TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

LICENCIATURA EN INGENIERIA BIOQUÍMICA

REPORTE FINAL DE RESIDENCIA

Estudio molecular de la fermentación colónica de la fracción indigestible de subproductos de mango (*Mangifera indica* L.) var. Ataulfo

PRESENTA:

LOURDES DEL CARMEN RAMOS SUSTAITA

DIRECTOR:

DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS **DICIEMBRE DE 2019**

Agradecimientos

Para el desarrollo de este proyecto fueron muchas las personas que se vieron involucradas en su proceso. Agradezco a Dios primeramente por la vida y la oportunidad que me ha dado de poder llegar hasta este punto de mi carrera profesional y seguidamente a mi asesor Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo por haberme brindado la oportunidad y la confianza de participar en este proyecto de investigación ya que gracias a él y a este trabajo he podido ampliar mis conocimientos y aplicar lo aprendido hasta el momento en mi carrera, puesto que es un excelente investigador en el área y como persona, así mismo, agradezco por la beca de apoyo (Proyecto CB-2015-253281, CONACYT) brindada durante la realización de este proyecto.

De igual forma, agradezco a mis padres y hermanos quienes han estado incondicionalmente a mi lado, me han guiado y apoyado en todo momento, a ellos le debo todo mi esfuerzo y dedicación, ya que la preparación profesional es la mejor de las herencias que mis padres al igual que mis hermanos nos pudieron dar.

De igual manera agradezco a mi “Jefecito” por su guía, apoyo y paciencia que durante la realización de este proyecto me ha tenido y de igual forma a cada uno de los integrantes del Laboratorio 4 de Biología Molecular del ITTG por compartir sus conocimientos y siempre ser de apoyo, por recibirme y hacerme sentir como una integrante más del equipo de trabajo, más que eso, de una familia.

Resumen

El mango ‘Ataulfo’ es un fruto popular en México con fuente de fibra dietética (FD) y de compuestos fenólicos (CF) asociados a ella. Estos compuestos y FD presentes en un refrigerio saludable, pueden llegar al colon, fermentarse y producir metabolitos con efectos benéficos a la salud. El objetivo de esta investigación fue evaluar los cambios en la microbiota intestinal durante la fermentación colónica in vitro de la fracción indigestible total (FIT) de un refrigerio elaborado con mango ‘Ataulfo’, el cual fue elaborado en el Laboratorio Integral en Investigación de Alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic. Este refrigerio se sometió a una simulación gastrointestinal de fermentación colónica *in vitro* de FIT, donde se obtuvieron muestras con una concentración en el rango entre 900 y 2000 ng/µl y calidad en el índice de A260/A280 entre 1.8-2, lo cual indica que el ADN obtenido en cada muestra fue aceptado como muestra pura para su futuro secuenciamiento mediante la plataforma Illumina, información que nos será de utilidad para proseguir con futuras investigaciones relacionados con las comunidades microbianas presentes en el proceso de fermetación colónica de subproductos de Mango.

Índice

Tabla de contenido

Resumen 3

Introducción 6

Descripción de la empresa 8

Generalidades de la empresa 8

Misión 9

Visión 9

Valores 9

Ubicación 9

Descripción del área que participo 10

Objetivos 11

Objetivo general 11

Objetivos específicos 11

Justificación 12

Marco Teórico 13

Generalidades del mango 13

Composición nutricional del mango 14

Fibra dietética (FD) de mango 15

Fracción Indigestible de mango 16

Otros compuestos de interés funcional en mango 16

Refrigerios saludables de frutas 19

Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en mango 21

Fermentación colónica *in vitro* 24

Fermentación colónica *in vitro*: modelos 27

Simulador Shime 27

Simulador TIM 28

Simulador AINIA 29

Simulador ARIS 30

Microbiota intestinal 31
Materiales y métodos 33
Sustrato de subproductos de mango 33
Pre digestión de la barra 33
Fermentación colónica 35
Extracción de ADN 36
Resultados 38
Fermentación colónica 38
Referencias 42

Introducción

La microbiota intestinal es una colección muy diversa de billones de microbios compuesta por cientos de especies (Gill, 2006). En el intestino grueso densamente colonizado, la microbiota puede alcanzar números de hasta 10-12 ufc / g de contenido de colon (Gueimonde y Collado, 2012). La microbiota intestinal ha evolucionado con los humanos hasta un estado complejo interdependiente, donde su genoma además del nuestro genera una capacidad profunda para metabolizar la gran variedad de sustratos en la dieta humana (Xu et al., 2007).

Es conocido que hasta un tercio de todas las enfermedades, incluidos los trastornos cardiovasculares, como las enfermedades coronarias y la hipertensión, la diabetes tipo 2, los problemas intestinales funcionales y el cáncer, están relacionados con el estilo de vida y su riesgo puede mitigarse a través de medios dietéticos (Shahidi, 2009). Lo cual indica que la dieta tiene un efecto sobre la microbiota y esto a su vez afecta la salud.

Los cambios en la composición bacteriana pueden conducir a una modificación metabólica que puede tener consecuencias directas para la salud del huésped. Investigaciones recientes (Blatchford, 2015) han demostrado que el perfil metabólico observado puede alterarse cambiando los sustratos disponibles para la fermentación. En este sentido, los sustratos que pueden inducir cambios en el metabolismo incluyen: carbohidratos tales como almidón resistente, azúcares-ONU absorbida, polisacáridos no almidón, gomas y celulosa; y proteínas de la dieta y fuentes endógenas como la mucina (Louis, Scott, Duncan y Flint, 2007). Algunos de los principales productos finales de la fermentación son los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), los ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) y gases como el hidrógeno, el dióxido de carbono y el metano (Rosendale, Cookson, Roy y Vetharaniam, 2011).

El mango (*Mangifera indica* L.) es un fruto que contiene tanto en su pulpa o cáscara componentes como la FD y otros compuestos bioactivos (CB); tales como los compuestos fenólicos (CF). Ambos, al entrar en contacto con el sistema digestivo del ser humano sufren cambios y transformaciones químicas, donde lo que no es digerido ni absorbido en el

intestino delgado (fracción indigestible) queda disponible para posteriormente ser utilizado como sustrato para fermentar parcial o completamente en el colon (Saura-Calixto et al., 2000), en donde, la fracción indigestible (FI) se metaboliza por medio de la microbiota colónica, liberando metabolitos con propiedades beneficiosas para la salud.

La FD compuesta principalmente por carbohidratos no amiláceos durante el proceso de fermentación llega a producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC) los cuales brindan efectos positivos a la salud como son las propiedades anti inflamatorias y/o anti proliferativas, las cuáles ayudan a prevenir el síndrome del colon irritable o el cáncer de colon (Topping & Lockett, 2016).

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar molecularmente la microbiota intestinal durante la fermentación colónica de FD y de CF presentes en la FI de un refrigerio elaborado con cáscara y pulpa de mango ‘Ataulfo’.

Descripción de la empresa

Generalidades de la empresa

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG); es una universidad pública de tecnología, ubicada en la Ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Es una Institución educativa pública de educación superior, que forma parte del Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos de México. El Instituto también está afiliado a la Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES), zona Sur-Sureste.

Fue fundado el 22 de octubre de 1972, por el entonces Gobernador del Estado, Dr. Manuel Velasco Suárez, inicialmente con el nombre de Instituto Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez (ITRTG), posteriormente se llamaría el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG).

Actualmente es considerado una de las dos máximas casas de estudios del estado de Chiapas, junto con la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Su lema es Ciencia y Tecnología con Sentido Humano y su actual director es el M.C. José Manuel Rosado Pérez.

Figura 1 . Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG), Fue fundado el 22 de octubre de 1972

Misión

Formar de manera integral profesionales de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos

Visión

Ser una Institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

Valores

- El ser humano
- El espíritu de servicio.
- El liderazgo.
- El trabajo en equipo.
- La calidad.
- El alto desempeño.
- Respeto al medio ambiente.

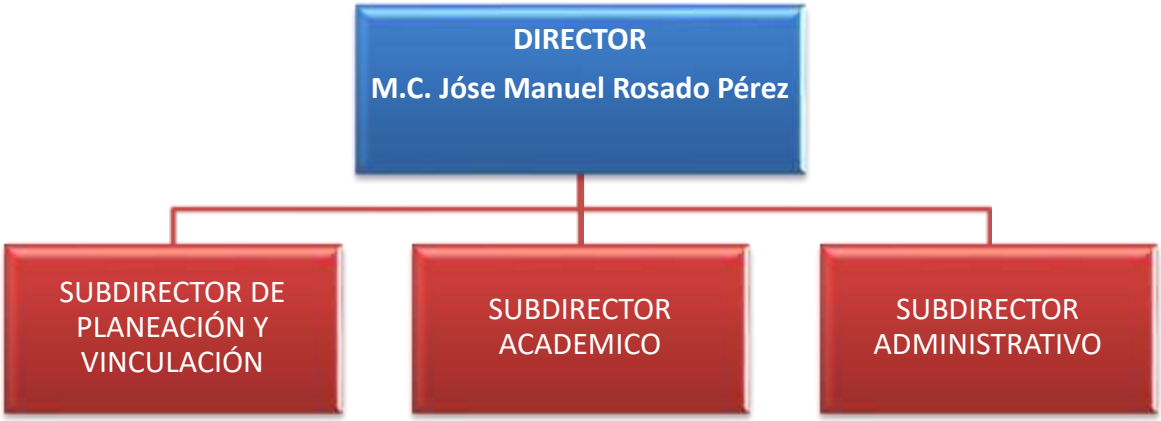
Ubicación

KM 29020, Carr. Panamericana 1080, Boulevares, Tuxtla Gutiérrez, Chis. (fig.2)

Figura 2 Logo oficial del Instituto Tecnólogico de **Tuxtla Gutierrez**

Figura 3 Ubicación: KM 29020, Carr. Panamericana 1080, Boulevares, Tuxtla Gutiérrez, Chis.

Organigrama



Descripción del área que participo

El proyecto de investigación se llevó acabo en TecNM - Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez - Laboratorio 4. Biología molecular del Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas en Biocombustibles, bajo la dirección del Dr. Victor Manuel Ruiz Valdiviezo

Objetivos

Objetivo general

Monitorear y extraer DNA metagenómico durante un sistema de fermentación colónica de subproductos de mango (*Mangifera indica L.*)

Objetivos específicos

Estandarizar el sistema de simulación gastrointestinal y fermentación colónica

Extracción de DNA de las muestras de fermentación colónica

Analizar mediante electroforesis y nanoespectofotometría la calidad y concentración del DNA obtenidos

Justificación

Actualmente el interés de la población por mejorar su salud y con ella su calidad de vida ha aumentado la demanda en alimentos saludables, esto debido a que los principales problemas de salud que presentan la sociedad se involucra principalmente al sistema digestivo, siendo en su mayoría relacionado a los malos hábitos alimenticios, por lo cual surge la necesidad de un cambio en la dieta diaria.

Existe una tendencia creciente en el consumo de alimentos saludables, incluyendo alimentos funcionales, los cuales pueden contener antioxidantes naturales o industrializados, junto a la adición de otros compuestos bioactivos (Coronado et al. 2015).

