



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES
EN MANGO CV. ATAULFO, SOBRE EL CRECIMIENTO
DE BACTERIAS PATÓGENAS Y BENÉFICAS**

POR

RAMON PACHECO ORDAZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

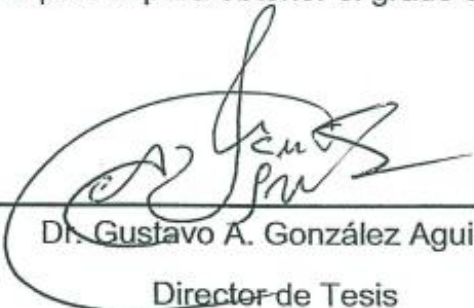
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Agosto Del 2015

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ramón Pacheco Ordaz, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



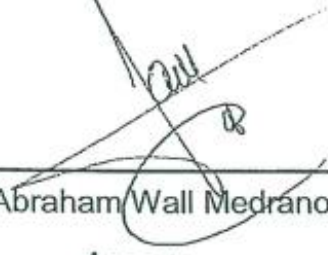
Dr. Gustavo A. González Aguilar
Director de Tesis



Dr. J. Fernando Ayala Zavala
Asesor



Dra. Gabriela Ramos Clamont-Montfort
Asesor



Dr. Abraham Wall Medrano
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante estos dos años de estudio.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.** por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y permitirme alcanzar una meta más dentro de mi formación profesional.

A la **Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal**, por brindarme sus instalaciones y apoyo académico.

A mi **Director de tesis, Dr. Gustavo A. González Aguilar**, por su apoyo incondicional, aportaciones teóricas, experiencias y consejos brindados. Gracias por su paciencia, dedicación y confianza.

A mi **Comité de Tesis** integrado por el **Dr. J. Fernando Ayala Zavala, Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort y Dr. Abraham Wall Medrano**, quienes siempre se preocuparon por mí. Por guiarme durante la realización de este trabajo.

A **Q.B. Mónica Alejandra Villegas Ochoa** por siempre tener tiempo para ayudarme a pesar de estar ocupada, agradezco su amistad y todos sus consejos durante estos 2 años para que todo saliera bien.

A **M.C. Reynaldo Cruz Valenzuela** por su ayuda, amistad y experiencias compartidas.

A **M.C. Brenda A. Silva Espinoza** por su apoyo técnico en el laboratorio y su amistad.

A mis amigos **Ana** y **Tavo**, por su amistad, por su tiempo, por apoyarme desde el principio, y por hacer que mi estancia en el laboratorio fuera más amena, muchas gracias.

A mis **compañeros de laboratorio Maribel, Mayra, Elena, Cinthia, Jacqueline, Alejandra, Cecilia** y especialmente a **Gabriela Goñi**, además de los integrantes del **Laboratorio de Tecnologías Emergentes Pancho, Melisa, Luis, Melvin, Julián** por su amistad y convivencia durante esta etapa.

A mis compañeros y amigos de esta generación del programa de Maestría en Ciencias de CIAD, en especial a **Dey, Fer, Caro, Agustín, Gerardo, Carolina, Lis, Sinaí, Anna Judith**, por brindarme su amistad y su apoyo durante estos dos años.

A mis amigos **Ángel Martínez, Luis Ochoa, David Delgado, Héctor Cota, Javier Carillo, Javier López, Jesús Alfredo, Javier Quiñones, Cesar Hinojo, Eduardo Contreras, Alberto Gardner**, quienes han creído en mí y me han apoyado siempre, soy muy afortunado al tener amigos como ustedes.

DEDICATORIA

A **DIOS**, por la vida, por darme salud y por darme fuerza para poder alcanzar otro triunfo más en mi vida.

A mis padres **Ramón** y **Martha**, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, por la confianza que siempre han tenido en mí. Por haberme dado la oportunidad de tener una buena educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo a seguir. A mi **Tía** y a mi **Hermana** por ser parte importante de mi vida y que siempre me han apoyado.

A **Karime**, por ser una parte muy importante de mi vida, por su amor incondicional y su paciencia, por haberme apoyado cuando más lo necesitaba. Gracias por ser como eres, no lo hubiera logrado sin ti.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Mango (<i>Mangifera indica</i> L.) cv. Ataulfo como Fuente de Compuestos Bioactivos.....	4
Compuestos Fenólicos (CF) en Mango cv. Ataulfo	5
Microbiota Intestinal (MI).....	8
Influencia de la Dieta sobre la Microbiota	10
Probióticos	13
Prebióticos	14
Componentes de la dieta	15
Interacciones entre la MI y CF	16
HIPOTESIS	23
OBJETIVOS	24
Objetivo General	24
Objetivos Específicos.....	24
Estándares de CF	25
Bacterias y Medios de Cultivo.....	25
Actividad Antibacteriana y Prebiótica de Estándares de CF	26

