben a su capacidad para transferir electrones, radicales libres, activar enzimas antioxidantes, reducir los radicales  $\alpha$ -tocoferol, inhibir oxidasas (Heim y col., 2002), producción de enzimas metabolizantes como la glutatión S-transferasa, quinona reductasa y uridina 5-difosfo-glucuronil transferasa mediante la cual los carcinógenos se desintoxican y, por lo tanto, se eliminan del cuerpo (Panche y col., 2016); teniendo efecto antiinflamatorio, antitumoral, antiviral y antialérgico (Castellano y col., 2013). Sin embargo, la actividad biológica de los flavonoides depende del tipo de constituyente fitoquímico que contenga, la complejidad de su estructura, las alteraciones físicas y químicas de los compuestos durante la digestión, así como la composición de la mezcla de

flavonoides, otorgando diferentes propiedades benéficas a la salud (Islas-Gómez y col., 2015).

#### 1.2.4.3 Capacidad antioxidante

Casi todos los organismos vivos utilizan oxígeno ( $O_2$ ) para la producción de energía, por lo que es esencial para la vida. Para producir energía, un organismo requiere un proceso llamado oxidación, que implica la pérdida de electrones. Sin embargo, la oxidación también involucra la inactivación de enzimas que no tienen mecanismos antioxidantes y no sobreviven en un ambiente de  $O_2$  (Rojas y Buitrago, 2019).

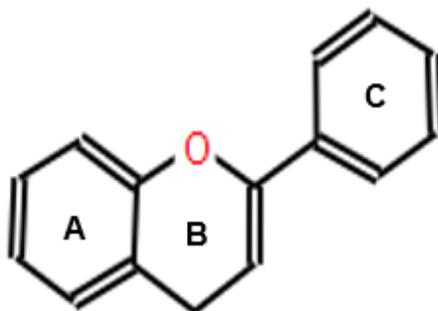


Figura 1. Estructura de la molécula de los flavonoides (Vuolo y col., 2019).

Durante el metabolismo normal se generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuales actúan como radicales libres y están involucradas en reacciones de ganancia de pérdida o ganancia de electrones. Al tener un electrón desapareado en la capa de valencia, inician una serie de reacciones en cadena que dañan las células. Por lo tanto, si la producción de radicales libres excede la capacidad antioxidante de un sistema vivo, estas especies pueden dañar moléculas biológicas como proteínas, lípidos, ADN y ARN causando daño estructural y funcional a las enzimas y al material genético (Castillo y col., 2010; Tütem y col., 2014; Soto-Zarazúa y col., 2015; Rojas y Buitrago, 2019; Arjeh y col., 2020). De modo que la acumulación de agentes oxidantes causa estrés oxidativo y juega un papel muy importante en la patogenia de muchas enfermedades crónicas degenerativas como, aterosclerosis, enfermedades coronarias, diabetes, asma, rinitis, cáncer, Alzheimer, envejecimiento, entre otras (Saura-Calixto y col., 2009; Chen y col., 2015). Por lo que, ha aumentado

el interés por el uso de antioxidantes naturales ya que se desea reemplazar los antioxidantes sintéticos que a medida están restringidos debido a sus efectos cancerígenos (Rojas y Buitrago, 2019).

Los antioxidantes son un grupo de compuestos de diversa naturaleza química capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, dando fin a las reacciones de oxidación, puesto que son lo suficientemente estables como para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo así su capacidad de dañar (Saura-Calixto y col., 2009; Lobo y col., 2010; Soto-Zarazúa y col., 2015). Son benéficos para la salud reforzando las defensas contra especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO/ERN) previniendo enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Tütem y col., 2014). Algunas enzimas y moléculas de defensa antioxidante endógena son las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y antioxidantes no enzimáticos como el glutatión y las vitaminas C y E. En condiciones fisiológicas, los agentes oxidantes y las defensas antioxidantes están en equilibrio. (Rojas y Buitrago, 2019). Sin embargo, diversos factores ambientales y situaciones patológicas pueden generar un desequilibrio entre formación y eliminación de radicales. Para eliminar el exceso de radicales es recomendable contar con fuentes externas de antioxidantes que puedan ser empleados como defensa para lograr reestablecer los niveles de ERO/ERN (Soto-Zarazúa y col., 2015). Algunos antioxidantes naturales son compuestos fenólicos (tocoferol, flavonoides, ácidos fenólicos, entre otros), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de clorofila, aminoácidos y aminas), carotenoides o ácido ascórbico (Rojas y Buitrago, 2019). Por lo que se recomienda la ingesta de frutas y verduras, debido a su naturaleza rica en antioxidantes, vitaminas C, E, carotenoides y compuestos fenólicos que ayudan en la prevención del estrés oxidativo (Bengtsson y Hagen, 2008; Tütem y col. 2014).

Las nueces tienen cantidades considerables de vitamina B, vitaminas antioxidantes (tocoferol) y polifenoles. Sin embargo, la mayoría de los antioxidantes de las nueces se encuentran en la cáscara blanda, lo que provoca la pérdida de dichos compuestos durante el pelado o tostado (Ros, 2015). Por otra parte, la cáscara verde del pistache

(mesocarpio) es una fuente rica de antioxidantes naturales (ácido gálico, quercetina, catequina, entre otros) teniendo actividades antioxidantes prometedoras; destacando que su actividad antioxidante depende directamente de la concentración de compuestos bioactivos presentes, como los compuestos fenólicos (Arjeh y col., 2020). La concentración de los compuestos fenólicos está correlacionada con la capacidad antioxidante total (TAC), que es la capacidad de los compuestos fenólicos para actuar como agentes reductores (y por tanto antioxidantes), está mediada por la capacidad donante de hidrógenos y de sus grupos hidroxilo, además de su capacidad quelante de metales (Fegredo y col., 2009; Chen y col., 2015). Existen diversas técnicas analíticas que se emplean para la identificación y cuantificación de los compuestos antioxidantes de diferentes alimentos (Tütem y col. 2014). Así como la concentración de compuestos bioactivos, la forma química de los compuestos que pueden actuar como antioxidantes también es de gran importancia (Bengtsson y Hagen, 2008). En este sentido, se han desarrollado muchos ensayos para la cuantificación de la capacidad antioxidante como ABTS $\bullet^+$  /TEAC [2,2'-azino-bis (3-ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico)/equivalente de trolox capacidad antioxidante], DPPH $\bullet$  (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), FRAP (poder antioxidante reductor férrico), siendo estos algunos de los ensayos más utilizados para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* (Tütem y col., 2014).

El DPPH $\bullet$  es un radical libre estable que reacciona con un sustrato capaz de donar un átomo de hidrógeno por lo tanto, este ensayo se basa en la eliminación del radical mediante la adición de antioxidantes capaces de decolorar la solución DPPH $\bullet$  de violeta oscuro a amarillo (Figura 2). De acuerdo con la metodología, el grado de decoloración es proporcional a la concentración de moléculas de tipo antioxidante. La actividad se mide mediante espectrofotometría UV. Una absorbancia baja indica una alta actividad de eliminación de radicales libres del compuesto bajo investigación. Los resultados se expresan como IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ), lo que significa la concentración de antioxidante requerida para causar la inhibición del 50% del radical.

El porcentaje de inhibición de radicales DPPH• se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibición del radical DPPH}\bullet = \frac{(A_1 - A_0)}{A_0} (100)$$

Donde,  $A_1$  es la absorbancia antes de la reacción (DPPH• + metanol),  $A_0$  es la absorbancia después de la reacción (DPPH• + muestra) (Rojas y Buitrago, 2019).

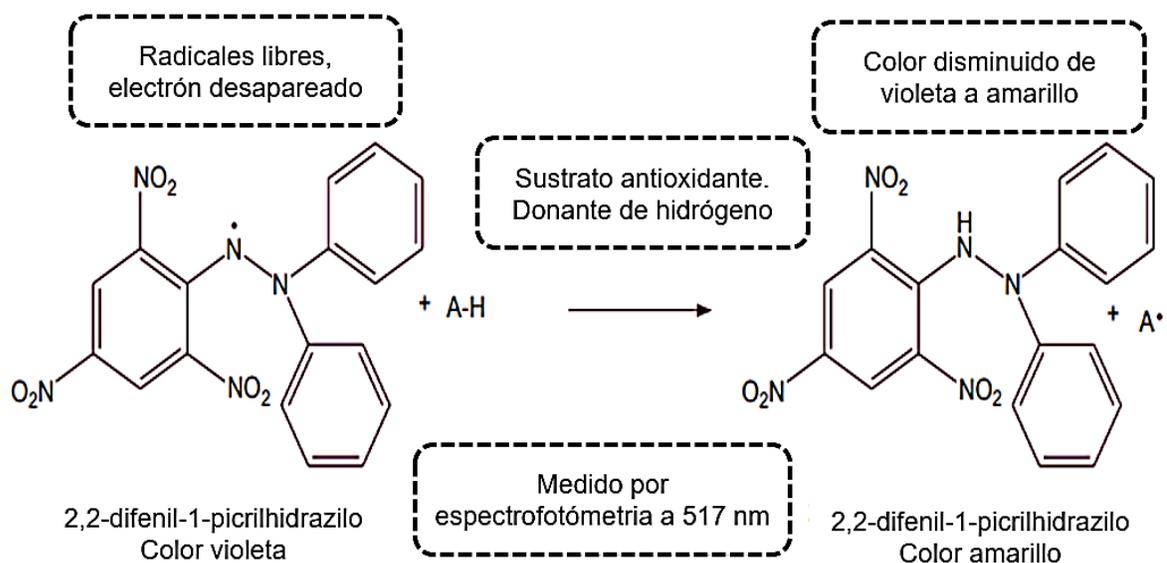


Figura 2. Reacción radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•). Adaptado de Rojas y Buitrago (2019).

Otro de los métodos para la determinación de la capacidad antioxidante es por medio del ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzoazolina-6-sulfónico) (ABTS•<sup>+</sup>). Este ensayo se considera una de las técnicas más sensibles para identificar la actividad antioxidante (Rojas y Buitrago, 2019). Se basa en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catiónico coloreado ABTS•<sup>+</sup>, que puede formarse previamente mediante la oxidación de ABTS•<sup>+</sup> por metahemoglobina y peróxido de hidrógeno, la relación se visualiza como una decoloración cuando el radical ABTS•<sup>+</sup> es reducido por antioxidantes. De esta forma el grado de decoloración permite evaluar el porcentaje de inhibición del radical catiónico ABTS•<sup>+</sup>, que se determina en función de la concentración de antioxidante y el tiempo de reacción. Los resultados se expresan

como equivalente de Trolox o TEAC Capacidad antioxidante Equivalente de Trolox (Hernández-Rodríguez y col., 2019). La oxidación de los radicales  $ABTS^{\bullet+}$  se muestra en la Figura 3.

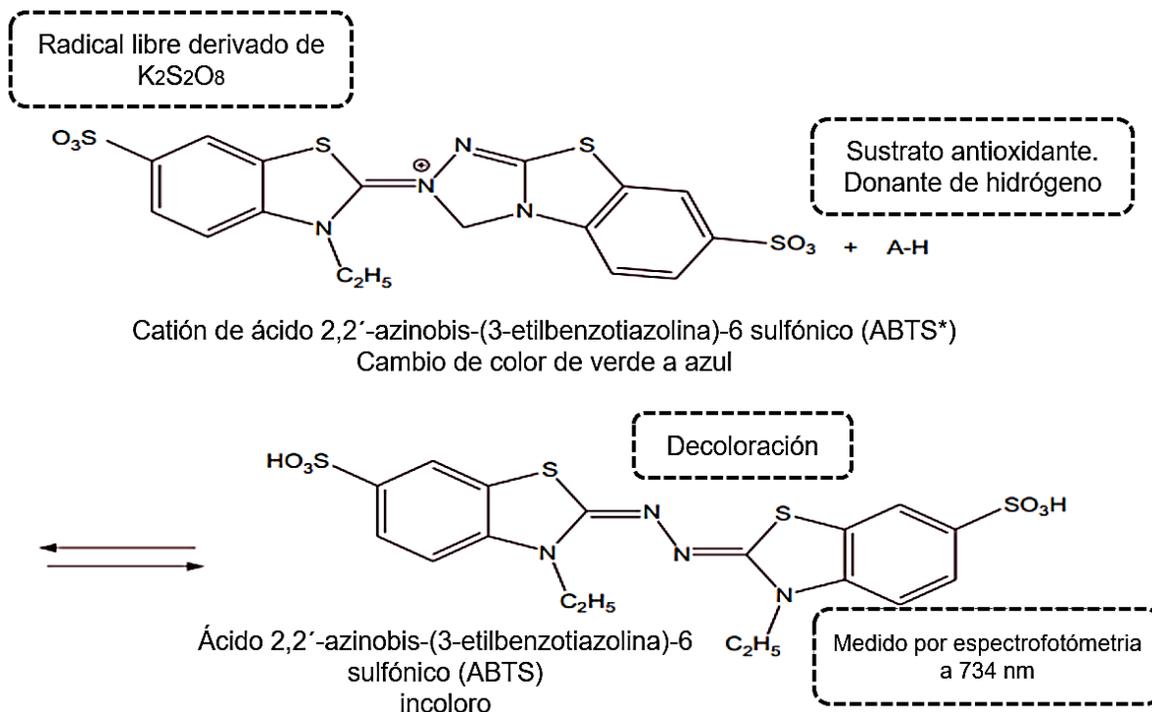


Figura 3. Oxidación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  Adaptado de Rojas y Buitrago (2019).

### 1.2.5 Alfa amilasa pancreática

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno endocrino y metabólico, caracterizado por hiperglucemia crónica y dislipidemia debido a la alteración de la secreción y función de la insulina (Adisakwattana y col., 2012; Gondokesumo y col., 2017). La DM consta de varios tipos, uno de los cuales es no insulínico, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), este tipo de DM es el más común en toda la población (Elya y col., 2012). Es un trastorno metabólico de etiología múltiple caracterizado por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas que incluyen defectos en la secreción de la insulina, casi siempre con una contribución importante de la resistencia a la insulina (Etxeberria y col., 2012). Debido a que la diabetes es una de las enfermedades crónico degenerativas no transmisibles (ECDNT) de mayor

incidencia en México y una de las enzimas cruciales en el desarrollo y/o prevención de esta patología es la alfa amilasa, uno de los enfoques terapéuticos de este padecimiento es reducir los niveles de glucosa en sangre (Gondokesumo y col., 2017), mediante el uso de inhibidores de enzimas digestivas de carbohidratos, lo que resulta un retraso de la digestión de monosacáridos absorbidos. La alfa amilasa pancreática es una enzima clave de la digestión de carbohidratos en la dieta humana (Tadera y col., 2006; Adisakwattana y col., 2012), esta es una metaloenzima de calcio que cataliza la hidrólisis de los enlaces 1-4 glucosídicos de almidón, amilosa, amilopectina, glicógeno y varias maltodextrinas, siendo responsable de la mayor parte de la digestión de almidón en humanos (Smith y Morton, 2010; Etxeberria y col., 2012). Por lo tanto, la inhibición de esta enzima juega un papel muy importante en el tratamiento de DM (Gondokesumo y col., 2017). Actualmente existen algunos fármacos antidiabéticos que actúan principalmente inhibiendo la digestión y absorción de carbohidratos, dentro de ellos destaca la acarbosa, un inhibidor de alfa amilasa pancreática disponible para el tratamiento de diabetes (Etxeberria y col., 2012). Sin embargo, la excesiva inhibición por medicamentos conlleva a efectos colaterales como distensión abdominal, flatulencias y posible diarrea como resultado de una fermentación anormal de los carbohidratos no digeribles en el colon. Por lo que se ha recomendado el uso de inhibidores naturales de origen vegetal como una alternativa para controlar la DM2 disminuyendo la absorción de glucosa, con la ventaja de no causar efectos secundarios graves y ayudando en la disminución de peso en las personas que consumen grandes cantidades de almidón (Etxeberria y col., 2012; Olivera-Fox y col., 2012; Gondokesumo y col., 2017). Dicho efecto se puede atribuir a la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos presentes en la matriz alimentaria con actividad inhibitoria de alfa amilasa (Mendoza y col., 2014). Sin embargo, su actividad inhibitoria depende de la cantidad y bioaccesibilidad de fenoles y flavonoides presentes, además de la naturaleza de las moléculas (Etxeberria y col., 2012).