Algunos desordenes gastrointestinales tales como obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal entre otras, pueden ser causados debido a cambios en la composición de la microbiota intestinal. La microbiota intestinal humana está dominada por tres principales phyla bacterianas, Firmicutes (comprende más de 200 géneros, incluyendo especies de *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus* y *Clostridium*), Actinobacteria (incluye bacterias Gram-positivas) y Bacteroidetes (incluyen aproximadamente 20 géneros Gram-negativos) (Musso et al. 2010). La microbiota intestinal tiene enzimas que transforman a los polisacáridos complejos de la dieta, que el intestino humano no puede digerir ni absorber, en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico.

El mango 'Ataulfo' es una fruta de fácil disponibilidad para el consumidor y además proporciona diversos compuestos bioactivos como los carotenoides, compuestos fenólicos, además de fibra dietética, vitamina C y E; esto acompañado de macronutrientes como proteínas, lípidos y en mayor proporción carbohidratos.

Por lo tanto, el estudio molecular de los microorganismos involucrados en la fermentación colónica de subproductos de mango "Ataulfo" es muy importante, es aquí donde se plantea monitorear los cambios en la microbiota intestinal que estos ocasionan al llegar al tracto digestivo, y así mismo relacionarlo con el efecto sobre la salud que pueden ocasionar.

Marco Teórico

Generalidades del mango

El mango (*Mangifera indica* L.) es un fruto suculento, carnoso, de forma oval. Sus medidas van de cinco a 15 cm de longitud y son de color verdoso, amarillento o rojizo. Es una especie tropical arbórea de vegetación permanente, que puede alcanzar de 10 a 40 m de altura. El mango crece en clima cálido y seco; en el caso de México, se encuentran en la zona costera del oriente, en el centro y occidente del país (SAGARPA, 2017).

El mango es una de las frutas más importantes en producción y consumo en el mundo. Es el fruto más dominante dentro de las frutas tropicales, el cual es cultivado alrededor del mundo; seguido de la piña, la papaya y el aguacate. Estos frutos representan aproximadamente el 75 % de la producción mundial de frutas tropicales frescas, a diferencia del resto denominadas menores, tales como, lichi, durian, rambután, guayaba y maracuyá (FAO, 2019). La temporada para los mangos en México comienza en febrero y continúa hasta septiembre. Las variedades de mangos que se cultivan son 'Ataulfo', 'Haden', 'Tommy Atkins', 'Irwing', 'Keitt', 'Kent', 'Manila', 'Palmer', 'Sensation' y 'Van Dyke' (De La Cruz Medina & García, 2002). En 2017, el consumo anual de mango en México reportado fue de 12.4 kg por persona (SIAP, 2018).

México es el principal productor de mango en el continente americano con un volumen aproximado de 1.5 millones de toneladas anuales de las cuales el 20% de dicha producción se ve mermada por maduración excesiva de la fruta y por lo tanto no pasa el control de calidad para ser exportado (SAGARPA, 2017). Entre las 41 naciones que compraron mango mexicano en 2017, sobresalen los volúmenes de Estados Unidos y Canadá, con 367 mil y 43 mil toneladas, respectivamente. Francia, Holanda y Reino Unido figuran entre las naciones que más mango importan (SIAP, 2018).

El mango variedad 'Ataulfo' es considerado como el más popular de México. El posicionamiento de este cultivar en los mercados está asociado a la calidad de la pulpa, el color amarillo intenso, la piel delgada, la semilla pequeña, el alto contenido de azúcar, el excelente aroma y sabor, además de su larga vida de anaquel. Debido a su amplia aceptación en los mercados locales e internacionales, la demanda de este cultivar ha

aumentado rápidamente en los últimos años (Infante et al., 2011). Además, se caracteriza por una composición promedio de 69% de pulpa, 19% de cáscara y 8.5% de hueso o semilla. La pulpa es de consistencia firme con contenido de fibra; es de sabor dulce y baja acidez; con cáscara firme, de color amarillo y resistente al manejo pos cosecha (SE, 2016).

El mango ataúlfo es una denominación de origen de un cultivar de mango originario del municipio de Tapachula, perteneciente al estado de Chiapas y ubicado al sureste de México en frontera con Guatemala. La zona del Soconusco tiene el clima adecuado para el cultivo. Se cultivan alrededor de 15.000 ha en los municipios chiapanecos de: Suchiate, Frontera Hidalgo, Metapa, Tuxtla Chico, Tapachula, Mazatán, Huehuetán, Tuzantán, Huixtla, Villa Comaltitlán, Escuintla, Acacoyagua y Acapetahua, y se producen 176.000 t anuales. El Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial otorgó la denominación de origen de este fruto al gobierno de Chiapas.

La Asociación Agrícola Local de Fruticultores del Soconusco (AALFS) dio a conocer que de febrero a mayo del 2019, se exportaron a Estados Unidos 23 mil toneladas de mango, siete mil a Canadá y 500 toneladas a Chile.

El mango se comercializa en su estado natural (fresco) o procesado. Algunas de las alternativas de industrialización/procesamiento del mango son: deshidratado, concentrado, en cubos y rodajas congeladas, puré, almíbar, yogurts, jugos y néctares, polvos, aceites esenciales, ates, licores, etc. (FAO 2018; SAGARPA, 2017). Aunque se han realizado estudios donde queda de manifiesto que los subproductos de mango son excelente fuente de fibra dietética (FD) y compuestos fenólicos (CF), los cuáles podrían ser aprovechados como ingredientes en alimentos (Ramírez Maganda et al., 2015).

Composición nutricional del mango

Los frutos de mango constituyen un alimento valioso ya que contiene vitaminas A y C, minerales, fibra y antioxidantes. Son bajos en grasas, sodio y calorías (valor calórico de 39 calorías por 100 g de pulpa); y tiene una gran cantidad de agua que proporciona una efectiva forma de hidratación (Cuadro 1) (Yahia, 2011).

Cuadro 1 Composición nutricional de mango por 100g de porción comestible.

Nutrientes	Valor	Minerales	Valor
Agua (g)	81.71	Calcio (mg) 10	10
Carbohidratos (g)	17	Sodio (mg)	2
Lípidos (g)	0.27	Magnesio (mg)	9
Fibra (g)	1.8	Hierro (mg)	0.13
Proteína (g)	0.51	Potasio (mg)	156
Energía (kcal)	65	Zinc (mg) 0.04	0.04
Vitaminas			
Ácido ascórbico (mg)	27.7	Tiamina (mg)	0.058
Vitamina E(mg)	1.12	Riboflavina (mg)	0.057
Vitamina A (IU)	765	Vitamina B6 (mg)	0.134
Carotenos			
B-caroteno (µg)	445	α-caroteno (µg)	17

(Yahia, 2011)

El mango resulta ser una fuente rica en fibra dietética (FD) y en la variedad de 'Ataulfo' se ha reportado 14.97 g FD por 100 g de pasta y 41.34 g por 100 g de cáscara (BlancasBenitez et al., 2015). En la actualidad el término de FD ha sido de sumo interés debido a los beneficios relacionados por el consumo de esta.

Fibra dietética (FD) de mango

A medida que se va generando conocimiento a través del tiempo en las investigaciones científicas, el concepto de FD también ha evolucionado teniendo una relación estrecha con la fisiología humana. "La fibra dietética consiste en carbohidratos no digeribles y lignina que son intrínsecos e intactos en las plantas; no se considera como entidad, sino como un término colectivo de una compleja mezcla de sustancias que ejercen distintos tipos de efectos fisiológicos (Lunn & Buttriss, 2007). Algunos de estos efectos fisiológicos pueden

presentarse en los dos componentes de la FD, las llamadas “fibras solubles” (glucanos, pectinas, oligosacáridos) forman geles viscosos en el intestino y afectan principalmente a la absorción de glucosa y grasa; y Las “fibras insolubles” (celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón resistente) aumentan el volumen fecal, tienen un efecto saciante al incrementar el tiempo de vaciado gástrico y además disminuyen el tiempo de tránsito intestinal, lo que favorece un efecto anticarcinogénico (Mongeau & Brooks, 2016).

Fracción Indigestible de mango

Los alimentos tienen numerosos compuestos que resisten a la digestión en el intestino delgado y responde más a un criterio fisiológico que químico. La fracción indigestible (FI) de los alimentos se define como aquella parte del alimento que escapa de la acción de las enzimas digestivas en el intestino delgado del organismo (Saura-Calixto et al., 2000) y que puede alcanzar el colon donde es utilizada como sustrato de fermentación por la microbiota intestinal (Trujillo et al., 2010).

La FI de los alimentos consiste no sólo en la FD sino también en otros compuestos con resistencia a la acción de enzimas digestivas, como el almidón resistente, la proteína resistente, los CF, los compuestos de Maillard y otros compuestos asociados (Saura-Calixto et al., 2000) ceras, cutinas o fitoesteroles (Gray, 2006).

La FI es una buena alternativa al concepto de FD en estudios epidemiológicos y además, se considera como uno de los indicadores para definir una dieta como saludable (Saura-Calixto & Goñi, 2009).

Otros compuestos de interés funcional en mango

Los CB se definen como aquellos microconstituyentes, no nutrientes, con actividad biológica significativa en el organismo, también llamados fitoquímicos; que parecen jugar un papel importante en el mantenimiento de la salud humana. Los principales grupos de estas sustancias son los compuestos fenólicos (CF), carotenoides y fitoesteroles (Saura-Calixto & Goni, 2009).

El fruto de mango además de los nutrientes mencionados anteriormente contiene otros compuestos de interés funcional, como algunos compuestos bioactivos (CB). Dentro de los

CB identificados en la cascara y pulpa de mango, que se han estudiado, se han encontrado un alto contenido de carotenoides y CF (Dorta et al., 2014). Otros estudios han demostrado que los subproductos de mango (cáscaras y semillas) tienen una gran actividad antioxidante atribuida a su alto contenido de CB tales como CF, carotenoides y esteroles (Masibo & He, 2008; Masibo & He, 2009).

Los CF contribuyen no sólo a las propiedades químicas y de textura en los alimentos, sino también a las propiedades sensoriales, principalmente a la astringencia y la amargura (Murkovic, 2016), también participan en la defensa contra la radiación UV o daños fisiológicos por patógenos. Estos compuestos pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenol que poseen y de los elementos estructurales que unen a estos anillos entre sí. Entre los principales grupos se encuentran los flavonoides (flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanolas: catequinas y proantocianidinas), y ácidos fenólicos (derivados de ácido benzoico y derivados de ácido cinámico), estilbenos y lignanos (Figura 4) (Manach et al., 2004).

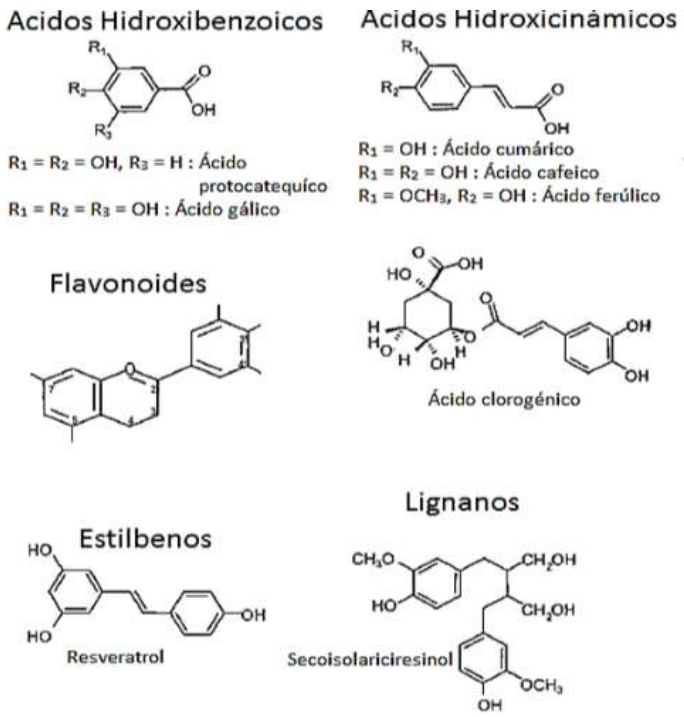


Figura 4 Estructura química de los principales compuestos fenólicos (Manach et al., 2004).

