



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**
FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

TESIS
ESTUDIO *in vitro* e *in vivo* DEL PROCESO DIGESTIVO DE
FIBRA DIETETICA y ALMIDON RESISTENTE.

Protocolo de investigación que como requisito del Programa, presenta:
PARA OBTENER GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS
I.B.Q. EDITH PEREZ VALADEZ

DIRECTOR DE TESIS:
D. C. HECTOR EDUARDO MARTINEZ FLORES.

Julio 2010

RESUMEN

ESTUDIO *in vitro* e *in vivo* DEL PROCESO DIGESTIVO DE FIBRA DIETETICA Y ALMIDÓN RESISTENTE

La fibra dietética (FD) es un componente funcional esencial en la alimentación humana. Una parte de la FD tiene la capacidad de fermentarse en el colon y producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC proporcionan múltiples e importantes beneficios a la salud de quien consume FD regularmente. Dos alimentos mexicanos, bolillo y tortilla, fueron formulados y elaborados con una combinación de fibra dietética soluble (FS) e insoluble (FI). Inulina de achicoria fue usada como fuente de FS y cáscara de trigo como FI. Los alimentos fueron sometidos a un proceso de digestión *in vitro* y un proceso de digestión *in vivo* efectuado en ratas Wistar macho de 12 semanas de nacidas. Se evaluaron los cambios en la proporción de Fibra Dietética Total (FT), FS, FI, y Almidón Resistente (AR) antes y después de cada proceso de digestión para ambos alimentos. Las modificaciones estructurales fueron monitoreadas por medio de las técnicas de Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Se observó un cambio en la proporción de ambas fracciones de fibra y un aumento en la FS durante las digestiones. Los contenidos de AR fueron variables en los dos alimentos, sin embargo se observó un aumento significativo del contenido de AR con las digestiones. Con las técnicas de DRX, FTIR y DSC se confirmaron los cambios estructurales del almidón y la producción de AR a nivel gástrico.

ABSTRACT

***In vitro* AND *in vivo* STUDY OF THE DIGESTIVE PROCESS OF DIETETIC FIBER AND RESISTANT STARCH**

Dietary fiber (DF) is an essential functional component in the human diet. Part of DF is fermentable in the colon and is able to produce short chain fatty acids (SCFA). SCFA provide multiple and important health benefits to people who ingest appropriate amounts of DF. Two Mexican foods, bolillo and tortilla, were formulated and prepared with a combination of soluble (SF) and insoluble (IF) dietary fiber. Chicory fiber was used as a SF source and wheat husk as IF source. The foods were submitted into an *in vitro* digestion process and an *in vivo* process using male Wistar rats of twelve-weeks old. Changes in proportion of total dietary fiber (FT), SF, IF and resistant starch (RS) were evaluated before and after each digestion process in both foods. The structural modifications were assessed by X ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). During digestions was observed a change in the rate of both fractions of fiber and it was noted an increase in FS. The contents of RS vary in both foods, however, a significant increase of RS content after the digestions was observed. Changes in the wheat structure and production of RS at gastric level were confirmed with XRD, FTIR and DSC.

INDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 La Fibra Dietética.....	3
2.1.1 Clasificación.....	3
2.1.2 Beneficios del consumo de FD	4
2.2 El trigo.....	6
2.2.1 Estructura de la planta.....	7
2.3 Inulina	8
2.4 Almidón resistente	10
2.5 Pan y tortillas ricos en fibra	12
2.6 El proceso de digestión de alimentos.....	13
2.6.1 Digestibilidad de la FD	17
3 JUSTIFICACIÓN	19
4 HIPÓTESIS	20
5 OBJETIVOS	21
5.1 General	21
5.2 Específicos	21
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 Materiales.....	22
6.1.1 Fuentes de FD	22
6.2 Métodos.....	23
6.2.1 Preparación del bolillo	23
6.2.2 Preparación de la tortilla	24
6.2.3 La digestión <i>in vitro</i>	24
6.2.4 La digestión <i>in vivo</i>	25
6.2.4.1 Obtención de muestras de la digestión <i>in vivo</i>	26
6.2.5 Caracterización química de las muestras	26
6.2.5.1 Cuantificación de FT, FS y FI	26

	6.2.5.2	Cuantificación de almidón resistente.....	28
	6.2.5.3	Difracción de rayos X.....	29
	6.2.5.4	Espectrofotometría de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).....	29
	6.2.5.5	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	30
7		RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
	7.1	Análisis de la fuente de FD.....	31
	7.2	Formulación de los alimentos	32
	7.3	Bromatológico de los alimentos.....	33
	7.4	FT, FS y FI.....	34
	7.5	Almidón resistente	37
	7.6	Difracción de rayos X.....	39
	7.7	Espectrofotometría de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	46
	7.8	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	55
8		CONCLUSIONES	60
9		REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1-	Fermentación bacteriana.	5
Fig. 2-	Arquitectura molecular de un tejido de una planta.	8
Fig. 3-	Estructura química de inulina en vegetales.	9
Fig. 4-	Estructura del almidón.	10
Fig. 5-	Esquema del sistema digestivo.	15
Fig. 6-	Obtención de la cascarilla de trigo.	22
Fig. 7-	Aumentos y disminuciones de % FS y FI durante ambos procesos de digestión.	36
Fig. 8-	Contenido de almidón resistente en los alimentos.	38
Fig. 9-	Patrón de difracción de rayos X de bolillo sin FD.	41
Fig. 10-	Patrón de difracción de rayos X de bolillo con FD.	42
Fig. 11-	Patrón de difracción de rayos X de tortilla sin FD.	43
Fig. 12-	Patrón de difracción de rayos X de tortilla con FD.	45
Fig. 13-	Espectro de FTIR de bolillo sin FD.	47
Fig. 14-	Espectro de FTIR de bolillo con FD.	49
Fig. 15-	Espectro de FTIR de tortilla sin FD.	51
Fig. 16-	Espectro de FTIR de tortilla con FD.	53
Fig. 17-	Termogramas DSC de bolillo sin fibra.	56
Fig. 18-	Termogramas DSC de bolillo con FD.	57
Fig. 19-	Termogramas DSC de tortilla sin FD.	58
Fig. 20-	Termogramas DSC de tortilla con FD.	59

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1- Tipos de fibra dietética.	4
Cuadro 2- Tipos de almidón resistente.	11
Cuadro 3- Bacterias predominantes en el colon humano y actividad enzimática... 16	
Cuadro 4- Principales productos de la fermentación colónica.....	17
Cuadro 5- Grupos de trabajo con animales de experimentación.	25
Cuadro 6- Análisis de las fuentes de fibra.	31
Cuadro 7- Formulación de bolillo sin FD.	32
Cuadro 8- Formulación de bolillo adicionado con fibra.	
Cuadro 9- Formulación de tortilla blanco.	33
Cuadro 10- Formulación de tortillas adicionadas con fibra.¡Error! Marcador no definido.	
Cuadro 11- Caracterización bromatológica del bolillo.	34
Cuadro 12- Caracterización bromatológica de la tortilla.	34
Cuadro 13- FT, FS y FI de Bolillo sin FD y sus residuos de los procesos de digestión.....	35
Cuadro 14- FT, FS y FI de Bolillo con FD y sus residuos de los procesos de digestión.....	35
Cuadro 15- FT, FS y FI de Tortilla sin FD y sus residuos de los procesos de digestión.....	35
Cuadro 16- FT, FS y FI de Tortilla con FD y sus residuos de los procesos de digestión.....	35
Cuadro 17- Cristalinidades Relativas de bolillo sin FD.....	41
Cuadro 18- Cristalinidades relativas del bolillo con FD.....	42
Cuadro 19- Cristalinidades relativas de tortilla sin FD.....	44
Cuadro 20- Cristalinidades relativas de tortilla con FD.....	45
Cuadro 21- Bandas correspondientes al espectro de FTIR de bolillo sin FD.	48
Cuadro 22- Bandas correspondientes al espectro de FTIR de bolillo con FD.	50
Cuadro 23- Bandas correspondientes al espectro de FTIR de tortilla sin FD.....	52
Cuadro 24- Bandas correspondientes al espectro de FTIR de tortilla con FD.....	54
Cuadro 25- Propiedades térmicas del bolillo sin FD.	55

Cuadro 26 -Propiedades térmicas del bolillo con FD.	56
Cuadro 27 -Propiedades térmicas de la tortilla sin FD.	57
Cuadro 28 -Propiedades térmicas de la tortilla con FD.	58

1 INTRODUCCIÓN

La fibra dietética (FD) es un componente esencial de la dieta, y aunque no sea considerada un nutriente, se ha demostrado que aporta calorías (Roberfroid, 1999) en mínimas cantidades, y ha sido estudiada ampliamente por inducir beneficios a la salud de los individuos que la consumen (Soergel, 1994; Slavin, 2003; Hoebler *et al.*, 1998 (a); Gotteland y Brunser, 2006; Frost *et al.*, 2003).

La FD ha sido dividida en dos tipos principales: fibra soluble (FS) y fibra insoluble (FI). Cada una se comporta de manera diferente al momento de ser ingerida debido a sus diferentes estructuras, las cuales determinan la manera fisiológica en la que actúan, es decir, los beneficios que puede aportar al organismo que la consuma.

Debido a los diferentes beneficios que su consumo representa, la FD ha sido utilizada como ingrediente funcional en alimentos. Con el plan de enriquecer los alimentos en FI, han sido fabricadas tortillas de harina de trigo adicionadas de salvado de cereal llamadas integrales; de la misma manera, se han fabricado diversos productos de panificación. Por su parte, a las FS también se les ha utilizado como aditivos de alimentos, en jamones, salchichas, panes, pastas, yoghurt y agua entre otros (Gotteland y Brunser, 2006; Bakke y Vickers, 2007; Jacira, 2006; Karppinen *et al.*, 2000; Toops, 2008).

La inulina pertenece a la familia de las FS y es un ingrediente funcional que por excelencia ha sido utilizado en la industria, debido a los diferentes beneficios fisiológicos que representa y a su fácil manejo dentro de las formulaciones de alimentos (Jacira, 2006). Por su parte, la cáscara de trigo está principalmente compuesta de FI, y al ser indigerible, su consumo también representa beneficios; por lo tanto, es ampliamente recomendada como ingrediente alimenticio.

En este trabajo se llevó a cabo la digestión de dos alimentos mexicanos, tortilla y bolillo adicionados con una mezcla de los dos tipos de FD compuesta por cáscara de trigo e inulina. Se evaluaron los cambios estructurales del almidón y los cambios en el contenido de fibra, tanto durante el proceso de fabricación de los alimentos como durante la digestión de éstos.

Este trabajo ayudará a conocer la manera en la que la FD llega realmente a su sitio de acción y permitirá en posteriores estudios, llevar a cabo la correlación de esto con sus efectos a nivel fisiológico.

2 ANTECEDENTES

2.1 La Fibra Dietética

En general, los componentes de los alimentos tienen la capacidad de ser digeridos y absorbidos, con excepción de la FD. En el 2001, la AACC (American Association of Cereal Chemists) define a la FD como la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso. La mayor parte de los componentes de la FD son indigeribles debido a sus enlaces tipo *beta*, que no pueden ser degradados por las enzimas tipo *alfa* que intervienen el proceso de digestión, sin embargo, a finales de los 80's se dieron las primeras evidencias de que una fracción del almidón escapaba de la digestión; esta fracción fue denominada almidón resistente (AR) y aunque no posee enlaces *beta*, es indigerible porque su estructura desordenada no permite el acceso a las enzimas.

2.1.1 Clasificación

La FD se divide en dos grupos (Cuadro 1); la fibra soluble (FS), que presenta un cierto grado de hidratación en el medio gástrico en condiciones fisiológicas y la fibra insoluble (FI), que presenta un mínimo grado de hidratación (Nelson, 2001).

Cuadro 1- Tipos de fibra dietética.

Tipo de fibra	Componentes
Soluble	Mucílagos, β -glucanos, inulinas, algunos tipos de hemicelulosas, gomas, pectinas.
Insoluble	Almidones resistentes Celulosa, lignina, algunos tipos de hemicelulosas, quitina, cutina, suberina y otras ceras.

La FS tiene capacidad de unirse con el agua, formar un gel a nivel gástrico y llevar a cabo la retención de macromoléculas. Al llegar al colon es fermentada por las bacterias colónicas, promoviendo así la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el acético, propiónico y butírico, provenientes de la fermentación. La FI, por su parte, tiene una estructura porosa en la cual es capaz de captar macromoléculas, aportar volumen al bolo alimenticio y posteriormente a las heces.

2.1.2 Beneficios del consumo de FD

El consumo de FD representa múltiples beneficios, desde una mayor higiene bucal (Escudero y González, 2006) hasta un sistema pulmonar más saludable (Haidong *et al.*, 2008; Fogarty *et al.*, 2007).

Cada uno de los tipos de FD posee diferentes propiedades fisiológicas según su estructura. Los efectos fisiológicos de la FS dependen grandemente de su fermentación en el colon (Hoebler *et al.*, 1998a) que está dada por la producción de AGCC (Figura 1).

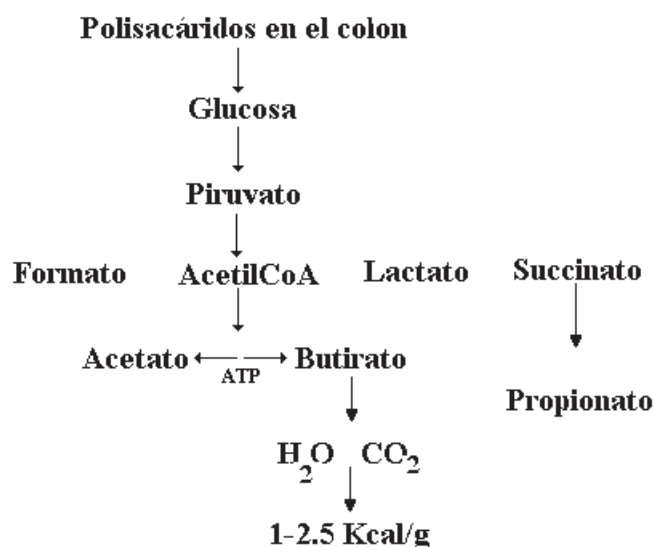


Fig. 1- Fermentación bacteriana.

Los AGCC provenientes de la fermentación de la fibra tienen el potencial de aumentar el pH colónico, el butirato sirve como una fuente de energía para los colonocitos y pueden alterar los lípidos sanguíneos (Slavin, 2003; Queenan *et al.*, 2007). Ha sido demostrado que dietas ricas en FD mejoran las variables metabólicas no solo en diabetes e hiperlipidemia, sino también en sujetos sanos (Frost *et al.*, 2003; Jenkins *et al.*, 2008; Queenan *et al.*, 2007; Tudorica *et al.*, 2002). Se ha comprobado que la fermentación de la FS también presenta un rango de efectos relevantes en la reducción del riesgo de cáncer colorectal (Muir *et al.*, 2004) y de otros tipos (Bandera *et al.*, 2007; Heavey y Rowland, 2004; Jacobsen *et al.*, 2006).

La FI por su parte, tiene capacidad de retención de macromoléculas dentro de su estructura porosa y además adiciona volumen al bolo alimenticio, lo que se traduce en una mejora del vaciamiento del intestino grueso (Slavin, 2003) debido a que aumenta la motilidad gastrointestinal. Su consumo retarda el tránsito intestinal (Gonlanchanvit *et al.*, 2004; Bortolotti *et al.*, 2008), las comidas que contienen FD también han sido reportadas por prolongar la duración de la saciedad (Bjorck *et al.*, 1994; Hlebowicz *et al.*, 2007; Isaksson *et al.*, 2008).

Además, se ha reportado la disminución de los síntomas de diverticulosis (Aldoori y Ryan-Harshman, 2002) y el mejoramiento en el control glicémico (Gonlachavit *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2003) y disminución de los síntomas del síndrome de colon irritable.

En cuanto a los cereales, que forman parte de las dietas en humanos y tienen una proporción importante de FD en su composición, también se les atribuyen efectos fisiológicos. Parece haber una sinergia entre el amplio rango de compuestos funcionales que contienen los cereales (FD, vitaminas, minerales, lignanos, fito-estrógenos, compuestos fenólicos y ácido fítico), sugiriendo que el grano entero es más valioso que la suma de sus partes (Slavin, 2003).

Debido a que ya había sido estudiado el impacto de cada uno de los tipos de fibra sobre la salud de los consumidores, Muir *et al.* (2004), llevaron a cabo la evaluación comparativa de los beneficios de la ingesta de una dieta enriquecida con algún tipo de fibra (12 g salvado de trigo) y una mezcla de fibras (12 g salvado de trigo + 22 g almidón resistente). Después de tres semanas se concluyó que el consumo de la combinación de ambas fuentes de fibra (FI y FS) proporciona mayores beneficios a la salud que el consumo de únicamente un tipo de fibra.

2.2 El trigo

El trigo es el segundo cultivo más importante en el mundo. Es un cultivo anual, se cree que es originario de Asia occidental. Por medio del método de radiocarbono su existencia data de alrededor de los 6700 A. C. El trigo se cultivaba en las regiones de Babilonia, Egipto, Grecia y Roma.

El trigo pertenece al género *Triticum* (*Gramineae*) y comprende alrededor de 500 especies. La manera en la que el trigo es consumido se divide principalmente en dos: 1) el trigo de uso para pan (*T. aestivum*) que abarca el 80% del consumo de trigo en el mundo y los trigos duros (*T. durum*) que se usa para la producción de pastas y se consumen en las regiones mediterráneas (Bajaj, 1990)

Este cereal ha sido la base de la alimentación para las naciones mediterráneas. La moderna industria alimentaria sigue enfrentando el antiguo reto de convertir los granos de trigo en una gran diversidad de productos de panificación; y ha tenido que acompañarse de

recursos científicos y tecnológicos que han permitido disfrutar de mejores panes, más sabrosos, con mayor calidad, mayor vida de anaquel, y de manera reciente con propiedades funcionales.

Son dos las especies que se cosechan en nuestro país, *T. aestivum*, destinado para la elaboración de harinas panificables, y *T. durum*, utilizado para la elaboración de semolina y la consecuente elaboración de pastas alimenticias. Cada especie responde a necesidades específicas según las condiciones de producción y uso al que esté destinada (Benitez y Salazar, 1998).

A través del tiempo, la principal parte de la planta que ha sido utilizada con fines alimentarios humanos, es el grano; sin embargo, el resto de la planta es utilizado con fines alimentarios para animales.

2.2.1 Estructura de la planta

Dentro de la planta del trigo se pueden diferenciar tres partes en general; tallo, hojas y espiga. Dentro de la espiga se encuentran los granos cubiertos de una cáscarilla protectora. Los granos están conformados principalmente por almidón, por esta razón es utilizado para la elaboración de harinas para consumo humano. El resto de la planta está principalmente constituido por FD.