Efecto de CF individuales presentes en mango cv. Ataulfo sobre el crecimiento de bacterias patógenas y probiótica.	26
Efecto de la combinación de los estándares de CF presentes en mango cv. Ataulfo sobre el crecimiento de bacterias patógenas y probióticas.....	27
Análisis Estadístico	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Efecto de CF Individuales Presentes en Mango cv. Ataulfo sobre el Crecimiento de Bacterias Patógenas y Probióticas	29
Efecto de la Combinación de CF Presentes en Mango cv Ataulfo sobre el Crecimiento de Bacterias Patógenas y Probióticas	37
CONCLUSIÓN	43
RECOMENDACIONES	44
REFERENCIAS	45

LISTA DE FIGURA

Figura	Página
Figura 1 Principales CF identificados en mango cv. Ataulfo Palafox-Carlos et al. (2012).....	7
Figura 2. Cambios en la composición de la microbiota en el transcurso de la vida.	11
Figura 3. Generación de metabolitos a partir de la transformación de CF presentes en la dieta al ser expuestos a la MI.	18

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. CMI de estándares de CF individuales probados in vitro contra probióticos y patógenos.	30
Cuadro 2. CMB de estándares de CF individuales probados in vitro contra probióticos y patógenos.	32
Cuadro 3. Efecto de CF individuales sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a patógenos.....	35
Cuadro 4. Efecto de los CF individuales sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a probióticos.	36
Cuadro 5. ICIF de la combinación de CF sobre patógenos.....	38
Cuadro 6. Efecto de combinación de CF sobre los parámetros de crecimiento evaluados sobre patógenos.	39
Cuadro 7. Efecto de combinaciones de CF sobre los parámetros de crecimiento evaluados sobre probióticos.	41

RESUMEN

Los compuestos fenólicos (CF) son metabolitos secundarios de las plantas con distintos beneficios para la salud humana, relacionados con su capacidad antioxidante (CAOX), antimicrobiana y prebiótica. El mango (*Mangifera indica*) cv. Ataulfo es rico en CF y su CAOX es alta; sin embargo, no se le conocen propiedades prebióticas. El objetivo de la presente tesis fue evaluar el efecto de CF puros (individuales y en combinaciones binarias) identificados en mango Ataulfo: Ácidos gálico (AG), vanílico (AV), ferúlico (AF), y protocateico (AP), catequina (CQ) y pirogalol (PG, metabolito microbiano de CF), sobre el crecimiento de dos bacterias probióticas (*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus acidophilus* NRRLB 4495) y dos patógenas (*Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de AV, AF y AP fue de 15-20 mM para *E. coli* y *S. Typhimurium*, y de 20-35 mM para *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*. AG (20mM) y CQ (35mM) inhibieron a *E. coli* y *S. Typhimurium* pero no a *L. rhamnosus* o *L. acidophilus*. Mientras que combinaciones con AG, AP y AV mostraron un efecto aditivo para inhibir a *E. coli*, sólo la combinación AV+AP inhibió a *S. Typhimurium* y prácticamente todos los CF mostraron efectos aditivos sobre el crecimiento de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*. En conclusión, los CF mayoritarios de mango cv. Ataulfo modulan de forma selectiva el crecimiento de bacterias patógenas (↓) y probióticas (↑).

Palabras clave: compuestos fenólicos, mango cv. Ataulfo, probióticos, prebióticos, patógenos.

ABSTRACT

Phenolic compounds (PC) are plant secondary metabolites with different benefits to human health associated with their antioxidant (AOXC), antimicrobial and prebiotic capacities. Mango (*Mangifera indica*) cv. Ataulfo is rich in PC and its AOXC is high; however, its prebiotic effect has not been investigated so far. The objective of this thesis was to evaluate the effect of pure PC (single/binary combinations) identified in Mango cv. Ataulfo: Gallic (GA), vanillic (VA), ferulic (FE) and protocatehuic (PA) acids, catechin (CQ) and pyrogallol (PG, a PC derived metabolite) on the growth of two probiotic (*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 and *Lactobacillus acidophilus* NRRLB 4495) and two pathogenic (*Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium) bacteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) of VA, FA and PA was 15-20mM against *S. Typhimuruim* and *E. coli*, and 20-35 mM for *L. rhamnosus* and *L. acidophilus*, respectively. GA (20 mM) and CQ (35mm) inhibited *E. coli* and *S. Typhimurium* but had no effect on *L. rhamnosus* or *L. acidophilus*. Combinations of GA, PA and VA showed an additive effect to inhibit *E. coli*; while, VA+PA inhibited *S. Typhimurium* and virtually all PC showed additive effects on *L. rhamnosus* and *L. acidophilus* growth. In conclusion, most of the assayed mango PC selectively modulated the growth of pathogenic (↓) and probiotic (↑) bacteria.