Diferentes investigaciones reportaron que el contenido fitoquímico de la pulpa de mango consiste en ácido gálico, mangiferina, glicósidos de quercetina y muchos taninos hidrolizables identificados y no caracterizados. Otros compuestos en concentraciones más pequeñas incluyen ácido p-hidroxibenzoico, m-cumárico, p-cumárico y ferúlico. En la mayoría de las variedades de mango, el ácido gálico libre (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) es el compuesto predominante presente (Matheyambath et al., 2016).

Manthey & Perkins-Veazie (2009) reportaron que el mango 'Ataulfo' presenta mayores cantidades de CF en comparación con otras variedades cultivadas en México. Los ácidos clorogénico, gálico, vanílico y protocatéquico son los principales CF en la pulpa de mango 'Ataulfo', y éstos tienden a aumentar con la maduración de los frutos, siendo el ácido clorogénico el más abundante.

Al igual que los compuestos fenólicos, los carotenoides son otros de los compuestos bioactivos presentes en el mango que presentan una función antioxidante. Los carotenoides están presentes en vegetales amarillos y rojos, los más conocidos son el β-caroteno, α-caroteno, luteína, zeaxantina y licopeno.

El fruto de mango es fuente rica de carotenoides (Cuadro 2). Los más conocidos son el β-caroteno, α-caroteno, luteína, zeaxantina y licopeno.

El β-caroteno es generalmente el carotenoide predominante en las pulpas de mango, que comprende el 48.84% del total de carotenoides. Durante la maduración del fruto del mango, los niveles de carotenoides aumentan, y los frutos maduros son diez veces más ricos en caroteno que los frutos parcialmente maduros, mientras que los mangos no maduros contienen sólo trazas (Matheyambath et al., 2016).

Además de los CF y carotenoides, los esteroles vegetales (fitoesteroles) son CB que se encuentran en todos los alimentos vegetales. Son alcoholes de 28 o 29 carbonos y se asemejan al colesterol en términos tanto de función (estabilización de las bicapas fosfolipídicas en las membranas celulares vegetales) como estructura (núcleo esteroide, grupo 3-hidroxilo, enlace doble 5,6) (Lagarda et al., 2006). Ensayos clínicos en humanos han establecido que los esteroles vegetales reducen el colesterol total y el colesterol LDL

(lipoproteínas de baja densidad), ya que inhiben competitivamente la absorción intestinal de colesterol protegiendo al organismo de enfermedades cardiovasculares (Kritchevsky & Chen, 2005).

En la composición química de los extractos lipófilicos en pulpa madura mango se encontró que los compuestos predominantes fueron esteroles libres y glicosilados, y ácidos grasos, representando respectivamente 44.8-70.7% y 22.6-41.9% de la cantidad total de componentes lipófilicos. B-Sitoesterol fue el componente principal de los esteroles libres, posteriormente el campesterol, fucosterol, estigmasterol, 24-metilenocolesterol y 24-metilenocicloartanol. Estos datos indican que el mango rica fuente de fitoquímicos valiosos que contribuyen a la ingesta de al menos 9,5-38,2 mg de fitoesteroles (libres y glicosilados) y 0,7-3,9 mg de ácidos grasos (ω-3 y ω-6) por 100 g de mango fresco (Vilela et al., 2013).

En la cáscara de mango 'Ataulfo' se han identificado ácido elágico, hidroxibenzoico, cafeico, ferúlico y gálico como los principales CF, siendo el 38.67 y 40.53% potencialmente bioaccesibles en pasta y cáscara, respectivamente (Blancas-Benitez et al., 2015).

En cuanto a, Rajendran et al. (2008) evaluaron el efecto de la mangiferina en los cambios de los componentes de la glicoproteína, las ATPasas y la peroxidación lipídica de la membrana en ratones control y con carcinoma de pulmón. En particular, en esta investigación se observó un aumento significativo en los niveles de glicoproteínas, ATPasas y peroxidación lipídica de la membrana en animales con carcinoma de pulmón, mientras al administrar mangiferina, estos cambios disminuyeron a niveles normales. El posible mecanismo de la mangiferina, especialmente en relación a la propiedad antioxidante, puede ser la inhibición de la formación de radicales libres y la reducción de la incidencia de cáncer.

Refrigerios saludables de frutas

Los alimentos están conformados por carbohidratos, proteínas y lípidos, además de vitaminas, minerales, fibra dietética y otras sustancias naturales que pueden tener efectos

positivos para la salud. González-Aguilar et al. (2014) reportan que los alimentos funcionales representan una nueva categoría de alimentos notablemente prometedores, entre las características que los hacen atractivos encontramos propiedades como el de bajar los niveles de colesterol, tener capacidad antioxidante, prevenir el riesgo de ciertos tipos de cáncer así como enfermedades del corazón (SSA, 2012).

Las frutas son una parte esencial de una dieta equilibrada, que a su vez juega un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles como la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares (OMS, 2004), se consideran una buena opción por ser bajos en calorías, altos en fibra, minerales (SSA, 2012), diversas vitaminas y CB; lo que sugiere que son excelentes refrigerios, los cuales pueden sustituir a comidas que están desequilibradas.

Gracias a los avances en la ciencia y el desarrollo de la tecnología podemos conocer las propiedades nutrimentales presentes en las frutas, y así mismo desarrollar productos alimenticios que faciliten el aprovechamiento de estos nutrientes, los cuáles como se ha mencionado anteriormente brindan beneficios a la salud humana.

Las diversas variedades de frutas y el avance en tecnologías de secado están poniendo un nuevo giro en las aplicaciones de frutas secas, que están disponibles en diferentes formas, incluyendo secos enteros, cortados, cortados en cubitos y polvos

Al igual que la pulpa, la cáscara de mango tiene CB como los carotenoides y los CF, así como FD con un excelente equilibro entre fibra soluble e insoluble y con un alto porcentaje de pectinas (Koubala et al., 2008), por lo que puede ser un ingrediente para alimentos funcionales; por ejemplo, se puede emplear en la elaboración de un alimento funcional como los macarrones (Ajila et al., 2010). Vergara-Valencia et al. (2007) trabajaron con un concentrado de FD compuesta por pulpa y cáscara de mango ‘Tommy Atkins’ reportando bajos niveles de lípidos y altos niveles de almidón, características valiosas para la elaboración de ciertos tipos de productos alimenticios.

Igualmente se ha trabajado con subproducto de mango ‘Ataulfo’ (cáscara y pasta) en productos de repostería, como las magdalenas, y también en golosinas tipo gomitas; resultando que los alimentos donde se agregó subproducto de mango obtuvieron mayor

contenido de FD en relación con un control (sin subproducto) (Ramírez-Maganda et al., 2015; Blancas-Benitez et al., 2015).

En el Laboratorio Integral en Investigación de Alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic, se elaboró un refrigerio saludable preparado a partir de pulpa y cáscara de mango 'Ataulfo' (barras de mango), siendo los carbohidratos los compuestos mayoritarios y con un valor notable de FD (Cuadro 2).

Cuadro 2 Valor nutricional de la barra de mango por 30 g de porción comestible.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL Porción= 30 g (1 barra de mango	
	Contenido por porción (g)
Carbohidratos	16.11
Proteínas	0.73
Grasas totales	0.61
Minerales	0.90
Fibra dietética	8.03
Fenoles solubles totales*	11.22
Valor energético	97.21 kcal = 406.72 kJ

*mg EAG/g de muestra bs (Agredano, 2015)

Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en mango

La bioaccesibilidad se define como la cantidad de un compuesto que se encuentra presente en el intestino, como consecuencia de la liberación de este compuesto de la matriz de un alimento; y que puede ser capaz de pasar a través de la barrera intestinal. Solo los CF liberados de la matriz alimenticia por la acción de enzimas digestivas (intestino delgado) y/o la microbiota intestinal (intestino grueso) son bioaccesibles y, por lo tanto, potencialmente biodisponibles. Las sustancias que alcanzan el intestino delgado son

removibles y constituyen la fracción soluble en el tracto gastrointestinal, los compuestos no liberados (la fracción no-bioaccesible) se descomponen en las heces (Saura-Calixto et al., 2007).

La digestión comienza en la cavidad oral, siendo la amilasa la enzima predominante. Debido al corto tiempo de interacción, el impacto de la digestión enzimática en la liberación de CF es bajo. La mayoría de los CF parecen liberarse durante la fase gástrica, ahí la digestión con pepsina junto con los movimientos peristálticos y el pH bajo, da como resultado un bolo digestivo de menor tamaño. Además, el bajo pH puede favorecer la presencia de CF en forma no disociada, que puede fomentar la transición/difusión desde la matriz a la fase acuosa debido a interacciones iónicas reducidas. Conforme la digesta pasa del estómago al intestino delgado, el pH generalmente aumenta de 2-4 a 7 aproximadamente, esto permite la activación de las enzimas secretadas por el páncreas y la bilis: la fosfolipasa, esteroesterasa, amilasa, carboxipeptidasa, tripsinógeno, quimiotripsinógeno, lipasa y sales biliares, éstas dos últimas ayudan en la digestión de los compuestos más apolares, como los lípidos y fitoquímicos (carotenoides), los CF apolares como la curcumina y las xantonas, así como las agliconas, flavonoides e isoflavonoides, también pueden ser micelarizados a través de esta vía (Bohn, 2014).

Los CF que no se absorben en el intestino delgado y, por lo tanto, entran en el colon. Dado que las paredes celulares pueden ser completamente fermentadas en el colon, estos CF atrapados/enlazados serán liberados y disponibles para absorción directamente a través del epitelio del colon, metabolizados por bacterias del colon antes de ser absorbidos o excretados sin metabolismo adicional (Crozier et al., 2010).

Los CF son estructuras anfifílicas capaces de: a) establecer interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas, b) quelar iones metálicos, c) absorber la luz UV y d) donar átomos de hidrógeno y/o transferir electrones (Figura. 5) (Torres et al., 2016). El grupo de polisacáridos que forman a la fracción indigestible se encuentran interaccionando químicamente con los CF, por lo que quedan atrapados en ella (Figura. 6). Los CF poseen anillos aromáticos hidrofóbicos y grupos hidroxilo hidrofílicos con la capacidad de enlazar polisacáridos y proteínas en la superficie de la pared celular. Este tipo de interacciones puede darse por puentes de hidrógeno (entre el grupo hidroxilo de los CF y los átomos de

oxígeno de los enlaces glucosídicos de los polisacáridos), interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes (enlace éster entre ácidos fenólicos y polisacáridos). Los compuestos de la FD que interaccionan con los CF incluyen al grupo carboxilo del ácido urónico (hemicelulosa y pectina) y el grupo hidroxilo presente en la celulosa (Quirós Sauceda et al., 2011).