La pared primaria de un tejido de una planta se observa en la Figura 2. Está compuesta de fibrillas de celulosa, hemicelulosas y proteína con grandes cantidades de pectina formando una matriz viscosa que consolida toda la pared. A la izquierda de la figura, se muestra la relación entre células contiguas, en el centro una vista de un corte de las capas de la pared celular y a la derecha un esquema de la relación de lignina, hemicelulosa y celulosa en la pared secundaria. El diámetro de cada célula es aproximadamente de 25 μm (Segura *et al.*, 2007).

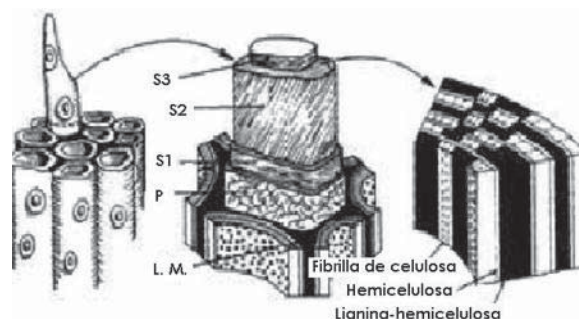


Fig. 2- Arquitectura molecular de un tejido de una planta. S1, S2 y S3 son capas de la pared celular secundaria. P = pared primaria; M. L. = lamela media (Kirk y Cullen, 1998).

La composición molecular varía entre tipos de células, tejidos y especies de plantas; una aproximación de peso seco es 30% de celulosa, 25% de hemicelulosas, 35% de pectina y un 10% de proteína (Gadd, 2001). Los componentes proteicos de la pared celular primaria son licoproteínas ricas en hidroxiprolina, llamadas extensinas, que están involucradas en la arquitectura de la pared celular y en la resistencia de la planta a enfermedades (Brownleader *et al.*, 1996; Dey *et al.*, 1997).

2.3 Inulina

La inulina es un polisacárido de reserva energética en vegetales, frutas y cereales regularmente consumidos; tales como, cebolla, ajo, trigo, achicoria, alcachofa y plátano, entre otros. Sosa y Campos (2008) mencionan que la inulina ha sido definida como un carbohidrato polidiserso que consiste principalmente, de una glucosa inicial unida a un grupo de fructosas con enlaces fructofuranosil-fructosa $\beta(2-1)$ (Figura 3). Debido a su estructura y a los tipos de enlaces que presentan, los fructanos tipo inulina, son oligosacáridos no digeribles que han sido clasificados dentro de la FD.

Todos los denominados fructooligosacaridos (FOS), difieren en el promedio de sus grados de polimerización (GP) desde 3 a 5 para oligofructosa y de hasta 25 para algunos tipos de inulina. Ellos son clasificados como FD y son ampliamente utilizados en una gran variedad de productos alimenticios por sus atributos funcionales y nutricionales (Roberfroid, 2002). Se estima que su consumo en USA es de 1-4 g/d (MoshFegh *et al.* 1999.) y 3-11 g/d en Europa (Van Loo *et al.* 1995.).

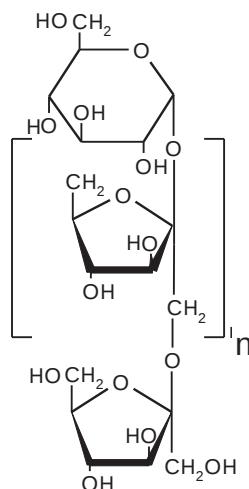


Fig. 3- Estructura química de inulina en vegetales.

Ha sido demostrado en gran número de estudios *in vitro* e *in vivo* que la inulina y oligofructosa son fermentadas por las bacterias que colonizan el intestino grueso, y han confirmado la producción de AGCC como productos finales de la fermentación. Debido a los efectos del consumo de inulina y oligofructosa, se puede concluir que una dosis de 5-15 g/d por unas pocas semanas, pueden ser consideradas como prebióticos (Gibson, 2000. Roberfroid y Dalzenne, 1998.; Van Loo *et al.*, 1998).

La inulina es un carbohidrato fermentable y su ingesta también aporta un contenido calórico al organismo. En términos de valor calórico, la inulina y la oligofructosa no se comportan como los carbohidratos digeribles, a los que se ha asignado un valor calórico de 3.9 Kcal/g (16.3 KJ/g) y que son metabolizados para la producción de 38 ATP/ mol o 0.21 mol ATP/g (Roberfroid, 1999). Para términos de etiquetado, se recomienda que la inulina y oligofructosa de achicoria reporten un valor calórico de 1.5 Kcal/g (6.3 KJ/g).

Generalmente, los productos con un GP de 2-60 son etiquetados como inulina (Raftiline), mientras la oligofructosa comercial se produce por hidrólisis enzimática parcial de la inulina y tiene un GP promedio de 10 (Raftilose).

Varios grados de inulina comercial de sabor neutro están disponibles actualmente, y son usados para mejorar la estabilidad, aceptabilidad y la sensación oral en alimentos bajos en grasa (Niness, 1999). Debido a su longitud de cadena larga, la inulina es menos soluble que la oligofructosa y tiene la habilidad de formar microcristales cuando es incorporada a

agua o leche. Estos cristales no son perceptibles en la boca, pero interactúan para formar una textura cremosa suave y proveer una sensación similar a la de una grasa.

La inulina posee varias propiedades nutricionales y funcionales que pueden ser usadas para la formulación de alimentos sanos e innovadores para los consumidores de hoy (Ellegård *et al.*, 1997).

2.4 Almidón resistente

El almidón es la principal reserva de energía de las plantas, en los granos se encuentra en el endospermo y tiene propiedades únicas que determinan su funcionalidad en aplicaciones alimentarias. El gránulo de almidón se compone principalmente de dos polímeros, amilosa y amilopectina (Figura 4) (Rodríguez *et al.*, 2002). La molécula de amilosa es una cadena lineal con enlaces α -(1,4)-D la cuál dentro del gránulo de almidón tiene forma de hélice (15-30%), mientras que la molécula de amilopectina (85–70%), presenta ramificaciones en los enlaces α -(1-6)-D.

La amilosa es una cadena teóricamente lineal, pero en la práctica existen algunas sustituciones iguales a las de la amilopectina, una de cada varios centenares de moléculas, que no modifican sus propiedades. Las moléculas de amilopectina son significativamente más grandes que las moléculas de amilosa; algunas contienen entre 10 mil y 200 millones de unidades de glucosa. El peso molecular de la amilosa está entre 0.1 y un millón de g/mol, mientras el de la amilopectina está entre 10000 y 1000 millones de g/mol (Ruiz, 2006).

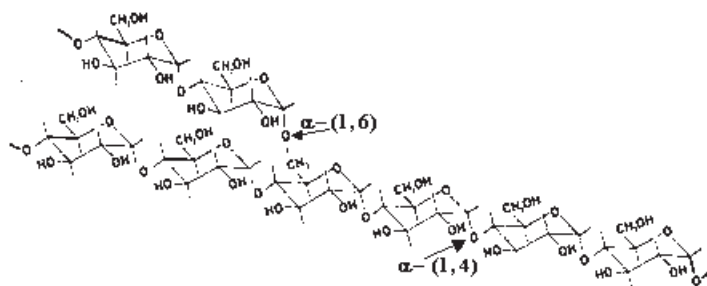


Fig. 4- Estructura del almidón.

Actualmente se sabe que una parte del almidón escapa a la digestión y absorción en el intestino delgado debido a que en algunas ocasiones su estructura, a pesar de tener enlaces tipo alfa, son inaccesibles al ataque de las enzimas digestivas (Englyst *et al.*, 1992; Aparicio-Saguilán *et al.*, 2007) y es capaz de ser fermentado por la flora colónica para producción de AGCC, siendo el butirato el principal resultado de su fermentación, debido a esto, muchas investigaciones se han dedicado a estudiar a la fracción resistente del almidón y a los múltiples beneficios que aporta durante su consumo (Willis *et al.* 2009; Granfeldt *et al.*, 2006).

El AR es definido como la suma del almidón más los productos de su degradación que no son absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos (Asp, 1992) y tiene la capacidad de fermentarse a nivel de colon y producir AGCC al igual que los componentes de la fibra soluble. Ha sido asociado con la reducción de índices glicémicos, bajos niveles de colesterol y prevención de cáncer de colon (Asp *et al.*, 1996; Englyst *et al.*, 1992). Englyst *et al.* (1996) describió los primeros 3 tipos de AR y un cuarto fue descrito posteriormente (Woo *et al.*, 2002). En el cuadro 2 describen los 4 tipos de AR descritos hasta el momento.

Cuadro 2- Tipos de almidón resistente*.

TIPO DE ALMIDÓN RESISTENTE	DEFINICIÓN	EJEMPLO
1	Físicamente inaccesible, rodeado por material de pared celular.	Trigo molido grueso.
2	Almidón de alta amilosa, largas cadenas de pocas ramificaciones.	Almidón de maíz de alta amilosa.
3	Amilosa retrogradada, dobles hélices de cadenas largas.	Almidones cocinados y enfriados.
4	Almidones modificados químicamente, reacomodos de enlaces por calor o enzimáticos.	Maltodextrinas modificadas.

* Adaptado de Murphy *et al.* (2008).

Debido a los beneficios que aporta el consumo de AR en la salud, el uso de este producto en alimentos funcionales ha tenido mucho éxito.

2.5 Pan y tortillas ricos en fibra

Los cereales, particularmente el trigo (*T. aestivum*), arroz (*Oryza sativa*), y el maíz (*Zea mays L.*), han estado muy vinculados con el origen y la evolución de las grandes civilizaciones. Hoy en día, estos aportan ingestas importantes de nutrientes a la población del mundo y continuaran haciéndolo en el futuro.

En la actualidad, la sociedad enfrenta problemas crecientes de salud debido a los malos hábitos alimenticios que han sido adquiridos en los últimos tiempos. La gran carga de carbohidratos o grasas disponibles en algunos alimentos han llevado a la ciencia de los alimentos al desarrollo de productos que reduzcan sus proporciones de grasas o/y carbohidratos disponibles, con el objetivo de disminuir diferentes problemas de salud. Una de las estrategias que se han utilizado para lograr lo anterior es la adición de FD en la formulación de diferentes productos.

Hablando específicamente del pan, desde hace mucho tiempo la FI proveniente de diferentes cereales ha sido adicionada a su formulación. De manera más reciente, se ha experimentado con gran éxito la incorporación de la inulina a la formulación de diversos productos de panificación (Franck, 2002). La inulina ha favorecido la reducción de la gelatinización del almidón sin alterar las características organolépticas del producto, y debido a las diferentes propiedades nutricionales y funcionales que la inulina presenta, el resultado final es un alimento funcional que no ha modificado sus características (Jacira, 2006).

En el caso de la tortilla, se han llevado a cabo muchos esfuerzos para mejorar su valor nutritivo, esto, debido a que la tortilla forma parte de la dieta de todos los sectores de la sociedad, reportándose un consumo per cápita en México de 120 Kg anuales (Figueroa *et al.*, 2001). El mejoramiento nutricional de la tortilla se ha dado a través de la fortificación y suplementación con nutrientes, se han tenido resultados positivos con las vitaminas del complejo B, la adición de lisina y triptófano, como aminoácidos o como proteínas, y de minerales en particular hierro. Se ha llevado a cabo el mejoramiento de la calidad de la proteína del maíz a través del desarrollo de maíces de alto valor nutritivo como el maíz opaco-2 (QPM), que soportan bien el proceso de nixtamalización (Rodríguez *et al.*, 2008).

Debido a que el proceso de nixtamalización del maíz facilita la eliminación del pericarpio, compuesto esencialmente de FD (celulosa, hemicelulosas, lignina y proteína fijada en estos compuestos), la tortilla presenta un menor contenido de FD en relación al maíz sin procesar. El contenido de FD en el maíz, disminuye al convertir el grano a tortilla, según lo informado por Bressani y Scrimshaw (1958), Bedolla y Rooney (1982), Saldaña y Brown (1984), por otro lado Acevedo y Bressani (1990) y Bressani *et al.* (1990) han reportado cambios en grano y tortilla respecto a los contenidos de FS y FI; debido a lo anterior, se ha explorado la producción de tortillas suplementadas con fibra, adicionándoles salvado de trigo, o de manera más reciente utilizando nopal (*Nopalea cochenillifera*) para su elaboración.

2.6 El proceso de digestión de alimentos

La cinética de la digestión depende de las características físicas y químicas de los alimentos y de su interrelación con los eventos fisiológicos que ocurren dentro del tracto gastrointestinal (Hoebler *et al.*, 2002). La digestión de los alimentos y la absorción de nutrientes son procesos dinámicos que involucran sistemas de complejos enzimáticos y reacciones de transporte (Fässler *et al.*, 2006).

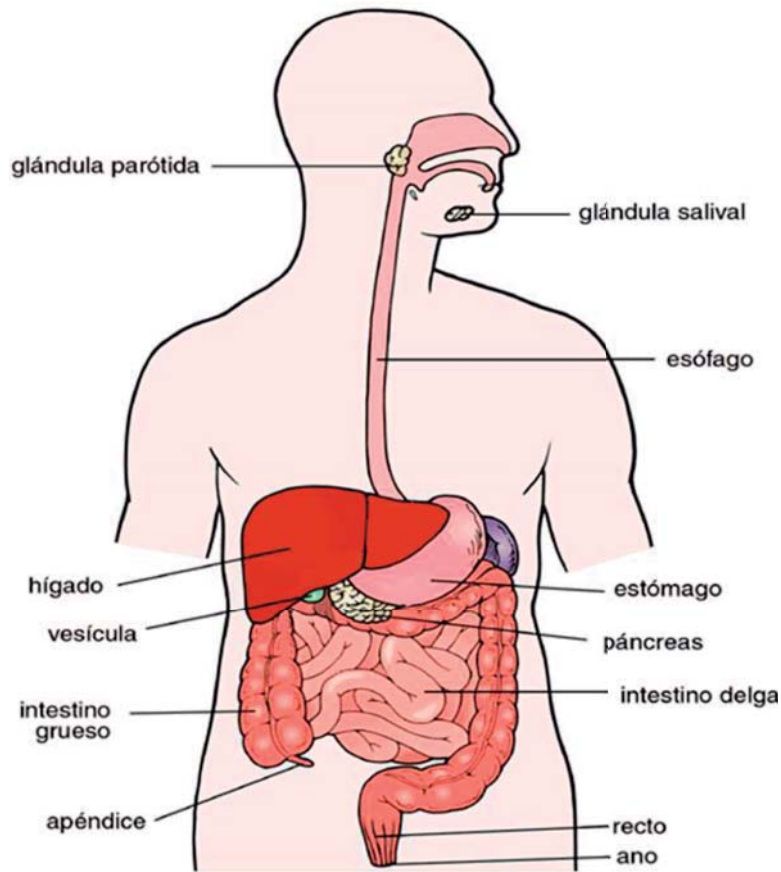
El proceso de digestión se compone de varias fases: la bucal, la gástrica, la de absorción y la colónica o de fermentación (Figura 5). Cada una de las fases del proceso de digestión se lleva a cabo bajo condiciones fisiológicas muy específicas que tienen además funciones concretas.

La digestión de los alimentos comienza con la masticación en la boca. La etapa oral es rápida y juega un papel muy importante en la digestión (Kong y Singh, 2008). Durante la fase bucal tiene lugar la masticación que transformará el alimento en partículas más pequeñas y además en este punto comienza la digestión enzimática del almidón.

La digestión oral es el primer paso en el cual las características físicas y fisicoquímicas de la comida sólida (textura, tamaño de partícula, humedad, y viscosidad) están sujetas a mayores modificaciones (Hoebler *et al.*, 2000). Posteriormente, continúa la digestión gástrica. Durante este tiempo, el estómago transforma su contenido en una mezcla multifase llamada quimo, la cual es una combinación de fases separadas en

soluciones acuosas, grasas y sólidos (Kong y Singh, 2008). En el estómago, principalmente las proteínas y en segundo término los carbohidratos y lípidos son degradados a través de una serie de reacciones enzimáticas acompañadas de un pH ácido.

Al llegar al duodeno muchas de las macromoléculas ya han sido transformadas a sus unidades más simples, y es aquí donde comienza la absorción de todos los monómeros. En el intestino delgado tienen lugar muchas reacciones enzimáticas que terminan la degradación de macromoléculas, principalmente de lípidos, pero en este punto el pH del medio ácido que prevalecía en la etapa anterior cambia por un pH cercano a la neutralidad. Por último, el colon está habitado por una serie de microorganismos denominados “microflora” que se encargan de fermentar todos los sustratos que llegan hasta este punto. Se estiman unas 400 especies.



Copyright © 2005 McKesson Corporation and/or one of its subsidiaries. All Rights Reserved.

Fig. 5- Esquema del sistema digestivo.

Las bacterias predominantes (Cuadro 3) representan el 99% de la población total y están compuestas de *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Clostridia*. Por su parte las bacterias subdominantes son *E. coli*, *Lactobacilli* (*L. acidophilus*) y *Streptococci*.

Cuadro 3- Bacterias predominantes en el colon humano y actividad enzimática*.

BACTERIA	ENZIMAS PRINCIPALES
Bifidobacteria	Beta-galactosidasa, amilasa, fructo-oligosacaridasa, galactomanasa.
Peptostreptococcus	Beta-glucuronidasa.
Costridia	Beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, fructo-oligosacaridasa.
Eubacterium	Pectinasa, beta-galactosidasa, fructo-oligosacaridasa, beta-glucuronidasa, 7-alfa-deshidroxilasa.
Bacteroides	Beta-glucosidasa, amilasa, pectinasa, celulasa, galactomanasa, fructo-oligosacaridasa, beta-glucuronidasa, proteasa, decarboxilasa, 7-alfa-deshidroxilasa.
Streptococcus	Beta-galactosidasa.
Lactobacilli	Beta- galactosidasa, fructo-oligosacaridasa.

* Adaptado de Szytli y Andrieux, 1993.

Los sustratos que llegan al colon pueden variar de un organismo a otro, dependiendo del régimen alimenticio que se tenga, pero, generalmente están compuestos en su mayoría de FS, que al fermentarse se obtienen productos (Cuadro 4) que juegan un papel importante en el mantenimiento de la salud del hospedero (Rossi *et al.*, 2005; Cummings y Macfarlane, 1991).

Cuadro 4- Principales productos de la fermentación colónica.

PRODUCTO	SUSTANCIA
Gases	CO ₂ , CH ₄ , H ₂ .
Biomasa	Incremento de biomasa.
Ac. Orgánicos	Láctico, Succínico, Pirúvico.
AGCC	Acético, Propiónico, Butírico.

Al final de la digestión, cuando ya han sido aprovechados todos los nutrientes posibles, se absorben los últimos minerales y el agua en el segmento final del intestino grueso, y el sobrante de la digestión se almacena hasta su evacuación (Guyton y Hall, 2001).