## 1.2.6 Digestión

La digestión es la descomposición de grandes moléculas insolubles de los alimentos (Shahidi y Peng, 2018). Es decir, es el proceso por el cual las moléculas de alto peso molecular, como el almidón y proteínas, se dividen en otras más pequeñas para que puedan cruzar las membranas celulares del epitelio intestinal y ejercer un efecto fisiológico (Smith y Morton, 2010). Dicho proceso es asistido por el cambio de pH y varias enzimas digestivas (Shahidi y Peng, 2018).

### 1.2.6.1 Digestión gastrointestinal

El proceso de digestión se compone de varias etapas: bucal, gástrica, intestinal/absorción y fermentación colónica. Cada una de estas fases se lleva a cabo bajo condiciones fisiológicas específicas, que tienen además funciones concretas (Kong y Singh, 2008). El proceso digestivo comienza en la boca, en donde la comida se descompone por el proceso de masticación y la acción enzimática de la alfa amilasa (Guyron y Hall, 2001). La masticación tiene la función de transformar el alimento en partículas más pequeñas, siendo la primera fase en la cual las características fisicoquímicas de la comida están sujetas a modificaciones mayores (Hoebler y col., 2000). Después de ser masticado y tragado, el bolo alimenticio entra al esófago para llegar al estómago, donde se encuentra la pepsina que se secreta en el estómago para hidrolizar las proteínas presentes; ahí mismo, la comida es mezclada con el ácido gástrico de modo que se forma el quimo. En el intestino delgado; la bilis (producida en el hígado), enzimas pancreáticas y otras enzimas digestivas (peptidasa) producidas por la pared del intestino delgado, ayudan en la descomposición de los alimentos, teniendo como resultado la absorción de algunos nutrientes individuales. Después de pasar a través del intestino delgado, la fracción no digerible del alimento transita al intestino grueso o colon, la última parte del sistema digestivo. En el colon se encuentra presente la microbiota, un grupo de bacterias que residen en este órgano, la cual puede sufrir alteraciones endógenas o exógenas por diversos factores y mantienen una relación simbiótica con el hospedador. La mayoría de las bacterias que componen la microbiota colónica son

benéficas y participan en numerosos procesos fisiológicos, no obstante, también existen bacterias dañinas que pueden proliferar y causar enfermedades (Guyton y Hall, 2001).

Además de los procesos fisiológicos para llevar a cabo el proceso de la digestión como lo son la absorción, motilidad, secreción de enzimas. También son importantes las características de alimento y sus interacciones con cuestiones fisiológicas mismas del tracto gastrointestinal e interacciones de los componentes de la matriz (Kong y Singh, 2008; Smith y Morton, 2010).

#### 1.2.6.2 Modelos de digestión gastrointestinal

Para que los compuestos bioactivos ejerzan un efecto fisiológico deben estar presentes en cantidades suficientes en los alimentos crudos o preparados, además de ser bioaccesibles (la fracción liberada de la matriz alimentaria durante la digestión gastrointestinal) y biodisponibles (la fracción liberada que alcanza la circulación sistémica como compuesto original o metabolito). No obstante, la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos está estrechamente relacionada con su estructura fisicoquímica, la matriz alimentaria que los contiene y la presencia de factores anti-nutricios que podrían interferir con su capacidad de liberación y absorción intestinal (Olivas-Aguirre y col., 2020).

Para medir la digestibilidad se emplean modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* con la finalidad de analizar los cambios estructurales, la bioaccesibilidad, la digestibilidad y la liberación de compuestos de los alimentos, en condiciones gastrointestinales simuladas (Hur y col., 2011), en las diferentes etapas del proceso digestivo por separado; bucal (Hoebler y col., 2000), gástrica (Fassler y col., 2006) y fermentación colónica (Hoebler y col., 1998). Para ello, se añaden secuencialmente diferentes enzimas digestivas con el propósito de simular las diferentes etapas del proceso digestivo (Boisen y Eggum, 1991).

### 1.2.6.3 Absorción

El proceso de absorción es la asimilación de nutrientes (Daniel, 2004), es decir, el transporte de los productos de la digestión y otras pequeñas moléculas, iones y agua a través de las membranas de las células epiteliales, principalmente en el intestino delgado (Smith y Morton, 2010).

Existen diferentes métodos para determinar la absorción tanto *in vivo* como *in vitro*. El primero es considerado el más confiable, donde se hacen análisis cuantitativos de biomarcadores en orina, sangre o heces. Sin embargo, se requiere mucho tiempo y son difíciles debido a la baja concentración del analito, junto con una alta interferencia (Rios y col., 2002; Olthof y col., 2003). Por lo que, el uso de técnicas *in vitro*, como el saco intestinal invertido de rata se utiliza ampliamente para evaluar la permeabilidad y absorción de compuestos bioactivos dentro del organismo, empleando intestino de rata, debido a su gran semejanza con el de humano. Además de que es una técnica sencilla y de bajo costo sin necesidad de equipo especializado. El saco intestinal se prepara mediante la inversión de segmento del intestino (yeyuno), logrando que el epitelio con las vellosidades se encuentre en la parte exterior, mientras que la membrana muscular, forma la superficie interior del saco. El uso de estos sacos invertidos logra la buena viabilidad del tejido, además, la actividad metabólica se mantiene mediante su incubación en medio de cultivo tisular. En estos se encuentran numerosos paquetes proteicos dedicados al transporte de estos que mediante diversas maneras permite el ingreso de aminoácidos libres y pequeños péptidos a través de la membrana cerosa del intestino (Daniel, 2004).

### 1.2.6.4 Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad es la eficiencia de la digestión de un determinado compuesto expresada como un porcentaje de la cantidad real liberado y absorbido hasta su contenido total (Shahidi y Peng, 2018). Es decir, la cantidad de compuestos del alimento como nutrientes o fitoquímicos que están presentes en él durante la digestión gastrointestinal, como consecuencia de su liberación de la matriz

alimentaria y que podría ser capaz de atravesar la barrera intestinal. Sin embargo, este proceso depende de las propiedades físicas y químicas de la matriz alimentaria y de su cambio durante el proceso de digestión (Holst y Williamson, 2008; Tagliacruz y col., 2010; Mandalari y col., 2013).

El término de biodisponibilidad se define como la cantidad y velocidad a la que el principio activo se absorbe y llega al lugar de acción. Por lo tanto, para que un compuesto sea potencialmente biodisponible primeramente debe ser bioaccesible en el tracto gastrointestinal (Holst y Williamson, 2008; Shim y col., 2009).

### 1.2.7 Quimioinformática

La quimioinformática es una disciplina relativamente nueva, que ha surgido de varias disciplinas como la química computacional, la química informática, química cuántica, modelado molecular de campos de fuerza, entre otras (Xu y Hagler, 2002; Varnek y Baskin, 2011; Varnek y Baskin, 2012). La quimioinformática tiene como objetivo utilizar la tecnología para resolver problemas en el campo de la química como la recuperación, procesamiento y la extracción de datos significativos de las estructuras químicas, además de evitar la experimentación *in vivo* e *in vitro*, mediante el uso de modelos *in silico*. Esto se ha convertido en una herramienta indispensable para el diseño de fármacos con importantes propiedades biológicas en la agroquímica, la industria farmacéutica, la industria de alimentos e investigación de fragancias (MacCuish y MacCuish, 2013; Humbeck y Koch, 2016; Lo y col., 2018). Además, se pueden obtener datos de predicción de su bioactividad, incluidas sus propiedades de absorción, distribución, metabolismo, extracción y toxicidad (ADMET) para un compuesto bioactivo dado. Por lo tanto, es de suma importancia la aplicación de esta disciplina ya que tanto la absorción como el metabolismo de los compuestos fenólicos son principalmente determinados por su estructura química, propiedades fisicoquímicas y moleculares, incluidos su grado de glicosilación, acilación, solubilización, log P, momento dipolar, entre otros (Maldonado y col., 2006; Hong y col., 2008; Varnek y Baskin, 2011; Nieto-Figueroa y col., 2020).

## 2. HIPÓTESIS

Los fenoles y flavonoides del pistache (*Pistacia vera* L.) son bioaccesibles durante su paso por las etapas del tracto gastrointestinal *in vitro*. Los compuestos bioaccesibles ejercen capacidad antioxidante e inhiben la actividad de la enzima alfa amilasa pancreática *in vitro*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar la composición química y nutracéutica, así como determinar la bioaccesibilidad *in vitro*, permeabilidad *ex vivo* de compuestos bioactivos del pistache (*Pistacia vera* L.) tostado y su potencial funcional *in silico*.

#### 3.2 Objetivos particulares

- Caracterizar química y nutracéuticamente el pistache tostado (*Pistacia vera* L.).
- Evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* y permeabilidad *ex vivo* de compuestos bioactivos (fenoles totales y flavonoides totales) del pistache, mediante un modelo de digestión gastrointestinal (boca-colon).
- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del pistache y sus productos de la digestión mediante los ensayos ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>.
- Cuantificar el efecto de los productos de la digestión intestinal del pistache sobre la actividad *in vitro* de la enzima alfa amilasa.
- Determinar la quimioinformática molecular y bioactividad potencial *in silico* de compuestos fenólicos seleccionados del pistache.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Material biológico

Se utilizaron pistaches (*Pistacia vera* L.) de marca comercial, tostados con sal y con cáscara. Cabe mencionar que se emplearon pistaches con cáscara adherida y sin cáscara. Para el pistache sin piel se les retiró la cáscara manualmente para obtener la nuez después de blanquear los pistaches con nitrógeno líquido durante 1 min, se separó de la piel y ambas muestras se pulverizaron empleando un molino de café y los polvos obtenidos se conservaron para los análisis posteriores.

#### 4.1.2 Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos: metanol, ácido sulfúrico, acetonitrilo, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, etanol, alfa amilasa, tartrato de sodio, almidón, DPPH• (2,2-Difenil-1-picrihidrazil), ABTS•<sup>+</sup> (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)), Folin-Ciocalteu, estándares como ácido gálico, Trolox y rutina. Kit comercial para la determinación de fibra dietética. Los reactivos no contemplados en esta lista fueron de la marca JT Baker.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Análisis proximal

Se determinaron los lípidos, proteína, humedad y ceniza siguiendo la metodología descrita por la AOAC en 2002, la cantidad de carbohidratos se determinó por diferencia.

##### 4.2.1.1 Humedad (Método 925.23)

Se pesó 1 g de muestra en una cápsula (previamente llevada a peso constante). Se colocó en una estufa a 130 ° C por 2 horas. Se pesó la cápsula y se realizó el cálculo correspondiente:

$$\% \text{ Humedad} = \left( \frac{P_o - P_f}{P_o} \right) * 100$$

Donde,  $P_o$  es el peso inicial de la muestra;  $P_f$  es el peso final de la muestra.

#### 4.2.1.2 Lípidos (Método 920.39)

En un cartucho de celulosa se colocaron 5 g de la muestra, los cuales fueron cubiertos con algodón y se colocaron en el compartimiento de extracción de Soxhlet, donde el matraz a peso constante contenía 2/3 partes de su volumen de éter de petróleo. La extracción se mantuvo a un flujo de 10 reflujos/hora durante 5 horas. Posteriormente, se destiló el solvente y se secó el matraz en la estufa para retirar la humedad y residuos de solvente. Los matraces se pesaron y realizaron los cálculos.

$$\% \text{ grasa} = \left( \frac{P_f - P_o}{M} \right) * 100$$

Donde,  $P_f$  es el peso final del matraz;  $P_o$  es el peso inicial del matraz;  $M$  es el peso de la muestra (g).

#### 4.2.1.3 Proteína (Método 920.105)

La proteína total se determinó empleando el método 920.105 (Kjeldhal). En un matraz tipo Kjeldhal, se colocó 1 g de muestra desgrasada, 3.5 g de sulfato de sodio, 0.4 g de sulfato de cobre y se adicionaron 10 ml de ácido sulfúrico. El matraz fue colocado en el digestor durante 1 hora hasta el cambio de color de la muestra a verde claro.

La muestra se atemperó y se colocó en el destilador, adicionándole agua e hidróxido de sodio al 40%. El destilado fue recibido en un matraz con 25 ml de ácido bórico. Se emplearon como indicadores el rojo de metilo y verde de bromocresol. El destilado se tituló con ácido clorhídrico 0.08 N. Finalmente se determinó el nitrógeno (N) total multiplicado por un factor de conversión proteica proveniente del contenido promedio de nitrógeno en los alientos, equivalente al % de proteína presente en el alimento.

Cálculos:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \left( \frac{A}{1000} \right) * \left( \frac{B - C}{D} \right) * (E) * 100$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} * 6.25$$

Donde, A es la normalidad del ácido valorado en moles; B es el volumen gastado del ácido en la muestra (ml); C es el volumen gastado del ácido en el blanco (ml); D son los gramos de muestra (g); E es el peso atómico del nitrógeno (14 g/mol).

#### 4.2.1.4 Cenizas (Método 945.46)

Se pesaron 2 g de muestra en un crisol de porcelana, previamente llevado a peso constante. La muestra se calcinó en una mufla a 550-560 ° C durante 5 horas hasta conseguir cenizas completamente blancas. Los crisoles se colocaron en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente. Se pesó el crisol junto con la muestra calcinada y se restó el peso del crisol.

$$\% \text{ ceniza} = \left( \frac{Pf - Po}{M} \right) * 100$$

Donde, Pf es el peso final del crisol con la muestra calcinada; Po es el peso inicial del crisol sin la muestra; M es el peso de la muestra (g).

#### 4.1.2.5 Carbohidratos

El cálculo de contenido de carbohidratos de la muestra se realizó por diferencia de peso, con respecto al porcentaje de las determinaciones anteriores (proteína, lípidos, cenizas y humedad).

#### 4.2.2 Análisis nutracéutico

##### 4.2.2.1 Fibra dietética

La fibra dietética total fue determinada mediante un kit comercial enzimático haciendo una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos (Shiga y col., 2003).

#### 4.2.2.1.1 Fibra insoluble

Se pulverizó y desengrasó la muestra, se adicionaron 50 ml de buffer de fosfato 0.08 mM a pH 6 y 100 µl de una solución de alfa amilasa cubriendo el matraz con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, se incubó en un baño maría a 95 ° C por 30 minutos, con agitación continua. Una vez a temperatura ambiente se ajustó el pH a 7.5. Se adicionaron 100 µl de proteasa y se incubaron en un baño maría a 60°C por 30 minutos con agitación continua, una vez a temperatura ambiente se ajustó el pH a 4. Posteriormente se adicionaron 300 µl de amiloglucosidasa y se incubaron en un baño maría a 60 °C con agitación continua. Posterior a la incubación, se filtró con papel Whatman N° 4 a peso constante y se realizaron 2 lavados con 15 ml de agua destilada a 60 °C, el filtrado obtenido fue recuperado y almacenado para la determinación de fibra soluble. El papel filtro junto con la muestra se secaron en una estufa a 60 ° C por 24 horas hasta peso constante.

$$\% \text{ fibra insoluble} = \frac{(W1 - W2) * 100}{W2}$$

Donde, W1 es peso del papel con muestra; W2 peso del papel; W3 peso de la muestra.

#### 4.2.2.1.2 Fibra soluble

De la prueba anterior se guardó el residuo filtrado, a este se le adicionó un volumen igual de etanol al 80% y se dejó precipitar 24 horas. El precipitado se filtró en papel Whatman N° 42 a peso constante, se realizaron 2 lavados con 15 ml de etanol al 80 % y 2 con 15 ml de acetona. El papel filtro se dejó secar por 24 horas a 60 ° C y se pesó.

$$\% \text{ fibra soluble} = \frac{(W1 - W2) * 100}{W2}$$

Donde, W1 es el peso del papel con muestra; W2 es el peso del papel; W3 es el peso de la muestra.

#### 4.2.2.2 Extracción de compuestos fenólicos

Con la finalidad de extraer los compuestos fenólicos presentes en el pistache, se realizó una extracción sólido-líquido utilizando como solvente de extracción metanol, la extracción fue asistida por ultrasonido y se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Yuntao y col. (2014). Brevemente, 1 g del pistache pulverizado con y sin piel previamente desengrasado se empleó para la extracción de los compuestos bioactivos, se extrajeron por 24 h a 4°C con 5 ml de metanol. Después se centrifugaron durante 5 min a 3000 rpm (1200 g), el sobrenadante se conservó para las pruebas siguientes.