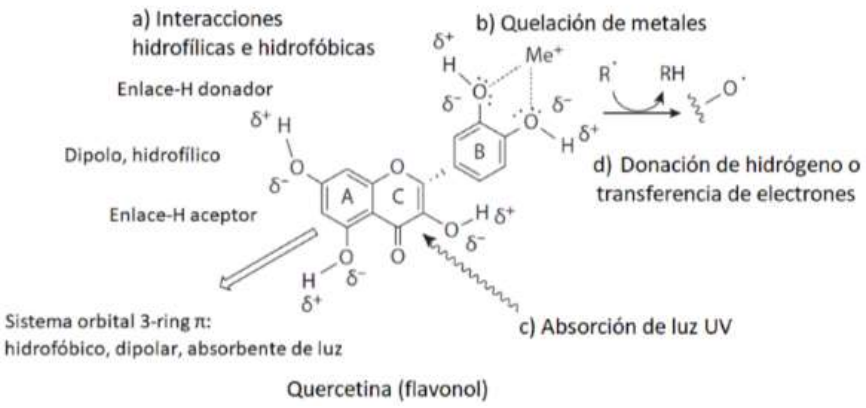


Figura 5 Estructura de un CF y sus interacciones químicas. Fuente: Torres et al., (2015).

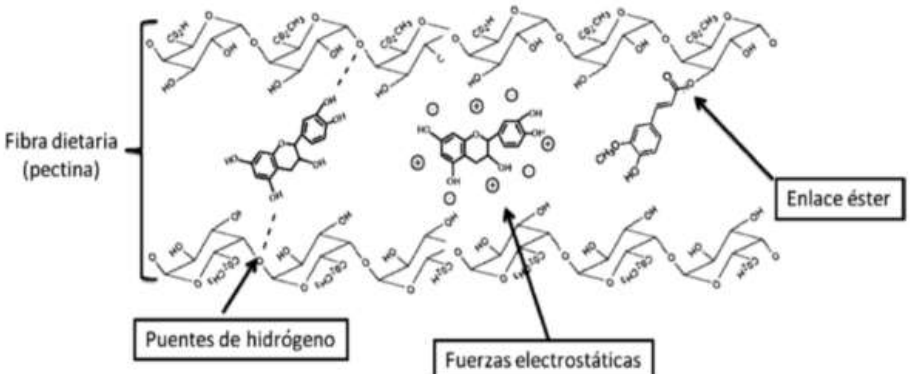


Figura 6. Tipos de interacciones entre compuestos fenólicos y fibra dietética. Fuente: Quirós-Sauceda et al. (2011).

Con base en el estudio realizado por Mercado-Mercado et al. (2015), la hidrólisis enzimática utilizada en el análisis de FD puede proporcionar una mejor aproximación al perfil de CF liberados de la matriz alimenticia bajo condiciones gástricas, lo que se traduce en un aumento de la bioaccesibilidad en residuos de decocción de flor de Jamaica. Esto podría contribuir a una comprensión más detallada de los mecanismos complejos

involucrados en la bioaccesibilidad de CF y para mejorar la función de la FD soluble como portador que permite a los CF alcanzar el colon y promover la salud. Saura-Calixto et al. (2007) estudiaron una dieta española consistente en frutas sólidas, verduras, legumbres y cereales, se estimó que el 42% de los CF totales eran bioaccesibles en el colon, mientras que el 10% eran inaccesibles y permanecieron en las matrices alimenticias después de todo el proceso de digestión.

La biodisponibilidad es una consideración importante en varias áreas de la nutrición, incluyendo la derivación de referencias dietéticas, la estimación de posibles cambios de impacto en el patrón dietético, la selección de fortificantes específicos para alimentos y la formulación de productos. Wang et al., (2006) demostraron que después de la administración oral de mangiferina purificada a ratas Sprague-Dawley, seguido de la recolección de sangre (más de 24 h) y de muestras de orina (más de 48 h), el compuesto original es biodisponible en ambas matrices biológicas, por lo tanto, la mangiferina pudiera ser metabolizada por la bacteria intestinal.

Fermentación colónica *in vitro*

En los últimos años con los avances científicos y estudios realizados cada vez más se considera al colon como un órgano central de la digestión, ya que en él tiene lugar la fermentación por la microbiota colónica de sustratos, fundamentalmente carbohidratos, que escapan de la digestión por las enzimas digestivas en el intestino delgado humano (García et al., 2002). El colon humano alberga un ecosistema microbiano altamente complejo que interactúa simbióticamente con el huésped y funciona como un biorreactor con un potencial metabólico ilimitado (Dall'Asta et al., 2012).

En el intestino, la cantidad y diversidad de especies microbianas aumentan desde el estómago hasta el colon. El colon humano es uno de los órganos más diversamente colonizados y metabólicamente activos en el cuerpo humano. Hasta 1000 especies diferentes de bacterias residen en el colon con poblaciones microbianas que comprenden 1011-1012 (Arbizu y Nurko, 2016) hasta más de 1013 células microbianas individuales (Sender et al., 2016), compuestas principalmente por anaerobios que pertenecen a la familia de Firmicutes (incluidos los géneros Clostridium, Enterococcus, Lactobacillus y

Ruminococcus) y Bacteroidetes (que incluyen los géneros Prevotella y Bacteroides) que constituyen más del 90% de las categorías filogenéticas conocidas y dominan la microbiota del intestino distal (Dueñas et al., 2015). A través de todo el trayecto del intestino, la composición de la microbiota también demuestra variación a lo largo de su diámetro con ciertas bacterias que tienden a adherirse a la superficie de la mucosa, mientras que otros predominan en el lumen (Serrano, 2013).

La microbiota intestinal tiene muchas funciones importantes, tales como la síntesis de nutrientes, la digestión y la absorción, la estimulación inmune y el control de patógenos (Russell et al., 2011). Influye en una gran variedad de funciones intestinales y desempeña un papel clave en la nutrición, en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial, en el desarrollo de la inmunidad de las mucosas y en el metabolismo del hospedero (Serrano, 2013).

El colon proporciona un ambiente favorable para el crecimiento bacteriano debido a su tiempo de tránsito más lento, nutrientes fácilmente disponibles y pH variable. Generalmente, las bacterias que tienen un metabolismo sacarolítico casi exclusivo pueden considerarse potencialmente beneficiosas, tal perfil metabólico es típico para Lactobacilos y Bifidobacterias. La microbiota intestinal lleva a cabo reacciones químicas para modificar esqueletos fenólicos y permite la absorción de una gama de metabolitos de menor peso. Las enzimas microbianas pueden hidrolizar glicósidos, glucurónidos, sulfatos, amidas, ésteres y lactonas y operar la escisión del anillo, la reducción, la descarboxilación, la desmetilación y las reacciones de deshidroxilación (Arbizu y Nurko, 2016).

La dieta es un poderoso modificador de la microbiota intestinal. Se sabe que los componentes dietéticos que escapan a la digestión en el intestino delgado son críticos para desarrollar, alimentar y mantener una microbiota intestinal saludable y fisiológicamente útil. Importante entre estos es la FD, pero tanto la ingesta total y la calidad de la fibra son igualmente importantes (Topping & Lockett, 2016).

El colon también está involucrado en el metabolismo y la absorción de otros nutrientes; por ejemplo, las proteínas, a través de la fermentación, se convierten en el colon distal a AGCC, ácidos grasos de cadena ramificada, aminas, amoníaco, fenoles y sulfuros (Arbizu y Nurko, 2016).

Reddy et al. (1997) consideran a la inulina y los fructo-oligosacáridos como FD, ya que incrementan la biomasa del colon, su fermentación produce AGCC como ácido propiónico, butírico, acético y láctico. Una vez que la inulina y los fructo-oligosacáridos son aprovechados por las bacterias lácticas, estas modulan el metabolismo de lípidos, hormonas, respuesta inmune, ya que previenen infecciones gastrointestinales, atenuando la virulencia de agentes patógenos y su adherencia, además ayudan a la absorción de nutrientes en el intestino y a disminuir la intolerancia hacia ciertos alimentos.

La fermentación sacarolítica es la más beneficiosa para el organismo y produce principalmente: acético, propiónico y butírico, en una proporción molar casi constante de 60:25:15 (Guarner & Malagelada, 2003). Aproximadamente el 90% de estos AGCC son absorbidos por la mucosa en el colon proximal a través de canales de transporte de AGCC/bicarbonato y otros transportadores acoplados a electrolitos. Un promedio de 400 mmol/día de AGCC se produce en el colon, proporcionando el 5-15% de las necesidades calóricas totales (den Besten et al., 2013).

La degradación de polisacáridos inicia con una hidrólisis extracelular que los convierte en mono y disacáridos, seguido por una glucólisis anaeróbica intracelular (fermentación) que tiene como productos finales AGCC, los cuales son sustratos preferenciales para las células intestinales. Estos se generan en el metabolismo del piruvato, producidos por la oxidación de la glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof (Guarner & Malagelada, 2003).

Los AGCC son compuestos pleiotrópicos notables que proporcionan la fuente de energía preferida para las células de la mucosa que recubren el intestino y para los canales encargados de la recolección de energía adicional de los componentes del alimento no digeridos en el intestino delgado. Se ha demostrado que promueven la homeostasis intestinal (incluyendo la eliminación de células cancerosas y precancerosas a través de apoptosis), la saciedad, el desarrollo y tolerancia del sistema inmune intestinal, mantienen la función de barrera intestinal y suprimen la inflamación intestinal (Topping & Lockett, 2016).

Fermentación colónica *in vitro*: modelos

En consecuencia a la importancia del estudio de la fermentación colonica se han ido desarrollando nuevas tecnologías, las cuales buscan simular el proceso digestivo con la finalidad de poder evaluar y estudiar estos procesos biológicos y bioquímicos.

Simulador Shime

SHIME® es un modelo dinámico científicamente validado único del tracto gastrointestinal completo que es empleado para estudiar los parámetros fisicoquímicos, enzimáticos y microbianos en el tracto gastrointestinal en un entorno *in vitro* controlado (2016 ProDigest).

El modelo consta de cinco reactores que simulan secuencialmente el estómago (condiciones ácidas y digestión con pepsina), el intestino delgado (procesos digestivos) y las 3 regiones del intestino grueso, es decir, el colon ascendente, transversal y descendente (procesos microbianos). El control cuidadoso de los parámetros ambientales en estos reactores permite obtener comunidades microbianas complejas y estables, que son muy similares en estructura y función a la comunidad microbiana en las diferentes regiones del colon humano. El modelo se puede utilizar para estudiar el destino metabólico de los compuestos alimenticios, microbianos y farmacéuticos durante un período de varias semanas (2016 ProDigest).

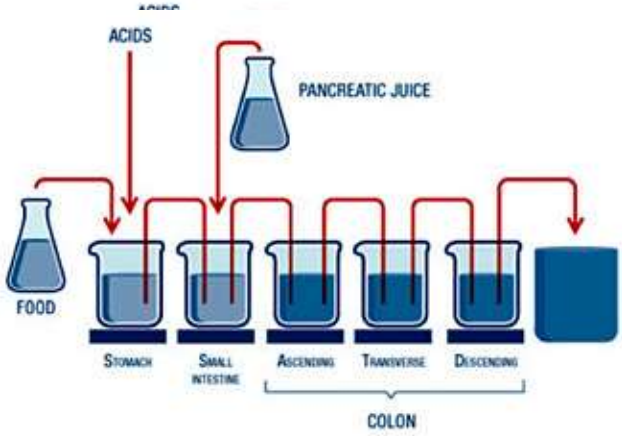


Figura 6 Modelo de Simulador Gastrointestinal Shime

Simulador TIM

El modelo Grastro Intestinal TNO (TIM) es un compartimento multiple modelo, diseñado para simular de forma realista las condiciones del tracto gastrointestinal. TIM se utiliza con éxito para estudiar el comportamiento gastrointestinal de una amplia variedad de alimentos y productos farmacéuticos (Minekus, M. 2015).