Conocer el proceso de digestión es de vital importancia. Se han usado varios modelos para llevar a cabo las investigaciones relacionadas a este tema. Los modelos *in vivo* más comúnmente usados son vacas, perros, cerdos, ratas y ratones. En cuanto a los modelos *in vitro*, se han diseñado varios procesos, sin embargo, el proceso de digestión es tan complejo, que será difícil poder diseñar un proceso que lo imite a la perfección, como lo han declarado Hoebler *et al.* (2002) y Fässler *et al.* (2006).

2.6.1 Digestibilidad de la FD

Conocer el comportamiento de la FD durante el proceso de digestión y su relación con los efectos fisiológicos de su consumo es uno de los principales retos de la ciencia hoy en día. Los nuevos conocimientos en este tema, están siendo aplicados en el mejoramiento de los procesos de fabricación de alimentos y en el desarrollo de alimentos funcionales y suplementos alimenticios.

Varias investigaciones han abordado el tema de la digestibilidad de la FD; tanto en modelos *in vivo* (Kong y Singh, 2008; Muir *et al.*, 2004; Golanchanvit *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2003; Aldoory y Ryan-Harshman, 2002; Jenkins *et al.*, 1998), como *in vitro*. En estos últimos se han investigado las digestiones principalmente de alimentos ricos en AR (Fässler

et al., 2006; Frost *et al.*, 2003; Hoebler *et al.*, 2002). En los estudios *in vitro* se han abordado las diferentes etapas del proceso de digestión por separado; la fase bucal (Hoebler *et al.*, 2000, Hoebler *et al.*, 1998b; Akerberg *et al.*, 1998), la fase gástrica (Fässler *et al.*, 2006; Hoebler *et al.*, 2002) y la fermentación (Hoebler *et al.*, 1998a; Björck *et al.*, 1994; Soergel, 1994; Cummings y Macfarlane, 1991).

Hoebler *et al.* (1998a), mencionan que la FD es susceptible de ser modificada en su composición química y en sus propiedades fisicoquímicas durante el proceso de digestión, y que estos cambios posiblemente afectan la velocidad y el grado de su fermentación en el colon; se reporta también que las fibras altamente solubles pueden ser fácilmente degradables por algunas bacterias que se encuentran antes de llegar al colon. Hoebler *et al.* (2002) mencionan que durante la preparación de pan, las proteínas del trigo se desnaturalizan y forman agregados que pueden limitar su hidrólisis péptica. Ellos también reportan que durante el proceso de digestión de pan se observa una disminución del tamaño de partícula del alimento a través de las diferentes etapas.

Fässler *et al.* (2006) hicieron una comparación de digestiones *in vitro* de tipo batch y dinámico de AR tipo 2 y 3. Ellos reportan que al final de ambos tipos de digestión se puede observar una proporción de AR que queda sin ser digerida. En su trabajo, reportan también que la cinética de digestión varió considerablemente en cada tipo de AR; en el análisis por difracción de rayos X, observaron una pérdida de cristalinidad durante la digestión de maltodextrina de tapioca.

3 JUSTIFICACIÓN

Desde los inicios de las investigaciones que involucran a la fibra dietética (FD), se ha argumentado, que al ser ingerida, tiene la capacidad de no sufrir ningún cambio a lo largo del tracto digestivo y que es únicamente en el colon cuando la fibra soluble se fermenta. Antes de su llegada al colon, la FD está sujeta al ambiente luminal (enzimas, pH, temperatura, minerales, ácidos biliares, etc.) del tracto digestivo superior y esas condiciones pueden promover cambios irreversibles en las características intrínsecas de la FD (composición química, tamaño de partícula) o modificaciones reversibles de las propiedades fisicoquímicas.

Se ha reportado que durante la digestión gástrica e intestinal, el almidón y las proteínas se hidrolizan y se separan de la FD y que las condiciones ácidas del estómago o neutras del intestino pueden solubilizar parcialmente componentes de las sustancias pécticas (arabinosa, galactosa, y ácidos urónicos).

El consumo de la fibra aporta importantes beneficios cuando es consumida en proporciones adecuadas. Para investigar los posibles efectos de las diferentes fibras es necesario contar con información precisa de cuáles son las cantidades y las condiciones en las que estas llegan al colon.

Sería útil el poder desarrollar un sistema *in vitro* para el estudio del comportamiento de la FD durante el proceso de digestión que nos permita la predicción del comportamiento *in vivo* con ventajas tales como: un bajo costo para su aplicación, relativamente fácil manejo, inexistencia de limitaciones éticas, y la posibilidad de poder evaluar varios sustratos bajo las mismas condiciones estándar de estudio, por esta razón, en este trabajo se lleva a cabo el estudio de digestibilidad de una técnica *in vitro* comparada con el proceso *in vivo* y se observan las diferencias en ambos procesos, para que con el tiempo pueda lograrse el diseño de sistema *in vivo* que evite el uso de animales de experimentación.

4 HIPÓTESIS

Los componentes de la fibra dietética adicionada a dos alimentos (bolillo y tortilla) se modificarán química y estructuralmente al someterse a los procesos de digestión *in vivo* e *in vitro*.

5 OBJETIVOS

5.1 General

Someter dos alimentos adicionados con una mezcla de fibra dietética a un proceso de digestión *in vivo* y un proceso de digestión *in vitro* y determinar los cambios que presenta durante dichos procesos.

5.2 Específicos

- Caracterizar químicamente las fuentes de fibra dietética.
- Elaborar y caracterizar dos alimentos adicionados con fibra dietética.
- Realizar la digestión *in vivo*.
- Realizar la digestión *in vitro*.
- Caracterizar químicamente los residuos de ambas digestiones
- Determinar las modificaciones en la fibra durante el proceso de digestión.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Para llevar a cabo las digestiones *in vivo* e *in vitro* se trabajó con pan y tortilla control (sin FD) e integrales adicionados con una mezcla de fibra, una de tipo soluble (inulina de achicoria) y otra donde predominará la fibra insoluble (cáscara de trigo).

Varias formulaciones fueron sometidas a evaluación para ver cuál sería la proporción final de fibra, sin embargo, los resultados no son reportados en este trabajo.

6.1.1 Fuentes de FD

La Inulina de Achicoria Raftiline HPX[®], fue proporcionada por la compañía Beneo-Orafti[®].

La cáscara de trigo utilizada fue obtenida de manera manual de plantas sembradas en la zona de Álvaro Obregón, Michoacán, México (Figura 6).

El proceso de obtención de la fuente de fibra consistió únicamente en retirar la cascarilla protectora del grano y posteriormente molerla en un molino manual de discos.



Fig. 6- Obtención de la cascarilla de trigo.

Espiga de trigo completa (izquierda); cáscara protectora del grano (centro-izquierda); grano (centro - derecha); centro de la espiga (derecha).

6.2 Métodos

6.2.1 Preparación del bolillo

El bolillo se preparó de acuerdo a la metodología descrita por Valencia (2000), utilizándose los siguientes ingredientes:

- 1 kg de harina de trigo.
- 20 g de azúcar.
- 20 g de sal.
- 30 g de levadura en pasta.
- 600 ml de agua hervida y fría.
- * Mezcla de fibra dietética (75gr de cáscara de trigo y 60 gr de inulina).

Preparación de la masa

Se preparó el bolillo control sin fibra, y bolillo adicionado con la mezcla de fibra dietética.

Se mezcló la harina con el resto de ingredientes, incluyendo la mezcla de FD en el caso del bolillo que llevaba, posteriormente, se agregaron 500 ml de agua y se incorporó a la mezcla hasta formar una masa. A continuación se agregó el sobrante de agua necesaria para que fuera manejable. Se amasó durante 15 - 20 min, hasta que quedó lisa y no se rompiera al estirarla.

Estando terminada, la masa se dejó reposar durante 30 min y posteriormente se volvió a amasar para sacar el aire que se le hubiera formado con la levadura. Se moldeó y se procedió a hornear.

Horneado del bolillo

Para hornear los bolillos se requirió una temperatura de 250 °C, se hizo un corte fino al lado derecho de cada bolillo con una navaja haciéndole una ligera punta y a continuación se metieron los bolillos al horno con ayuda de una pala. Se dejaron cocer los bolillos de 15 a 20 min.

Una vez preparados los bolillos se molieron y guardaron en bolsas herméticamente cerradas a -20 °C para posteriormente ser caracterizados y sometidos a los procesos de digestión.

6.2.2 Preparación de la tortilla

La tortilla se elaboró de acuerdo a lo documentado por Arámbula *et al.* (2001), utilizando los siguientes ingredientes:

- 1 Kg de Harina instantánea MASECA[®].
- 1300 ml de Agua.
- 5 g de sal.
- * Mezcla de fibra dietética (75 gr de cáscara de trigo y 60 gr de inulina).

Preparación de la masa: Se mezcló la harina en polvo con el agua hasta obtener una masa de consistencia semisólida. Se amasó durante 10 min y se dejó reposar durante 60 min. Se dividió la masa en porciones de aproximadamente 25g y se procedió al moldeado.

Cocción: Se puso la masa, previamente moldeada, en un comal a ~250 °C, se dejó cocer 25 seg por un lado, 25 por el otro lado y se volteó una última vez.

Al tener las tortillas frías, se cortaron en pedazos lo más pequeños posible y se molieron, posteriormente se congelaron a -20 °C y almacenaron bajo esas condiciones.

6.2.3 La digestión *in vitro*

La metodología utilizada para esta digestión se basó en el trabajo de Fässler *et al.* (2006).

Para ambos alimentos se partió de polvo con una humedad de 5%. Para simular la digestión se partió de 10 g de alimento (sustrato), se suspendieron en 166ml de Buffer fosfato (20 mM, pH 6.9, Na₂HPO₄ 1.42 g/l, KH₂PO₄ 1.36 g/l, NaCl 0.58 g/l) y se procedió a incubarlos en una solución de α -amilasa salival humana (Sigma A1031, 10 mg/ml en CaCl₂ 1 mM) a pH 6.9 por 15 min.

Se disminuyó el pH hasta un valor de 2 con HCl 0.5 N para proceder a la digestión gástrica. Se llevó a cabo la digestión gástrica con suspensión de pepsina porcina (sigma P7012, 1 mg/ml en NaCl 9 g/l) a pH 2 por 30 min. Se ajustó el pH a 6.9 con NaOH y se llevó a cabo la digestión que simuló la primera fracción del intestino delgado con pancreatina porcina (sigma P7545, 0.5 mg/ml en CaCl₂ 25 mM) a pH 6.9 por 3 h en presencia de bilis bovina (sigma B8381).

Los productos de la degradación fueron removidos por diálisis (SPECTRA/POR 2 MVCO:12-14,000 Kda, Spectrum Medical Industries INC., Los Angeles, CA, USA.) toda la noche en movimientos contra agua desionizada a 20 °C y posteriormente liofilizados para su análisis.

6.2.4 La digestión *in vivo*

Para el estudio biológico fueron usadas ratas Wistar macho de 60 días de nacidos. Los animales fueron adquiridos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.

Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales para su adaptación por un periodo de 3 días, alimentados con dieta comercial.

Las condiciones ambientales fueron: temperatura de cuarto de 22 °C $\pm$ 1 °C, con ciclo de claridad – oscuridad de 12 h con ventilación. Para el ensayo *in vivo* los animales fueron distribuidos al azar en cuatro grupos de ocho animales. Se alimentaron con las dietas experimentales y agua, abastecidas *ad libitum* por un periodo de 5 días (Cuadro 5).

Cuadro 5- Grupos de trabajo con animales de experimentación.

GRUPO	DIETA
I	Tortilla sin fibra
II	Pan sin fibra
III	Tortilla con fibra
IV	Pan con fibra

6.2.4.1 Obtención de muestras de la digestión *in vivo*

Al final del ensayo, los animales se sacrificaron y se hizo la recuperación del contenido de estómago e intestino delgado.

La eutanasia de los animales se llevo a cabo mediante la inyección intraperitoneal de una dosis de pentobarbital sódico. La dosis a aplicar fue determinada según el peso de cada animal de acuerdo a la siguiente fórmula 0.04 g/ Kg de peso del animal.

Habiendo esperado a que la inyección hiciera efecto, se procedió a abrir la piel del animal. Se hizo un corte en el cual se separó el colon del intestino delgado y se vació el contenido de ambos de manera manual. Posteriormente, se uso un lavado con ayuda de una jeringa y agua. Se vació el contenido del estómago de la misma manera que el intestino y se separaron ambas fracciones para posteriores análisis. El residuo de la digestión se almacenó -20°C para su posterior liofilización y caracterización.

6.2.5 Caracterización química de las muestras

Se llevó a cabo la caracterización química de los materiales, tanto de la materia prima usada como fuente de fibra, como del alimento elaborado y digerido por ambos métodos.

Extracto etéreo, humedad y cenizas se hicieron de acuerdo a los métodos de la AACC (2002). El contenido de proteína fue determinado por el método Kjeldahl usando un factor de conversión de 5.7. Se realizaron análisis de fibra dietética total (FT), fibra dietética soluble (FS) y fibra dietética insoluble (FI) de acuerdo al método de Prosky *et al.* (1988).

El almidón resistente (AR) se analizó de acuerdo a Goñi *et al.* (1996). El contenido de inulina fue determinado mediante HPLC como fructosa y el contenido de carbohidratos totales se llevó a cabo según Clegg (1956).

A continuación se hace una descripción detallada de las técnicas menos comunes.

6.2.5.1 Cuantificación de FT, FS y FI

Se llevo a cabo la técnica propuesta por Prosky *et al.* (1988) que consta de dos partes: la digestión enzimática y la filtración. La digestión enzimática consistió en pesar 1g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml; posteriormente se agregaron 50 ml de

solución buffer de fosfatos 0.08M a pH 6 y se le agregaron 0.1 ml de la α -amilasa contenida en el kit de cuantificación de fibra dietética (TDF-100A SIGMA), se puso en un baño maría a una temperatura de 95 °C; y se agitó por 30 min.

A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó a pH de 7.5 con NaOH (0.275N), posteriormente se le agregó 0.1 ml de proteasa (TDF-100A SIGMA) (50mg/ml de solución de proteasa en buffer de fosfato) y se llevó a baño María a 60 °C, agitándose por 30 min. Al terminar los 30 min, la muestra se atemperó y se modificó el pH a 4.5 con HCl (0.325M).

A continuación se agregó 0.1 ml de amiloglucosidasa contenida en el mismo kit, se llevó a baño María a una temperatura de 60 °C por 30 min, con agitación constante y al terminar el tiempo se volvió a poner a temperatura ambiente.

Para la parte de filtración se pusieron a peso constante dos papeles filtros por muestra, para hacer la separación de ambas fracciones de fibra dietética (FS y FI). Se filtró la muestra obtenida de la parte de digestión y se lavó con 3 volúmenes de 10 ml de agua destilada, quedando dos partes, el filtrado y el sobrenadante. Se reservaron ambas fracciones.

A la parte del papel filtro (FI) se hicieron lavados con 3 volúmenes de 10 ml de etanol al 78%, al 95% y con acetona. Posteriormente, se puso el papel filtro a peso constante a 105 °C por 1 h, se atemperó y se pesó.

La parte líquida (FS) se colocó en un vaso precipitado y se ajustó a 100 ml con agua destilada, se le adicionaron 400 ml de etanol al 95% a 60°C; posteriormente se dejó precipitar por aprox. 2 h y a continuación se lavó de la misma manera como se lavó la FI.

Al finalizar ambos lavados se colocaron los papeles filtro a peso constante en la estufa por una hora a 105 °C, se atemperaron y se pesaron.

Después de pesar los papeles filtro, se determinó proteína y cenizas de los mismos.

La fibra total (FT) de cada tipo se calculó considerando el peso del residuo menos las correcciones de proteínas y cenizas.

$$FT = [(\text{Peso inicial de papel} - \text{peso final de papel}) / \text{peso muestra}] - \text{proteína} - \text{cenizas}.$$

6.2.5.2 Cuantificación de almidón resistente

Este análisis fue realizado por triplicado con la técnica propuesta por Goñi *et al.*(1996). Para cada análisis se peso una muestra de 100 mg y se dispersó en 10 ml de solución de buffer cloruro (KCl-HCl, pH 0.1M), pH 6.9, 0.2 ml de soln. de pepsina (Sigma P-7000. Sln conteniendo 1g de enzima en 10ml de buffer KCl-HCl), posteriormente se incubó con agitación constante en un baño maría a 40 °C por 60 min.

Se sacó del baño y se enfrió, posteriormente se ajustó el pH a 6.9 y se adicionaron 9 ml de buffer tris maleato 0.1M, pH 6.9.

Se adicionaron 1ml de solución de α -amilasa (Sigma A-7136, 40 mg por cada ml de buffer tris maleato) y se incubó durante 16 hr en agitación constante.

Se centrifugó por 10 min a 3000 g y se descartó el sobrenadante. El residuo se lavó dos veces con 10 ml de agua. Al residuo seco se adicionaron 3 ml de agua destilada y 3 ml de KOH 4 M. La dispersión formada fue dejada a temperatura ambiente por 30min.

Después de ese tiempo se adicionaron 5.5 ml de HCl 2M y 3 ml de buffer acetato (0.4M, pH 4.75 conteniendo CaCl_2 20mM), posteriormente el pH se cambió a 4.75.

A continuación se adicionaron 80 μL de amiloglucosidasa (Sigma A-3514) y se dejó en agitación por 45 min a 60 °C.

Se centrifugó a 3000 g durante 10 min y se guardó el sobrenadante en un matraz volumétrico, se hizo un lavado del residuo con agua destilada y el sobrenadante se recuperó en el mismo matraz y se aforó el matraz con agua destilada para hacer la determinación de contenido de glucosa de la solución preparada en el matraz.

La cantidad de glucosa producida fue determinada a través de la lectura en espectrofotómetro a 505 nm, después de la oxidación enzimática con la glucosa-oxidasa (reactivo GOD-POD) contenida en el kit de determinación de glucosa (GLUC-PAP RANDOX), siguiendo la metodología sugerida por el fabricante.

Se calculó el % de AR como lo marca la técnica.

$$\% AR = 100 * \frac{[glucosa (\mu g)] * volumen (ml) * 0.9}{1000 * W}$$

Donde 0.9 es el factor de conversión de glucosa y W es el peso de la muestra.

6.2.5.3 Difracción de rayos X

Es una técnica de caracterización de rango amplio y consiste en hacer pasar un haz de rayos X a través de la muestra. El haz choca con la superficie de la muestra con un ángulo θ de incidencia, interactúa con los átomos de la superficie y se difracta en varias direcciones debido a la simetría de la agrupación de los átomos. La difracción da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse con la aplicación de la ley de Bragg:

$$\text{sen}\theta = \frac{n\lambda}{2d}$$

Donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de los rayos X, d es la distancia entre los planos de la red cristalina y θ es el ángulo entre el rayo incidente y los planos de dispersión.