#### 4.2.2.3 Cuantificación de compuestos fenólicos totales

El contenido de fenoles totales se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Singleton y Rossi (1965), con algunas modificaciones. Este método está basado en la reducción de compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu (molibdatos) en presencia de una base (carbonato de sodio). Se empleó una microplaca de 96 pozos a la cual se adicionaron 150  $\mu$ l de reactivo de Folin Ciocalteu (1:10), 30  $\mu$ l de extracto metanólico descrito anteriormente, se adicionaron 120  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75% w/v). Después de 30 minutos se leyó la microplaca en un espectrofotómetro MultiSkan Go a una longitud de onda de 765 nm. Se realizó una curva de calibración de ácido gálico de 1-80  $\mu$ g/ml.

#### 4.2.2.4 Capacidad antioxidante

##### 4.2.2.4.1 DPPH•

Se siguió el método descrito por Fukumoto y Mazza (2000). Este método se basa en el decremento de la absorbancia del radical DPPH• cuando es reducido por compuestos antioxidantes (Carvalho *et al.*, 2016). Brevemente, el extracto metanólico (20  $\mu$ L) se adicionó a una microplaca de 96 pozos, así como etanol (blanco). Se agregaron 200  $\mu$ l de solución DPPH (150  $\mu$ M), y se leyó en un espectrofotómetro MultiSkan Go a una longitud de onda de 520 nm. Se realizó una

curva de calibración de 50-800  $\mu\text{M}$  de Trolox y se calculó el % de inhibición con la fórmula previamente descrita.

#### 4.2.2.4.2 ABTS $\bullet^+$

Se utilizó la técnica descrita por Nenadis y col. (2004). Este método se basa en la disminución de la absorbancia de la solución del radical ABTS $\bullet^+$ , debido a su reducción por parte de compuestos antioxidantes. La técnica implica la producción directa del catión cromóforo ABTS $\bullet^+$  verde-azul a través de la reacción entre el radical ABTS $\bullet^+$  y el persulfato de potasio. La adición de moléculas antioxidantes al radical lo reduce al igual que el grado de decoloración, estando en función de la concentración y el tiempo (Pande y Akoh, 2009). Brevemente, se mezclaron 5 ml de una solución acuosa de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS $\bullet^+$ ) 7mM y 88  $\mu\text{l}$  de una solución de persulfato de potasio  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  140 mM, conservándose en un lugar oscuro durante 12 h, para la generación del radical.

Terminado el tiempo, a 500  $\mu\text{l}$  de la solución se les agregaron de 20-25 ml de etanol. La absorbancia estaba entre 0.7 y 1 leyéndose a una longitud de onda de 734 nm. El extracto metanólico (20  $\mu\text{L}$ ) se adicionó a una microplaca de 96 pozos, así como etanol (blanco). Se les agregaron 230  $\mu\text{l}$  de solución ABTS $\bullet^+$ , y se leyó en un espectrofotómetro MultiSkan Go a una longitud de onda de 734 nm. Se realizó una curva de calibración de 50-800  $\mu\text{M}$  de Trolox.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición} = \left( \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \right) * 100$$

Donde, el % inhibición es la actividad antioxidante de la muestra;  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra a 734 nm;  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia del control a 734 nm.

#### 4.2.2.5 Actividad inhibitoria de alfa amilasa pancreática

Para determinar la inhibición de alfa amilasa pancreática se utilizó la técnica descrita por Elya y col. (2012) con algunas modificaciones. Para ello, se empleó la fracción intestinal digerible del pistache con y sin piel, previamente procesada y obtenido de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Se colocaron 49 µl de las muestras en un tubo Eppendorf color ámbar por separado, en seguida se agregan 49 µl de enzima alfa amilasa 100 U/ml disuelta en buffer de fosfatos (pH 6.9, 20 mM). Se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior al reposo se adicionaron 164 µl de almidón al 3% disuelto en buffer de fosfatos (pH 6.9, 20 mM). Nuevamente se dejaron en reposo por 10 min a temperatura ambiente. Después del tiempo se adicionaron 124 µl de colorante DNS (tartrato de sodio 5.3 mM, hidróxido de sodio 2 M, ácido 3-5 dinitrosalicílico 96 mM). Posteriormente se hirvieron los tubos en agua durante 5 min para detener la reacción. Finalizado el tiempo, se adicionaron 1,114 µl de agua. Cada una de las muestras se colocó en una microplaca de 96 pozos y se leyó en un espectrofotómetro MultiSkan Go a una longitud de onda de 540 nm. Se realizó una curva de calibración de 25-300 µg/ml de acarbosa.

La actividad inhibitoria de alfa amilasa pancreática se expresa como porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left( \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right) * 100$$

Donde la  $Abs_{control}$  fue la absorbancia sin la muestra y  $Abs_{muestra}$  es la absorbancia del extracto de la muestra.

#### 4.2.3 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Las muestras de pistache se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro*, la cual consta de cuatro fases: boca, estómago, intestino y colon. A continuación se describe brevemente la metodología, la cual involucra la participación de individuos sanos y el uso de intestinos de rata, el experimento fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro

(ANEXO 3) con número de oficio CBQ21/104, tomando en cuenta las disposiciones para el manejo correcto de animales de laboratorio establecidas en la NOM-062-ZOO-1999. Por lo que, una persona capacitada realizó los procedimientos que se describen a continuación. Cabe mencionar que este proyecto es parte del proyecto con número de oficio CBQ19/013, aprobado por el comité de bioética.

De cada una de las etapas de la digestión (boca, estómago, intestino y colon), se tomaron alícuotas para la cuantificación de fenoles, flavonoides y la capacidad antioxidante como se describió anteriormente.

#### 4.2.3.1 Simulación de las condiciones de la boca

Se realizó la metodología adaptada y descrita por Campos-Vega y col. (2015). Se invitaron a 4 individuos sanos al estudio, proporcionándoles previamente un consentimiento informado por escrito (ANEXO 2); los cuales después de cepillarse los dientes sin pasta dental, masticaron 1 g de la muestra de pistache durante 15 veces por 15 segundos vaciando el contenido en un vaso con 5 ml de agua destilada. Inmediatamente los voluntarios enjuagaron la boca con 5 ml de agua destilada 15 veces por 15 segundos para después depositarla en el mismo vaso. Al finalizar se mezclaron las suspensiones de cada muestra en un vaso, es importante tomar en cuenta que se empleó un blanco el cual contenía agua destilada en lugar de la muestra de pistache.

#### 4.2.3.2 Simulación de las condiciones del estómago

Para la digestión gástrica se tomó una alícuota de 10 ml, la cual se ajustó a pH 2 usando solución de HCl (150 mM, 2-81 ml). Se añadió una solución de pepsina (0.055 g en 0.94 ml de HCl 20 mM) a cada muestra y se incubó durante 2 h a 37°C.

#### 4.2.3.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado

Se preparó un extracto intestinal 30 minutos antes de su uso disolviendo 3 mg de hiel de buey y 2.6 mg de pancreatina de páncreas porcino en 5 ml de una solución amortiguadora Krebs-Ringer (NaCl 118 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucosa 11 mM, KCl

4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM con pH 6.8). Esta solución (5 ml) fue añadida a cada muestra y blanco procedente de la digestión gástrica; la suspensión (15 ml) se transfirió a un recipiente que contenía un saco intestinal invertido de rata.

#### 4.2.3.3.1 Técnica del saco intestinal invertido en ratas

##### 4.2.3.3.1.1 Manejo de los animales

Se emplearon 5 ratas macho de la cepa Wistar (peso entre 250-300 g, de 8 semanas de edad), clínicamente sanas, a las que se les realizó verificación de sexo, peso y constancia de salud. Se alojaron dos ratas por jaula de acero inoxidable (187 cm de área por 18 cm de alto) que permitió la entrada de aire y luz y un clip a prueba de escape. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad (30-70 %), temperatura adecuada ( $21 \pm 2$  °C), con ciclos día/noche de 12/12 h y condiciones aceptables de limpieza y ventilación constante (NOM-062-ZOO-1999). Se les alimentó con alimento comercial Rodent Lab Chow 5001 (Nupec, Querétaro). Previo al procedimiento quirúrgico, las ratas fueron mantenidas en ayuno durante la noche (16 h) con agua *ad libitum*.

##### 4.2.3.3.1.2 Sacrificio de los animales y preparación del saco intestinal invertido

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg) para producir la sedación, el intestino de las ratas fue expuesto por una incisión abdominal de la línea media para la obtención del yeyuno proximal de rata (20-25 cm) el cual fue segmentado en trozos de aproximadamente 6 cm y se colocaron en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer gasificada a 37°C. Posterior a la extracción del intestino, de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 se administró pentobarbital sódico (120 mg/kg) para producir la eutanasia de los animales. Los fragmentos de intestino se lavaron con la misma solución de Krebs-Ringer, se voltearon suavemente y se ataron de un extremo. Cada intestino se llenó con 2 ml de solución Krebs-Ringer y se ató para alcanzar una longitud final de aproximadamente 4 cm, el cual fue incubado en un baño de agua con agitación oscilante (80 ciclos por minuto, 37 °C, 1

h) conteniendo los 15 ml de la solución anterior (procedente de la digestión gástrica) bajo una atmósfera anaeróbica (CO<sub>2</sub>) durante 15, 30 y 60 minutos. Después del período de incubación se retiraron los sacos para obtener la muestra contenida fuera del saco, la cual se denominó fracción no digerible (FND) y posteriormente ser sometida a una fermentación colónica *in vitro*.

#### 4.2.3.3.1.3 Manejo de los animales después del sacrificio

Los restos de los animales fueron etiquetados y almacenados en bolsas para residuos biológicos para su debido transporte e incineración (NOM-087-ECOL-SSA1-2002). El material quirúrgico utilizado se dejó remojar con cloro por 12 h, se lavó y esterilizó para su posterior almacenamiento.

#### 4.2.3.4 Simulación de las condiciones de fermentación colónica *in vitro* de la FND

La fermentación colónica *in vitro* se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Campos-Vega y col. (2009). Se empleó como control positivo el blanco del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mencionado anteriormente sin carbohidrato disponible para ser fermentado. Se utilizó inóculo fecal humano como fuente representativa de la microbiota colónica, el cual fue obtenido de la primera evacuación de 2 individuos voluntarios sanos, con ausencia de enfermedades gastrointestinales y sin haber consumido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de muestra.

Se prepararon tubos estériles con 9 ml de medio de cultivo basal que contenían (g/L): Agua peptonada (2), extracto de levadura (2), 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), cisteína HCl (0.5), sales biliares (0.5), Tween-80 (2 ml) y hematina (0.2, previamente diluida en 5 ml de NaOH). Los tubos se sellaron y mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia que contenía una mezcla de gases (H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 10:10:80 volumen) durante 24 horas. El inóculo fecal (3 g) se homogenizó con 27 ml de solución de fosfato de sodio 1 M a pH 7. Los tubos con el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1

ml de homogenizado fecal, se adicionó FND proveniente de la digestión intestinal (100 mg del precipitado sólido y 0.5 ml del sobrenadante líquido), del blanco 1 ml e inulina 100 mg como control positivo de la fermentación. Los tubos se agitaron con vortex durante 30 s y se incubaron en un baño de agua a 37 °C. El flujo de la mezcla de gases se mantuvo continuo hasta el término de la fermentación. Los productos de la fermentación colónica se almacenaron a – 70 °C hasta su análisis.

#### 4.2.4 Quimiometría y química medicinal

Se evaluaron *in silico* los compuestos fenólicos más bioaccesibles de acuerdo con la literatura durante la digestión en intestino delgado del pistache (catequina (CAT), catecol (CTC) A (CTC-A), ácido gálico (GA), Epicatequina (ECAT), Eriodictyol-7-O-glucósido (E7G), Cyanidina-3-O-glucósido (Cy3G), Quercetin-3-O-rutinósido (Q3R), Genisteina (GEN), Apigenina (APG), Genisteina-7-O-glucósido (GEN7G), Daidzeína (DAI) y Kaemferol (KF)). Los datos de predicción de bioactividad y quimiinformática molecular, incluidas las propiedades de ADMET y la química medicinal, se calcularon utilizando descriptores canónicos SMILES obtenidos de Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando AdmetSAR 2.0 (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSar2>), swissADME (<http://www.swissadme.ch/>) y Moliinspiration (<https://www.molinspiration.com/>), software de acceso gratuito.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Composición química y nutracéutica del pistache con cáscara y sin cáscara

El contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos, cenizas y humedad tanto del pistache con piel (PCP) y pistache sin piel (PSP) tostados con sal se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición química y nutracéutica del pistache (*Pistacia vera* L.)

	PCP	PSP
<b>Lípidos (g)</b>	46.91 ± 1.56	51.34 ± 0.03*
<b>Proteínas (g)</b>	23.07 ± 0.81	24.36 ± 1.41*
<b>Carbohidratos (g)</b>	24.45 ± 0.80*	18.54 ± 1.49
<b>Fibra dietaria total (g)</b>	13.03 ± 0.20*	9.50 ± 0.30
<i>Soluble (g)</i>	12.43 ± 0.20*	9.17 ± 0.20
<i>Insoluble (g)</i>	0.60 ± 0.00*	0.33 ± 0.00
<b>Cenizas (g)</b>	4.22 ± 0.12*	3.19 ± 0.01
<b>Humedad (g)</b>	1.35 ± 0.24	2.57 ± 0.06*
<b>Fenoles totales (mg EAG)</b>	3.34 ± 0.40*	2.34 ± 0.20
<b>Flavonoides totales (mg ER)</b>	1.71 ± 0.30 *	1.08 ± 0.10

Los valores se expresan como la media (g o mg por 100 g) ± la desviación estándar (n=3); Pistache con piel (PCP); pistache sin piel (PSP); equivalentes de ácido gálico (EAG) y rutina (ER). Diferencia estadística significativa (prueba t de Student para datos no pareados, p <0.05) entre muestras (\*).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los macronutrientes más abundantes del PSP son los lípidos (51.34 %), seguido de las proteínas (24.36 %), los carbohidratos (18.54 %) y la fibra dietaria (9.50 %). El PCP presentó un menor contenido de estos, pero un mayor contenido de fibra (13.03 %).

El contenido de lípidos del PSP fue estadísticamente mayor en comparación con el PCP, los cuales fueron 51.34 g/ 100 g y 46.91 g/ 100 g, respectivamente. Esto se puede deber a que la mayoría de los compuestos lipofílicos se encuentran en la nuez, mientras que los compuestos hidrofílicos están presentes en la piel (Liu y col., 2014),

teniendo así mayor contenido de lípidos en PSP. Hernández-Alonso y col., (2016), reportaron un contenido de lípidos en el pistache tostado seco de 43.4 g/ 100 g, el cual corresponde a un 7.05 % menos que el contenido de lípidos en el PCP. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la variedad de pistache, el tipo de tostado, así como el proceso de extracción.

Cabe mencionar que el pistache es rico en ácidos grasos mono (24.5%) y poliinsaturados (13.3%). Más del 70% de las grasas totales corresponde a ácido oleico y linoleico, por lo que las grasas saturadas son muy bajas (5.6%), por consiguiente, se sugiere que el pistache promueve perfiles lipídicos saludables en sangre, reduce los niveles de colesterol y triglicéridos (Terzo y col., 2019).

Al igual que los lípidos, el contenido de proteína fue estadísticamente mayor en el PSP (24.36 g/ 100g) comparado con el PCP (23.07 g/ 100 g). Se ha reportado que el contenido de proteína en el pistache es de 21 g/100 g (Hernández-Alonso y col., 2016). Los valores de proteína obtenidos en el presente trabajo son ligeramente mayores a lo reportado por los autores, estas diferencias pueden ser debidas a la variedad del pistache. Por lo tanto, el pistache es rico en proteína vegetal, además de que tienen un alto porcentaje de aminoácidos esenciales, como la lisina y L-arginina correspondiente a 9.5 g/100 g (Hernández-Alonso y col., 2016; Terzo y col., 2019).

Otro de los contribuyentes más abundantes del pistache son los carbohidratos. En el presente trabajo se encontró diferencia estadística significativa, siendo el PCP el que contiene más carbohidratos respecto al PSP con un 24.45 g/ 100 g y 18.54 g/ 100 g respectivamente. De acuerdo a lo reportado por Hernández-Alonso y colaboradores (2016) se pueden tener valores de hasta 29 g/ 100 g en el pistache.