Los experimentos en TIM son basados en una simulación por computadora de las condiciones digestivas en la luz del intestino durante el tránsito y la digestión de una comida in vivo. Estas condiciones incluyen el control de parámetros tales como el tránsito gástrico y del intestino delgado, las tasas de flujo y la composición de fluidos digestivos, valores de pH, eliminación de agua y metabolitos.

Se han desarrollado protocolos de simulación para perros, cerdos, terneros y humanos jóvenes, adultos y ancianos después de la ingestión de varias comidas. El punto final típico de los resultados obtenidos con TIM es la disponibilidad de un compuesto para la absorción a través de la pared intestinal (bioaccesibilidad).

El Modelo Gastro-Intestinal TNO (TIM) es un modelo dinámico multicompartimental que se desarrolló a principios de la década de 1990 en respuesta a la demanda industrial para estudiar productos alimenticios en condiciones fisiológicamente más relevantes en comparación con los modelos de digestión contemporáneos (Minekus et al. 1995). Durante los últimos años, TIM se ha desarrollado a partir de una configuración de laboratorio experimental, controlada por una PC de 8 MHz, en una plataforma de sistemas de gabinetes que se utilizan con éxito para una amplia gama de estudios, sirviendo a las industrias alimenticias y farmacéuticas.

El tracto gastrointestinal es un tubo como órgano con diferentes compartimentos (estómago, intestino delgado, intestino grueso) para cada paso de la digestión. Durante el tránsito gradual de la comida a través de los compartimentos se exponen a diferentes fracciones de la comida condiciones cambiantes debido a la secreción gradual de fluidos digestivos y la absorción de agua y nutrientes. TIM tiene la intención de simular las

condiciones dinámicas en la luz del tracto gastrointestinal, está diseñado para combinar la capacidad de control y reproducibilidad de un sistema modelo con parámetros fisiológicos como la mezcla, el tránsito de comidas, valores de pH variables en el lugar y el tiempo, secreción realista y composición del aparato digestivo fluidos y eliminación de compuestos digeridos y agua. Estos parámetros se combinan en un protocolo como entrada para una simulación por computadora de un entorno digestivo específico. Tal configuración incluye especies (humanos, perros, cerdos, terneros), edad (lactantes, adultos, ancianos), patología y parámetros relacionados con las comidas, obtenidos de datos in vivo (Smeets-Peeters 2001; Havenaar y col. 2013). Basado en la simulación por computadora el modelo físico se controla para reproducir la configuración subyacente in vivo.

Simulador AINIA

El modelo de digestión dinámico in vitro de AINIA es capaz de reproducir in vitro (en el laboratorio) las condiciones mecánicas y fisicoquímicas presentes en el sistema digestivo humano más fielmente que los modelos estáticos in vitro. Así, lleva a cabo un proceso de digestión muy similar al que ocurre en el interior de cada uno de nosotros al permitir imitar los movimientos del estómago, presiones que sufren los alimentos durante la digestión y el vaciado del alimento del estómago al intestino (ainia © 2016).

Figura 8 Simulador gástrico ainia

Simulador ARIS

Algunos de los sistemas más exitosos en su capacidad para reproducir las condiciones ecofisiológicas del TDH (Tracto digestivo humano) son los sistemas combinados de simulación fluida in vitro con aislados de microbiota gastrointestinal, destacando los sistemas SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) de Prodigest, los sistemas TIM-1 y TIM-2 (TNO intestinal model) de TNO 8 y el sistema ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System) de CIATEJ.

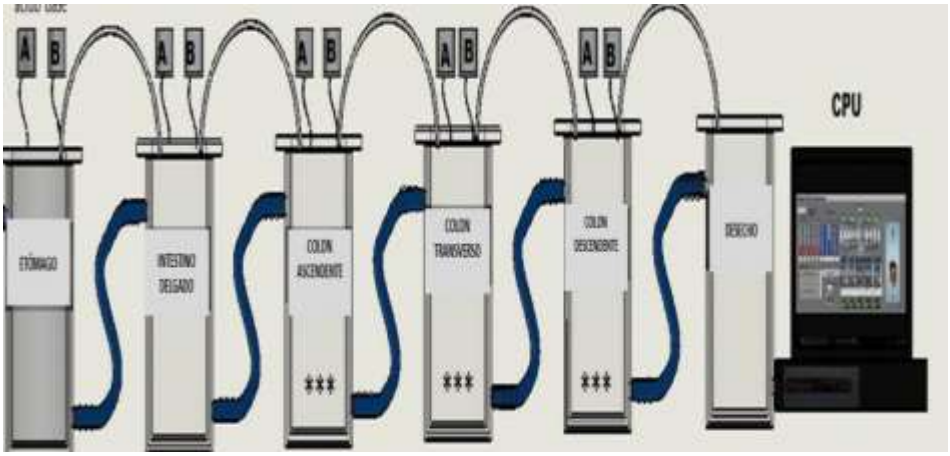


Figura 9 Representación esquemática del simulador del tracto digestivo humano ARIS ((Automatic and Robotic Intestinal System) y parámetros de operación para una población de estudio, con los que se lleva a cabo el proceso para evaluación de productos en un sistema de digestión normal; los asteriscos (***) indican las secciones inoculadas con microbiota intestinal humana, dispensador de ácido (A), dispensador de base (B).

ARIS permite la simulación de cinco secciones del TDH, estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transverso y colon descendente; cuenta con sistemas de funcionamiento independiente en cada sección diferenciándose de los procesos secuenciales de sistemas similares; adicionalmente utiliza muestras de microbiota 94 de poblaciones metabólicas definidas (población abierta, infantil, adulta, sobrepeso, atlética etc.)9; representada de manera estadísticamente significativa en el concentrado microbiológico de estudio. La correlación entre las dinámicas poblacionales y estructuras filogenéticas de la microbiota intestinal encontrada in vivo y las de la microbiota presente en el sistema ARIS es positiva, se mantiene con el tiempo y se modula de manera

equivalente a los hallazgos en estudios clínicos. Por las características y origen de la muestra, se considera al sistema ARIS como un modelo ex vivo (fig. 9) ya que se encuentra depositado el "órgano" completo, es decir la microbiota intestinal. A través de este sistema, es posible obtener muestreos en cualquier momento del proceso digestivo y en cualquier sección, lo que lo convierte en una herramienta de la que se pueden obtener datos que no pueden ser recuperados en estudios clínicos o intervenciones nutricionales. A continuación, se presentan algunos ejemplos del uso de ARIS como modelo de elección preclínica para realizar estudios de interés de la industria alimenticia y farmacéutica; sin embargo, las posibilidades de este sistema no se limitan a las presentadas en este capítulo, solo se ejemplifica con los siguientes estudios representativos: a) Biodisponibilidad y digestibilidad de alimentos, b) Evaluación de probióticos c) Evaluación de prebióticos y d) Evaluación y validación de sistemas de liberación controlada y encapsulados de compuestos activos (González, 2018)

Microbiota intestinal

El termino microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado. La microbiota residente en el intestino humano es una de las comunidades más densamente pobladas (Ruiz et al., 2012) incluso que el suelo, el subsuelo y los océanos. El ecosistema microbiano del intestino (microbiota intestinal) incluye muchas especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal, y una serie variable de microorganismos que solo lo hacen de manera transitoria. Al conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos se le denominan microbioma. El microbioma humano se refiere a la población total de microorganismos con sus genes y metabolitos que colonizan el cuerpo humano, incluyendo el tracto gastrointestinal, el genitourinario, la cavidad oral, la nasofaringe, el tracto respiratorio y la piel (Petrosino et al., 2009). La microbiota modula la expresión de genes que regulan la absorción de nutrientes, la mejora de la barrera mucosa, metabolismo xenobiótico y angiogénesis.

El ecosistema intestinal es un entorno en el ocurren interacciones biológicas y bioquímicas en varios niveles jerárquicos, conectando a las comunidades microbianas y sus huéspedes (Bradford et al, 2012).

Estudios de muestras de heces revelaron que la microbiota de un intestino sano es un comunidad ecológica compleja compuesta de billones de microorganismos, desde virus hasta eucariotas unicelulares (Partida-Rodriguez et al., 2017)]. Sin embargo nosotros, usaremos el término microbiota para referirnos solo a la población de bacterias de un organismo. La microbiota intestinal es altamente dinámica, varía con el tiempo y está modulada por las condiciones ambientales (uso de antibióticos, estilo de vida, preferencias de dieta e higiene, disfunción metabólica, inmunodeficiencia e hiperinmunidad) (Sommer et al., 2013).

Los cambios en la composición de la microbiota generalmente tienen un efecto directo sobre infección parasitaria, en parte porque los parásitos y las bacterias se metabolizan sustratos interactivamente y secretan productos que se afectan entre sí, interfiriendo con la supervivencia y la fisiología de ambos (Berrilli et al., 2012) Del mismo modo, La constitución de la comunidad microbiana es un factor extremadamente importante para las respuestas inmunes del huésped: desequilibrio entre la microbiota y el sistema inmunitario puede alterar la homeostasis del huésped y conducir a una mayor susceptibilidad a la enfermedad, y por lo tanto dictan el éxito del intestino patógenos.

Alrededor del 50% de la masa fecal está constituida por bacterias. Esta población se compone de trillones de microorganismos pertenecientes, fundamentalmente, a 4 filas: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria, con un predomino de las 2 primeras (90%) (Draganov, 2009)

Materiales y métodos

Sustrato de subproductos de mango

Los mangos (cv. Ataulfo) se compraron en el mercado local en Tepic, estado de Nayarit, México. Las frutas se lavaron con agua corriente, se desinfectaron (Biopur, México) y se cortaron en rodajas (cáscara con pulpa) de 3 mm de espesor (Tor-Rey, R-300, México). Las rodajas de fruta se secaron en un horno con convección forzada por aire a 70 ° C durante 22 h; (Scorpion Scienti fi c, A-52055, México). Las rodajas secas se molieron en un procesador de alimentos (NutriBullet, NBR-0804B, Los Ángeles, CA, EE. UU.). Para preparar las barras a base de mango, la fruta molida se moldeó con un agente aglutinante (Nutriose FB, Tecnovam, México), y las barras se secaron a 60 ° C durante 3 h (ScorpionScienti fi c, A-52055, México). Las barras estaban preparadas sin aditivos o conservantes para endulzar. Las muestras de la barra se liofilizaron (FreeZone 6, Labconco, Kansas City, MO, EE. UU.). Y posteriormente se molieron (NutriBullet), se tamizaron (0,5 micras) y se almacenaron en bolsas selladas a -20 ° C hasta el análisis.