Esta es una de las técnicas que goza de mayor prestigio entre la comunidad científica para dilucidar estructuras cristalinas en muestras como las manejadas en este trabajo, y tiene como única limitante que no puede usarse en soluciones.

Las muestras fueron procesadas en un difractómetro de rayos X (RIGAKU Dmax2100) equipado con una fuente de cobalto operado a 30 kV y 16 mA produciendo una radiación de 1.78899 Å. Los datos fueron colectados en un intervalo de 5°-60° con un paso de 0.02°. La gráfica fue suavizada a 12 puntos y el índice de cristalinidad relativa fue sacado a partir de la integración de áreas de los picos obtenidas mediante el programa Origin 6.0. El índice de cristalinidad relativa está definido como se marca a continuación.

$$\text{Cristalinidad relativa} = \frac{\text{área de los picos}}{\text{área total de la gráfica}} * 100$$

6.2.5.4 Espectroscopía de Infrarrojo utilizando Transformada de Fourier (FTIR)

En esta técnica, un haz de radiación infrarroja se pasa a través de la muestra, alguna de la radiación se absorbe por la muestra y alguna pasa a través de ella, es decir, se transmite. El espectro resultante representa la absorción y transmisión molecular, creando una huella

digital de la muestra. Como una huella dactilar, ninguna estructura molecular produce el mismo espectro, lo que hace a esta técnica útil para varios tipos de análisis, como identificación de materiales, determinación de la calidad y cantidad de componentes en muestras. La señal que nos brinda el Infrarrojo es captada por un interferómetro, y para decodificarla y poder tener un espectro de frecuencias, se utiliza una técnica matemática conocida como Transformada de Fourier generalmente llevada a cabo por una computadora.

Para la preparación de la muestra fue retirada la humedad y se pesaron 12mg de muestra para posteriormente mezclarse con 204 mg de KBr.

El análisis fue realizado en un Perkin Elmer GX acoplado a un detector de reflectancia difusa, tomando el espectro medio. Cada espectro fue analizado en el rango de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ con 16 barridos.

6.2.5.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Esta técnica es usada para estudiar lo que ocurre cuando un polímero es calentado, en lo que se llama transiciones térmicas de un polímero. La técnica consiste en aplicar calor de manera independiente a dos charolas iguales, una vacía y otra con muestra. Mediante una computadora se regula el flujo de calor de manera que ambas charolas eleven su temperatura igualmente en un rango predeterminado según la muestra. Es la diferencia de flujos de calor de ambos calentadores que está siendo registrada por la computadora lo que nos brinda la información necesaria para conocer las propiedades calóricas de la muestra.

Las propiedades térmicas de las muestras fueron analizadas en un Calorímetro Mettler Toledo DSC 822e calibrado con Indio. Cada muestra analizada tuvo un peso de 6mg (base seca), las muestras fueron pesadas en una cápsula de aluminio y 14 microlitros de agua fueron adicionados en la cápsula. La cápsula fue sellada fuertemente y se dejó reposar por 30min antes de llevar a cabo el análisis. Una cápsula de aluminio vacía fue usada como referencia. La muestra se sometió a un programa con un rango de temperatura de entre $30 - 120^{\circ}\text{C}$ y una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La temperatura de pico ó de gelatinización (T_p), así como la entalpía de transición (ΔH), fueron obtenidas usando el programa propio del equipo.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis de la fuente de FD

El análisis inicial consistió en caracterizar las fuentes de fibra a utilizar respecto a su composición de fibra (Cuadro 6).

Cuadro 6- Análisis de las fuentes de fibra.

MUESTRA	% FT	% FI	% FS
Cáscara de trigo	68.29±4.33 ^a	64.95±3.15 ^a	3.34±1.18 ^b
INULINA	65.82±7.43 ^a	0.01 ^b	65.82±7.43 ^a

En base peso seco. Promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), ($n=3$). FT: fibra dietética total, FI: fibra insoluble, FS: fibra soluble.

En el Cuadro 6 se observa un contenido de FT similar entre ambas fuentes de fibra, siendo de 68.29% para la cáscara de trigo y de 65.82% para la inulina, correspondiendo la totalidad de la fibra para el tipo de FS en la inulina y en el caso de la cáscara de trigo, la FI correspondió a la proporción mayor (64.95%). Los resultados de esta primera etapa fueron importantes. Se esperaba contar con una fuente de tipo soluble y otra de tipo insoluble para la formulación de los alimentos y la cáscara de trigo y la inulina cumplieron con las proporciones necesarias.

7.2 Formulación de los alimentos

Después de definir las fuentes de FD se probaron varias formulaciones, se procedió a evaluar cuál era la mejor, según la calidad textural al alimento y, de acuerdo a la salud de los animales de experimentación, para no tener ningún problema al momento de llevar a cabo el experimento de digestión *in vivo*.

En los Cuadros 7 y 8 se muestra las formulaciones usadas para la elaboración del bolillo (con y sin FD) y de la tortilla (con y sin FD).

Cuadro 7- Formulación de bolillo sin y con FD.

INGREDIENTE	FORMULACIÓN 1 (g)
Harina refinada de trigo	1000
Agua	600
Azúcar	20
Sal	20
Mantequilla	20
Mejorante para panificación	20
INGREDIENTE	FORMULACIÓN 2 (g)
Harina refinada de trigo	1000
Agua	600
Azúcar	20
Sal	20
Mantequilla	20
Mejorante para panificación	20
Cáscara de trigo	75
Inulina	100

FORMULACIÓN 1: bolillo sin FD. FORMULACIÓN 2: bolillo con FD.

Para los bolillos se uso una base de harina refinada de trigo y para las tortillas se uso una harina instantánea de maíz nixtamalizado. A cada harina base, le fue adicionada la mezcla de fibra dietética para lograr el alimento integral.

Cuadro 8- Formulación de tortilla sin y con FD.

INGREDIENTE	FORMULACIÓN 1 (g)
Harina MASECA®	1000
Agua	1300
Sal	5
INGREDIENTE	FORMULACIÓN 2 (g)
Harina MASECA®	1000
Agua	1300
Sal	5
Cáscara de trigo	75
Inulina	100

FORMULACIÓN 1: tortilla sin FD. FORMULACIÓN 2: tortilla con FD.

7.3 Bromatológico de los alimentos

A los alimentos preparados se les realizó su caracterización bromatológica (Cuadros 9 y 10). Se observó un comportamiento generalizado de dilución de componentes en el caso de los alimentos que contenían fibra, debido a que cuando se adicionó fibra dietética a las formulaciones, los demás componentes cambiaron sus proporciones en la formulación.

En el caso del extracto etéreo (EE) de bolillo y tortilla, se observó que los contenidos fueron diferentes; mientras el bolillo contiene 1.08% de EE, la tortilla presentó más del doble. Esto se debe a que el grano de maíz contiene mayor cantidad de EE que el grano de trigo (Bressani *et al.*, 2001; Figueroa *et al.*, 2001).

Para el caso de la proteína ocurre un efecto contrario, ya que el grano de trigo contiene más proteína que el grano de maíz, por lo cual el contenido proteico es mayor en el bolillo que en la tortilla, tal como reportan Ikhtiar y Alam (2007).

Cuadro 9- Caracterización bromatológica del bolillo.

ALIMENTO	%H	%EE*	%PC*	%ELN*~
pan control	6.00±0.54 ^a	1.08±0.08 ^a	13.87±1.54 ^a	75.25±2.34 ^a
pan100/75	6.50±0.35 ^a	1.30±0.1 ^a	12.69±2.13 ^a	76.47±3.13 ^a

Cuadro 10- Caracterización bromatológica de la tortilla.

ALIMENTO	%H	%EE*	%PC*	%ELN*~
Tortilla control	11.40±0.68 ^a	2.39±0.098 ^a	10.94±1.71 ^a	76.31±3.23 ^a
Tortilla 100/75	6.50±0.73 ^b	2.83±0.21 ^a	8.71±0.97 ^a	74.38±2.51 ^a

Promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). (n=3) * En base peso seco.~ ELN: Extracto Libre de Nitrógeno = 100 – (cenizas, PC, EE, fibra cruda). EE: Extracto etéreo. PC: Proteína cruda. H: Humedad.

7.4 FT, FS y FI

El contenido de fibra esperada mínima teórica (según las formulaciones) en los alimentos adicionados con fibra fue de 6.3% en el caso del bolillo (Cuadro 7) y de 7. 9% en el caso de la tortilla (Cuadro 8), sin embargo, estos valores difieren de los valores reales, tal como se muestra en los Cuadros 14 y 16. Tomando en cuenta los valores de FT obtenidos para los alimentos control, es decir, sin FD, los valores de FT esperados para los alimentos con FD debieron ser de 17.75% para el bolillo y de 26.33% para la tortilla; haciendo un comparativo entre los valores teóricos esperados con los valores reales obtenidos (Cuadros 12 y 14), se observó que los reales fueron menores a lo esperado, encontrándose una diferencia de 1.82% y 2.35%, respectivamente.

Los tratamientos mecánicos, térmicos o químicos ocurridos durante el procesamiento del alimento pueden tener un efecto sobre la proporción de FT, tal como lo mencionan Bello-Pérez y Paredes-López (2009).

Cuadro 11- FT, FS y FI de Bolillo sin FD y sus residuos de los procesos de digestión.

MUESTRA	%FT*	%FS*	%FI*
Alimento	11.45±1.46 ^c	5.5±0.26 ^c	5.94±0.78 ^c
<i>in vitro</i>	16.45±0.78 ^b	9.56±1.57 ^b	6.89±0.97 ^b
<i>in vivo</i>	21.24±0.54 ^a	13.35±0.78 ^a	7.89±0.69 ^a

Cuadro 12- FT, FS y FI de Bolillo con FD y sus residuos de los procesos de digestión.

MUESTRA	%FT*	%FS*	%FI*
Alimento	15.93±1.35 ^c	7.46±0.13 ^c	8.47±1.75 ^c
<i>in vitro</i>	21.01±2.4 ^b	11.34±2.34 ^b	9.67±2.12 ^b
<i>in vivo</i>	30.69±3.2 ^a	16.24±1.35 ^a	14.45±1.8 ^a

Cuadro 13- FT, FS y FI de Tortilla sin FD y sus residuos de los procesos de digestión.

MUESTRA	%FT*	%FS*	%FI*
Alimento	18.43±1.13 ^c	4.84±0.78 ^c	13.59±2.8 ^b
<i>in vitro</i>	22.49±2.4 ^b	10.43±1.81 ^b	12.06±0.78 ^c
<i>in vivo</i>	28.32±1.35 ^a	12.59±2.4 ^a	16.73±1.64 ^a

Cuadro 14- FT, FS y FI de Tortilla con FD y sus residuos de los procesos de digestión.

MUESTRA	%FT*	%FS*	%FI*
Alimento	23.98±1.46 ^c	7.13±1.46 ^c	16.85±0.7 ^c
<i>in vitro</i>	29.91±2.51 ^b	12.46±0.65 ^b	17.45±1.42 ^b
<i>in vivo</i>	37.65±1.59 ^a	15.57±0.59 ^a	22.08±0.77 ^a

*Los valores reportados son los promedios en peso seco de al menos 3 repeticiones (promedio ± desviación estándar). Promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). FT: Fibra Total. FS: Fibra Soluble. FI: Fibra Insoluble.

En los Cuadros 11, 12, 13 y 14 se observa que los residuos de ambas digestiones aumentaron significativamente su contenido de FT comparados con los alimentos antes de digerir. Este comportamiento puede ser atribuido a dos posibles causas, por una parte el residuo de digestión *in vivo* fue tomado en la parte terminal del íleon, por lo tanto, el fenómeno de concentración de FT en todos los residuos puede deberse al proceso de

absorción de nutrientes llevado a cabo a nivel de intestino delgado en sus dos primeras porciones, el duodeno y el yeyuno; por otra parte, los valores aumentados de FT pueden deberse a una modificación en los componentes químicos de la FD (Hoebler *et al.*, 1998a).

En la Figura 7 puede ser observada la modificación de las proporciones de ambas fracciones de fibra que indican la transformación de FI a FS, el mismo comportamiento es observado en ambos tipos de digestión y para ambos alimentos. Graham *et al.*, (1986) reportan una solubilización de componentes de la FD en dietas aplicadas en ratas. Hoebler *et al.* (1998a) observaron un proceso de solubilización de FD mientras trabajaban con la digestión *in vitro* de tres tipos de fibra, cebada, caña y trigo. Ellos explican que durante la digestión gástrica, las condiciones de motilidad y pH pueden ser suficientes para solubilizar parcialmente algunos de los componentes de la fibra y que a nivel intestinal son removidos del material.

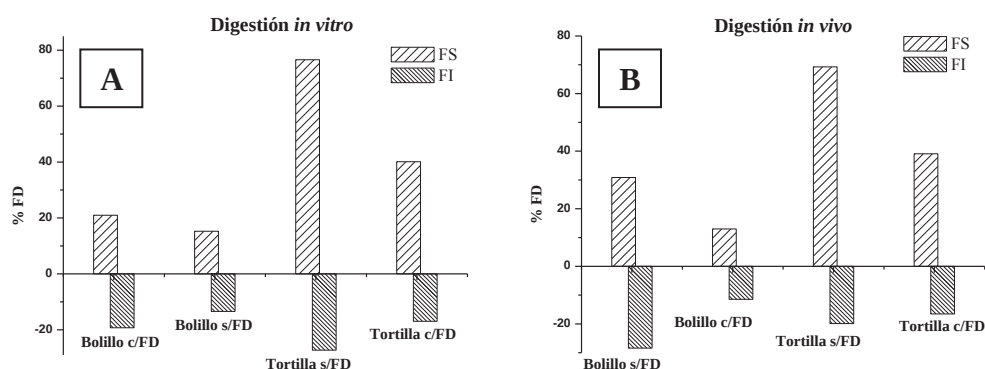


Fig. 7- Aumentos y disminuciones de % FS y FI durante ambos procesos de digestión.

Los valores máximos de AR provinieron de tortilla (Figura 8), esto coincide con la obtención de mayores valores de FS durante ambos procesos de digestión en las muestras de tortilla, lo que puede indicar que esta fracción de AR está siendo detectada como FS; este comportamiento coincide con Rendón-Villalobos *et al.* (2008) que encontró AR asociado a fibra durante la elaboración de tallarines adicionados con almidón de plátano y con Peñalver *et al.*, (2007) que trabajó con semillas de legumbres cocidas y encontró AR en un rango entre 3 y 7.2 % para semillas de diferentes fuentes. Por su parte, Kunkel y Seo (1994) estudiaron la digestibilidad *in vitro* de 10 polímeros, algunos utilizados como

fuentes de FD, y encontraron que el almidón, el colágeno y la seda fueron más de 10% digeridos, mientras la celulosa y sus derivados fueron digeridos en menos de 10%.

Por otra parte, el diferente comportamiento entre los dos alimentos puede deberse también a la estructura física de los alimentos. Hoebler *et al.* (1998b), Björck *et al.*, (1994) y Hoebler *et al.*, (2000) entre otros, han documentado ampliamente que la digestión es variable dependiendo de los alimentos en sí (textura, humedad, dureza, tamaño).

7.5 Almidón resistente

Durante la elaboración de los alimentos se llevan a cabo varios fenómenos que pueden modificar el contenido de fibra de los mismos. En el caso del bolillo y la tortilla, se parte de harinas que contienen aproximadamente 75% de almidón, este se hidrata durante el amasado y se calienta durante el cocido provocando la gelatinización del mismo, posteriormente, al enfriarse se produce la retrogradación de las cadenas para formar nuevas uniones que transforman el almidón de una forma digerible a una forma resistente a la digestión, el almidón resistente, incluida en la definición de fibra dietética (Cheung y Chau, 1998; Agama-Acevedo *et al.*, 2005; Peñalver *et al.*, 2007).

Los contenidos de AR tuvieron una amplia variación en cada uno de los alimentos (Figura 8), siendo en la tortillas sin y con FD de 3.3% y 1.8%, respectivamente, mientras en el bolillo sin y con FD fueron de 1% y 1.9%, respectivamente. El comportamiento de estos resultados es comprensible debido a que ha sido demostrado que la forma física de los alimentos tiene un efecto crítico en la velocidad y la extensión de la digestión del almidón (Hoebler *et al.*, 2000; Kong y Singh, 2008).

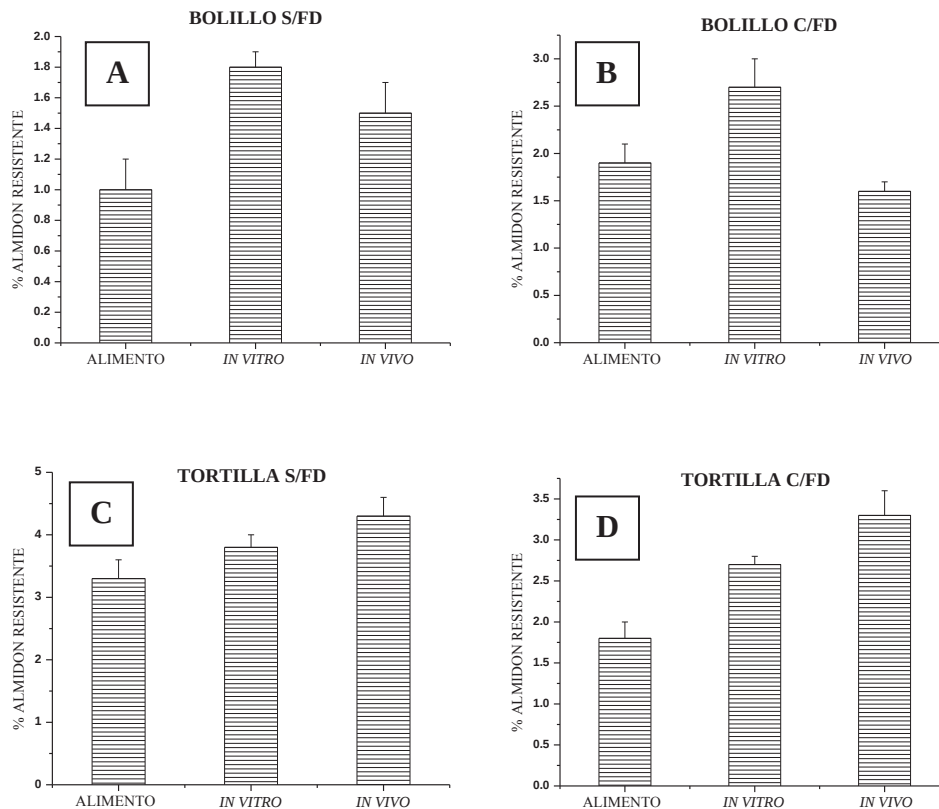


Fig. 8- Contenido de almidón resistente en los alimentos.
Antes y después de haber sido sometidos a ambos procesos de digestión.