El contenido de carbohidratos presentes en el pistache reportado por Terzo y colaboradores (2019), corresponden al 2.17 g en azúcares, 0.47 g de almidón y 2.9 g de fibra. No obstante, aunque la cantidad de carbohidratos es mayor comparado con otras nueces, datos de varios estudios epidemiológicos y ensayos clínicos

sugieren que su consumo no está relacionado con el mal funcionamiento del metabolismo de la glucosa y su consumo está inversamente relacionado con un mayor riesgo de enfermar por diabetes mellitus tipo 2. Esto se puede deber a que el pistache es rico en fibra, grasas saludables y antioxidantes. Además, presenta un índice glucémico bajo, que contribuye a mantener la saciedad por más tiempo (Hernández-Alonso y col., 2016).

En cuanto al contenido de fibra total se encontró significativamente mayor en el PCP en comparación con el PSP (13.03 g/100 g y 9.50 g/100 g, respectivamente). El porcentaje de fibra total del pistache fue ligeramente menor a lo reportado por Ros (2015), el cual fue de 9.0 g/100 g.

El contenido de fibra soluble para el PCP fue de 12.43 g/100 g, mientras que para el PSP fue de 9.17 g/100 g; el contenido de fibra soluble para el PCP fue de 0.60 g/100 g y para el PSP de 0.33 g/100 g. Por lo que se puede decir que el contenido de fibra insoluble corresponde al 95.40 % de la fibra total y el 4.60 % a fibra soluble en el caso del PSP, mientras que para el PCP la fibra insoluble corresponde al 96.53 % y para fibra soluble el 3.47 %. Los valores de fibra insoluble y soluble se muestran diferentes a lo previamente reportado por Dreher (2012), los cuales corresponden a un 80% y 20 % de fibra insoluble y soluble.

En estudios prospectivos se establece que existe una relación inversa entre la fibra soluble e insoluble y el riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV). Esto se puede deber al mecanismo de reducción de lípidos en sangre atribuido a la fibra para aumentar el volumen de las heces y disminuir el tiempo de tránsito en el intestino, interfiriendo así la absorción de colesterol (Dreher, 2012).

El contenido de cenizas del pistache se observó en mayor porcentaje en el PCP (4.22 g/100 g) en comparación con el PSP (3.19 g/100 g). Cabe mencionar que, el contenido de cenizas se refiere al residuo inorgánico que queda después de la ignición o la oxidación completa de la materia orgánica en una muestra de alimento. Consiste principalmente de los minerales presentes en el alimento, los cuales se

consideran micronutrientes esenciales para la salud humana debido a que participan en procesos biológicos del cuerpo humano (Ismail, 2017).

Los principales minerales presentes en el pistache corresponden a potasio (59 %), fósforo (28%), magnesio (6 %), calcio (6 %) y otros (1 %) como cobre, hierro, selenio, sodio y zinc (Hernández-Alonso y col 2016). El pistache es una de las nueces que tiene mayor cantidad de potasio, el cual es necesario para el funcionamiento celular normal y tono vascular. Además de que contienen zinc y selenio, ambos minerales relacionados con la prevención de enfermedades cardiovasculares (ECV) y algunos tipos de cáncer (Terzo y col., 2019).

Debido a que el pistache (*Pistacia vera* L.) es una buena fuente de lípidos y proteínas, fuente moderada de fibra dietaria total y de micronutrientes puede inducir la saciedad y por lo tanto reducir la ingesta frecuente de alimentos reduciendo la obesidad y ECV. Además de que su consumo está inversamente relacionado con un mayor riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (Jun-Yang y col., 2009; Terzo y col., 2019), y con una alta actividad como agente contra el cáncer y patógenos (Mandalari y col., 2013).

Los pistaches también son fuente de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos y flavonoides. En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales del PCP y PSP.

El mayor contenido de fenoles totales se presentó en el PCP comparado con el PSP (3.34 mg ER/g y 2.43 mg EAG/g, respectivamente). Esta tendencia se repitió en el contenido de flavonoides totales (1.71 mg ER/g en PCP y 1.08 mg ER/g en PSP). El PCP contiene más fenoles y más flavonoides que el PSP; esto se puede deber a que la piel del pistache es una fuente de polifenoles, como antocianinas, flavonoides, estilbenos, cianidin-3-galactósido, catequina, quercetina, luteína y miricetina (Liu y col., 2014; Terzo y col., 2019). Teniendo así mayor cantidad de fenoles totales y flavonoides en PCP. Debido a que dichos compuestos antioxidantes se encuentran presentes en la cáscara blanda, estos compuestos se pueden perder fácilmente cuando el pistache se pela o se tuesta (Ros, 2015).

Debido a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que aportan los compuestos fenólicos, el pistache se considera como un alimento que puede tener un efecto protector contra enfermedades relacionadas con la sobreproducción de radicales, como enfermedades cardiovasculares y cáncer. Ayudando a mejorar la función endotelial y disminuir las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Dreher, 2012; Terzo y col., 2019).

## 5.2 Bioaccesibilidad *in vitro* de fenoles y flavonoides

En el Cuadro 4 y la Figura 4 se muestra la bioaccesibilidad de los fenoles y flavonoides totales durante la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* del PCP y PSP.

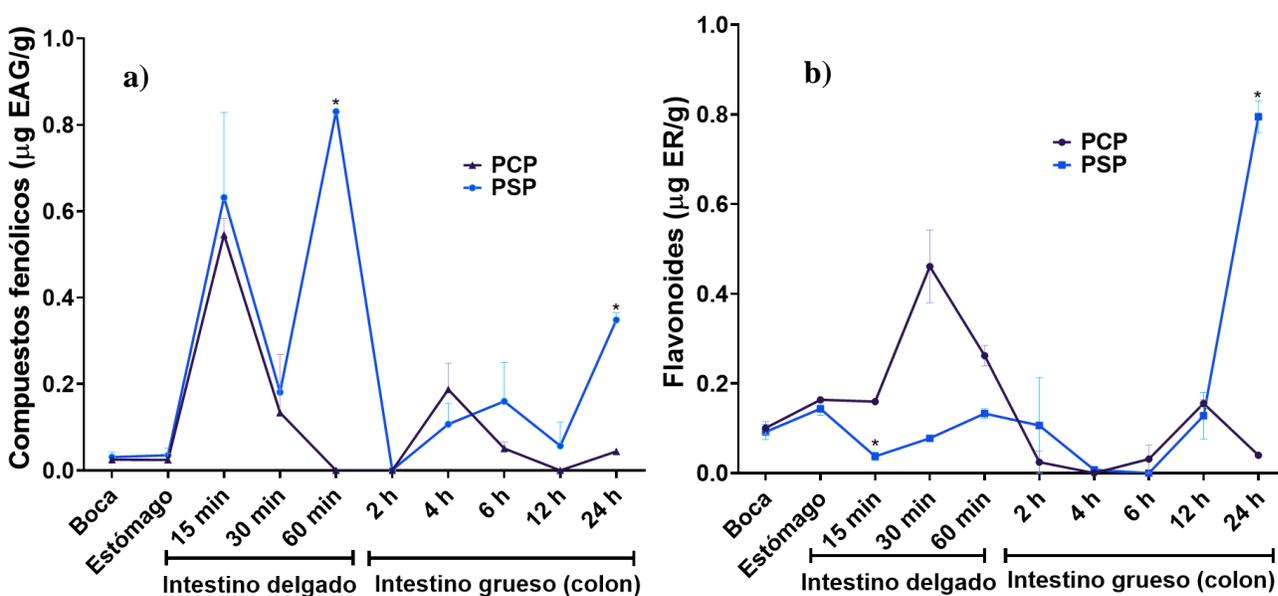


Figura 4. Bioaccesibilidad de a) fenoles totales ( $\mu\text{g}$  EAG) y b) flavonoides totales ( $\mu\text{g}$  ER) del pistache con piel (PCP) y sin piel (PSP) durante la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar. Diferencia estadística (prueba t de Student para datos no pareados,  $p < 0.05$ ) entre muestras (\*) y misma etapa de digestión. Equivalentes de ácido gálico (EAG); equivalentes de rutina (ER).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración de fenoles totales (Cuadro 4 y Figura 4a) tanto en el PCP como en el PSP no presentó diferencia estadística significativa en las etapas de boca y estómago. En la etapa oral, se obtuvieron valores de 0.025 y 0.031  $\mu\text{g EAG/g}$ , respectivamente. Dichos valores representan una baja bioaccesibilidad en ambas muestras (PCP y PSP) teniendo un porcentaje de bioaccesibilidad de 0.73 % para PCP y 1.26 % para el PSP (Cuadro 5).

En el caso del estómago la concentración fue similar que la etapa de la boca, teniendo valores de 0.024 y 0.035  $\mu\text{g EAG/g}$ , respectivamente. Correspondiente al 0.65 % (PCP) y 1.45 % (PSP) de porcentaje de bioaccesibilidad. Esta baja bioaccesibilidad de fenoles totales en dichas etapas durante la digestión gastrointestinal se puede deber a que durante la masticación se determina la bioaccesibilidad de lípidos, rompiendo algunas paredes y exponiendo su contenido a las enzimas digestivas (McArthur y Mattes, 2019). Esto provoca la interacción de los compuestos fenólicos con la grasa presente en las muestras, teniendo como resultado una baja bioaccesibilidad debido al aumento de micelización, el cual ejerce un efecto protector sobre los compuestos fenólicos (Domínguez-Avila y col., 2017).

Por otra parte, la bioaccesibilidad de los fenoles totales se vieron favorecida en la etapa del intestino delgado en ambas muestras (PCP y PSP) a los 15 min alcanzaron valores de 0.546 y 0.632  $\mu\text{g EAG/g}$ , respectivamente. Equivalente al 15.27 % (PCP) y 26.00 % (PSP) de porcentaje de bioaccesibilidad, comparado con las otras etapas de la digestión. Como se observa en la Figura 4a, después de la etapa del estómago, es decir, posterior a la adición de pepsina, la cantidad de compuestos fenólicos totales incrementa para ambas muestras. Lo cual concuerda con lo reportado por García-Gutiérrez y colaboradores (2015). Dicho aumento se puede deber a las condiciones de pH, temperatura y reacciones enzimáticas que hacen más bioaccesibles los metabolitos. Por lo tanto, se puede observar que los fenoles totales de ambas muestras se liberan y se absorben en el intestino delgado, con la posibilidad de alcanzar el sistema circulatorio. De acuerdo con Shahidi y Peng (2018) los compuestos fenólicos del pistache son absorbidos en el intestino delgado solo

parcialmente, porque podrían estar unidos a macromoléculas insolubles (fibra y proteínas) por lo tanto, podrían llegar al colon para convertirse en sustratos fermentables por la microbiota colónica. Además, cabe mencionar que la bioaccesibilidad se puede ver afectada por la fibra dietaria (Parada y Aguilera, 2007; Saura-Calixto y col., 2010). Sin embargo, diferentes estudios *in vitro* han demostrado que los compuestos fenólicos se asocian a la fibra y no son bioaccesibles en el intestino delgado, por ende, no llegan a la circulación y al estar unidos a la fibra dietaria esta los transporta hasta el intestino grueso como metabolitos de fermentación colónica y como polifenoles libres no fermentables. Lo cual, tiene un efecto positivo en la salud intestinal derivado del metabolismo bacteriano en el colon, teniendo características prebióticas al promover el crecimiento de bacterias benéficas e inhibir las bacterias patógenas (Saura-Calixto, 2011; Domínguez-Avila y col., 2017).

Debido a que el contenido inicial de compuestos fenólicos en el extracto corresponde a 3.34 mg EAG/g (PCP) y 2.34 (PSP) (Cuadro 3), se esperaba que el PCP presentara una mayor bioaccesibilidad durante el tracto gastrointestinal. Sin embargo, esto no ocurrió, por lo que se sugiere que se puede deber a que los compuestos fenólicos se encuentren principalmente unidos a fibra. El contenido de fibra total en el PCP es de 13.03 g/ 100 g de muestra, mientras que el PSP tiene solo 9.50 g de muestra (Cuadro 3). Tomaino y colaboradores (2010), encontraron que los grupos fenólicos que se encuentran en el pistache están presentes en mayor cantidad en las pieles que en la semilla, lo cual concuerda con los resultados de este estudio.

Mientras que, los estudios realizados por Garavand y colaboradores (2015) mostraron que el contenido total de fenoles en los extractos de la cáscara de pistache varió de 179 a 76 mg EAG/g muestra seca, por lo tanto, en el presente estudio se tiene un menor contenido de fenoles totales a lo reportado por estos autores, esta diferencia se puede deber a los disolventes empleados para la extracción de fenoles, por su alta polaridad y buena solubilidad en agua de tales fitoquímicos presentes en la cáscara verde del pistache. La cantidad de los compuestos fenólicos depende de

muchos factores, tales como la matriz del alimento, pH, temperatura, presencia de inhibidores o potenciadores de la absorción, presencia de enzimas, huésped, y otros factores relacionados (Tagliazucchi y col., 2010; Aguilón-Osma y col., 2019). La mayoría de los compuestos polifenólicos presentes en los alimentos se encuentran como ésteres, glucósidos o polímeros que no pueden ser absorbidos en su forma nativa teniendo que ser hidrolizados ya sea por las enzimas intestinales como la  $\beta$ -glucosidasa y la lactasa-pirozil-hidrozilasa o por la microbiota colónica (D'Árchivio y col., 2007).

El contenido de fenoles totales durante la digestión en el intestino delgado disminuye dependiendo del tiempo de incubación de un 45 a 34 % (García-Gutiérrez y col., 2015); se ha reportado que sólo de 5 al 10 % de la ingesta total de compuestos fenólicos se absorbe en el intestino delgado; los compuestos fenólicos restantes pueden acumularse en el intestino luminal, donde pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal. La microbiota colónica es responsable del metabolismo de las estructuras fenólicas originadas para formar una serie de metabolitos fenólicos de bajo peso molecular que, una vez absorbidos, podrían ser responsables de los efectos sobre la salud intestinal (estado antioxidante, modulación de la microbiota) derivada del consumo de alimentos ricos en fenoles (D'Árchivio y col., 2007; Jacobs y col., 2009; Manach y col., 2004; Pérez-Jiménez y col., 2009; Saura-Calixto 2011).

En la etapa del colon, la mayor concentración obtenida en el PCP se dio a las 4 h con un valor de 0.188 y para el PSP las 24 h con 0.349  $\mu\text{g}$  EAG/g, lo cual corresponde al 2.82 % y 14.19 % de porcentaje de bioaccesibilidad, respectivamente. Por lo tanto, los compuestos fenólicos unidos a fibra y proteína pueden llegar al colon, para ser sometidos a fermentación colónica y ser liberados después de las 4 h de incubación para ambas muestras, por lo tanto, otorgar beneficios a la salud al disminuir el pH y prevenir el crecimiento microbiano patógeno en el colon (Shahidi y Yeo, 2016).

Cuadro 4. Bioaccesibilidad de fenoles y flavonoides totales del pistache con piel (PCP) y sin piel (PSP) durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

	<b>Etapa</b>	<b>PCP</b>	<b>PSP</b>
<b>Fenoles</b> ( $\mu\text{g}$ EAG/g muestra)	<b>Boca</b>	0.025 $\pm$ 0.00	0.031 $\pm$ 0.01
	<b>Estómago</b>	0.024 $\pm$ 0.01	0.035 $\pm$ 0.01
	<b>Intestino delgado FND</b>		
	15 min	0.546 $\pm$ 0.04	0.632 $\pm$ 0.09
	30 min	0.134 $\pm$ 0.08	0.181 $\pm$ 0.02
	60 min	0.000 $\pm$ 0.00	0.831 $\pm$ 0.01*
	<b>Intestino delgado FD</b>		
	15 min	0.511 $\pm$ 0.08	0.000 $\pm$ 0.00
	30 min	0.120 $\pm$ 0.02	0.044 $\pm$ 0.01
	60 min	0.181 $\pm$ 0.02*	0.347 $\pm$ 0.01
	<b>Colon</b>		
	2 h	0.000 $\pm$ 0.00	0.001 $\pm$ 0.00
	4 h	0.188 $\pm$ 0.06	0.107 $\pm$ 0.05
	6 h	0.051 $\pm$ 0.02	0.160 $\pm$ 0.90
	12 h	0.000 $\pm$ 0.00	0.057 $\pm$ 0.02
24 h	0.044 $\pm$ 0.00	0.349 $\pm$ 0.02*	
<b>Flavonoides</b> ( $\mu\text{g}$ ER/ g muestra)	<b>Boca</b>	0.101 $\pm$ 0.01	0.092 $\pm$ 0.01
	<b>Estómago</b>	0.164 $\pm$ 0.01	0.144 $\pm$ 0.01
	<b>Intestino delgado FND</b>		
	15 min	0.160 $\pm$ 0.01*	0.038 $\pm$ 0.00
	30 min	0.461 $\pm$ 0.08*	0.078 $\pm$ 0.00
	60 min	0.262 $\pm$ 0.02*	0.133 $\pm$ 0.01
	<b>Intestino delgado FD</b>		
	15 min	0.042 $\pm$ 0.01	0.068 $\pm$ 0.02
	30 min	0.026 $\pm$ 0.00	0.027 $\pm$ 0.00
	60 min	0.110 $\pm$ 0.04	0.088 $\pm$ 0.01
	<b>Colon</b>		
	2 h	0.025 $\pm$ 0.01	0.107 $\pm$ 0.04
	4 h	0.000 $\pm$ 0.00	0.008 $\pm$ 0.00
	6 h	0.032 $\pm$ 0.00	0.000 $\pm$ 0.00
	12 h	0.156 $\pm$ 0.01	0.128 $\pm$ 0.05
24 h	0.040 $\pm$ 0.00	0.795 $\pm$ 0.02*	

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar. Diferencias estadísticas significativa (prueba t de Student para datos no pareados,  $p < 0.05$ ) entre muestras (\*) y misma etapa de digestión. EAG, equivalentes de ácido gálico; ER, equivalentes de rutina, fracción no digerible (FND), fracción digerible (FD).