Keywords: phenolic compounds, mango cv. Ataulfo, probiotics, prebiotics, pathogens.

INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es una fruta tropical muy popular y de importancia económica en todo el mundo, por sus características sensoriales y composición nutricional y de compuestos bioactivos (Kim, Lounds-Singleton, & Talcott, 2009). La producción mundial de este fruto alcanzó los 30 millones de toneladas en 2009, seguido de plátano, piña, papaya y aguacate. India es el principal productor de mango con un 35% de la producción (13.6 millones de toneladas), seguido por China, Tailandia, Indonesia, México y otros (FAOstat, 2009). Recientemente, se ha reportado que el cultivar Ataulfo, tiene el mayor contenido de compuestos fenólicos (CF) y capacidad antioxidante (CAOX) comparado a otras variedades de mango. La CAOX está relacionada con la composición y tipo de CF presentes en las frutas y vegetales (Manthey & Perkins-Veazie, 2009).

Los CF son metabolitos secundarios de las frutas y vegetales. Estos se encuentran involucrados en diferentes funciones bioquímicas y fisiológicas de la planta, como la defensa contra patógenos y son responsables del color y el sabor de estos (Bravo, 1998; Naczk & Shahidi, 2004). En los últimos años, el estudio de los CF ha incrementado debido a sus bien documentados beneficios a la salud, particularmente en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer y retrasando el proceso de envejecimiento (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014). Sus efectos positivos son atribuidos principalmente a su potente CAOX y a su capacidad de atrapar radicales libres (Scalbert, Manach, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2005). Por otra parte, se sabe que los CF pueden afectar negativamente el crecimiento de ciertas bacterias patógenas. Además, actualmente se estudia su posible efecto benéfico sobre el crecimiento de microorganismos probióticos (Hervert-Hernandez & Goni, 2011; Puupponen-

Pimiä *et al.*, 2001). En este sentido, nuevos estudios sugieren que el aumento en el consumo de frutas con alto contenido de CF como el mango, podría causar un cambio en la composición de la microbiota intestinal (MI), de tal forma que haya mayor prevalencia de probióticos, respecto a bacterias patógenas (Davis & Milner, 2009). La MI humana está compuesta por diversas especies de microorganismos. Se calcula que existen alrededor de 500-1000 especies de bacterias que pueden dividirse en bacterias residentes (microbiota normal) y aquellas que son ingeridas. Dentro de estas últimas, se pueden encontrar bacterias probióticas y patógenas (Xu & Gordon, 2003). Entre las principales funciones de la microbiota, se encuentra el mantenimiento de la homeostasis intestinal, proporcionar nutrientes al hospedero, y ofrecer protección contra patógenos (Leser & Mølbak, 2009). Además, la MI está involucrada en el metabolismo de nutrientes y otros compuestos provenientes de la dieta.

Los CF se encuentran en las plantas comúnmente como estructuras complejas. Frecuentemente forman conjugados (e.g. como glucósidos) o arreglos macromoleculares que impiden su absorción en el intestino delgado llegando hasta el colon para ser metabolizados ahí (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014). De acuerdo a Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, y Jiménez (2004) aproximadamente el 42% de los CF ingeridos son liberados en colon, 245.86 mgEAG/100g de peso fresco de mango son liberados en colon según Velderrain-Rodríguez (2013). Ahí los CF se metabolizan a agliconas, por medio de glucosidasas y esterases microbianas, facilitando por un lado su absorción; y por otro llevando a la producción de metabolitos capaces de modular la composición de la microbiota (Larrosa *et al.*, 2009). Estudios recientes muestran que los CF pueden inhibir selectivamente el crecimiento de patógenos sin afectar la microbiota normal, y en algunos casos estimular su crecimiento (Laparra & Sanz, 2010). Los efectos prebióticos de diversos CF han sido ampliamente reportados, pero no así para aquellos derivados de frutos tropicales como el mango (*Mangifera indica L.*). Por lo anterior, el objetivo fue evaluar el efecto de CF puros (solos y combinaciones binarias) identificados en mango cv. Ataulfo: Ácidos

gálico (AG), vanílico (AV), ferúlico (AF), y protocateico (AP), catequina (CQ) y pirogalol (PG, metabolito microbiano de CF), sobre el crecimiento de dos bacterias probióticas (*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus acidophilus* NRRLB 4495) y dos patógenas (*Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium).