Bello-Pérez y Paredes-López (2009) informan de modificaciones del almidón durante el calentado, durante la nixtamalización, el enfriado, el almacenado del alimento y el manejo post elaboración. Por otra parte, comentan también de que la producción de AR es un proceso complejo que involucra la fuente botánica del almidón, la proporción amilosa/amilopectina, la concentración del almidón, el pH, las temperaturas de cocinado y enfriamiento y la presencia de otros solutos (lípidos, sales, azúcares). Hoebler *et al.* (1998b) documentaron ampliamente la diferencia en el comportamiento durante la digestión de dos alimentos, pan y spaghetti, y concluyeron que la forma física de los alimentos es un factor que modifica el proceso de digestión. Bello-Pérez y Paredes-López (2009) mencionan valores de 1.99% para maíz, 2.18% para nixtamal y 3.12% para tortilla; Rendón-Villalobos *et al.*, (2008) obtuvieron 2.16% como valor máximo de AR en pasta y Bello-Pérez *et al.* (2004) reportaron 3.9% en galletas.

Por otra parte, en la Figura 8 se comparan los contenidos de AR para cada alimento antes y después de haber sido digeridos. En el caso del bolillo control (Figura 8A), se observó que el contenido de AR fue estadísticamente diferente únicamente en el caso del tratamiento *in vitro*, en el caso del bolillo con FD (Figura 8B), la diferencia significativa se presentó también en el tratamiento *in vitro*. Para la tortilla control la diferencia significativa se presentó solo para el tratamiento *in vitro* (Figura 8C), mientras para la tortilla con FD (Figura 8D), ambas digestiones dieron valores de AR significativamente diferentes al alimento sin digerir. Fäsler *et al.* (2006) reportaron un comportamiento similar al del bolillo (Figuras 8A y 8B) mientras realizaron ambas digestiones con almidón retrogradado de tapioca ($AR_{in vitro} = 61\%$ y $AR_{in vivo} 31\%$).

Los contenidos mayores de AR fueron encontrados en la tortilla (3.8% y 4.3%, 2.7% y 3.3% en los alimentos sin y con FD respectivamente) comparados contra el bolillo (1.8% y 1.5%, 2.7% y 1.6 % para los alimentos sin y con FD respectivamente), estos resultados pueden ser explicados por la anteriormente mencionada susceptibilidad del almidón a los cambios químicos. Puede suponerse que la diferencia en la tendencia de contenido de AR en ambos alimentos se debe a que el almidón de trigo usado para la elaboración del bolillo no es procesado de manera química, mientras el almidón de maíz sí. Puede pensarse que durante la nixtamalización el almidón se modifica de tal manera que se hace más susceptible para el ataque y la modificación por las enzimas, generando así mayores cantidades de AR.

La generación de AR por modificaciones enzimáticas ha sido ampliamente expuesta con anterioridad por Montes *et al.* (2008), Pongjanta *et al.* (2009) y Cairns *et al.* (1995), entre otros.

7.6 Difracción de rayos X

La información que nos arroja esta técnica corresponde al arreglo estructural de rango amplio, es decir, podemos analizar la estructura de la muestra como un conjunto de moléculas. La difracción de rayos X del bolillo sin FD nos muestra inicialmente lo que parece ser un patrón tipo A característico del almidón proveniente del almidón nativo de los tubérculos, sin embargo, el patrón parece estar recorrido. El corrimiento observado puede

deberse a que si bien, la muestra está principalmente compuesta de almidón, el compuesto no es totalmente puro (Rico *et al.*, 2007)(Figura 9). A pesar de que el almidón nativo de los cereales presenta un patrón característico tipo B, se ha reportado que, por retrogradación o algún otro proceso al que el almidón nativo sea sometido, los patrones pueden llegar a cambiar (Mun, S-H y Shin, M. 2006; Mondragón *et al.*, 2004).

El patrón tipo A tiene 5 picos como patrón característico en las longitudes 15°, ~17.3°, 18°, 20° y 23° (Corradinia *et al.*, 2007) y el patrón encontrado en la harina para la preparación del bolillo sin FD (TRIGO), tiene los mismos 5 picos, pero corridos, encontrándose a 17.94°, 19.8°, 20.94°, 23.18° y 26.81°.

Con la información obtenida de las gráficas y cristalinidades relativas (Figura 9 y cuadro 15) podemos darnos cuenta que en las muestras de PB (pan sin FD), APB (residuo de la digestión *in vitro*) y RTPB (residuo de la digestión *in vivo*) se modifica el arreglo inicial que tenía la harina, sin embargo, a pesar de que podríamos pensar que se pierde el orden cristalino debido a que se pierde la intensidad de los picos, los datos de cristalinidad nos indican que existe un grado de ordenamiento que disminuye en PB y APB comparados con la harina inicial, pero que aumenta durante el proceso de digestión *in vivo*. Podemos entonces pensar que la serie de reacciones enzimáticas a las que es sometido el alimento durante la digestión en animales de experimentación causan un ordenamiento que en difracción de rayos X se ve representado como un aumento en el índice de cristalinidad relativa. Varios autores han demostrado que es posible lograr reordenamientos moleculares por medio de reacciones enzimáticas y producir almidones resistentes con un grado de polimerización ~30 (Htoon *et al.*, 2010; Pongjanta *et al.*, 2009; Hoover & Zhou, 2003; Mun, S-H y Shin, M. 2006).

Por otro lado, es evidente por la pérdida de intensidad de picos, que las nuevas estructuras, aunque presentan cierto grado de ordenamiento, son estructuras débiles (Htoon *et al.*, 2009).

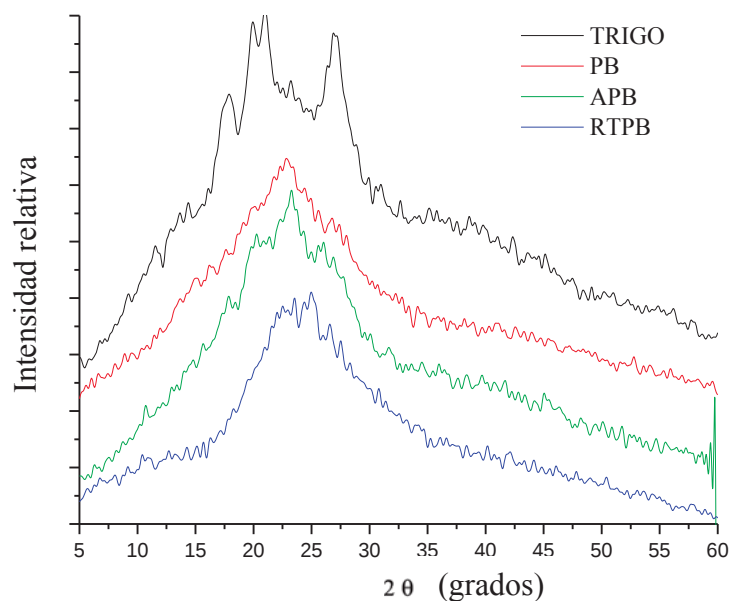


Fig. 9- Patrón de difracción de rayos X de bolillo sin FD.
 FD- Fibra dietética. TRIGO-Harina de trigo para panificación marca Selecta®. PB- Bolillo sin FD. APB- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPB- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

Cuadro 15- Cristalinidades Relativas de bolillo sin FD.

MUESTRA	% CRISTALINIDAD RELATIVA
TRIGO	9.65071353
PB	7.89863495
APB	7.71931512
RTPB	9.78851364

En el caso del pan con FD tenemos el mismo comportamiento que observamos anteriormente, donde la harina usada inicialmente nos muestra lo que parece un típico patrón de difracción tipo A recorrido en 17.94°, 19.87°, 20.94°, 23.18° y 26.81°. En la Figura 10 se observa también que existe una pérdida de la estructura inicial, pero que no por eso se pierde el ordenamiento, únicamente puede detectarse un reordenamiento que conlleva a que la estructura cambie su cristalinidad relativa a través de cada proceso (Cuadro 18).

Al igual que en el caso del bolillo se observa que la cristalinidad se eleva del alimento (8.064%) al alimento procesado con la digestión *in vivo* (8.731%).

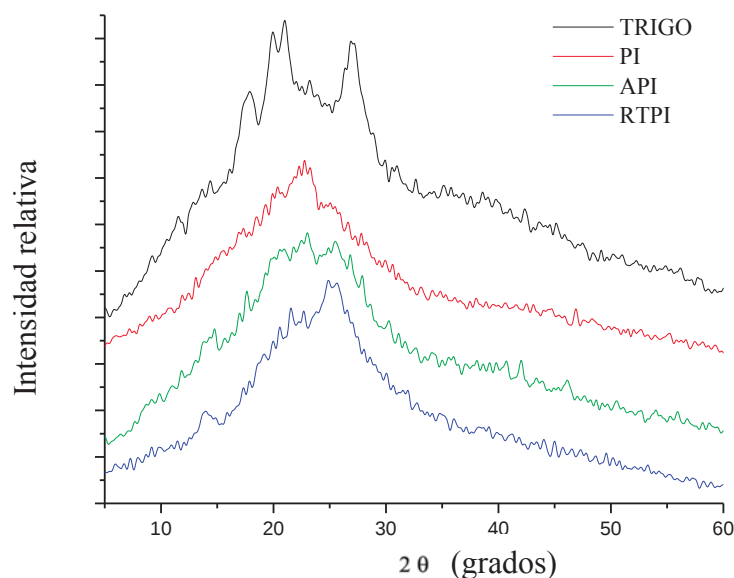


Fig. 10- Patrón de difracción de rayos X de bolillo con FD.
FD- Fibra dietética. TRIGO- Harina de trigo para panificación marca Selecta® PI- Bolillo con FD. API- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPI- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

Cuadro 16- Cristalinidades relativas del bolillo con FD.

MUESTRA	% CRISTALINIDAD RELATIVA
TRIGO	9.97456519
PI	8.06476691
API	6.29972002
RTPI	8.73178709

Para la tortilla sin FD el patrón de difracción de harina inicial es completamente diferente al patrón de la harina usada para la elaboración de los bolillos. Esta harina no tiene ningún patrón característico, pueden ser diferenciados un conjunto de picos en el segmento de 20.78° a 24.88°, pero no pertenecen a ningún patrón previamente descrito.

En la Figura 11 se observa que todas las muestras presentan características diferentes. Se evidencia un cambio en la estructura de cada una de las muestras debido a que se presentan diferentes tipos de gráficas, en el caso de la harina usada para la

fabricación de las tortillas (MAIZ) no se observa ningún pico que sobresalga de los demás, en TB (tortilla sin FD) se observa principalmente un pico en 22.9° , en el caso de ATB (residuo de digestión *in vitro*) se muestran dos picos intensos, uno en 19.58° y el otro en 23.17° y en el caso de RTTB (residuo de digestión *in vivo*) se vuelve a mostrar un patrón parecido al de la harina inicial, pero recorrido hacia la derecha, presentando picos en el rango de 22.1° a 24.8° . Se ve entonces un reacomodo estructural en cada una de los procesos.

En el Cuadro 19 encontramos nuevamente el valor de cristalinidad relativa mayor en la muestra que proviene de la digestión *in vivo*, que aunque no parece tener picos de difracción muy prominentes, logra un valor de cristalinidad mayor al de MAIZ, TB y ATB.

El valor de cristalinidad relativa de RTTB proveniente de una gráfica que no presenta un patrón de difracción definido nos da la pauta para pensar que la estructura del almidón presenta un arreglo poco estable, esta información coincide con la información que se obtuvo con las técnicas de DSC y FTIR.

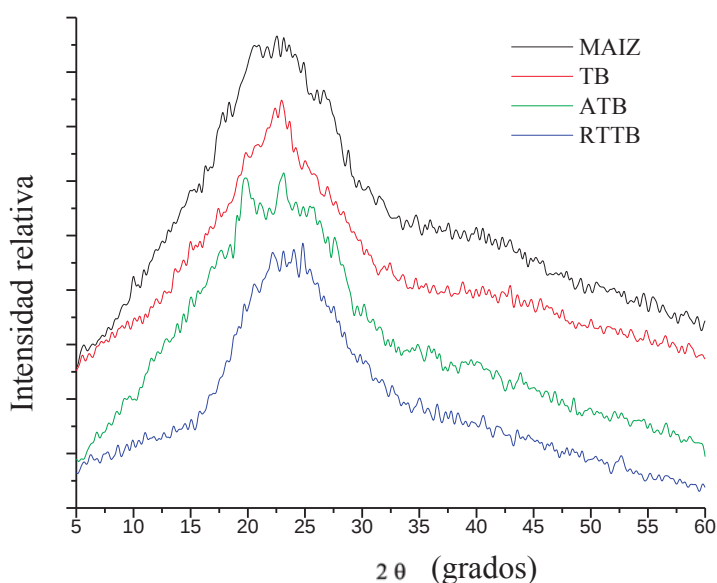


Fig. 11- Patrón de difracción de rayos X de tortilla sin FD.
FD- Fibra dietética. MAIZ-Harina de maíz nixtamalizado para elaboración de tortillas marca Maseca®. TB-Tortilla sin FD. ATB- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTTB- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

Cuadro 17- Cristalinidades relativas de tortilla sin FD.

MUESTRA	% CRISTALINIDAD RELATIVA
MAIZ	8.16428151
TB	8.65536516
ATB	8.08656783
RTTB	10.8203252

Para la muestra de tortilla con FD podemos observar que en la Figura 12 se muestra la falta de patrón característico en el caso de la harina, y también en el resto de las muestras. Al igual que en las gráficas anteriores, podemos deducir que existe un reordenamiento estructural y el valor de la cristalinidad relativa más alto está proporcionado nuevamente por la muestra proveniente del proceso *in vivo* (RTTI) (Cuadro 20). Podemos pensar que el proceso de digestión *in vivo* realiza un ordenamiento molecular que forma nuevos enlaces, pero débiles. Esta suposición es apoyada por los resultados que se obtuvieron de los análisis de DSC y de FTIR, donde se observa que el almidón inicial (MAIZ) se reordena formando una estructura débil e inestable. Similarmente, Fässler *et al.* (2006) reporta una secuencia de patrones en una muestra de AR digerida de manera *in vitro* e *in vivo* donde se nota una pérdida de picos durante ambos procesos, comparados con el patrón del almidón inicial, sin embargo, en ese caso, fue observada una mayor pérdida de cristalinidad durante el proceso *in vivo*. Este resultado puede deberse a que el ensayo *in vivo* llevado a cabo por este grupo de investigadores fue realizado en pacientes ileostómicos y no en ratas, y el impacto de ambas digestiones *in vivo* es diferente en cuanto al ataque en almidones.

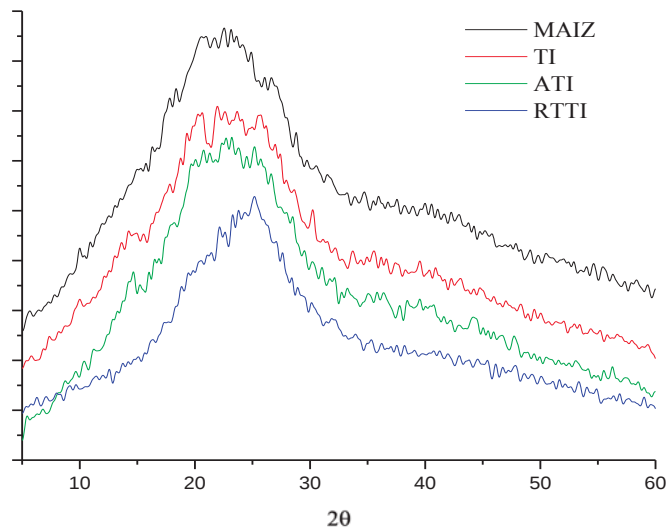


Fig. 12- Patrón de difracción de rayos X de tortilla con FD.
FD- Fibra dietética. MAIZ-Harina de maíz nixtamalizado para elaboración de tortillas marca Maseca®. TI-Tortilla con FD. ATI- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTTI- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

Cuadro 18- Cristalinidades relativas de tortilla con FD.

MUESTRA	% CRISTALINIDAD RELATIVA
MAIZ	7.66983447
TI	8.34633542
ATI	8.12999659
RTTI	11.1045638

Los valores de cristalinidad relativa obtenidos en los productos elaborados a partir de harina maíz fueron menores a los de los productos basados en harina de trigo, por su parte, Fässler *et al.* (2006) también reportan valores de cristalinidad relativa menores en almidones de maíz de alta amilosa comparados contra maltodextrinas de tapioca retrogradada.

7.7 Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier

(FTIR)

La información obtenida de esta técnica corresponde al arreglo de rango corto de las moléculas de la muestra, es decir, nos brinda datos de la presencia de enlaces y su comportamiento con la radiación Infrarroja. En este caso es observado principalmente el almidón, que es el principal componente de la muestra que fue analizada.

Para la serie de muestras del almidón proveniente del bolillo sin FD se observaron 12 bandas. En el Cuadro 21 se muestra un resumen de la ubicación y señalización de las bandas. En la Figura 13 se observan principalmente cambios en las bandas 3003, 1582, 1481, 956, 875 y 818 cm^{-1} .

Se observa una reducción de la banda 3003 cm^{-1} que nos indica la disminución de los modos de estiramiento simétricos de grupos CH_2 durante ambos procesos de digestión, lo cual puede sugerirnos una pérdida de OH en los grupos funcionales $\text{CH}_2\text{-OH}$ y un reordenamiento con una posible formación de nuevos enlaces intermoleculares α -(1, 6). La disminución de la banda 1582 cm^{-1} nos indica una pérdida de OH por posible formación de nuevos enlaces que impiden la vibración de los grupos. La banda 1481 cm^{-1} está relacionada con la cristalinidad (Cuadro 19). Esta banda nos indica la vibración de CH_2 y mientras más intenso es el pico, nos da la señal de mayor libertad de movimiento, por lo tanto, nos da los indicios de que se trata de una estructura menos organizada o amorfa. La señal de esta banda no es muy clara en las primeras tres muestras, sin embargo, es claro que RTPB tiene la estructura más organizada por tener la intensidad menor, en concordancia con los resultados obtenidos por medio de la técnica de difracción de rayos X, donde RTPB tuvo el valor más alto de cristalinidad relativa de la serie con 9.78%.