La concentración de flavonoides (Cuadro 4, Figura 4b) tanto en PCP y PSP no presentó diferencia estadística significativa en la etapa oral y gástrica. En la etapa oral se obtuvieron valores de 0.101 y 0.092  $\mu\text{g ER/g}$ , respectivamente. Teniendo un porcentaje de bioaccesibilidad de 0.73 % para PCP y 1.26 % para PSP (Cuadro 5).

Ambos valores representan una baja bioaccesibilidad, incluso menor comparada con los compuestos fenólicos totales. En la etapa del estómago se observó un incremento en la bioaccesibilidad con 0.16 y 1.44  $\mu\text{g ER/g}$ , respectivamente. Correspondiente al 9.57 % (PCP) y 1.44 % (PSP) de porcentaje de bioaccesibilidad. Este aumento de bioaccesibilidad se puede deber a que los flavonoides son susceptibles a la hidrólisis ácida, por lo tanto, se pueden liberar monómeros derivados de flavonoides por las condiciones de pH bajo; sin embargo, su contenido disminuye en los pasos posteriores como consecuencia del ambiente alcalino (García-Gutiérrez y col., 2015; Domínguez-Ávila y col., 2017; Agudelo y col., 2018). La bioaccesibilidad de flavonoides en PCP fue mayor que PSP a nivel oral, gástrica e intestinal. Mientras que en la etapa colónica se vio reducida.

El PCP alcanzó la mayor bioaccesibilidad en la etapa del intestino delgado a los 30 min de incubación teniendo valores de 0.46  $\mu\text{g RE/g}$  con un porcentaje de bioaccesibilidad de 26.96 %. Mientras que, el PSP presentó el mayor valor a las 24 h de fermentación colónica (0.795  $\mu\text{g RE/g}$ ), correspondiente a un 75.38 % de porcentaje de bioaccesibilidad. Esto se puede deber al alto contenido de flavonoides en la cascara del pistache. Como se observa en el Cuadro 3, el contenido de flavonoides totales en el extracto es de 1.71  $\mu\text{g RE/g}$  en el PCP y 1.08  $\mu\text{g RE/g}$  en el PSP, lo obtenido concuerda con lo reportado por Tomaino y colaboradores (2010).

Como se observó en los resultados, la bioaccesibilidad de los flavonoides fue más baja comparada con los fenoles totales, esto se puede deber a que además de las interacciones que pueden tener los flavonoides con la fibra y proteínas ocurren interacciones con otros compuestos de la matriz alimentaria, como los azúcares y ácidos grasos a través de enlaces covalentes, produciendo reacciones de epimerización disminuyendo así su bioaccesibilidad.

Cuadro 5. Porcentaje de bioaccesibilidad de fenoles en las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*.

<b>Fenoles totales</b>	<b>Boca</b>	0.73 ± 0.03	1.26 ± 0.50
	<b>Estómago</b>	0.65 ± 0.51	1.45 ± 0.67
	<b>Intestino delgado FND</b>		
	15 min	15.27 ± 0.46	26.00 ± 8.10
	30 min	3.90 ± 3.90	7.44 ± 0.80
	60 min	0.00 ± 0.00	33.65 ± 0.81*
	<b>Colon</b>		
	2 h	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.03
	4 h	2.82 ± 0.89	4.40 ± 1.99
	6 h	1.48 ± 0.45	6.58 ± 3.69
	12 h	0.00 ± 0.00	2.34 ± 2.28
	24 h	0.00 ± 0.00	14.19 ± 0.54*
<b>Flavonoides</b>	<b>Boca</b>	0.73 ± 0.03	1.26 ± 0.49
	<b>Estómago</b>	9.58 ± 0.41	13.3 ± 1.33
	<b>Intestino delgado FND</b>		
	15 min	9.32 ± 0.39	3.48 ± 0.91
	30 min	26.96 ± 4.73	7.22 ± 0.38
	60 min	13.36 ± 0.62	10.94 ± 0.35
	<b>Colon</b>		
	2 h	1.43 ± 1.43	9.88 ± 9.88
	4 h	0.00 ± 0.00	0.69 ± 0.69
	6 h	1.85 ± 1.85	0.00 ± 0.00
	12 h	7.58 ± 1.00	11.85 ± 4.84
	24 h	2.47 ± 0.06	75.38 ± 1.54*

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de dos muestras independientes por triplicado. Pistache con piel (PCP); pistache sin piel (PSP). Se realizó la prueba estadística de t Student para datos no pareados ( $p < 0.05$ ), \* representa diferencia estadística significativa. Tomando como 100 % el contenido de compuestos bioactivos del extracto inicial.

De acuerdo con Mandalari y colaboradores (2013) quienes reportaron que la absorción de la catequina podría ser afectada por dicha reacción. Liberando

alrededor del 90 % de los flavonoides en el compartimiento gástrico, con poco o sin aumento en la fase duodenal.

Sin embargo, esto difiere de los resultados obtenidos, donde se observó una liberación de flavonoides durante toda la digestión intestinal y colónica. Durante la digestión gastrointestinal superior pueden ser liberación por las interacciones con enzimas digestivas, mientras que, los flavonoides que no se absorben en el intestino delgado y se encuentran unidos a la fibra dietaria pueden llegar al colon para ser fermentado por la microbiota colónica (Parada y Aguilera, 2007; Saura-Calixto y col., 2010; Gonzales y col., 2015).

La liberación parcial durante el paso por la digestión se debe a que existen diferentes interacciones de los flavonoides con los componentes de la matriz alimentaria formando enlaces no covalentes (fibra dietaria), hidrófobos (proteínas) y covalentes (ácidos grasos). Por lo tanto, estas se ven debilitadas parcialmente por la acción mecánica y química, liberando así los compuestos fenólicos. Cabe mencionar que, en el colon se libera una cantidad adicional de los flavonoides por acción enzimática de la microbiota, las condiciones de pH, temperatura y reacciones enzimáticas, lograron liberar los compuestos que en un principio se encontraban unidos a fibra y/o proteína (García-Gutiérrez y col., 2015)

La rápida bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos presentes en el estómago maximiza el potencial de absorción en el duodeno y contribuye a la relación benéfica entre el consumo del pistache y sus benéficos a la salud. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que los fenoles y flavonoides del pistache son bioaccesibles durante la digestión gastrointestinal simulada, por lo tanto, son capaces de absorberse en el tracto gastrointestinal superior. Por ejemplo, ha sido reportado que los ácidos fenólicos como ácido gálico y clorogénico se absorben en la parte superior del tracto gastrointestinal dentro de 1 a 2 h después de la ingesta (Mandalari y col., 2013).

5.3. Coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) ex vivo de fenoles y flavonoides del pistache.

El coeficiente de permeabilidad aparente de apical a basolateral ( $P_{app AP \rightarrow BL}$ ) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$P_{app AP \rightarrow BL} = \frac{V}{A * t(min)} * \frac{C_{f1}}{C_0 * 60}$$

Donde V es el volumen del contenido 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), t es el tiempo de incubación (en min),  $C_0$  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 a los 60 min de incubación) y  $C_{f1}$  es la concentración de la fracción digerible a un tiempo determinado (en minutos).

Mientras que, la permeabilidad aparente de basolateral a apical ( $P_{app BL \rightarrow AP}$ ) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$P_{app BL \rightarrow AP} = \frac{V}{A * t(min)} * \frac{C_{f2}}{C_0 * 60}$$

Donde  $C_{f2}$  es la concentración de la fracción no digerible luego de un tiempo determinado (en minutos), los otros parámetros son los mismos que se emplearon para la determinación de la  $P_{app AP \rightarrow BL}$ .

La relación de flujo de salida (ER) se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$ER = \frac{P_{app BL \rightarrow AP}}{P_{app AP \rightarrow BL}}$$

En el Cuadro 6 se muestran los coeficientes de permeabilidad aparente ex vivo (siguiendo la técnica del saco intestinal invertido) del PCP y PSP de los fenoles totales y flavonoides. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que existe una diferencia estadística significativa entre el coeficiente de permeabilidad aparente

de los fenoles totales del PCP y PSP para el transporte apical (AP, lado correspondiente al lumen) a basolateral (BL, lado al flujo sanguíneo) (Ito y col., 2005) y el radio de eflujo (ER) a los 15 min de incubación, teniendo los valores más altos de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) para el PCP  $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$  de  $67.62 \times 10^{-3}$  cm/s, al igual que la  $P_{app\ BL\rightarrow\ AP}$  se obtuvo a los 15 min ( $72.21 \times 10^{-3}$  cm/s), mientras que el ER se dio a los 30 min ( $2.4 \times 10^{-3}$  cm/s). En el caso del PSP, la mayor  $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$  se obtuvo a los 60 min de incubación con  $10.9 \times 10^{-3}$  cm/s, la  $P_{app\ BL\rightarrow\ AP}$  fue a los 15 min de incubación con valor de  $79.6 \times 10^{-3}$  cm/s y el RE fue a los 30 min ( $4.4 \times 10^{-3}$  cm/s) al igual que el PCP. De acuerdo con Ma y colaboradores (2014) establecen que valores de permeabilidad aparente igual o mayor a  $14 \times 10^{-6}$  cm/s se considera altamente permeable. Mientras que valores inferiores a  $5 \times 10^{-6}$  cm/s se consideran de baja permeabilidad. En este estudio, los valores de  $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$  oscilaron entre  $2.76\text{--}67.62 \times 10^{-3}$  cm/s y los valores de  $P_{app\ BL\rightarrow\ AP}$  entre  $11.4\text{--}79.6 \times 10^{-3}$  cm/s para fenoles. Mientras que los valores de los flavonoides (Cuadro 6) de  $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$  fluctúan entre  $0.35\text{--}2.09 \times 10^{-3}$  cm/s y los valores de  $P_{app\ BL\rightarrow\ AP}$  entre  $1.03\text{--}6.25 \times 10^{-3}$  cm/s, para ambas muestras. Por lo tanto, los resultados describen que tanto el PCP como el PSP comprenden una alta permeabilidad en ambos sentidos tanto de AP→BL como de BL→AP.

Mientras que, en el caso de los flavonoides presentaron valores más bajos respecto a los fenoles totales, esta tendencia también se observa en la bioaccesibilidad de los mismos compuestos. Esto se puede deber a que el coeficiente de permeabilidad aparente a nivel intestinal se relaciona con la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de algunos compuestos. Por lo tanto, reflejan de forma directa su absorción, en mayor o menor medida (Ma y col., 2014). Para el PCP  $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$  a los 60 min fue de  $1.49 \times 10^{-3}$  cm/s, la  $P_{app\ BL\rightarrow\ AP}$  a los 30 min fue de  $6.25 \times 10^{-3}$  cm/s y la ER a los 30 min de  $25.2 \times 10^{-3}$  cm/s. Mientras que, la mayor  $P_{app\ AP\rightarrow\ BL}$  del PSP se obtuvo a los 60 min ( $1.36 \times 10^{-3}$  cm/s), la  $P_{app\ BL\rightarrow\ AP}$  a los 60 min ( $2.06 \times 10^{-3}$  cm/s) y de ER a los 30 min ( $14.2 \times 10^{-3}$  cm/s). Por lo tanto, se sugiere que al igual que los compuestos fenólicos los flavonoides también presentan una alta permeabilidad.

Cuadro 6. Coeficientes de permeabilidad aparente *ex vivo* ( $P_{app}$ ) de compuestos bioactivos de pistache.

Compuesto	Tiempo (min)	PCP			PSP		
		AP→BL	BL→AP	ER	AP→BL	BL→AP	ER
Fenoles totales	15	67.62 <sup>ab*</sup>	72.21 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a*</sup>	--	79.6 <sup>x</sup>	--
	30	7.91 <sup>b*</sup>	18.4 <sup>a*</sup>	2.4 <sup>a</sup>	2.76 <sup>x</sup>	11.4 <sup>xy</sup>	4.4 <sup>x*</sup>
	60	6.00 <sup>a</sup>	--	--	10.9 <sup>x*</sup>	26.2 <sup>y*</sup>	2.4 <sup>x*</sup>
Flavonoides	15	1.12	4.33 <sup>a*</sup>	3.9 <sup>*</sup>	2.09	1.62 <sup>x</sup>	0.8
	30	0.35	6.25 <sup>ab*</sup>	25.2	0.42	1.21 <sup>x</sup>	14.2
	60	0.74	1.78 <sup>b*</sup>	3.9	0.68	1.03 <sup>x</sup>	5.0

$P_{app}$  se expresa como la media ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1} \times 10^{-3}$ )  $\pm$  desviación estándar ( $n \geq 2$ ). Transporte de apical (AP) a basolateral (BL) (AP→BL) y hacia el lado contrario (BL→AP), Radio de eflujo [ER= (BL→AP). (AP→BL)<sup>-1</sup>]; Debajo del límite de detección (--). \* Diferencias estadísticas (*t* de Student para muestras no pareadas,  $p < 0.05$ ) entre muestras (PCP vs. PSP) y entre tiempos de incubación (letras superíndices) para el mismo componente y muestra.

En consecuencia, pueden ser absorbidos y llegar al torrente sanguíneo debido a que existe una alta semejanza con el modelo *in vivo*, así como incrementos (PCP) o disminución (PSP) de absorción intestinal conforme aumenta el tiempo de incubación durante la digestión. Se sugiere que esto se relaciona con el contenido de compuestos presentes en la cáscara del pistache, por lo tanto, presentan una mayor permeabilidad de los compuestos por su alto contenido de flavonoides en el PCP.

El Cuadro 7 muestra el porcentaje de permeabilidad de los compuestos fenólicos. Los fenoles totales del PCP fueron rápidamente absorbidos en el intestino delgado, alcanzando valores del 100 % de permeabilidad a los 15 min, mientras que la absorción de estos compuestos a partir del PSP alcanzó los máximos valores a los 60 min con 41 %, presentando diferencia estadísticamente significativa entre ambas muestras durante todos los tiempos de incubación. Por otra parte, los flavonoides tuvieron un mayor porcentaje de permeabilidad en el PSP a los 60 min (74 %), al igual que el PCP (46 %). Sin embargo, en ambas muestras en algunos tiempos de incubación no fue posible detectar el porcentaje de permeabilidad tanto en fenoles como en flavonoides. Como se puede observar en algunos tiempos de incubación no

se presentó permeabilidad. Esto se puede deber a que dependiendo del tamaño y grado de conjugación sólo una parte de los compuestos fenólicos son capaces de atravesar la pared intestinal y llegar al torrente sanguíneo (Mnach y col., 2005; Pérez-Jiménez y col., 2009).

Cuadro 7. Porcentaje de permeabilidad *in vitro* de fenoles y flavonoides del pistache (*Pistacia vera* L.)