Pre digestión de la barra

Las muestras liofilizadas se sometieron a digestión *in vitro* o simulación gástrica antes de comenzar, se determinó la humedad de las muestras y se pesaron (A&D Company Limited, HR-250AZ, Seoul, Korea) 300 mg en tubos de centrífuga de 50 mL a peso constante (Thermo Scientific, 31140050, Rochester, New York, Estados Unidos). Brevemente, las muestras se sometieron a hidrólisis con 0.2ml de pepsina (300 mg / ml en tampón HCl-KC lo.1M, ph 1.5, P-7000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), durante 1 h a 40 ° C. Inmediatamente después de la fase gástrica, a las muestras se le añadieron 4.5 ml de un tampón fosfato(0.2M, pH 7.5, 6 h, 37 ° C) y 1ml de una solución de pancreatina (5 mg de pancreatina/mL) (Sigma Aldrich, P-1750, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) para una fase intestinal simulada. Después se añadieron 9 mL de tampón Tris-Maleato (0.5 M, pH 6.9) que contiene 1ml de α-amilasa (5 mg / ml en tampón fosfato, 16 h, 37 ° C) (A-6255, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU).

Finalmente, se añadió 10 mL de tampón de acetato de sodio (pH 4.75) y se ajustó el pH, para finalmente añadir 100 µL de amiloglucosidasa (Sigma Aldrich, A-9913, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Las muestras se incubaron a 60º C por 45 min con agitación, y posteriormente se enfriaron los tubos a temperatura ambiente.

Los tubos se colocaron en una centrífuga (Hermle, Z326K, Wehingen, Alemania) por 15 min a 3000 rpm, se recogieron los sobrenadantes y los residuos se lavaron con 5 mL de agua destilada, se agitaron (Scientific Industries, Vortex-Genie2 G560, Bohemia, New York, Estados Unidos) y de nuevo se centrifugaron, el sobrenadante se mezcló con el resto.

Para cuantificar la FII, los residuos se secaron en horno (Novatech, HS60A1D, Tlaquepaque, Jalisco, México) a 100 °C por 24 h. Se añadió 3 ml de H2SO4 (12 M), manteniendo en baño maría a 37 ° C por espacio de 1 h. Enseguida se añadió 33 mL de agua destilada y se colocaron en baño con agitación a 100 °C por espacio de 90 minutos para hidrolizar la fibra insoluble. Después se centrifugaron las muestras hidrolizadas a 3000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. Se lavó 2 veces el residuo con 5 ml de agua destilada y se centrifugaron en las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

Posteriormente, se tomó una muestra de 0.5 mL en tubos de ensayo, a cada tubo se le añadió 0.25 mL de NaOH (3.9 M) y 1 mL de reactivo colorimétrico (10 g de ácido 3,5dinitrosalicilico + 16 g de NaOH + 300 g de tartrato sódico-potásico tetrahidratado). Las muestras se agitaron y se colocaron en baño por 10 min a 100°C, se enfriaron y se añadieron 10 mL de agua destilada. Para la determinación de la absorbancia se tomaron muestras de 3 ml para leerlas en un espectrofotómetro (Jenway, 7315, Stone, Staffordshire, Reino Unido) a 530 nm. Se realizó una curva de calibración con glucosa estándar a una concentración de 0 a 2000 ppm.

Para cuantificar la FIS, los sobrenadantes se transfirieron a bolsas de diálisis (largo de 25 cm, anchura plana de 33 mm, D9652-30.48 m, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), las cuales se colocaron en un baño de agua a 100 ºC durante 10 min, posteriormente se colocaron en una cubeta con flujo constante de agua corriente por 48 h a 25 °C. Transcurrido el tiempo, se recogieron las bolsas de diálisis y se tomaron 17 mL de solución dializada, se añadió 1 mL de H2SO4 concentrado a los tubos, que fueron incubados en baño con agitación a 100 °C durante 90 min. Posteriormente se enfriaron a

temperatura ambiente y se tomó una muestra de 0.5 mL y se le añadieron 0.25 mL de NaOH (3.9 M) y 1 mL de reactivo colorimétrico.

Las muestras se trataron como fue mencionado anteriormente y se tomaron 3 ml de muestra para la determinación de la absorbancia en un espectrofotómetro. De la misma manera, se realizó una curva de calibración con glucosa estándar a una concentración de 0 a 2000 ppm. La cuantificación de la FIT se determinó como la sumatoria de FII + FIS

Fermentación colónica

La FIT de la barra de mango se fermentó en un sistema discontinuo bajo condiciones anaerobias estrictas, siguiendo una adaptación del método descrito por Campos-Vega et al. (2009), con modificaciones de Zamora-Gasga et al. (2018)

Primeramente se preparó el medio de fermentación, el cual se esterilizó por filtración, el filtrado se colocó en un vaso de cultivo con tapa (esterilizado previamente en autoclave); se limpió la campana de flujo laminar con alcohol, posteriormente se encendió el flujo de la campana junto con la lámpara germicida por 20 min. Transcurrido este tiempo se encendió un mechero de alcohol para garantizar que el área de trabajo sea estéril, se colocó una jeringa de 3 mL (Terumo®, 21Gx1.5”, Estados Unidos) al tapón de caucho con manguera previamente esterilizados y se conectó la manguera principal del tanque de gases (H_2-CO_2N_2: 10-10-80), se abrió el paso del gas a un flujo mínimo (7.5 L/h) hasta comenzar a burbujear. Se colocó el vaso del medio dentro del baño a 37 °C (Boekel Scientific, 290400, Feasterville, Pennsylvania, Estados Unidos) y se dejó durante toda la noche por 12 h. Previamente, en la campana de extracción, se colocó el sistema de fermentación (mangueras y tapones estériles) junto con el baño de agua a 37 ºC y se encendió la lámpara germicida por 20 min.

Se pesaron (A&D Company Limited, HR-250AZ, Seoul, Korea) 100 mg de muestra y rafinosa para cada tiempo de fermentación (0, 6, 12, 24 y 48 h) en tubos de centrífuga de 15 mL estériles y etiquetados (Capp Denmark, 5100050, Nordhausen, Alemania), llevándolos a -20º C para posteriormente ser utilizados en la fermentación. Antes de comenzar con la fermentación, se limpió la campana de flujo laminar con el procedimiento descrito

anteriormente. Se llevó el medio de cultivo y los tubos con los sustratos a la campana de flujo laminar previamente estéril y se añadieron 9 mL del medio de cultivo a cada tubo.

Simultáneamente, se pesaron 10 g de inoculo fecal fresco (recolectado en un recipiente con condiciones anaeróbicas por 4 personas sin obesidad, sin ningún tipo de padecimiento intestinal y sanos, es decir, que no hayan tomado tratamiento con antibióticos en 3 meses). Se mezcló la muestra fecal con 90 mL de buffer de fosfatos (pH 7.0, 0.1 M) y se homogenizó (Ika, Ultra-Turrax T18 digital, Alemania) la muestra. Se llevó a la campana de flujo laminar y se añadió 1 mL del inóculo fecal a cada tubo y se cerraron con los tapones de caucho con manguera perforados con una jeringa estéril. Se agitaron (Scientific Industries, VortexGenie2 G560, Bohemia, New York, Estados Unidos) por 10 segundos y se tomó el pH (Hanna instruments, HI2210, Cluj-Napoca, Rumania). Después se ensamblaron las gradillas con los tubos restantes al sistema de fermentación, se abrió el paso del gas a un flujo de 7.5 L/h (1/8 en el flujómetro), verificando que no tuviera fugas y que los émbolos de las jeringas subieran sin problemas y sin botarse.

Cuando pasaron las primeras 6 h, se tomaron los tubos correspondientes a ese tiempo, las muestras se agitaron y se tomó el pH. Después de leer el pH se centrifugaron los tubos (Hermle, Z326K, Wehingen, Alemania) para recuperar el sobrenadante en viales para las determinaciones posteriores, almacenándose a – 80 °C. Se realizó el mismo procedimiento para los tubos correspondientes a los 12, 24 y 48 h

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó un kit comercial, QIAGEN. Primeramente se pesó 200µl de muestra en un microtubo de 1,5ml, posteriormente se le agrego 250µ de lisosima [20mg/ml] donde ser dejo incubar 30min a 37°C en un termomix. Terminado este tiempo se agregaron 180µl de ATL buffer y 25µ de proteinasa k, la cual se incubo en un termomix por 40min a 56°C. Posteriormente se le adiciona 200µl AL buffer y se mezcla en el vortex, se centrifuga a 8000rpm durante 1min y el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo, se repite el paso anterior y se mezcla el sobrenadante con 200µl de etanol al 96%. Nuevamente el sobrenadante se transfiere a columnas de filtración con membrana y se centrifuga a 8000rpm por 1, donde se desecha el líquido y la columna se le agregan 500µl de AW1 buffer, se deja actuar por un minuto y se centrifuga a 8000rpm durante 1min. Se

desecha el líquido y a la columna se adicionan 500 µl de AW2, donde se deja a reposar nuevamente por un minuto y posteriormente se centrifuga a 14000 rpm durante 3 min. El líquido restante se desecha, la columna con mebrana se transfiere a un microtubo nuevo y finalmente se adicionan AE buffer elution con el cual se centrifuga a 8000 rpm durante 1min. El producto final sometido a un análisis de calidad a través de nanodrop.

Resultados

Fermentación colónica

Se obtuvieron 15 muestras de cada uno de los diferentes tratamientos durante la simulación gastrointestinal de fermentación colónica, teniendo un total de 45 muestras para analizar.

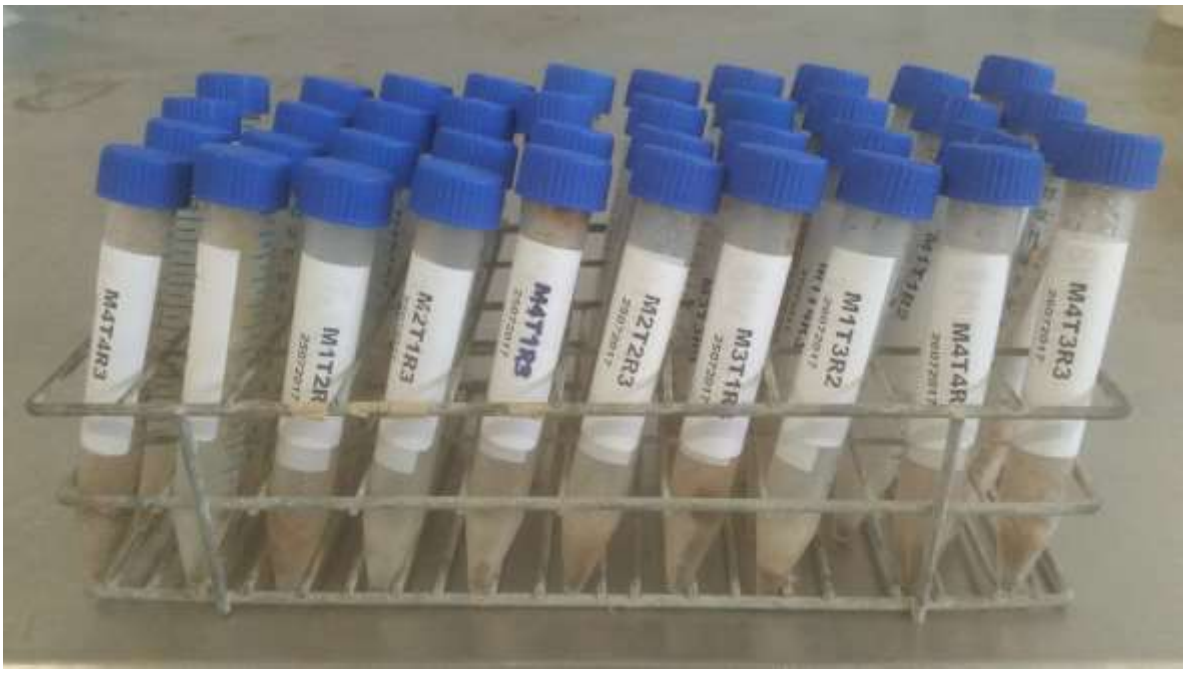


Figura 10. Muestras de los diferentes tratamientos; M1 corresponde al control positivo (Rafinosa), M2: control negativo (Inoculo), M3: (Barra de mango). En los diferentes tiempos del tratamiento (T0: 0h, T1: 6h, T2: 12h, T3: 24h, T4: 48h).