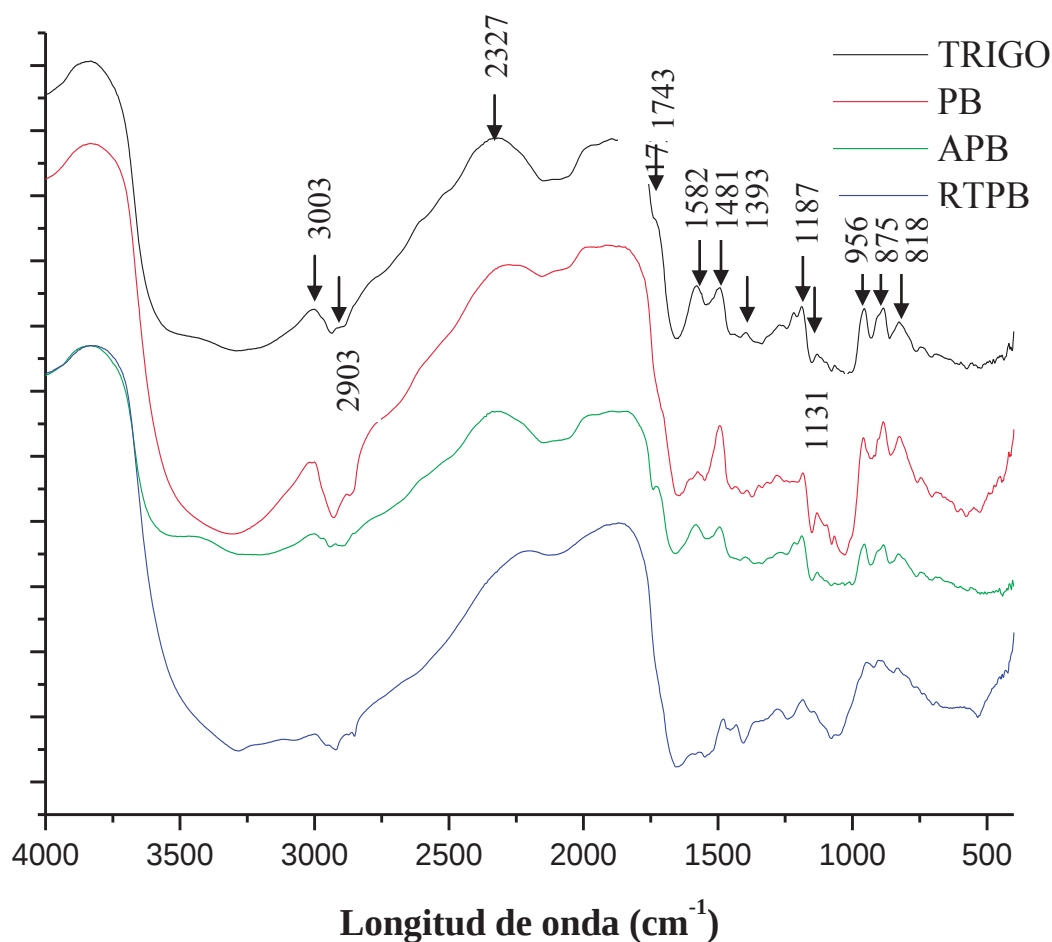


Fig. 13- Espectro de FTIR de bolillo sin FD.
 FD- Fibra dietética. TRIGO-Harina de trigo para panificación marca Selecta®. PB-Bolillo sin FD. APB- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPB- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

Pueden también observarse diferencias en la banda 1131 cm^{-1} que es sensible a los cambios de conformación y evidentes disminuciones de intensidad en las bandas 956, 875 y 818 referentes a los anillos de fructosa. La disminución en estas bandas nos refleja la desaparición de anillos y enlaces glucosídicos, siendo el proceso *in vivo* el más agresivo con la estructura. Los daños estructurales evidenciados en esta técnica son acordes con los observados con la técnica de DSC.

Cuadro 19- Bandas correspondientes al espectro de FTIR de bolillo sin FD.

FRECUENCIA EXPERIMENTAL (cm ⁻¹)	FRECUENCIA TEORICA* (cm ⁻¹)	GRUPO FUNCIONAL	ASIGNACIÓN
3003 y 2903	2990-2900	-CH ₂ -OH	Estiramiento asimétrico de CH ₂
2327	2300-2000	H ₂ O	Señal ancha tipo meseta indicación de presencia de agua.
1743	1750-1725	Celulosa	Estiramiento de C=O.
1582	1635-1600	Celulosa	O-H vibración de deformación.
1481	1480-1435	Celulosa	Vibración de deformación CH ₂ Intensidad afectada por el grado de cristalinidad.
1393	1480-1410	-CH ₂ -OH	CH ₂ vibración de deformación.
1187, 1131	1150-1075	CH-OH	Estiramiento de C-O, Frecuentemente en bandas múltiples sensible a cambios conformacionales.
956	960-730	Carbohidratos	Deformaciones CH enlaces glicosídicos.
875	890-870	Carbohidratos	CH Deformación vibración ecuatorial.
818	~815	Carbohidratos	Alargamiento simétrico de los anillos.

*Ramesh *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2007; Mondragón *et al.*, 2006; Dragunski and Pawlicka, 2001.

En la serie de muestras del bolillo con FD se observan cambios principalmente en las bandas 3016, 1588, 1488, 949, 875 y 818 cm⁻¹ (Figura 14).

Se observa una disminución en la banda 3016 cm⁻¹ que es indicador de una reducción de grupos OH que nos puede sugerir un reordenamiento de la molécula, como lo sugieren también los resultados de difracción de RX. Es notable una menor disminución de la señal de estiramiento CH₂-OH en comparación con el bolillo sin FD, lo que nos puede indicar menor grado de reordenamiento, además de que existe cierto indicio de hidrólisis.

Respecto a la señal de vibración de deformación de la banda 1588 cm⁻¹, se observa en general, menor pérdida de señal a través de los procesos en el bolillo con FD comparado

con el sin FD. Respecto a la proporción de cristalinidad que nos da la banda 1488, la muestra RTPI sigue mostrando una estructura que presenta mucho impedimento para mover los CH₂. Estos resultados coinciden con los encontrados por medio de la técnica de difracción de rayos X que muestran un mayor arreglo en RTPI con un valor de cristalinidad relativa de 8.73% que es mayor a la del alimento y a la del alimento digerido *in vitro*.

El daño a la estructura de los anillos se observa como una disminución de las bandas 949, 875 y 818. Puede notarse un proceso de hidrólisis que es más evidente en la muestra RTPI al igual que para el bolillo sin FD. El daño a la estructura pudo también ser observado por medio de la técnica de DSC.

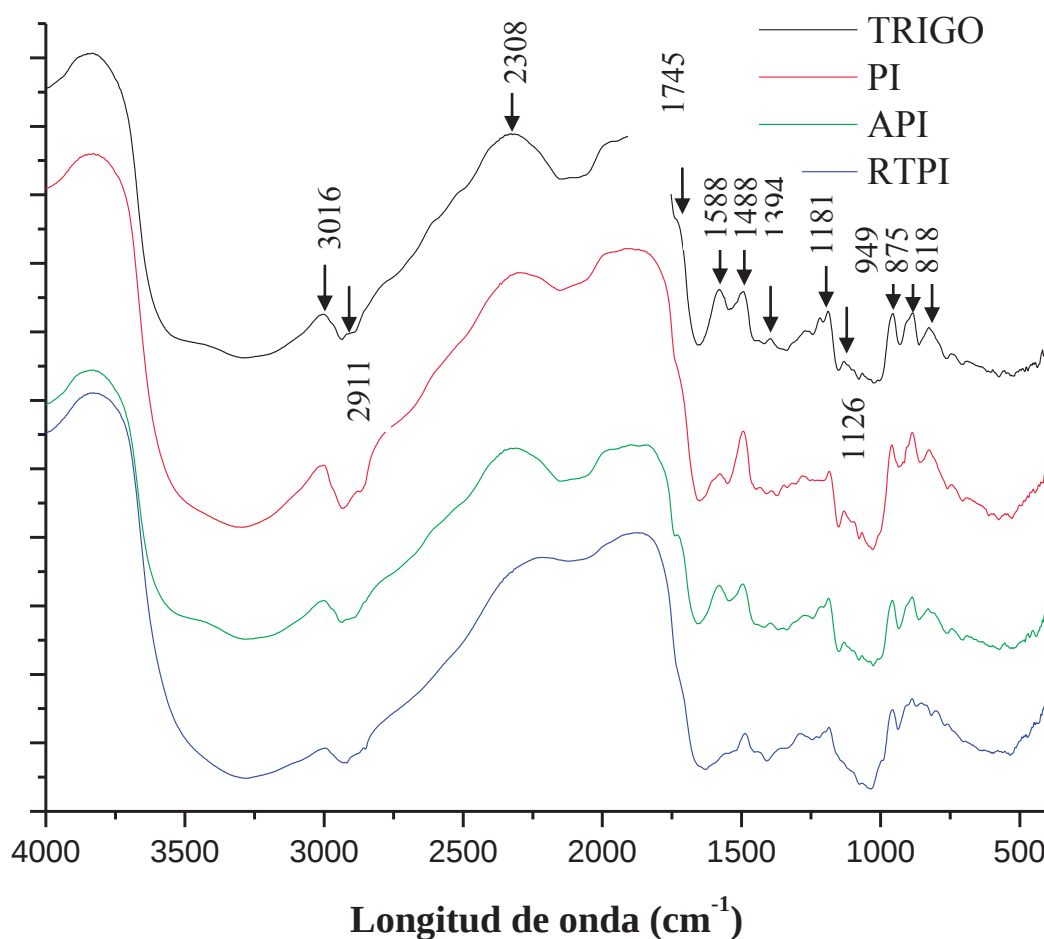


Fig. 14- Espectro de FTIR de bolillo con FD.
 FD- Fibra dietética. TRIGO-Harina de trigo para panificación marca Selecta®.
 PI-Bolillo con FD. API- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPI-
 Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

Cuadro 20- Bandas correspondientes al espectro de FTIR de bolillo con FD.

FRECUENCIA EXPERIMENTAL (cm ⁻¹)	FRECUENCIA TEORICA* (cm ⁻¹)	GRUPO FUNCIONAL	SEÑAL
3016 y 2905	2990-2900	-CH ₂ -OH	Estiramiento asimétrico de CH ₂
2308	2300-2000	H ₂ O	Señal ancha tipo meseta indicación de presencia de agua.
1745	1750-1725	Celulosa	Estiramiento de C=O.
1588	1635-1600	Celulosa	O-H vibración de deformación.
1488	1480-1435	Celulosa	Vibración de deformación CH ₂ con intensidad afectada por el grado de cristalinidad.
1394	1480-1410	-CH ₂ -OH	CH ₂ vibración de deformación.
1181, 1126	1150-1075	CH-OH	Estiramiento de C-O, Frecuentemente en bandas múltiples, sensible a cambios conformacionales.
949	960-730	Carbohidratos	Deformaciones CH enlaces glicosídicos.
875	890-870	Carbohidratos	CH Deformación vibración ecuatorial.
818	~815	Carbohidratos	Alargamiento simétrico de los anillos.

*Ramesh *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2007; Dumoulin *et al.*, 1998; Mondragón *et al.*, 2006; Guerra-DellaValle, 2008; Mano *et al.*, 2003; Dragunski and Pawlicka, 2001.

En la serie de espectros de la tortilla sin FD se observan 12 bandas y pueden verse cambios notorios solo en 7 de ellas (Figura 15 y Cuadro 20).

Se muestra una disminución importante en la intensidad de la banda 3016 correspondiente a los estiramientos CH₂ asimétricos de los grupos funcionales CH₂-OH en las muestras que han sido digeridas con ambos tipos de digestión, lo que sugiere un reacomodo estructural durante las digestiones y la posible formación de enlaces α -(1,6).

Es notable también la aparición de la banda 1720 únicamente en el almidón de MAIZ y en la muestra proveniente de la digestión *in vitro*, mientras en el alimento y el

residuo de digestión *in vivo*. La reducción de la banda 1583 indica una pérdida de vibración OH debido a una posible formación de nuevos enlaces que impiden la deformación.

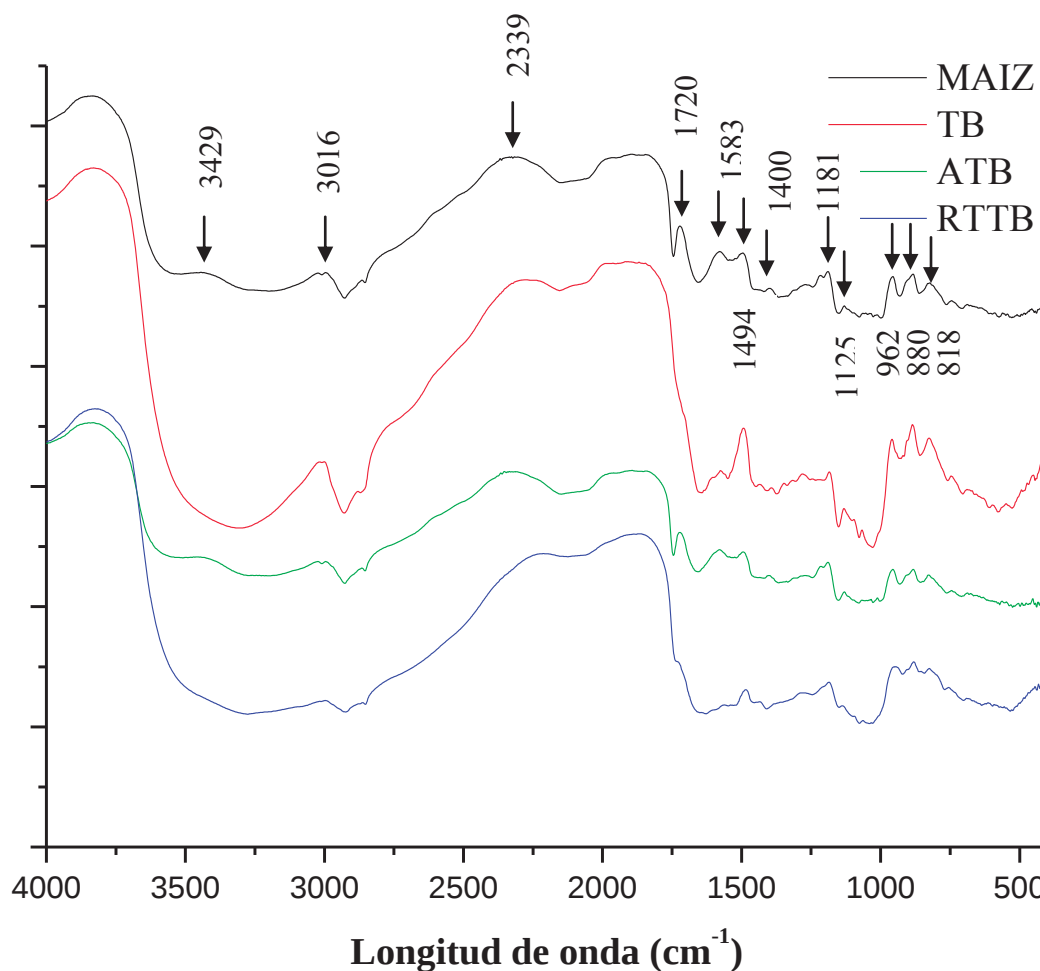


Fig. 15- Espectro de FTIR de tortilla sin FD.
FD- Fibra dietética. MAIZ-Harina de maíz nixtralizado para elaboración de tortillas marca Maseca®. TB-Tortilla sin FD. ATB- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPB- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

Por otra parte, la banda 1494 cm^{-1} relativa a la cristalinidad indica un arreglo mayor en la muestra que ha sido digerida de manera *in vivo*, ya que es la que representa más impedimento para vibrar.

Estos resultados pudieron ser verificados mediante la técnica de difracción de rayos X donde RTTB obtuvo el valor mayor de cristalinidad relativa (10.82%). Las bandas 962, 880 y 818 referentes a los anillos indican una pérdida de estos durante las digestiones como

reflejo del proceso de hidrólisis. Los desarreglos estructurales pudieron ser monitoreados también por medio de la técnica de DSC.

Cuadro 21- Bandas correspondientes al espectro de FTIR de tortilla sin FD.

FRECUENCIA EXPERIMENTAL (cm ⁻¹)	FRECUENCIA TEORICA* (cm ⁻¹)	GRUPO FUNCIONAL	SEÑAL
3429	3580-3200	O-H	Estiramiento de grupos OH. Enlaces intermoleculares. Bandas amplias independientes de la concentración.
3016	2990-2900	-CH ₂ -OH	Estiramientos asimétricos CH ₂ .
2872	2935-2840	-CH ₂ -OH	Estiramientos simétricos CH ₂ .
2339	2300-2000	H ₂ O	Señal ancha tipo meseta.
1720	1750-1725	Celulosa	Estiramientos C=O.
1583	1635-1600	Celulosa	Deformación OH, Banda ancha.
1494	1480-1435	Celulosa	Vibración de deformación CH ₂ con intensidad afectada por el grado de cristalinidad.
1181, 1125	1150-1075	CH-OH	Acortamiento C-O. frecuentemente presenta bandas múltiples sensibles a cambios conformacionales.
962	960-730	Carbohidratos	Deformación de carbohidratos.
880	890-870	Carbohidratos	CH vibración de deformación ecuatorial
818	~815	Carbohidratos	Alargamiento simétrico del anillo.

*Ramesh *et al.*, 2007; Hernandez *et al.*, 2007; Ruiz, 2006; Mondragón *et al.*, 2006; Dave *et al.*, 1997 Dragunski and Pawlicka, 2001.

En el cuadro 22 se resumen las 12 bandas presentes en el espectro de la tortilla con FD. En la Figura 16 se puede observar una disminución en la banda 3013 muy similar al del observado en el espectro de la tortilla sin FD, que nos indica una disminución de los estiramientos CH₂ de los grupos funcionales de alcoholes secundarios por la posible

formación de enlaces α -(1, 6) y la reconfiguración estructural de la molécula. La banda 1720 se muestra únicamente en MAIZ (harina) y ATI (residuo de digestión *in vitro*) y pueden observarse picos un poco más definidos que los observados en la tortilla sin FD. La disminución de la banda 1582 nos indica una pérdida de OH por posible formación de nuevos enlaces que impiden la vibración de los grupos. La banda 1485 está relacionada con la cristalinidad. Esta banda nos indica la vibración de CH_2 y mientras más intenso es el pico, nos da la señal de mayor libertad de movimiento, por lo tanto, nos da los indicios de que se trata de una estructura menos organizada o amorfa. Las bandas 1582 y 1485 presentan un comportamiento similar al de los demás espectros analizados, sin embargo, se observa una mayor definición de los picos en los espectros provenientes de los bolillos.