Compuesto fenólico	Tiempo (min)	Porcentaje de permeabilidad (%)	
		PCP	PSP
<b>Fenoles totales</b>	15	100.00 ± 19.7*	ND
	30	96.69 ± 2.3*	24.26 ± 6.9
	60	ND	41.49 ± 18.12*
<b>Flavonoides totales</b>	15	ND	29.44 ± 3.4*
	30	5.70 ± 0.2*	34.93 ± 0.4
	60	45.85 ± 18.9	74.35 ± 15.9

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar. Diferencias estadísticas significativa (prueba Tukey,  $\alpha < 0.05$ ) entre muestras (\*). Pistache con piel (PCP); pistache sin piel (PSP); no detectable (ND). Tomando como 100% el contenido de compuesto bioactivo del extracto inicial.

#### 5.4. Capacidad antioxidante

En el Cuadro 8 se muestra la capacidad antioxidante del PCP y PSP de los radicales DPPH y ABTS durante la digestión gastrointestinal *in vitro* (boca-colon). Las muestras de PCP exhibieron una capacidad antioxidante más alta en ambos radicales en comparación con el PSP. Por lo que se observa que la cáscara del pistache aumenta la capacidad antioxidante alrededor de un 5 % más que el pistache sin cáscara. La capacidad antioxidante se vio favorecida en la etapa del colon en ambas muestras en un tiempo de incubación de 4 h para el radical DPPH (7058 y 7452 mM TE/g muestra, respectivamente) comparadas con las otras etapas de la digestión. En la etapa del estómago se observó la menor capacidad antioxidante (906 y 823 mM TE/g muestra, respectivamente), mientras que en la etapa con mayor capacidad antioxidante para el PCP fue en la etapa del intestino delgado correspon-

Cuadro 8. Capacidad antioxidante del pistache con piel (PCP) y sin piel (PSP) durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

	<b>Etapa</b>	<b>PCP</b>	<b>PSP</b>
<b>DPPH (mM TE/g muestra)</b>	<b>Boca</b>	906.78 ± 102.2	844.88 ± 80.5
	<b>Estómago</b>	905.87 ± 160.0	822.75 ± 45.3
	<b>Intestino delgado FND</b>		
	15 min	5892.18 ± 1263.2	5586.54 ± 55.6
	30 min	5717.00 ± 864.0	5697.68 ± 41.2
	60 min	5772.57 ± 122.2	5393.40 ± 185.9
	<b>Intestino delgado FD</b>		
	15 min	5958.61 ± 71.5	5260.94 ± 32.3
	30 min	5933.69 ± 497.7	5764.81 ± 181.6
	60 min	5581.05 ± 164.4	5473.08 ± 99.8
	<b>Colon</b>		
	2 h	6335.34 ± 411.4	6622.88 ± 585.5
	4 h	7058.14 ± 171.7	7452.09 ± 41.9
	6 h	7030.60 ± 679.3	6949.64 ± 718.2
12 h	6861.58 ± 273.4	6272.33 ± 668.1	
24 h	6709.68 ± 583.6*	6662.10 ± 89.3	
<b>ABTS (mM TE/g muestra)</b>	<b>Boca</b>	2.22 ± 0.1	2.35 ± 0.1*
	<b>Estómago</b>	2.14 ± 0.2	1.19 ± 0.2
	<b>Intestino delgado FND</b>		
	15 min	11.93 ± 0.3	11.06 ± 1.7
	30 min	9.56 ± 0.2*	8.66 ± 0.0
	60 min	10.03 ± 0.1	9.70 ± 0.3
	<b>Intestino delgado FD</b>		
	15 min	8.88 ± 0.5	5.22 ± 0.5
	30 min	11.33 ± 0.4	10.57 ± 1.0
	60 min	10.37 ± 0.0	9.86 ± 0.6
	<b>Colon</b>		
	2 h	10.72 ± 0.1	10.67 ± 0.1
	4 h	10.06 ± 0.1	9.50 ± 1.6
	6 h	10.51 ± 0.9	13.55 ± 1.3
12 h	10.75 ± 0.5	10.15 ± 0.7	
24 h	11.47 ± 0.4	10.31 ± 0.8	

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n=4; mM TE/ g de muestra (DPPH, ABTS). Diferencias estadísticas significativa (prueba t de Student para datos no pareados, p <0.05) entre muestras (\*) y misma etapa de digestión. Equivalentes de trolox (TE), fracción no digerible (FND), fracción digerible (FD).

diente a la fracción no digerible (FND) con un valor de 11.93 mM/g muestra, a diferencia del PSP la etapa más favorecida fue el colon a un tiempo de incubación de 6 h (13.55 mM TE/g muestra).

De acuerdo con estudios previos la capacidad antioxidante está directamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos presentes en la matriz alimentaria.

Se ha encontrado que las principales contribuciones a la inhibición de radicales libres por materiales vegetales es causada por los compuestos fenólicos (Garavand y col., 2015). Lo cual se reafirma con lo mostrado en el Cuadro 3 ya que el PCP tiene mayor contenido de fenoles y flavonoides. Ha sido previamente reportado que el pistache es una fuente rica de antioxidantes naturales como el ácido gálico, la catequina, epicatecina, entre otros. Cabe mencionar que el ácido gálico puede donar un átomo de hidrógeno o bien, actuar como donante de electrones logrando así un mayor efecto antioxidante (Arjen et al., 2020). Por otra parte, se logró observar que a partir de la fase del estómago la capacidad aumento drásticamente, esto se puede deber a que el pH ácido del estómago afectó la racemización de las moléculas, provocando su reactividad biológica, logrando que los compuestos antioxidantes sean más reactivos durante el paso de la digestión gastrointestinal (Chen et al., 2015). La alta capacidad antioxidante en la etapa colónica se debe a que en el intestino delgado solo se absorben parcialmente los compuestos fenólicos. Mientras que otra parte pasan en asociación con fibra dietaria y llegan al colon, donde pueden fermentarse por la acción de enzimas bacterianas. Debido a que solo la microbiota colónica es capaz de romper la matriz de la fibra dietaria y liberar los compuestos antioxidantes asociados en condiciones fisiológicas (pH neutro, 37 °C, ambiente reductor) creando un ambiente antioxidante (Saura-Calixto, 2011).

Por lo tanto, el pistache tiene una alta capacidad antioxidante comparado con otros frutos secos, por lo que se puede suponer su efecto preventivo contra el estrés oxidativo (Stevens-Barrón y col., 2019) durante su paso por el tracto gastrointestinal.

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición capacidad antioxidante del pistache con piel (PCP) y sin piel (PSP) durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

	<b>Etapa</b>	<b>PCP</b>	<b>PSP</b>
<b>DPPH</b>	<b>Boca</b>	100 ± 26.0	95 ± 20.5
	<b>Estómago</b>	100 ± 39.5	83 ± 11.2
	<b>Intestino delgado FND</b>		
	15 min	100 ± 45.9	100 ± 2.0
	30 min	100 ± 31.4	100 ± 1.5
	60 min	100 ± 4.4	100 ± 6.8
	<b>Intestino delgado FD</b>		
	15 min	100 ± 2.5*	100 ± 1.1
	30 min	100 ± 17.7	100 ± 6.5
	60 min	100 ± 5.9	100 ± 3.6
	<b>Colon</b>		
	2 h	100 ± 12.1	100 ± 17.3
	4 h	100 ± 5.1	100 ± 1.2
	6 h	100 ± 20.1	100 ± 21.2
	12 h	100 ± 4.8	99 ± 19.7
24 h	100 ± 7.5*	100 ± 11.9	
<b>ABTS</b>	<b>Boca</b>	100 ± 6.2	100 ± 5.0*
	<b>Estómago</b>	100 ± 19.6	100 ± 13.0
	<b>Intestino delgado FND</b>		
	15 min	100 ± 4.6	100 ± 24.3
	30 min	100 ± 3.6*	100 ± 0.2
	60 min	100 ± 1.7	100 ± 4.0
	<b>Intestino delgado FD</b>		
	15 min	100 ± 7.2*	48 ± 7.1
	30 min	100 ± 6.2	100 ± 13.7
	60 min	100 ± 0.5	100 ± 9.3
	<b>Colon</b>		
	2 h	100 ± 0.8	100 ± 1.6
	4 h	93 ± 1.0	86 ± 19.0
	6 h	98 ± 11.2	100 ± 15.0
	12 h	100 ± 5.3	94 ± 8.1
24 h	100 ± 2.5*	96 ± 4.1	

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n=4; porcentaje de inhibición (DPPH, ABTS). Diferencias estadística significativa (prueba t de Student para datos no pareados, p <0.05) entre muestras (\*) y misma etapa de digestión, fracción no digerible (FND), fracción digerible (FD). Tomando como 100% la capacidad antioxidante del extracto inicial.

Como se observa en el Cuadro 9 el porcentaje de inhibición de la capacidad antioxidante por DPPH para el PCP fue del 100% de permeabilidad durante todas las etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro*, por lo tanto, se sugiere que debido al contenido de compuestos antioxidantes presentes tanto en la cáscara como en la semilla pueden llegar al torrente sanguíneo.

Mientras que el PSP presentó menor porcentaje de bioaccesibilidad en la etapa de la boca, estómago y colon con 12 h de incubación (95, 83 y 99 %, respectivamente). Sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas muestras.

A diferencia de la técnica por ABTS presento menor porcentaje de permeabilidad para ambas muestras comparada con DPPH. Los valores más bajos de porcentaje de permeabilidad para el PCP se presentaron en el colon a las 4 y 6 horas de fermentación (93 y 98 %, respectivamente). Mientras que, el PSP presentó los valores más bajos en la fracción digerible (FD) en el intestino delgado a los 15 min de incubación (48 %), colon a las 2 h (48 %), 12 h (94 %) y 24 h (96 %). Por lo tanto, se sugiere que ambas técnicas demuestran que el pistache con y sin piel presentan alta capacidad antioxidante.

#### 5.5. Actividad inhibitoria de alfa amilasa pancreática

Se evaluó la actividad inhibitoria de la alfa amilasa, para ello se realizó una curva de calibración de acarbose a diferentes concentraciones (Cuadro 10 y Figura 5). Posteriormente, se calculó la actividad inhibitoria de la enzima alfa amilasa pancreática y el porcentaje de actividad inhibitoria de la fracción intestinal digerible del pistache con y sin piel.

La actividad inhibitoria de la enzima alfa amilasa pancreática fue mayor en el PSP a los tiempos 15 y 30 min de incubación, alcanzando una actividad inhibitoria del 100 % (Tabla 11), mientras que para para el PCP la mayor actividad inhibitoria fue a los 30 min de incubación con 100 %.

Cuadro 10. Efecto de las concentraciones de acarbosa en la actividad inhibitoria de alfa amilasa (%).

Concentración (µg/ml)	Actividad inhibitoria
50	19.41 ± 4.2
75	24.34 ± 6.1
100	30.98 ± 2.1
150	34.54 ± 3.5
175	41.88 ± 3.2
200	43.59 ± 3.1
250	48.98 ± 1.2

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar.

El PCP fue más activo en la inhibición de la alfa amilasa con valores de IC<sub>50</sub> de 6147 µg/ml a los 30 min en comparación con el PSP que su valor más alto de IC<sub>50</sub> fue de 6001 µg/ml a los 15 min de incubación.

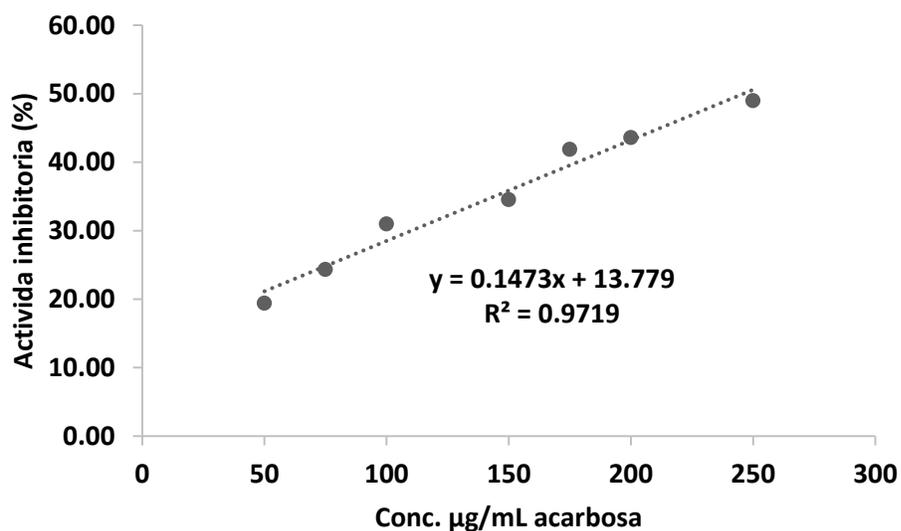


Figura 5. Actividad inhibitoria (%) de acarbosa a diferentes concentraciones, 50, 75, 100, 150, 175, 200 y 250 (µg/ml).

Los resultados del presente estudio mostraron que tanto el PCP y PSP poseen una actividad inhibitoria de la enzima alfa amilasa. Esto sugiere una actividad antidiabética, debido a que la alfa amilasa pancreática promueve el retraso de la

hidrólisis del almidón, reduce la tasa de digestión y absorción de carbohidratos, resultando una disminución de la hiperglucemia postprandial. Dicho efecto benéfico ha sido relacionado con el contenido de flavonoides (Elya et al., 2012). Esto se debe a que los compuestos fenólicos tienen la capacidad de inhibir la formación de micelas de colesterol, ejerciendo un papel importante en la inhibición de la alfa amilasa (Adisakwattana y Chanathong, 2011).

Cuadro 11. Valores de IC<sub>50</sub> y actividad inhibitoria (%) de pistache con y sin piel de la fracción digerible de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Tiempo (min)	IC <sub>50</sub> (µg/ml) y Actividad inhibitoria (%)	
	PCP	PSP
15	5263.12 ± 542.3 (84)	6001.42 ± 184.5 (100)
30	6146.88 ± 152.3 (100)	5761.40 ± 210.8 (100)
60	5270.57 ± 601.9 (84)	5462.51 ± 32.2 (95)

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar. Diferencias estadísticas significativa (prueba t de Student para datos no pareados, p <0.05) entre muestras (\*). La actividad inhibitoria (%) se toma como 100 % del extracto inicial.

## 5.6. Quimioinformática

En la actualidad se emplean diferentes métodos *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo* para evaluar la bioaccesibilidad, absorción y el destino gastrointestinal de los compuestos fitoquímicos con la finalidad de conocer su farmacocinética. Todos los conocimientos aportados han llevado a desarrollar modelos *in silico* como la quimioinformática que ayuda a predecir el destino metabólico de las moléculas, su potencial bioactivo y toxicidad. En este estudio, se evaluaron los principales compuestos fenólicos presentes en el pistache tanto en la cáscara como en la semilla reportados en la literatura. Dichos resultados nos proporcionan información preliminar sobre la capacidad de cada compuesto fitoquímico para ser absorbido a lo largo del tracto gastrointestinal. De acuerdo al Cuadro 11, el ácido gálico (GA) y daidzeina (DAI) son biodisponibles por vía oral, sin embargo, la catequina (CAT), epicatequina (ECAT), eriodictyol-7-O-glucósido (E7G), Cyanidina-3-O-glucósido (Cy3G) y Quercetin-3-O-

rutinosido (Q3R) no son bioaccesibles en dicha etapa. Lo que se puede observar es que los compuestos que son bioaccesibles en la etapa oral se encuentran en su mayoría en la semilla. Por otra parte, el valor de área de superficie polar topológica (TPSA) para la CAT, ECAT, E7G, Cy3G y Q3R es mayor a 100 Å<sup>2</sup>, mientras que solo GA, DAI y genisteina (GEN) su TPSA es menor a dicho valor.

Otro dato importante es que el GA, CAT, ECAT, DAI y GEN presentan una alta absorción en el tracto gastrointestinal, mientras que E7G, Cy3G y Q3R tienen una baja absorción, sin embargo, ninguno presenta permeabilidad a la barrera hematoencefálica (BHE).

Cuadro 12. Quimioinformática molecular y bioactividad potencial de compuestos fenólicos de pistache (*Pistacia vera* L.) en la semilla<sup>a</sup> y piel<sup>b</sup> (Tomaino y col., 2010; Garavand y col., 2015).