En la Figura 10 se observan los tubos que contiene al producto de la fermentación colónica de la fracción indigestible de mango "Ataulfo". Posteriormente estas muestras fueron almacenadas en congelación a -80 °C para el análisis posterior de la microbiota.

Concentración y Calidad en el ADN

Por otro lado se realizó la cuantificación de ADN extraído (Cuadro 3), en los resultados podemos apreciar que existe una concentración alta y el ADN de buena calidad. De acuerdo a las especificaciones del equipo utilizado, el índice de absorbancia corregida a 260 nm en relación a la absorbancia corregida a 280 nm (A260/A280), lo cual indica que un índice

mayor o muy cercano a 1.8 es aceptado como muestra pura en la cuantificación de ADN genómico, mientras que en índice de absorbancia corregida a 260 nm en relación a la absorbancia corregida 230 nm (A260/A230) indica tanto para ADN y ARN que el índice de pureza de la muestra deben estar entre 1.8 y 2.2 (Thermo Scientific, 2016).

Cabe mencionar que los resultados que se utilizaron para determinar la pureza de la muestras fueron los resultados obtenidos en el índice A260/A280 puesto que el rango del espectro fue más amplio en comparación con el índice A260/A230.

Cuadro 3. Cuantificación de ADN extraído utilizando el equipo Nanodrop One. Promedio de las réplicas de cada muestra por tiempo de cada tratamiento.

MUESTRAS	ng/µl	A260/A280
M1T0	$1215.56 \pm 403.33^{A,b}$	1.79
M1T1	$4986.11 \pm 3049.26^{A,a}$	1.99
M1T2	$3384.44 \pm 1285.25^{A,ab}$	1.99
M1T3	$11676.11 \pm 6277.40^{A,ab}$	2.09
M1T4	$26069.44 \pm 5688.90^{B,b}$	2.14
M2T0	$499.44 \pm 189.27^{A,a}$	1.36
M2T1	$617.78 \pm 189.57^{A,a}$	1.50
M2T2	$976.11 \pm 547.54^{A,a}$	1.61
M2T3	$853.33 \pm 187.24^{A,a}$	1.46
M2T4	$669.44 \pm 215.23^{A,a}$	1.50
M3T0	$452.78 \pm 69.45^{A,a}$	1.51
M3T1	$4081.67 \pm 456.70^{AB,a}$	2.01
M3T2	$10507.78 \pm 5630.33^{AB,b}$	2.09
M3T3	$23393.33 \pm 9752.40^{BC,b}$	2.18
M3T4	$37352.78 \pm 12487.83^{C,b}$	2.19

Letras mayúscula indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) dentro del tratamiento. Letras minúsculas indican diferencia estadística significativa (´$P<0.05$) entre los tiempos. * Promedio ± desviación estándar.

En el cuadro 3 podemos observar que se presenta una diferencia significativa (letras mayúsculas) en la concentración de ADN entre las muestras de M2 (inoculo, control negativo) en comparación a las muestras de M1 y M3 los cuales corresponden a los tratamientos de Rafinosa (control positivo) y Mango respectivamente.

Los tratamientos en base al tiempo de T0 (0h), T1 (6H), T2 (12H), T3 (24H) y T4 (48h) presentan un comportamiento similar, donde se puede apreciar que la existe una diferencia significativa es los tratamientos M1 y M3 principalmente en el T4.

Lo cual nos permite suponer que existe un aumento y cambio en la microbiota intestinal en estos tratamientos, existiendo más variabilidad en el tratamiento de Mango.

Electroforesis del ADN

Para verificar la integridad del ADN, se realizó una electroforesis de las muestras de ADN extraídos. El gel de electroforesis fue revelado y se logró observar que el ADN extraído fue de buena calidad ya que las bandas reveladas son nítidas de acuerdo al marcador utilizado (Figura 8)

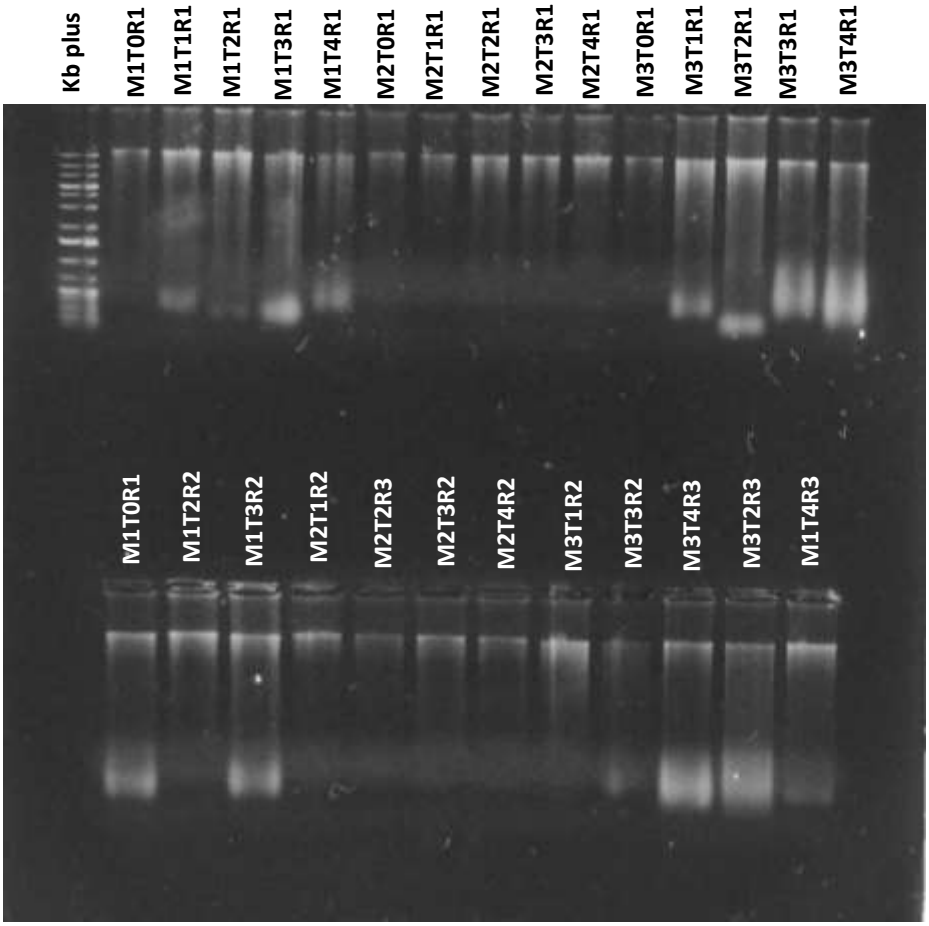


Figura 11. Gel de agarosa 1% revelado después de electroforesis. Las muestras se realizaron con ADN genómico de las muestras de los diferentes tratamientos; M1 corresponde al control positivo (Rafinosa), M2: control negativo (Inoculo), M3: (Barra de mango). En los diferentes tiempos del tratamiento (T0: 0h, T1: 6h, T2: 12h, T3: 24h, T4: 48h).

La investigación de estas bacterias asociadas al intestino se complica por el hecho de que la mayoría aún no se ha cultivado en el laboratorio y solo ha sido a través del desarrollo de enfoques independientes del cultivo, y más recientemente a través de la aplicación de secuenciación de alto rendimiento, por lo que obtener ADN de calidad es de suma importancia para continuar con la secuenciación e identificación de la microbiota intestinal.

La importancia de la integridad del ADN es determinante ya que se necesita partir de un producto de excelente calidad para estudios posteriores, por ejemplo, antes de secuenciar, es muy importante para los propósitos de validación de la secuencia.

El ADN codifica los genes de un organismo y la información que contiene funciona como una receta para su desarrollo. Una secuencia de ADN se refiere al orden de nucleótidos de los cuales está compuesto el ADN. Hay cuatro nucleótidos diferentes en el ADN los cuales tienen respectivamente en su estructura las bases adenina, timina, citosina y guanina. Secuenciar el ADN ayuda a los científicos a obtener información, identificar moléculas involucradas en complicados procesos metabólicos y procesos evolutivos.

Conclusiones de Proyecto

La estandarización del proceso de simulación gastrointestinal y fermentación colónica permitió generar las muestras para el análisis molecular, del cual se obtuvo ADN de calidad a partir de 200 microlitros de muestra.

Y a través de la electroforesis en gel de acrilamida y el análisis por NanoDrop permitió la detección de la concentración e integridad del ADN a una relación Abs 260/280, el cual es adecuado para posteriormente su secuenciación.

La importancia en haber obtenido ADN de calidad radica en que, existe la presencia de microorganismos los cuales se encargan de la fermentación colónica y debido a la dieta a la cual son sometidos presentan un cambio. Dicha información nos sirve de base para continuar con este trabajo.

Referencias

Ainia © 2016. Parque Tecnológico de Valencia. https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/food-digest-beneficios-de-modelos-in-vitro-que-simulan-la-digestion-gastrointestinal/

Ajila, C. M., Aalami, M., Leelavathi, K., & Rao, U. P. (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *11*(1), 219-224.

Álvarez, M. C., Compes, C. C., Lesmes, B., & Peris, P. G. (2002). Metabolismo colónico de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*, *17*, 11-16.

Arbizu, R. A., Rodriguez, L., & Nurko, S. (2016). Tu1760 Can Propofol Be Used To Assess The Presence of The Rectoanal Inhibitory Reflex During Anorectal Manometry Studies?. *Gastroenterology*, *150*(4), S936-S937.

Berrilli, F., Di Cave, D., Cavallero, S., & D'Amelio, S. (2012). Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *2*, 141.

Blancas-Benitez, F. J., de Jesús Avena-Bustillos, R., Montalvo-González, E., Sáyago-Ayerdi, S. G., & McHugh, T. H. (2015). Addition of dried 'Ataulfo'mango (Mangifera indica L) by-products as a source of dietary fiber and polyphenols in starch molded mango snacks. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(11), 7393-7400.

Blancas-Benitez, F. J., Mercado-Mercado, G., Quirós-Sauceda, A. E., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and in vitro kinetics release of polyphenols in Mexican 'Ataulfo'mango (Mangifera indica L.) by-products. Food & function, 6(3), 859-868.

Blatchford, P., Stoklosinski, H., Walton, G., Swann, J., Gibson, G., Gearry, R., & Ansell, J. (2015). Kiwifruit fermentation drives positive gut microbial and metabolic changes irrespective of initial microbiota composition. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *6*(1), 37-45.

Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition reviews*, *72*(7), 429-452.

Bradford, M. A., & Fierer, N. (2012). The biogeography of microbial communities and ecosystem processes: implications for soil and ecosystem models. *Soil ecology and ecosystem services*, *18*.

Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-Lopez, O., ... & Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (Phaseolus vulgaris L.). *Journal of Food Science*, *74*(7), T59-T65.

Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Revista chilena de nutrición, 42(2), 206-212.

Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular aspects of medicine*, *31*(6), 446-467.