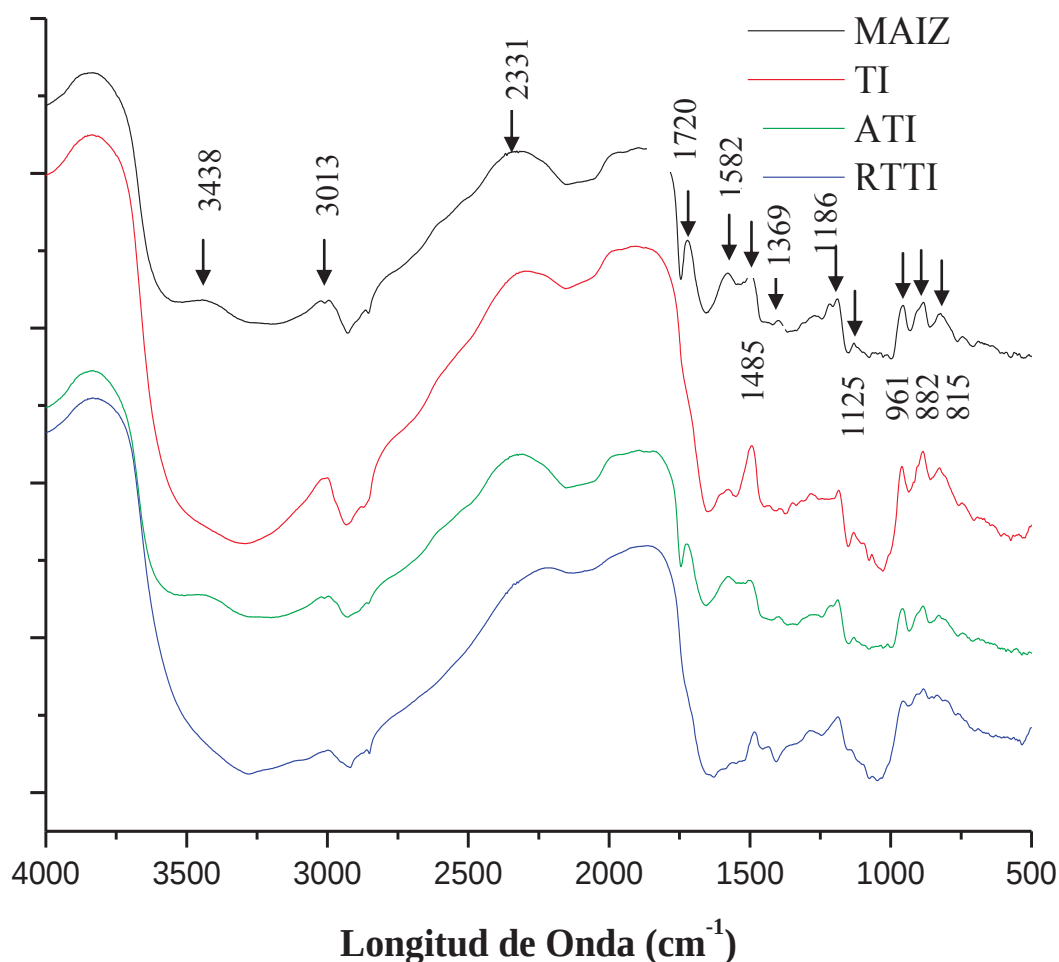


Fig. 16- Espectro de FTIR de tortilla con FD.
FD- Fibra dietética. MAIZ-Harina de maíz nixtamalizado para elaboración de tortillas marca Maseca®. TI-Tortilla sin FD. ATI- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPI- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

La banda 1485 relativa al grado de cristalinidad nos muestra claramente que la estructura con mayor grado de cristalinidad pertenece a la muestra RTTI (residuo de digestión *in vitro*), y este resultado fue obtenido también mediante difracción de rayos X, donde 11.10% fue el valor de cristalinidad relativa obtenido para RTTI como mayor de la serie. El fenómeno de hidrólisis se ve reflejado en una disminución de las bandas 961, 882, 815 y este daño pudo también ser observado con la técnica de DSC.

Cuadro 22- Bandas correspondientes al espectro de FTIR de tortilla con FD.

FRECUENCIA EXPERIMENTAL (cm ⁻¹)	FRECUENCIA TEORICA* (cm ⁻¹)	GRUPO FUNCIONAL	SEÑAL
3438	3580-3200	O-H	Estiramiento de grupos OH. Enlaces intermoleculares. Bandas amplias independientes de la concentración.
3013	2990-2900	-CH ₂ -OH	Estiramientos asimétricos CH ₂ .
2872	2935-2840	-CH ₂ -OH	Estiramientos simétricos CH ₂ .
2331	2300-2000	H ₂ O	Señal ancha tipo meseta.
1720	1750-1725	Celulosa	Estiramientos C=O.
1582	1635-1600	Celulosa	Deformación OH, Banda ancha.
1485	1480-1435	Celulosa	Vibración de deformación CH ₂ con intensidad afectada por el grado de cristalinidad.
1186, 1125	1150-1075	CH-OH	Acortamiento C-O. Frecuentemente presenta bandas múltiples, sensible a cambios conformacionales.
961	960-730	Carbohidratos	Deformación de carbohidratos.
882	890-870	Carbohidratos	CH vibración de deformación ecuatorial.
815	~815	Carbohidratos	Alargamiento simétrico del anillo.

*Ramesh *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2007; Ruiz, 2006; Mondragón *et al.*, 2006; Dave *et al.*, 1997; Dragunski and Pawlicka, 2001.

7.8 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Esta técnica, al igual que la difracción de rayos X, nos brinda información de cambios del arreglo de rango amplio de la molécula, es decir, nos da un panorama de la estructura de un conjunto de moléculas en la muestra. En el cuadro 25 se muestran las propiedades térmicas del bolillo sin FD, se puede observar que la entalpía de fusión de la harina de la cual se partió (5.28 J/g) disminuyó notablemente (0.8 J/g) al elaborar el alimento.

En la figura 17 para APB y RTPB existe ausencia de datos debido a que no pudo detectarse ningún proceso de fusión o gelatinización, lo que sugiere que la gelatinización de la muestra se había completado en estos puntos o que la entalpía de fusión de los cristales remanentes fue muy débil para ser detectada por esta técnica (Htoon *et al.*, 2010). El efecto del procesamiento fue importante, pero el efecto de los procesos de digestión fue aún más. La desorganización de los componentes del almidón y la ruptura de los gránulos durante estas modificaciones son responsables de este comportamiento (Guerra-DellaValle *et al.*, 2008).

Cuadro 23- Propiedades térmicas del bolillo sin FD.

	AH (J/g)	Ti (°C)	Tp (°C)	Tf (°C)
TRIGO	5.28	58.56	63.57	70.32
PB	0.8	79.05	89.62	98.08
APB	-	-	-	-
RTPB	-	-	-	-

Ti- Temperatura inicial. Tp- Temperatura del pico. Tf- Temperatura final. FD- Fibra dietética. TRIGO-Harina de trigo para panificación marca Selecta®. PB-Bolillo sin FD. APB- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPB- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

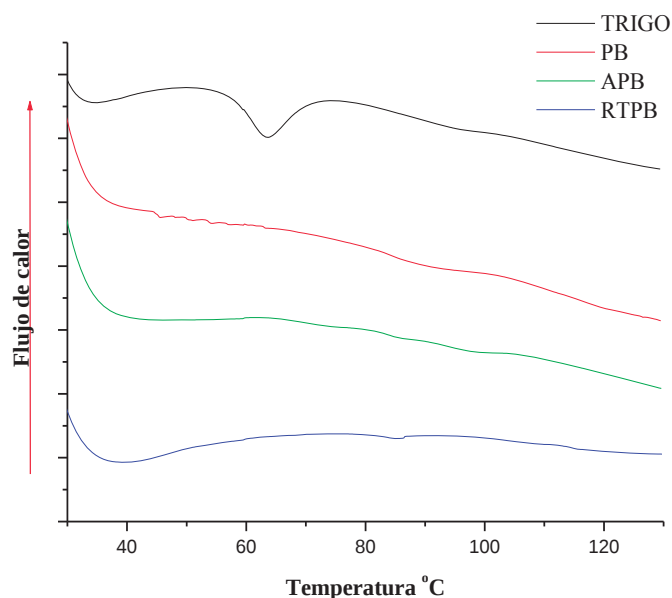


Fig. 17- Termogramas DSC de bolillo sin fibra.
FD- Fibra dietética. TRIGO-Harina de trigo para panificación marca Selecta® PB- Bolillo sin FD. APB- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPB- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

El bolillo con FD es el único alimento en el cual la técnica DSC pudo detectar todas las muestras (Figura 18 y Cuadro 26) y puede observarse claramente que la entalpía de la harina de la cual se partió disminuyó drásticamente, indicando que la estructura fue debilitada, y por lo tanto la energía para causar el proceso de fusión fue muy baja en comparación a la estructura inicial. Los valores de entalpía *in vitro* e *in vivo* en esta muestra (0.46 J/g y 1.02 J/g respectivamente) son contrarios a los reportados por Fässler *et al.* (2006) quienes encuentran un valor menor en almidones de maíz y tapioca digeridos *in vivo* comparados a los digeridos *in vitro* (5.2 J/g y 10.8 J/g respectivamente).

Cuadro 24- Propiedades térmicas del bolillo con FD.

	AH (J/g)	Ti	Tp	Tf
TRIGO	5.28	58.56	63.57	70.32
PI	0.45	79.02	86.25	92.98
API	0.46	86.18	95.76	101.36
RTPI	1.02	76.56	83.61	88.96

Ti- Temperatura inicial. Tp- Temperatura del pico. Tf- Temperatura final. FD- Fibra dietética. TRIGO-Harina de trigo para panificación marca Selecta®. PI-Bolillo con FD. API- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPI- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

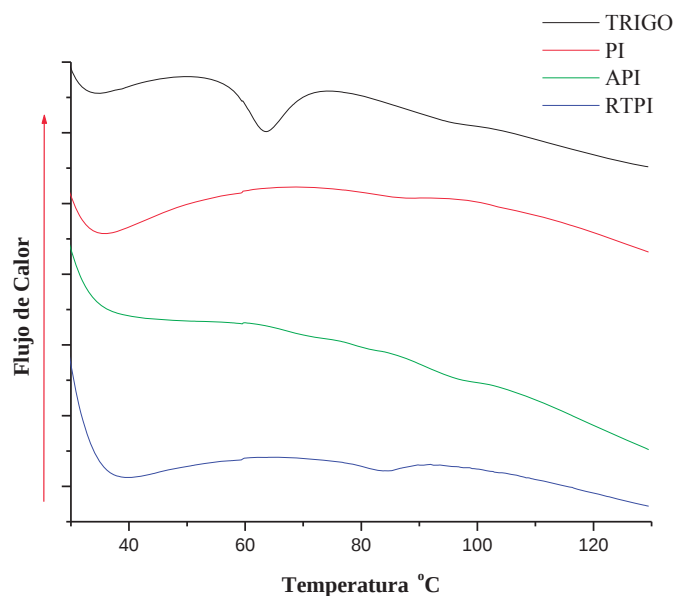


Fig. 18- Termogramas DSC de bolillo con FD. FD- Fibra dietética. TRIGO-Harina de trigo para panificación marca Selecta®. PI-Bolillo con FD. API- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPI- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

Los análisis de la tortilla con y sin FD fueron similares (Cuadro 27 y 28), en ambos solo se pudieron detectar las propiedades térmicas de la harina de la cual se partió para hacer el alimento, y este valor (1.31 J/g) es bajo comparado con el de la harina de la cual se partió para hacer el bolillo (5.28 J/g), por lo tanto, es de esperarse que si la estructura no era ya muy fuerte, al ser procesada se perdiera la capacidad de encontrar cierta cristalinidad en la muestra que permitiera detectar un cambio de fase.

Cuadro 25- Propiedades térmicas de la tortilla sin FD.

	AH (J/g)	Ti	Tp	Tf
MAIZ	1.31	61.82	71.08	82.9
TB	-	-	-	-
ATB	-	-	-	-
RTTB	-	-	-	-

Ti- Temperatura inicial. Tp- Temperatura del pico. Tf- Temperatura final. FD- Fibra Dietética. MAIZ- Harina nixtamalizada MASECA®. TB- Tortilla sin FD. ATB-Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTTB- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

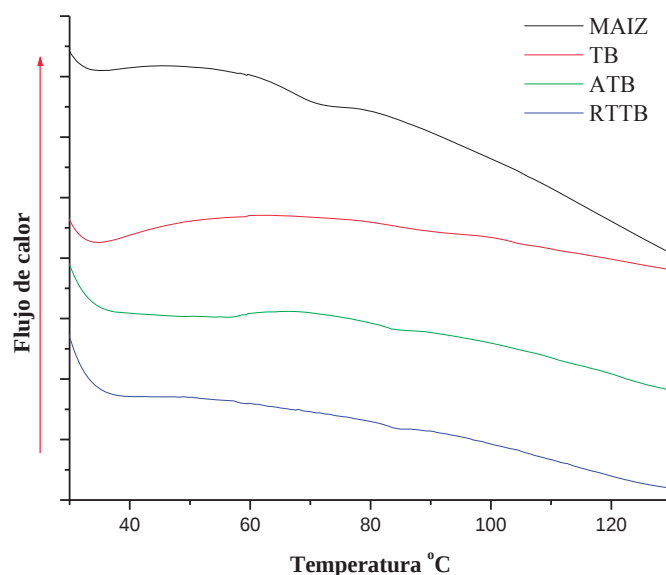


Fig. 19- Termogramas DSC de tortilla sin FD.
FD- Fibra dietética. MAIZ-Harina de maíz nixtamalizado para elaboración de tortillas marca Maseca®. TB-Tortilla sin FD. ATB- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPB- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

El termograma DSC de la tortilla con FD está también incompleto (Figura 20), podemos darnos cuenta que TI, ATI y RTTI no pudieron experimentar un proceso de gelatinización porque ya estaban gelatinizados.

Cuadro 26- Propiedades térmicas de la tortilla con FD.

	AH (J/g)	Ti	Tp	Tf
MAIZ	1.31	61.82	71.08	82.9
TI	-	-	-	-
ATI	-	-	-	-
RTTI	-	-	-	-

Ti- Temperatura inicial. Tp- Temperatura del pico. Tf- Temperatura final. FD- Fibra dietética. MAIZ-Harina de maíz nixtamalizado MASECA®. TB-Tortilla sin FD. ATB- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPB- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

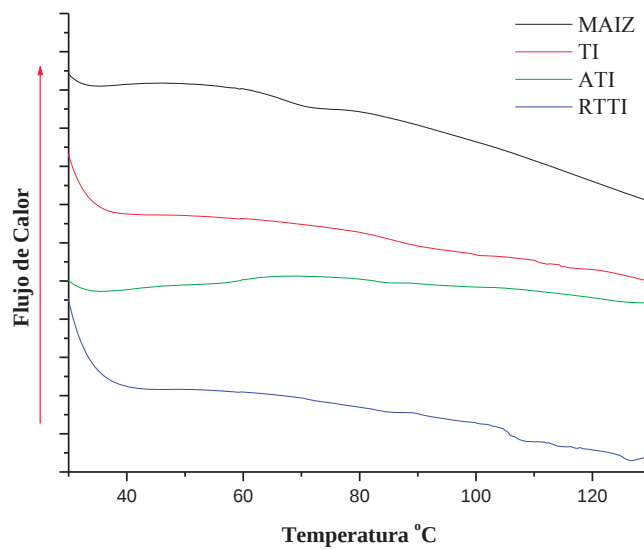


Fig. 20- Termogramas DSC de tortilla con FD.
 FD- Fibra dietética. MAIZ-Harina de maíz nixtramalizado para elaboración de tortillas marca MASECA®. TI-Tortilla sin FD. ATI- Muestra proveniente de digestión *in vitro*. RTPI- Muestra proveniente de digestión *in vivo*.

8 CONCLUSIONES

En este trabajo se muestra el cambio en la proporción de ambos tipos de FD durante el proceso de digestión, tanto *in vitro*, como *in vivo*. Se observó que una parte de la proporción de FI se hace soluble, aportando una mayor cantidad de sustrato fermentable al colon y a su flora.

Por otro lado, se muestra también la evidencia de una elevación del contenido de AR durante los procesos de digestión y una modificación estructural del almidón a nivel gástrico. Esta información pudo ser corroborada por las técnicas de determinación resistente, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X y espectrofotometría de IR medio.

El aumento del contenido de AR durante el proceso de digestión, nos indica que las enzimas involucradas en los procesos de digestión tienen el potencial de causar un reacomodo estructural en la estructura del almidón que lo hace aumentar su resistencia al ataque de enzimas. Podemos pensar que este reacomodo se verá reflejado en el sustrato disponible para la fermentación a nivel colónico con los beneficios que esto conlleva.

9 REFERENCIAS

- AACC. 2002. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists** 10th ed. The Association, St. Paul, MN.
- AACC report. 2001. The definition of Dietary Fiber. *Cereal Foods World* 46(3): 112-126.
- Acevedo, E., y Bressani, R. 1990. **Contenido de fibra dietética de alimentos centroamericanos.** *Arch Lat Amer Nutr* 40:439-451.
- Agama-Acevedo, E., Rendon-Villalobos, R., y Tovar, J. 2005. **Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de almidón resistente y la tasa de digestión in vitro de tortillas elaboradas con masas comerciales de maíz.** *Arch Latinoam Nutr.* 55(1):86-92.
- Aldoory, Walid., and Ryan-Harshman, M. 2002. **Preventing diverticular disease.** *Can Fam Physician* 48: 1632-1637.
- Akerberg, A. K. E., Liljeberg, H. G. M., Granfeldt, Y. E., Drews, A. W. and Björck, I. M. E. 1998. **An in vitro Method, Based on Chewing, to Predict Resistant Starch Content in Foods Allows Parallel Determination of Potentially Available Starch and Dietary Fiber.** *J Nutr* 128: 651-660.
- Aparicio-Saguilán, A., Sáyago-Ayerdi, S. G., Vargas-Torres, A., Tovar, J., Ascencio-Otero, T. E., and Bello-Pérez, L. A. 2007. **Slowly digestible cookies prepared from resistant starch-rich lintnerized banana starch.** *J Food Comp Anal* 20: 175-181.
- Asp, N-G. 1992. **Resistant Starch.** *Eur J Clin Nutr* 46 Suppl 2:1
- Asp, N-G., An Amelsvoort, J. M. M., and Hautvas, J. G. A. J. 1996. **Nutritional implications of resistant starch.** *Nutr Res Rev* 9:1-31.
- Arámbula V. G., Barrón A. L., González H. J., Moreno M. E., y Luna B. G. 2001. **Efecto del tiempo de cocimiento y reposo del grano de maíz (Zea mays L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz.** *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 51(2):187-194.