Pubchem CID	GA <sup>a,b</sup>	CAT <sup>a,b</sup>	ECAT <sup>b</sup>	E7G <sup>a,b</sup>	Cy3G <sup>b</sup>	Q3R <sup>a,b</sup>
	370	9064	72276	13254473	441667	5280805
<b>Fisicoquímica</b>						
Peso molecular (g/mol)	170.12	290.27	290.27	450.4	449.4	610.5
TPSA (Å <sup>2</sup> )	98	110	110	186	181	266
XLogP3	0.7	0.4	0.4	0.2	--	-1.3
Solubilidad en agua	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
<b>Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción, Toxicidad</b>						
Biodisponibilidad oral	Si	No	No	No	No	No
Absorción GI/BHE	Alta/No	Alta/No	Alta/No	Bajo/No	Bajo/No	Bajo/No
Inhibidor de OATP1,2	Si	Si	No	Si	Si	Si
Inhibidor de CYPs	No	No	No	No	No	No
Inhibidor OCT2	No	No	No	No	No	No
P-gp (Substrato/inhibidor)	No	Si	Si	No	No	Si
Biodisponibilidad (puntaje)	0.56	0.55	0.55	0.17	0.17	0.17
Violaciones LROF	0	0	0	2	2	3
<b>Bioactividad</b>						
PAINS	CTC-A	CTC-A	CTC-A	CTC-A	CTC-A	CTC-A
Comportamiento como droga	CTC	CTC	CTC	CTC	CTC/O <sup>+</sup> /S <sup>+</sup>	CTC
Ligando-GPCR	No	Si	Si	Si	Si	No
Ligando-Receptor nuclear	No	Si	Si	Si	Si	No
Inhibidor proteasas/enzimas	No	Si	Si	Si	Si	No

Continuación Cuadro 12. Quimioinformática molecular y bioactividad potencial de compuestos fenolicos de pistache (*Pistacia vera* L.) en la semilla<sup>a</sup> y piel<sup>b</sup> (Tomaino y col., 2010; Garavand y col., 2015).

Pubchem CID	GEN <sup>a</sup> 5280961	APG <sup>a</sup> 5280443	GEN7G <sup>a</sup> 44257273	DAI <sup>a</sup> 5281708	KF <sup>b</sup> 5280863
<b>Fisicoquímica</b>					
Peso molecular (g/mol)	270.24	270.24	432.4	254.24	286.24
TPSA (Å <sup>2</sup> )	87	87	166	66.8	107
XLogP3	2.7	1.7	0.9	2.5	1.9
Solubilidad en agua	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Alta
<b>Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción, Toxicidad</b>					
Biodisponibilidad oral	No	No	No	Si	No
Absorción GI/BHE	Alto/no	Alto/No	Baja/No	Alto/No	Alta/No
Inhibidor de OATP1,2	Si	Si	Si	Si	Si
Inhibidor de CYPs	Si	Si	No	Si	Si
Inhibidor OCT2	No	No	No	No	No
P-gp (Substrato/inhibidor)	No	No	No	No	No
Biodisponibilidad (puntaje)	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Violaciones LROF	0	0	1	0	0
<b>Bioactividad</b>					
PAINS	0	0	0	0	0
Comportamiento como droga	0	0	0	0	0
Ligando-GPCR	No	No	No	No	No
Ligando-Receptor nuclear	Si	Si	Si	Si	Si
Inhibidor proteasas/enzimas	No/Si	No/Si	No/Si	No/Si	No/Si

Datos calculados con AdmetSAR 2.0 (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2/>), swissADME (<http://www.swissadme.ch/>) y Moliinspiration (<https://www.molinspiration.com/>), usando descriptores canónicos SMILES obtenidos de PubChem CIDs: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Barrera hematoencefálica (BHE), catequina (CAT), catecol (CTC) A (CTC-A), ácido gálico (GA), gastrointestinal (GI), receptor acoplado a proteína-G (GPCR), coeficiente de particion octanol-agua (LogP/XLogP3), regla de cinco de Lipinsky (LROF), polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs; OATP1B1 y/o OATP1B3), compuestos de interferencia de ensayo panorámico (PAINS), Epicatequina (ECAT), Eriodictyol-7-O-glucósido (E7G), Cyanidina-3-O-glucósido (Cy3G), Quercetin-3-O-rutinósido (Q3R), Genisteina (GEN), Apigenina (APG), Genisteina-7-O-glucósido (GEN7G), Daidzeína (DAI), Kaemferol (KF). Dato no disponible (--).

Durante su tránsito, todos los compuestos presentes en el Cuadro 11 a excepción de la ECAT pueden inhibir los transportadores de cationes orgánicos (OATP). Además, CAT, ECAT y Q3R son sustratos para la P-glicoproteína (P-gp). De acuerdo con los datos obtenidos, los compuestos GA, CAT, ECAT, DAI y GEN presentaron cero violaciones a la regla de Lipinski (LROF), mientras que E7G, Cy3G y Q3E presentaron 2, 2 y 3, respectivamente.

En resumen, la regla de Lipinski predice que la mala absorción o permeabilidad del fármaco es más probable cuando hay más de 5 donantes de enlaces hidrogeno, 10 aceptores de enlaces hidrogeno, un peso molecular superior a 500 y un Log P superior a 5 (McKerrow y Lipinski, 2017). De acuerdo con Turner y Agatonovic-Kustrin (2007) si se violan 2 o más reglas existe mayor probabilidad de que los compuestos tengan una mala absorción o permeabilidad. Por ende, si no se tiene ninguna violación a la regla los compuestos tendrán una mayor probabilidad de ser permeables y llegar a torrente sanguíneo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la quimioinformática los compuestos fenólicos evaluados, la mayoría tienen una buena absorción en el tracto gastrointestinal, lo que explica y corrobora los resultados de la bioaccesibilidad *in vitro*. Por otra parte, el valor del área de superficie polar topológica (TPSA) de una molécula se emplea para determinar la capacidad de un fármaco para penetrar en las células. Por lo que los valores mayores a  $140 \text{ \AA}^2$  tienen deficiencias en la penetración de las membranas celulares. También se observó que los compuestos fenólicos evaluados a excepción de la ECAT pueden inhibir los transportadores de cationes (OATPS). Estos OATPS se expresan selectivamente en el hígado y están influenciados por el pH, el potencial de membrana y los sustratos (Nieto-Figueroa et al., 2020). Por último, el GA y DAI presentan buenas propiedades ANDEMT, teniendo así buenas propiedades medicinales.

## 6. CONCLUSIONES

El PCP y PSP son una buena fuente de lípidos y proteínas, así como de fibra. Los compuestos fenólicos y flavonoides presentan una baja bioaccesibilidad sin embargo, tienen una alta capacidad antioxidante, son permeables durante el tracto gastrointestinal y alcanzar el colon, lo que puede estar ligado a sus beneficios a la salud. Su baja bioaccesibilidad en el tracto gastrointestinal superior se puede deber a interacciones con compuestos de la matriz alimentaria principalmente lípidos, proteínas y fibra. Por otra parte, el pistache es un agente antidiabético prometedor al inhibir la alfa amilasa. Por lo que una ingesta diaria del pistache podría ayudar a prevenir enfermedades como DM, obesidad, hiperglucemia, entre otras. El modelo *in silico* sugiere que algunos compuestos fenólicos del pistache como el GA, CAT, ECAT y DAI tienen las bioactividades más relevantes, y también pueden exhibir actividades de ligandos hacia los receptores acoplados de la proteína G (GPCR) y receptores nucleares, así como proteasas, actividad inhibitoria enzimática, lo que sugiere sus beneficios a la salud. En general, los resultados justifican el consumo de pistache para prevenir enfermedades como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, entre otros.

## 7. REFERENCIAS /BIBLIOGRAFÍA

**Adisakwattana S**, Ruengsamran T, Kampa P, Sompong W. *In vitro* inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2012**; 12(110):1-8.

**Agudelo C**, Luzardo-Ocampo I, Campos-Vega R, Loarca-Piña G, Maldonado-Celis M. Bioaccessibility during *in vitro* digestion and antiproliferative effect of bioactive compounds from andean berry (*Vaccinium meridionale Swartz*) Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2018**; 66(28): 7358–7366.

**Arjeh E**, Akhavan H, Barzegar M, Carbonell-Barrachina ÁA. Bioactive compounds and functional properties of pistachio hull: A review. *Trends in Food Science & Technology*, **2020**; 97:55-64.

**Bengtsson G**, Hagen S. Storage and handling of fruit and vegetables for optimum health-related quality. En: *Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products*, Ed. Elsevier Inc, **2008**; 412-430.

**Bes-Rastrollo M**, Sánchez-Tainta A. A small handful of mixed nuts. En: *The prevention of cardiovascular disease through the mediterranean diet*, Ed. Elsevier Inc, **2018**; 89-99.

**Boisen S**, Eggum B. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, **1991**; 4(01):141-162.

**Bonku R**, Yu J. Health aspects of peanuts as an outcome of its chemical composition. *Food Science and Human Wellness*, **2019**; 9(2020): 21-30.

**Campos-Vega R**, Reynoso-Camacho R, Pedraza-Aboytes G, Acosta-Gallegos J, Guzman-Maldonado S, Loarca-Piña y col. Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food science*, **2009**; 74(7):T59-T65.

**Campos-Vega R**, Vázquez-Sánchez K, López-Barrera D, Loarca-Piña G, Mendoza-Díaz S, Oomah B. Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, **2015**; 77:156-161.

**Carvalho E**, Yoshime I, Sattler J, Pavan R, Mancini-filho J. Characterization of constituents, quality and stability of pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.). *Food Science and Technology*, **2016**; 36(1):132-139.

**Castellano G**, González-Santander JL, Lara A, Torrens F. Classification of flavonoid compounds by using entropy of information theory. *Phytochemistry*, **2013**; 93: 182-191.

**Castillo J**, Alcaraz M, Benavente-García O. Antioxidant and radioprotective effects of olive leaf extract. En: *Olives and olive oil in health and disease prevention*, Ed. Elsevier Inc, **2010**; 951-958.

**Chen G**, Chen S, Xie Y, Chen F, Zhao Y, Luo C, Gao Y. Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, **2015**; 17:243-259.

**Cheynier V**. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**; 81(1):223S-229S.

**Cruz-Requena M**, Escobedo-García S, Salas-Tovar J, Mora-Cura Y, Chávez-González M, Castillo-Reyes F, *et al.* Definitions and regulatory perspectives of dietary fibers. En: *Dietary Fiber: Properties, Recovery, and Applications*, Ed. Elsevier Inc, **2019**; 1-25.

**Dai F**, Chau C. Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. *Journal of Food and Drug Analysis*, **2017**; 25(1):37-42.

**D'Archivio** M, Filesi C, Di B, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, **2007**; 43(4): 348-361.

**De la Rosa** L, Moreno-Escamilla J, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E. Phenolic compounds. En: *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Ed. Elsevier Inc, **2019**; 253-271.

**Dhingra** D, Michael M, Rajput H, Patil R. Dietary fiber in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology*, **2011**; 49(3):255-266.

**Domínguez-Avila** J, Wall-Medrano A, Velderrain-Rodríguez G, Chen C, Salazar-López N, Robles-Sánchez M, González-Aguilar G. Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food & Function*, **2017**; 8(1): 15–38.

**Dreher** M. Pistachio nuts: composition and potential health benefits. *Nutrition reviews*, **2012**; 70(4):234-240.

**Elya** B, Basah K, Mun'im A, Yuliasuti W, Bangun A, Septiana E. Screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from some plants of *Apocynaceae*, *Clusiaceae*, *Euphorbiaceae*, and *Rubiaceae*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2012**; 1-6.

**Escudero-Álvarez** E, González-Sánchez P. La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, **2006**; 21(S2):61-72.

**Esteban** R, Mollá E, Benítez V. Sources of fiber. En: *Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease*, Ed. Elsevier Inc, **2017**; 121-146.

**Etxeberria** U, De la Garza A, Campión J, Martínez J, Milagro F. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **2012**; 16(3): 269-297.

**Fassler** C, Arrigoni E, Venema K, Hafner V, Brouns F, Amado R. Digestibility of resistant starch containing preparation using two *in vitro* models. *Eur J Nutr*, **2006**; 45:445-453.

**Fegredo** J, Meynell R, Lai A, Wong M, Martin C, Wiseman H, Preedy V. The antioxidant capacity of beer: relationships between assays of antioxidant capacity, color and other alcoholic and non-alcoholic beverages. En: *Beer in Health and Disease Prevention*, Ed. Elsevier Inc, **2009**; 475-481.

**Fukumoto** L, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**; 48(8): 3597-3604.

**Garavand** F, Madadlou A, Moini S. Determination of phenolic profile and antioxidant activity of pistachio hull using high-performance liquid chromatography–diode array detector–electro-spray ionization–mass spectrometry as affected by ultrasound and microwave. *International Journal of Food Properties*, **2015**; 20(1):19–29.

**García-Gutiérrez** N, Campos-Vega R, Loarca-Piña F, Mendoza-Díaz S, García-Gasca M, Guevara-González R. Efecto de los productos de la fermentación colónica de la fracción no digerible del café (*coffea arábica L.*) usado sobre células de adenocarcinoma humano y su mecanismo de acción. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de química. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. **2015**; 22-25.

**Gondokesumo** M, Kusuma H, Widowati W.  $\alpha$ / $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*) ethanol extract. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, **2017**; 1(1):34-40.

**Gonzales** G, Smaghe G, Grootaert C, Zotti M, Raes K, Van Camp J. Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure-activity/ property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metab Rev.* **2015**; 47(2):175-90.

**Heim K**, Tagliaferro A, Bobilya D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **2002**; 13(10):572-584.

**Hernández-Alonso P**, Bulló M, Salas-Salvadó J. Pistachios for Health: What Do We Know About This Multifaceted Nut? *Nutrition Today*. **2016**. 51(3):133-138.

**Hernández-Rodríguez P**, Baquero L, Larrota H. Flavonoids. En: *Bioactive Compounds*, Ed. Elsevier Inc, **2019**; 265-288.

**Hoebler B**, Devaux M, Karinthi A, Bellevile C, Berry J. Particle size of solid food after human mastication and *in vitro* simulation of oral breakdown. *Int J, Food Sci Nutr*, **2000**; 51: 353-366.

**Hoebler C**, Gullon F, Fardet A, Cherbut C, Barry J. Gastrointestinal or simulated *in vitro* digestion changes dietary fiber properties and their fermentation. *J Sci Food Agric*, **1998**; 77: 327-333.

**Holst B**, Williamson G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, **2008**; 19(2):73-82.

**Hong H**, Xie Q, Ge W, Qian F, Fang H, Shi L, Tong W. Mold<sup>2</sup>, Molecular descriptors from 2D structures for chemoinformatics and toxicoinformatics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2008**; 48(7):1337-1344.

**Humbeck L**, Koch O. What can we learn from bioactivity data? Chemoinformatics tools and applications in chemical biology research. *ACS Chemical Biology*, **2016**; 12(1):23-35.

**Hur S**, Lim B, Decker E, McClements D. *in vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, **2011**; 125(1):1-12.

**Islas-Gómez E**, Loarca-Piña F, Mendoza-Díaz S, Campos-Vega R, Reynoso-Camacho R, Gonzáles de Mejía E. Caracterización del perfil de compuestos fenólicos

durante la digestión gastrointestinal de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido y evaluación de sus actividad antiinflamatoria *in vitro*. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Programa de Posgrados en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC). Maestría en Ciencia y Tecnología de los alimentos, **2015**; 7-26.

**Ismail B.** Ash Content Determination. Food Science Text Series, **2017**. 117–119.

**Jacobs D,** Gaudier E, Duynhoven J, Vaughan E. Non-digestible food ingredients, colonic microbiota and the impact on gut health and immunity: a role for metabolomics current drug metabolism. **2009**; 10(1):41-54.

**Jun-Yang,** Rui-Hai L, Linna Halim. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. LWT. Food Science and Technology. **2009**; 42(1):1-8.

**Kong F,** Singh R. Disintegration of solid foods in human stoach. J Food Sci, **2008**; 73 (5): R65-R80.

**Kumar N,** Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. Biotechnology Reports, **2019**; 24(e00370):1-10.

**Liu Y,** Blumberg J, Chen C. Quantification and bioaccessibility of california pistachio bioactives. J Agric Food Chem. **2014**. 62(7):1550-6.

**Lo Y,** Rensi S, Torng W, Altman R. Machine learning in chemoinformatics and drug discovery. Drug Discovery Today, **2018**; 23(8):1538-1546.

**Lobo V,** Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews, **2010**; 4(8):118-126.

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

**MacCuish** J, MacCuish N. Chemoinformatics applications of cluster analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, **2013**;4(1):34-48.

**Maldonado** A, Doucet J, Petitjean M, Fan B. Molecular similarity and diversity in chemoinformatics: From theory to applications. Molecular Diversity, **2006**; 10(1): 39–79.