Dall'Asta, M., Calani, L., Tedeschi, M., Jechiu, L., Brighenti, F., & Del Rio, D. (2012). Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition*, *28*(2), 197-203.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, *54*(9), 2325-2340.

Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., Sánchez-Moreno, C., & de Ancos, B. (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (Mangifera indica L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, *57*, 51-60.

Dueñas, M., Muñoz-González, I., Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Sánchez-Patán, F., Santos-Buelga, C., ... & Bartolomé, B. (2015). A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *BioMed research international*, *2015*.

Fernando, W., Hill, J., Zello, G., Tyler, R., Dahl, W., & Van Kessel, A. (2010). Diets supplemented with chickpea or its main oligosaccharide component raffinose modify faecal microbial composition in healthy adults. *Beneficial microbes*, *1*(2), 197-207.

Gill, SR, Pop, M., DeBoy, RT, Eckburg, PB, Turnbaugh, PJ, Samuel, BS y Nelson, KE (2006). Análisis metagenomático del microbioma del intestino distal del humano. Science , 312 (5778), 1355 - 1359. http://dx.doi.org/10.1126/ science.1124234 .

González Á, Marisela, 2018. Simulador ARIS . SISTEMA DE SIMULACIÓN DEL PROCESO DIGESTIVO. Laboratorio de Digestión Ex Vivo. Guadalajara, Jalisco, México http://www.exvivo-lab.com/

González-Aguilar, G. A. (2014). *Los Alimentos Funcionales: Un nuevo reto para la industria de alimentos* (No. 613.2 613.2 A4 ALI).

Gray, J. (2006). Fibra dietética. Definición, análisis, fisiología y salud. *Bruselas: International Life Sciences Institute (ILSI)*.

Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, *361*(9356), 512-519.

Gueimonde, M., & Collado, M. C. (2012). Metagenomics and probiotics. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*, 32-34. http://dx.doi.org/10.1111/ j.1469-0691.2012.03873.x

Havenaar R, Anneveld B, Hanff LM, de Wildt SN, de Koning BAE, Mooij MG, Lelieveld JPA, Minekus M (2013) In vitro gastrointestinal model (TIM) with predictive power, even for infants and children? Int J Pharm http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.053

Hernández-Maldonado, L. M., Blancas-Benítez, F. J., Zamora-Gasga, V. M., Cárdenas-Castro, A. P., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2019). In Vitro Gastrointestinal Digestion and Colonic Fermentation of High Dietary Fiber and Antioxidant-Rich Mango (Mangifera indica L.)"Ataulfo"-Based Fruit Bars. *Nutrients*, *11*(7), 1564.

Infante, F., Quilantán, J., Rocha, F., Esquinca, H., Castillo, A., Ibarra-Nuñez, G., & Palacio, V. (2011). Mango Ataulfo: orgullo chiapaneco. Biodiversitas, 96, 1-5.

Koubala, B. B., Kansci, G., Mbome, L. I., Crépeau, M. J., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2008). Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from "Améliorée" and "Mango" mango peels. *Food Hydrocolloids*, *22*(7), 1345-1351.

Kritchevsky, D., & Chen, S. C. (2005). Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research*, *25*(5), 413-428.

Lagarda, M. J., García-Llatas, G., & Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *41*(5), 1486-1496.

Lockett, T. J., Bird, A. R., Christophersen, C., Clarke, J. M., Conlon, M. A., & Topping, D. L. (2016). Microbes, metabolites and health. In Microbial Metabolomics (pp. 13-48). Springer, Cham.

Louis, P., Scott, KP, Duncan, SH y Flint, HJ (2007). Comprender los efectos de la dieta sobre el metabolismo bacteriano en el intestino grueso. Journal of Applied Micro- biología , 102 (5), 1197 - 1208. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03322.x

Lunn, J., & Buttriss, J. L. (2007). Carbohydrates and dietary fibre. Nutrition Bulletin, 32(1), 21-64.

Mai, V., & Draganov, P. V. (2009). Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World journal of gastroenterology: WJG*, *15*(1), 81.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *79*(5), 727-747.

Manthey, J. A., & Perkins-Veazie, P. (2009). Influences of harvest date and location on the levels of β-carotene, ascorbic acid, total phenols, the in vitro antioxidant capacity, and phenolic profiles of five commercial varieties of mango (Mangifera indica L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, *57*(22), 10825-10830.

Masibo, M., & He, Q. (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *7*(4), 309-319.

Masibo, M., & He, Q. (2009). Mango bioactive compounds and related nutraceutical properties—a review. *Food Reviews International*, *25*(4), 346-370.

Matheyambath, A. C., Subramanian, J., & Paliyath, G. (2016). Mangoes.

Medina, J. D. L. C., & García, H. S. (2002). Mango: Post-harvest operations. Mejia, D. and Lewis, B.(eds).

Mercado-Mercado, G., Blancas-Benitez, F. J., Velderrain-Rodríguez, G. R., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., Alvarez-Parrilla, E., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.). *Journal of Functional Foods*, *18*, 171-181.

Minekus, M. (2015). The TNO gastro-intestinal model (TIM). In *The impact of food bioactives on health* (pp. 37-46). Springer, Cham.

Mongeau, R., & Brooks, S. (2016). Dietary fiber: Properties and sources in the Encyclopedia of food sciences and nutrition. *Encyclopedia of Food and Health*, 1813-1822.

Murkovic, M. (2016). Phenolic compounds: occurrence, classes, and analysis. *The Encyclopedia of Food and Health*, *4*, 346-351.

Musso, G., Gambino, R., & Cassader, M. (2010). Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded?. Diabetes care, 33(10), 2277-2284.

Partida-Rodríguez, O., Serrano-Vázquez, A., Nieves-Ramírez, M. E., Moran, P., Rojas, L., Portillo, T., ... & Ximenez, C. (2017). Human intestinal microbiota: interaction between parasites and the host immune response. *Archives of medical research*, *48*(8), 690-700.

Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., & Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical chemistry*, *55*(5), 856-866.

ProDigest, 2016. https://www.prodigest.eu/en/technology/shime-and-m-shime

Rajendran, P., Ekambaram, G., Magesh, V., & Sakthisekaran, D. (2008). Chemopreventive efficacy of mangiferin against benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in experimental animals. *Environmental toxicology and pharmacology*, *26*(3), 278-282.

Ramírez-Maganda, J., Blancas-Benítez, F. J., Zamora-Gasga, V. M., García-Magaña, M. D. L., Bello-Pérez, L. A., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Nutritional properties and phenolic content of a bakery product substituted with a mango (Mangifera indica)'Ataulfo'processing by-product. Food Research International, 73, 117-123.

Reddy, B. S., Hamid, R., & Rao, C. V. (1997). Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis*, *18*(7), 1371-1374.

Rosendale, Douglas, Cookson, Adrian, Roy, Nicole y Vetharaniam, Indrakumar (2011). Oportunidades para el modelado predictivo y la salud intestinal. Conceptualmente explorar una herramienta in silico para la cuantificación de los bene fi cios de la dieta fi bra con- consumo. Agro Food Industry Hi-Tech , 22 (6), 18 - 22.

Ruiz Álvarez, V., Puig Peña, Y., & Rodríguez Acosta, M. (2010). Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, *29*(3), 364-397.

Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology*, *149*(1), 88-105.

Russell, W. R., Gratz, S. W., Duncan, S. H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., ... & Duthie, G. G. (2011). High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *The American journal of clinical nutrition*, *93*(5), 1062-1072.

Sauceda, A. E. Q., Palafox, H., Sánchez, R. M. R., & Aguilar, G. A. G. (2011). Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Biotecnia*, *13*(3), 3-11.

Saura-Calixto, F., & Goni, I. (2009). Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, *49*(2), 145-152.

Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goni, I., & Bravo, L. (2000). In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. Journal of Agricultural and food Chemistry, 48(8), 3342-3347.

Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goni, I., & Bravo, L. (2000). In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, *48*(8), 3342-3347.

Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goni, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, *101*(2), 492-501.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017). Planeación agrícola nacional. Mango mexicano. Consultado en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257078/Potencial-Mango.pdf

Secretaría de Economía (SE). (2016). ¿Sabías que el Mango Ataulfo tiene denominación de origen?.Consultado en: https://www.gob.mx/se/articulos/sabias-que-el-mangoataulfo-tiene-denominacion-de-origen

Secretaría de Salud (SSA). (2012). Aliméntate sanamente: Refrigerios saludables. Consultado en: http://www.promocion.salud.gob.mx/dgps/interior1/promocionando_come_articulos_refrigerios.html

Serrano, V., S. (2013). Probióticos, prebióticos y simbióticos. Efectos sobre la salud y regulación. Universidad Autónoma de México.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2018). Atlas Agroalimentario 2012-2018. Consultado en: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/AtlasAgroalimentario-2018

Shahidi, F. (2009). Nutracéuticos y alimentos funcionales: alimentos enteros versus procesados. Trends in Food Science & Technology , 20 (9), 376 - 387. http://dx.doi.org/ 10.1016 / j.tifs.2008.08.004

Smeets-Peeters MJE (2000) Feeding FIDO: development, validation and application of a dynamic in vitro model of the gastrointestinal tract of the dog. PhD thesis, Wageningen University, Universal Press, Veenendaal, The Netherlands Southon S (2001) Model systems in vitro and in vivo, for predicting the bioavailability of lipid soluble components in food. FAIR CT97-3100 (Final Report)

Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(4), 227.

Thermo Scientific, (2016). NanoDrop One, Guía del Usuario. Estados Unidos (EUA): Thermo Scientific.

Topping, D. L., & Lockett, T. J. (2016). Human Physiology and Health: Dietary Fiber, Short-Chain Fatty Acids, and Their Impact on Gut Physiology.

Valenzuela, J. C., Vergara-Salinas, J. R., & Perez-Correa, J. R. (2016). *Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols*. CRC Press.

Vergara-Valencia, N., Granados-Pérez, E., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., Ruales, J., & Bello-Pérez, L. A. (2007). Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product ingredient. *LWT-Food Science and Technology*, *40*(4), 722-729.

Vilela, C., Santos, S. A., Oliveira, L., Camacho, J. F., Cordeiro, N., Freire, C. S., & Silvestre, A. J. (2013). The ripe pulp of Mangifera indica L.: A rich source of phytosterols and other lipophilic phytochemicals. *Food research international*, *54*(2), 1535-1540.

Wang, H., Ye, G., Tang, Y. H., Zhu, H. Y., Ma, R. R., Sun, Z. L., & Huang, C. G. (2006). High-performance liquid chromatographic method for the determination of mangiferin in rat plasma and urine. *Biomedical Chromatography*, *20*(12), 1304-1308.

Xu, Jian, Mahowald, Michael A., Ley, Ruth E., Lozupone, Catherine A., Hamady, Micah, Martens, Eric C. y Gordon, Jeffrey I. (2007). Evolución de bacterias simbióticas en el intestino humano distal. PLoS Biology , 5 (7), 1574 - 1586. http: // dx. doi.org/10.1371/journal.pbio.0050156

Yahia, E. M. (2011). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Volume 3: cocona to mango. Woodhead Publishing Ltd.

Zamora-Gasga, V. M., Álvarez-Vidal, C., Montalvo-González, E., Loarca-Piña, G., Vázquez-Landaverde, P. A., Bello-Pérez, L. A., ... & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2018). Gut metabolites associated with pH and antioxidant capacity during in vitro colonic fermentation of Mexican corn products. *Cereal Chemistry*, *95*(3), 399-410.