- Htoon K. A., Uthayakumaran S., Piyasiri U., Appelqvist A. M. I. , López-Rubio A., Elliot P. Gilbert P. E., and Mulder, J. R. 2010. **The effect of acid dextrinisation on enzyme-resistant starch content in extruded maize starch.** *Food Chemistry*. 120:140-149.
- Bandera, E. V., Kushi, L. H., Moore, D. F., Gifkins, D. M., and McCullough, M. L. 2007. **Association between dietary fiber and endometrial cancer: a dose-response meta-analysis.** *Am J Clin Nutr* 86(6): 1730–1737.
- Bajaj, Y. P. S. 1990. **Biotechnology in Agriculture and Forestry 13: wheat.** Springer-Verlag. Sri Lanka.
- Bakke, A., and Vickers, Z. 2007. **Consumer Liking of Refined and Whole Wheat Breads.** *J food sci* 72(7).
- Benitez, A., y Salazar, A., 1998. **Moviendo a la industria del trigo.** *Tecnología de Alimentos* 33(8).
- Bedolla, S. and Rooney, L. W. 1982. **Cooking maize for masa production.** *Cereal Foods World* 27:219-221.
- Bello-Pérez, L. A., Sáyago-Ayerdi, S. G., Méndez-Montealvo, G. and Tovar J. 2004. **In vitro digestibility of banana starch cookies.** *Plants Food Human Nutr* 59: 79-83.
- Bello-Pérez, L. A. and Paredes-López, O. 2009. **Starches of some crops, changes during Processing and their nutraceutical potential.** *Food Eng Rev* 1:50-65.
- Bjorck, I., Grandfeldt, Y., Liljeberg, H., Tovar, J. and Asp, N-G. 1994. **Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates.** *Am J Clin Nutr* 59, suppl., 699S-705S.
- Bortolotti, M., Levorato, M., Lugli, A. and Mazzero, G. 2008. **Effect of a balanced mixture of dietary fibers on gastric emptying, intestinal transit and body weight.** *Ann Nutr Metab* 52(3):221-6
- Bressani, R. and Scrimshaw, N. S. 1958. **Effect of lime treatment on in vitro availability of essential amino acid and solubility of protein fractions in corn.** *J Agr Food Chem* 6:774-778.

- Bressani, R., Benavidez, B., Acevedo, E. and Ortiz, M. A. 1990. **Changes in selected nutrient content and in protein quality of corn masa and quality protein maize during rural tortilla preparation.** *Cereal Chem* 67:515-518.
- Bressani, R., Turcios, J. C., Reyes, L. y Mérida, R. 2001. **Caracterización física y química de harinas industriales nixtamalizadas de maíz de consumo humano en América Central.** *Arch Latinoam Nutr* 51(3).
- Brownleader, M. D., Byron, O., Rowe, A., Trevan, M., Welham, K. and Dey, P. M. 1996. **Investigations into the molecular size and shape of tomato extensin.** *Biochem J* 320(2): 577-583.
- Cairns, P., Sun, L., Morris, V. J. and Ring, S. G. 1995. **Physicochemical studies using amylose as an in vitro model for resistant starch.** *J of Cereal Sci* 21(1):37-47.
- Cheung, P. C. K. and Chau C-F. 1998. **Changes in dietary fiber (resistant starch and nonstarch polysaccharides) content of cooked flours prepared from three Chinese indigenous legume seeds.** *J Agric Food Chem* 46:262-265.
- Clegg, K. M. 1956. **Analysis for starch and sugar content of roots. A modified Anthrone-sulfuric acid method.** *J Sci Food Agric* 7(40)
- Corradinia, E., Felix de Carvalhob, A. J., Da Silva, C. A. A., Marcondes, A. J. A. and Capparelli, M. L. H. 2007. **Preparation and Characterization of Thermoplastic Starch/Zein Blends.** *Materials Research* 10(3):227-231
- Cummings, J. H. and Macfarlane, G. T. 1991. **The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon.** *J Applied Bacteriol* 70: 443-459.
- Dave, H., Rao, P. V. C. and Desai, J. D. 1997. **Biodegradation of starch-polyethylene films in soil and by microbial cultures.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 655-658.
- Dey, P., Brownleades, M., PAntelides, A., Trevan M., Smith, J. and Saddler, G. 1997. **Extensin from suspensión-cultured potato cells: a Hydroxyproline-rich GLycoprotein, devoid of agglutinin activity.** *Plant* 202(2): 179-187.
- Dragunski, D. C. and Pawlicka, A. 2001. **Preparation and characterization of starch grafted with toluene poly(propylene oxide) disocyanate.** *Materials Research* 2:77-81

- Dumoulin, Y., Alex, S., Szabo, P., Cartilier, L. and Alexandru, M. 1998. **Cross linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis.** *Carbohydrate Polymers* 37: 361-370.
- Ellegård, L., Andersson, H. and Bosaeus, I. 1997. **Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increase energy excretion in ileostomy subjects.** *Eur J Clin Nutr* 45: 451-457.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M. and Cummings, J. H. 1992. **Classification and measurement of nutritionally important starch fractions.** *Eur. J. Clin. Nutr* 46: S33-S50.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., Hudson, G. J. and Cummings, J. H. 1996. **Measurement of resistant starch in vitro and in vivo.** *Br J Nutr* 75:749-755.
- Escudero, A. E. y González, S. P. 2006. **La fibra dietética.** *Nutr Hosp.* 21 (Supl. 2) 61-72.
- Fogarty, A. W., Jones S., Britton, J. R., Lewis, S.A. and McKeever, T. M. 2007. **Systemic inflammation and decline in lung function in a general population: a prospective study.** *Thorax* 62:515-20.
- Fässler, C., Arrigoni, E., Venema, K., Hafner, V., Brouns, F. and Amado, R. 2006. **Digestibility of resistant starch containing preparations using two *in vitro* models.** *European J Nutr* 45: 445-453.
- Figuerola, C. J. de D., Acero, G. M. G., Vasco, M. N. L., Lozano, G. A., Flores, A.L. M. y González-Hernández, J. 2001. **Fortificacion y evaluacion de tortillas de nixtamal.** *Arch Latinoam Nutr* 51(3): 293-302.
- Franck, A. 2002. **Technological functionality of inulin and oligofructose.** *British Journal of Nutrition*, 87, S287-S291, S2.
- Frost, G. S., Brynes, A. E., Dhillon, W. S., Bloom, S. R. and McBurney, M. I. 2003. **The effects of fiber enrichment of pasta and fat content on gastric emptying, GLP-1, glucose, and insulin responses to a meal.** *Eur J Clin Nutr* 57: 293-298.
- Gadd, G. M. 2001. **Fungi in Biorremediation.** *British Mycological Society* 1-20.
- Gibson, G. R. 2000. **Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotic inulin and oligofructose.** *J Nutr* 129(7S): 1438-1441.

- Gonlachanvit, S., Coleski, R., Owyang, C. and Hasler, W.L. 2004. **Inhibitory actions of a high fibre diet on intestinal gas transit in healthy volunteers.** *Gut* 53: 1577-1582.
- Gofí, I., Garcia-Diz, L., Mañas, E. and Saura-Calixto, F. 1996. **Analysis of resistant starch: a method for foods and food products.** *Food Chemistry* 56(4): 445-449.
- Gotteland, M. R. and Brunser, O. T. 2006. **Effect of an inulin containing yogurt on intestinal function of healthy and constipated volunteers.** *Rev Chil Nutr* 33(3).
- Graham, H., Hesselman, K. and Aman, P. 1986. **The influence of wheat bran and sugar-beet pulp on the digestibility of dietary components in a cereal-based pig diet.** *J Nutr* 116:242-251.
- Grandfeldt, Y., Wu, X. and Björck, I. 2006. **Determination of glycaemic index; some methodological aspects related to the analysis of carbohydrate load and characteristics of the previous evening meal.** *Eur J Clin Nutr* 60(1):104-12.
- Guerra-DellaValle, D., Bello-Pérez, L. A., González-Soto, R. A., Solorza-Feria, J. and Arámbula-Villa, G. 2008. **Efecto o del tiempo de reacción en la acetilación de almidón de plátano.** *Revista mexicana de Ingeniería Química.* 7(3):283-291.
- Guyton, A. C. and Hall, J. E. **Tratado de Fisiología Médica.** Mc Graw-Hill. 10ª edición. España. 2001.
- Haidong, K., June, S., Gerardo, H., Kathryn, M. and Stephanie, J. L. 2008. **Dietary fiber, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.** *Am J Epidemi* 167(5): 570–578.
- Heavey, P. M. and Rowland, I. R. 2004. **Gastrointestinal cancer.** *Best Practice & Res Clin Gast.* 18(2): 323–336.
- Hernández, E. M., Guillane, R. A. y Ortiz del Toro, P. 2007. **Síntesis de 2-ceto-almidón.** *Sociedad Cubana de Bioingeniería T099.*
- Hlebowicz, J., Wickenberg, J., Fahlström R., Björgell, O., Almér, Lars-Olof., Darwiche, G. 2007. **Effect of commercial breakfast fibre cereals compared with corn flakes on postprandial blood glucose, gastric emptying and satiety in healthy subjects: a randomized blinded crossover trial.** *Nutr* 6: 22.

- Hoebler, C., Guillon, F., Fardet, A., Cherbut, C. and Barry, J-L. 1998a. **Gastrointestinal or simulated *in vitro* digestion changes dietary fibre properties and their fermentation.** *J Sci Food Agric* 77: 327-333.
- Hoebler, C., Karinthe, A., Devaux, M. F., Guillon, F., Gallant, D.J.G., Bouchet, B., Melegary, C. and Barry, J .L. 1998b. **Physical and chemical transformations of cereal food during oral digestion in human subjects.** *British Journal of Nutrition* 80:429-436.
- Hoebler, B., Devaux, M. –F., Karinthe, A., Bellevile, C. and Barry, J-L. 2000. **Particle size of solid food after human mastication and *in vitro* simulation of oral breakdown.** *International J Food Sci and Nutr* 51: 353-366.
- Hoebler, B., Lecannu, G., Bellevile, C., Devaux, M. –F., Popineau, Y. and Barry, J-L. 2002. **Development of an *in vitro* system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food.** *International J Food Sci and Nutr* 53:389-402.
- Hoover, R. and Zhou, Y. 2003. ***In vitro* and *in vivo* hydrolysis of legume starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes—a review.** *Carbohydrate Polymers* 54:401-417.
- Htoon, A., Shrestha, A. K., Flanagan, B. M., Lopez-Rubio A., Bird, A. R., Gilbert, E. P., Gidley, M. J. 2009. **Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organisation and amylase digestibility.** *Carbohydrate Polymers* 75:236-245.
- Ikhtiar, K. and Alam, Z. 2007. **Nutritional composition of Pakistani wheat varieties.** *J Zhejiang Univ Sci* 8(8):555-559.
- Isaksson, H., Sundberg, B., Åman, P., Fredriksson, H. and Olsson, J. 2008. **Whole grain rye porridge breakfast improves satiety compared to refined wheat bread breakfast** *Food Nutr Res* 52.
- Jacira, A. B. **Efeito da adição de inulina sobre os parâmetros nutricionais, físicos e sensoriais do pao.** RECIFE-PE. 2006.
- Jacobsen, H., Poulsen, M., Dragsted, L. O., Ravn-Haren, G., Meyer, O. and Lindecrón, R. H. 2006. **Carbohydrate Digestibility Predicts Colon Carcinogenesis in Azoxymethane-Treated Rats.** *Nutrition and cancer* 55(2): 163–170.

- Jenkins, A. L., Jenkins, D. J. A., Wolever, T. M. S., Rogovik, A. L., Jovanovski, E. B. V., Rahelić, D. and Vuksan, V. 2008. **Comparable Postprandial Glucose Reductions with Viscous Fiber Blend Enriched Biscuits in Healthy Subjects and Patients with Diabetes Mellitus: Acute Randomized Controlled Clinical Trial.** *Croat Med J* 49(6): 772–782.
- Karppinen, S., Liukkonen, K., Aura, A-M., Forssell, P. and Poutanen, K. 2000. **In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria.** *J Sci Food Agric* 80:1469-1476.
- Kirk, T. K. and Cullen, D. Capítulo 9: **Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi.** En: Young, R.A., Akhtar, M. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry.* John Wiley & Sons. p. 273-307. Toronto, 1998.
- Kong, F. and Singh, R. P. 2008. **Disintegration of Solid Foods in Human Stomach.** *J of Food Sci* 73(5): R67-R80.
- Kunkel, M. E. and Seo, A. 1994. **In vitro digestibility of selected polymers.** *J of Environmental Polymer Degradation* 2(4): 245-251.
- Mano, J. F., Koniarova, D. and Reis, R. L. 2003. **Thermal properties of thermoplastic starch/ synthetic polymer blends with potential biomedical applicability.** *Journal of materials science: Materials in medicine.* 14:127-35.
- Mondragón, M., Bello-Pérez L. A., Agama, E., Melo, A., Betancur-Ancona, D. and Peña, J. L. 2004. **Effect of nixtamalization on the modification of crystalline structure of maize starch.** *Carbohydrate Polymers* 55: 411-418.
- Mondragón, M., Mendoza-Martínez, A. M., Bello-Pérez, L. A. and Peña, J. L. 2006. **Viscoelastic behavior of nixtamalized maize starch gels.** *Carbohydrate Polymers* 65: 314-320.
- Montes, E., Salcedo, J., Zapata, J. E., Carmona, J. and Paternina, S. 2008. **Evaluación de las propiedades modificadas por vía enzimática del almidón de ñame (*D. trifida*) utilizando α -amilasa (Termamyl 120L, tipo L).** *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACEUTICA* 15(1):51-60.

- MoshFegh, A. J., Friday, J. E., Goldman, J. P. and Chung Ahuga, J. K. 1999. **Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans.** *J Nutr* 129(7S): 1407 S-1411S.
- Muir, J. G., Yeow, E. G. W., Keogh, J., Pizzey, C., Bird, A. R., Sharpe, K., O'Dea, K. and Macrae, F. A. 2004. **Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone.** *Am J Clin Nutr* (79): 1020-1028.
- Mun, S-H and Shin, M. 2006. **Mild hydrolysis of resistant starch from maize.** *Food Chemistry*. 96:115-121.
- Murphy, M. M., Spungen, D. J. and Birkett, A. 2008. **Resistant Starch Intakes in the United States.** *J Am Diet Assoc* 108: 67-78.
- Nelson A. L. **High Fiber Ingredients.** Practical Guides for the food Industry. Eagan Press. St. Paul, Minnesota, USA. 2001.
- Niness, K. R. 1999. **Inulin and Oligofructose: What Are They?** *J. Nutr* 129: 1402S–1406S.
- Peñalver, C., Herrera, I. M. and Tovar, J. 2007. **Indigestible starch associated to dietary fiber residues from cooked legume seeds consumed in Venezuela.** *INTERCIENCIA* 32(9): 620-623.
- Pongjanta, J., Utaipattanaceep A., Naivikul, O. and Piyachomkwan K. 2009. **Debranching enzyme concentration effected on physicochemical properties and α -amylase hydrolysis rate of resistant starch type III from amylose rice starch.** *Carbohydrate Polymers* 78:5-9.
- Prosky, L., Asp, N. G., Schweiser, T., Furda, I. and Devries, J. W. 1998. **Determination of the Insoluble, Soluble and Total Dietary Fiber in Food and Products: Interlaboratory Study.** *J Assoc Anal Chem* (71): 1018-1023.
- Queenan, K. M., Stewart, M. L., Smith, K. N., Thomas, W., F. R. G., and Slavin, J. L. 2007. **Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial.** *Nutr J* 6: 6.

- Ramesh, Y. A., Mahade, V. S., Tharanathan, R. N. and Ramteke, R. S. 2007. **Characteristic of acetylated and enzyme-modified potato and sweet potato flours.** *Food chemistry* 103:1119-1126.
- Rendón-Villalobos, R., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo E., Tovar J. y Bello-Pérez, L. A. 2008. **Tallari nes salados de sémola de trigo y almidón de plátano. Composición proximal y digestibilidad del almidón *in vitro*.** *Interciencia* 33 (9): 658-662.
- Rico, Y., Elsner, C. I. y Bidegain, J. C. 2007. **La voltamperometría de micropartículas en la diferenciación de óxidos y oxihidróxidos de hierro.** *Rev Asoc Geol Argent* 62(3):417-424.
- Roberfroid, M. B. and Dalzenne, N., 1998. **Dietary fructans.** *Annual Review Nutr* 18: 117-143.
- Roberfroid, M. B. 1999. **Caloric Value of Inulin and Oligofructose.** *J. Nutr* 129: 1436S–1437S.
- Roberfroid, M. B. 2002. **Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose.** *British Journal of Nutrition* 87(2): S139–S1430.
- Rodríguez, G. M., Serna, S. S. and Sánchez, S. F. **Nixtamalización del maíz a la tortilla. Aspectos nutrimentales y toxicológicos.** Ediciones UAQ. Querétaro, 2008.
- Rodríguez, P., San Martín, M. E. y González de la Cruz, G. 2002. **Calorimetría diferencial de barrido y rayos X del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada.** *Superficies y vacío* 13:61-65.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zaroni, S. y Matteui, D. 2005. **Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria a comparative study of pure and fecal cultures.** *Applied and environmental microbiology* 71 (10):6150-6158.
- Ruiz, A. G. 2006. **Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca.** *Ingeniería y ciencia* 2(4):5-28.
- Ruiz, G., Montoya, C. y Paniagua, M., 2009. **Degradabilidad de un polímero de almidón de yuca.** *EIA* 12:67-78.
- Saldaña, G., Brown, H. E. 1984. **Nutritional composition of corn and flour tortillas.** *J Food Sci.* 49: 1202-1203, 1205.

- Segura, S. F., Echeverri, F. R., Patiño L. A. and Mejía, G. A. 2007. **Description and discussion about the methods of analysis of fiber and of the nutritional value of forages and foods for animals.** *VITAE, Revista de la Facultad de química farmacéutica* 14(1).
- Slavin, J. 2003. **Why whole grains are protective: biological mechanisms.** *Proceedings of the Nutrition Society* (62): 129–134.
- Soergel, K.H. 1994. **Colonic fermentation: metabolic and clinical implications.** *Clin Investig* (72): 742-748.
- Sosa, A. C. R. y Campos, G. J. 2008. **Introducción a los prebióticos y sus perspectivas de industrialización en México.** En: **Temas Selectos de Nutrición y Salud.** Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. pp. 39-58.
- Szylił, O. y Andrieux, C. 1993. **Physiological and pathophysiological effects of carbohydrate fermentation.** *World review of nutr and diet* 74:88-122.
- Toops D., 2008. **Wellness Foods: General health-promoting ingredients have given rise to condition-specific marketing.** *Food processing* December - 2008. W7-W7.
- Tudorica, C. M., Kuri, V. and Brennan, C. S. 2002. **Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber: Enriched Pasta.** *J. Agric. Food Chem* 50: 347-356.
- Valencia, de la M. L. **Manual de la Colección “Saber más sobre panadería económica”.** **Pan blanco. No 2.** Editado por el INEA y el CONEVyT. Tulancingo, Gro., 2000.
- Van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer, L. and Hoebregs, H. 1995. **On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 525-552.
- Van Soest, P. J. and Wine, R. H. 1967. **Uses of detergents in the analysis of fibrous seeds. IV. Determination of plan cell-walls constituents.** *J Assoc Official Agr Chem* 50:50.
- Willis, H. J., Eldrich, A. L., Beiseigel, J., Thomas, W. and Slavin, J. L. 2009. **Greater Satiety response with resistant starch and corn bran in human subjects.** *Nutr Res* 29(2):100-5.

Woo, K. S. and Seib, P. A. 2002. **Cross-linked resistant starch: preparation and properties.** *Cereal Chem* 79:819–825.