**Manach** C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition, **2004**; 79(5): 727-747.

**Mandalari** G, Bisignano C, Filocamo A, Chessa S, Sarò M, Torre G, Dugo P. Bioaccessibility of pistachio polyphenols, xanthophylls, and tocopherols during simulated human digestion. Nutrition, **2013**; 29(1): 338-344.

**Mandalari** G, Bisignano C, Filocamo A, Chessa S, Sarò M, Torre G, Dugo P. Bioaccessibility of pistachio polyphenols, xanthophylls, and tocopherols during simulated human digestion. Nutrition. **2013**; 29(1): 338–344.

**McArthur** B, Mattes R. Energy extraction from nuts: walnuts, almonds, pistachios. British Journal of Nutrition, **2019**; 1–21.

**McKerrow** J, Lipinski C. The rule of five should not impede anti-parasitic drug development. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, **2017**; 7(2): 248–249.

**Mendoza** M, Loza R. Inhibitory activity of alpha-amylase and total phenols in *Smallanthus sonchifolius* (yacon) ethanolic leaf extracts. Rev Cubana Plant Med, **2014**; 19(4):310-318.

**Murthy** P, Naidu M. Sustainable management of coffee industry by products and value addition. Resources, Conservation and Recycling, **2012**; 66: 45-58.

**Nakajima** A, Sasaki T, Itoh K, Kitahara T, Takema Y, Nagahara, A, *et al.* A soluble fiber diet increases *Bacteroides fragilis* group and IgA production in the gut. Applied and Environmental Microbiology, **2020**; 86(16):32-64.

**Nenadis** N, Wang L, Tsimidou M, Zhang H. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2004**; 52(15):4669-4674.

**Nieto-Figueroa** H, Mendoza-García V, Gaytán-Martínez M, Wall-Medrano A, Loarca-Piña F, Campos-Vega R. Effect of drying methods on the gastrointestinal fate and bioactivity of phytochemicals from cocoa pod husk: *In vitro* and *in silico* approaches. *Food Research International*, **2020**; 137(109725):1-10.

**Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999**. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario de la Federación, **2001**.

**Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002**. Protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo. Diario de la Federación, **2005**.

**Olivas-Aguirre** F, Mendoza S, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar G, Villegas-Ochoa M, Quintero-Vargas J, Wall-Medrano A. First-pass metabolism of polyphenols from selected berries: a high-throughput bioanalytical approach. En: *Antioxidants*, Ed. MDPI, **2020**; 9(4)311: 3-17.

**Olivera-Fox** E, Reynoso-Camacho R, Mercado-Silva E, Cardador-Martínez A, Ramos-Gómez M, Loarca-Piña F. Evaluación de subproductos obtenidos en la elaboración de jugos de mango y guayaba como fuente de fibra antioxidante. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos, **2012**; 5-6 y 56-57.

**Olthof** M, Hollman P, Buijsman M, Amelsvoort J, Katan M. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr*, **2003**; 133:1806-1814.

**Padmanabhan** P, Correa-Betanzo J, Paliyath G. Berries and related fruits. *Encyclopedia of Food and Health*, **2016**; 364–371.

**Panche** A, Diwan A, Chandra S. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, **2016**; 5(e47):1-15.

**Pande** G, Akoh C. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**; 57(20):9427-9436.

**Pangestuti** R, Kim S. Biological activities of carrageenan. *Marine carbohydrates: fundamentals and applications*. En: *Advances in Food and Nutrition Research, Part A*, Ed. Elsevier Inc, **2014**; 72:113–124.

**Parada** J, Aguilera J. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*. **2007**; 72(2): R21-32.

**Park** Y. Dietary fiber and health: Bioactive foods in health promotion. En: *Fruits, Vegetables, and Herbs*, Ed. Elsevier Inc, **2016**; 423–449.

**Pérez-Jiménez** J, Serrano J, Tebernero M, Arranz S, Díaz-Rubio M, García-Diz L, Saura-Calixto F. Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherland)*, **2009**; 64(2): 102-107.

**Rios** L, Bennett R, Lazarus S, Rémésy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr*, **2002**; 76:1106-1110.

**Robert** M. Food allergens: Seafood, tree nuts, peanuts. *Reference Module in Food Science*. *Encyclopedia of Food Chemistry*, **2018**; 1:640-647.

**Rojas** J, Buitrago A. Antioxidant activity of phenolic compounds biosynthesized by plants and its relationship with prevention of neurodegenerative diseases. En: *Bioactive Compounds*, Ed. Elsevier Inc, **2019**; 3-31.

**Ros** E. Health benefits of nut consumption. *Nutrients*, **2010**; 2(7):652-682.

**Ros E.** Nuts and CVD. *British Journal of Nutrition*, **2015**; 113(S2):S111-S120.

**Salas-Salvadó J**, Bulló M, Pérez-Heras A, Ros E. Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *British Journal of Nutrition*, **2006**; 96(S2):S45-S51.

**Saura-Calixto F**, Pérez-Jiménez J, Touriño S, Serrano J, Fuget E, Torres J, Goñi I. Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fiber from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*. **2010**; 54(7): 939-946.

**Saura-Calixto F**, Serrano J, Pérez-Jiménez J. What contribution is beer to the intake of antioxidants in the diet? En: *Beer in health and disease prevention*, Ed. Elsevier Inc, **2009**; 441-448.

**Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.** Los frutos secos te pueden ayudar. [Serie en internet] 2018 [consultado 2020 mayo 17]; Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/tienes-mucha-tarea-los-frutos-secos-te-pueden-ayudar>

**Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.** Y a ti ¿te gusta el pistache? [Serie en internet] 2019 [consultado 2020 mayo 17]; Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/articulos/y-a-ti-te-gusta-el-pistache?idiom=es>

**Shahidi F**, Peng H. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compound. *Journal of Food Bioactives*, **2018**; 4: 11-68.

**Shiga T**, Lajolo F, Filisetti T. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology (Campinas)*, **2003**; 23(2): 141-148.

**Shim H**, Ferruzzi M, Kim Y, Santerre C. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry*, **2009**; 112(1):46-50.

**Singleton V**, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, **1965**; 16(3):144-158.

**Smith M, Morton D.** Digestion and absorption. En: The Digestive System, Ed. Elsevier Inc, **2010**; 129-152.

**Soto-Zarazúa M, Moustapha-Bah M, Berumen-Segura L, Rojas-Molina A, Rojas-Molina J, Camacho-Corona M.** Evaluación de la actividad estrogénica, antioxidante y citotóxica de dos productos alimenticios elaborados a base de alfalfa (*Medicago sativa*) e identificación de sus fitoestrógenos. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de química, Maestría en Ciencias Químico-Biológicas, **2015**; 10-13.

**Souza A, Cabral L, Bernardino F, Zervoudakis J, Rocha F, Valadares R.** Coffee hulls in diets of dairy cows: nitrogenous compounds balance. Research Gate, **2004**; 39(5): 1141-1145.

**Stephenson R.** Nuts. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, **2003**; 2:4205-4212.

**Swanson B.** Tannins and polyphenols. En: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Ed. Elsevier Inc, **2003**; 5729-5733.

**Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T.** Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. Journal of nutritional science and vitaminology, **2006**; 52(2):149-153.

**Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A.** In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. Food Chemistry, **2010**; 120(2): 599-606.

**Tarko T, Duda-Chodak A, Zajac N.** Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by *in vitro* simulation methods. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, **2013**; 64 (2):79-84.

**Terzo S, Baldassano S, Caldara GF, Ferrantelli V, Lo Dico G, Mulè F, Amato A.** Health benefits of pistachios consumption. Nat Prod Res. **2019**. 33(5):715-726.

**Tomaino A, Martorana M, Arcoraci T, Monteleone D, Giovinazzo C, Saija A.** Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. Biochimie. **2010**; 92(9):1115-22.

**Turner** J, Agatonovic-Kustrin S. *In silico* prediction of oral bioavailability. *Comprehensive Medicinal Chemistry*, **2007**; II: 699–724.

**Tütem** E, Apak R, Başkan K. Off-line HPLC integrated to total antioxidant capacity measurement of beverages. En: *Processing and impact on antioxidants in beverages*, Ed. Elsevier Inc, **2014**; 265-276.

**Varnek** A, Baskin I. Chemoinformatics as a theoretical chemistry discipline. *Molecular Informatics*, **2011**; 30(1):20-32.

**Varnek** A, Baskin I. Machine learning methods for property prediction in chemoinformatics: Quo vadis? *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2012**; 52(6):1413-1437.

**Vuolo** M, Lima V, Maróstica M. Phenolic compounds. En: *Bioactive Compounds*, Ed. Elsevier Inc, **2019**; 33-50.

**Wang** C, Song R, Wei S, Wang W, Li F, Tang X, et al. Modification of insoluble dietary fiber from ginger residue through enzymatic treatments to improve its bioactive properties. *LWT Food Science and Technology*, **2020**; 125(109220):1-7.

**Wang** M, Wichienchot S, He X, Fu X, Huang Q, Zhang B. In vitro colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, **2019**; 88:1-9.

**Xu** J, Hagler A. Chemoinformatics and drug discovery. *Molecules*, **2002**; 7(8): 566-600.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Glosario de abreviaturas

- ABTS<sup>•+</sup>: 2,2'-azino-bis (3-ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
- ADEMT: absorción, distribución, metabolismo, extracción y toxicidad
- APG: Apigenina
- BHE: Barrera hematoencefálica
- BHE: permeabilidad a la barrera hematoencefálica
- CAT: catequina
- CTC: catecol
- CTC-A: catecol A
- Cy3G: Cyanidina-3-O-glucósido
- DAI: Daidzeína
- DM: diabetes mellitus
- DM2: diabetes mellitus tipo 2
- DPPH<sup>•</sup>: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- E7G: Eriodictyol-7-O-glucósido
- EAG: equivalentes de ácido gálico
- ECAT: Epicatequina
- ECDNT: enfermedades crónico degenerativas no transmisibles
- ECV: enfermedades cardiovasculares
- ER: equivalentes de rutina
- ERN: especies reactivas de nitrógeno
- ERO: especies reactivas de oxígeno
- FD: fracción digerible
- FND: fracción no digerible
- FRAP: poder antioxidante reductor férrico
- GA: ácido gálico
- GEN: Genisteina
- GEN7G: Genisteina-7-O-glucósido

GPCR: receptor acoplado a proteína-G  
IC<sub>50</sub>: concentración de antioxidante requerida para causar la inhibición del 50% del radical.  
KF: Kaemferol  
LDL: lipoproteínas de baja densidad  
LogP/XLogP3: coeficiente de partición octanol-agua  
LROF: regla de Lipinski  
OATPs: polipéptidos transportadores de aniones orgánicos  
PAINS: compuestos de interferencia de ensayo panorámico  
 $P_{app\ AP \rightarrow BL}$ : coeficiente de permeabilidad aparente de apical a basolateral  
 $P_{app\ BL \rightarrow AP}$ : coeficiente de permeabilidad aparente de basolateral a apical.  
 $P_{app}$ : coeficiente de permeabilidad aparente  
PCP: pistache con piel  
P-gp: glicoproteína-P  
PSP: pistache sin piel  
Q3R: Quercetin-3-O-rutinósido  
TAC: capacidad antioxidante total  
TE: equivalente de trolox  
TEAC: equivalente de trolox capacidad antioxidante  
TPSA: área de superficie polar topológica

## ANEXO 2. Carta consentimiento informado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Posgrado de Alimentos, Facultad de Química

“Carta consentimiento para participar en el proyecto de investigación”

---

Título del protocolo:

“Efecto del pistache (*Pistacia vera* L.) sobre la regulación molecular *in vitro* del ritmo circadiano en tejido adiposo”

Investigador principal: Dra. Rocio Campos Vega

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

### **INVITACIÓN**

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como *consentimiento informado*. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

### **1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

El pistache (*Pistacia vera* L.) es un alimento que ha sido asociado a diferentes efectos benéficos a la salud, lo cual ha sido atribuido a su alto contenido de compuestos fenólicos y fito-melatonina. Para dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos es importante comprender como son transformados durante la digestión

gastrointestinal, ya que en base a su forma química pueden o no ser aprovechados y cumplir su función en las células de destino, o ser desechados por el organismo.

## **2. OBJETIVO DEL ESTUDIO**

Evaluar el efecto *in vitro* del pistache (*Pistacia vera* L.) sobre la regulación del tejido adiposo y su relación con el ciclo circadiano.

## **3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Este estudio permitirá conocer la estabilidad que tanto los compuestos fenólicos como la fito-melatonina presentes en el pistache a través de su paso por el tracto gastrointestinal.

## **4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

En caso de aceptar participar en el estudio usted seguirá el siguiente procedimiento:

1. Se aplicará un breve cuestionario para determinar su historia clínica y sus hábitos de alimentación.
2. Usted tendrá que asistir el día y hora señalados al laboratorio de Bioquímica Toxicológica del Posgrado de Alimentos, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Deberá haber consumido su último alimento al menos 90 minutos antes del inicio del ensayo. Además, cepillarse los dientes, sin pasta dental o cualquier otro producto para el aseo bucal, solamente con agua natural. Antes de iniciar el ensayo, se le pedirá enjuagarse la boca con agua. Se le solicitará que mastique 1 gramo de muestra (Pistache y pistache sin cascarilla) 15 veces, durante 15 segundos, descargando el contenido en un vaso. Inmediatamente después, se enjuagará la boca por 15 segundos con otros 5 mL de agua destilada, depositando el líquido en el vaso anterior. Esto se repetirá en dos días diferentes.

## **5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO**

Este estudio consta de 1 sola fase en la que masticará pistache con y sin cascarilla. De no expresar alergia o intolerancias previas a este producto, este procedimiento no implica ningún riesgo para usted.

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará en los términos del apartado 6.

## **6. ACLARACIONES**

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, se le proporcionará el cuidado médico apropiado, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio, previamente valorado por el médico.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador corresponsable al teléfono: 1921200 ext: 5585
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

## 7. INFORMACIÓN DE CONTACTO

Si tiene alguna pregunta acerca de su participación o desea la opinión de otra persona fuera del estudio, usted puede consultar al médico de su confianza.

En caso de que tenga cualquier pregunta acerca del proyecto o en caso de una emergencia, llame al número 4421878477, con la M en C. Elisa Dufoo Hurtado.

## 8. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
**Firma del participante**

\_\_\_\_\_  
**Fecha de la firma**

\_\_\_\_\_  
**Testigo 1**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

\_\_\_\_\_  
**Testigo 2**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_  
**Firma del investigador**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

### **9. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

**Título del protocolo:**

**Investigador principal:**

**Sede donde se realizará el estudio:**

**Nombre del participante:** \_\_\_\_\_

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Opcional)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Nombre del participante**

\_\_\_\_\_  
**Firma del participante o del padre o tutor**

\_\_\_\_\_  
**Fecha de la firma**

ANEXO 3. Carta aprobación Comité de Bioética.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA

C.U., Querétaro, 25 de marzo de 2019  
No. de oficio. CBQ19/013

**Dra. Rocío Campos Vega**  
Facultad de Química  
Presente

**At'n. M. en C. Elisa Dufoo Hurtado**

Nos permitimos hacer de su conocimiento que, en reunión del Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, con objeto de llevar a cabo la revisión de propuesta de investigación, el protocolo titulado "**Efecto del pistache (*Pistacia vera* L.) sobre la regulación molecular *in vitro* del ritmo circadiano en tejido adiposo**" del cual usted es responsable fue evaluado con la resolución de: **aprobado**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

  
Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez  
Presidente



  
Dra. Minerva Ramos Gómez  
Secretaria



Ccp archivo

Centro Universitario, Cerro de las Campanas, Santiago de Querétaro, Gro., México C.P. 76010  
Tel. 01 (442) 192 12 67 Fax 192 13 02

C.U., Querétaro, septiembre 27, 2021  
No. de oficio. CBQ21/104

**Dra. Rocío Campos Vega**  
**Facultad de Química**  
**Presente**

**At'n. María del Rocío Olvera Bautista**

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado "**Caracterización química y nutracéutica del pistache (*Pistacia vera* L.) tostado, y evaluación de la bioaccesibilidad *in vitro*, permeabilidad *ex vivo* y análisis quimiinformático *in silico***", del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado** con base en la resolución **CBQ19/013**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

**Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez**  
**Presidente**

**M.I.M. David Gustavo García Gutiérrez**  
**Representante investigador**

Ccp archivo