ANTECEDENTES

Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo como Fuente de Compuestos Bioactivos

En los últimos años, la producción y el consumo de frutas tropicales ha aumentado significativamente. Ello debido a sus propiedades organolépticas, además de que representan una fuente de compuestos bioactivos, cuyo consumo se ha asociado con beneficios a la salud (Yahia, 2010). Dentro de las frutas tropicales más consumidas en el mundo, se encuentran la piña, la papaya, la guayaba, el aguacate y el mango (González-Aguilar *et al.*, 2008; Miljkovic & Bignami, 2002; Yahia, 2010). Cabe mencionar, que la ingesta de mango a nivel mundial ha aumentado en las últimas décadas, especialmente en Estados Unidos de América y Europa. La producción mundial de este fruto llega a más de 30 millones de toneladas por año (FAOstat, 2009). Dentro de las diferentes variedades de mango que existen, el mango cv 'Ataulfo' de origen mexicano, sobresale de las demás variedades de mango, por sus propiedades organolépticas, su resistencia al manejo postcosecha, y su alto contenido de compuestos bioactivos (Villa-Corrales, Flores-Prieto, Xamán-Villaseñor, & García-Hernández, 2010).

El consumo de mango cv. Ataulfo se ha relacionado con la prevención y reducción de enfermedades cardiovasculares, artritis, arterosclerosis y cáncer (Aruoma, 1998; Boeing *et al.*, 2012; Lim, Lim, & Tee, 2007). Esto debido a su alto contenido de compuestos bioactivos. Algunos compuestos bioactivos son antioxidantes y pueden retrasar o prevenir el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos causados por las especies reactivas de oxígeno (Dosil-Díaz, Ruano-Ravina, Gestal-Otero, & Barros-Dios, 2008). Los antioxidantes previenen

el estrés oxidativo suprimiendo la formación de radicales libres mediante la quelación de metales y donación de electrones o átomos de hidrógeno a estructuras químicas inestables (HongLian *et al.*, 2001). Dentro de los principales antioxidantes presentes en mango destacan, las vitaminas A, C y E, carotenoides, CF y fibra dietaria antioxidante, siendo estos tres últimos los más estudiados (Saura-Calixto, 2010; Yahia, 2010)

Compuestos Fenólicos (CF) en Mango cv. Ataulfo

Los CF se producen como resultado del metabolismo secundario vegetal en respuesta al estrés biótico y abiótico (Bravo, 1998). Su contenido en los alimentos vegetales dependen de factores intrínsecos como su género, especie y cultivares, y extrínsecos como diversos factores agronómicos, ambientales, manipulación y almacenamiento (Tomás-Barberán & Espin, 2001). Los CF pueden existir principalmente como ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos) o como flavonoides, (C6-C3-C6) que son moléculas con dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidas por tres átomos de carbono, por lo general dispuestas como un heterociclo oxigenado (anillo C). Los flavonoides se clasifican de acuerdo con el grado de oxidación del anillo C en antocianinas, flavonoles, flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas. Estas estructuras monoméricas producen oligómeros y polímeros, los últimos clasificados como taninos condensados (también conocidos como proantocianidinas o procianidinas) o taninos hidrolizables (Anhê *et al.*, 2013; Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002). La mayoría de los flavonoides están presentes en la naturaleza en forma glicosilada y otros conjugados, que contribuyen a su complejidad y al gran número de moléculas individuales que han sido identificadas (Harborne & Williams, 2000).

Diversos estudios sugieren, que una dieta rica en CF está asociada con beneficios a la salud. Los CF actúan como agentes anti-alérgicos, anti-inflamatorios, antioxidantes, cardioprotectores, como antimicrobianos y

últimamente se ha estudiado su efecto como moduladores de la MI (Hervert-Hernandez & Goni, 2011; Kurosumi *et al.*, 2007; Thériault, Caillet, Kermasha, & Lacroix, 2006; Yahia, 2010). Los beneficios a la salud de los CF se atribuyen generalmente a mecanismos no específicos, dependientes de la actividad antioxidante e interacciones con proteínas claves de señalización (Anhê *et al.*, 2013). Sin embargo, su acción metabólica depende de su absorción y metabolismo xenobiótico, que a su vez está determinada por su estructura, la conjugación con otros CF, grado de glicosilación, tamaño molecular y solubilidad entre otros factores (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006; Bravo, 1998). Los CF que no son absorbidos en el intestino delgado, así como aquellos absorbidos, metabolizados en el hígado y eliminados en la bilis llegan al colon. La microbiota del colon hidroliza y rompe los CF más grandes a moléculas más simples (Scalbert & Williamson, 2000), para metabolizarles a otros compuestos como el pirogalol, el cual es un metabolito microbiano generado a partir del ácido gálico (Quiros-Sauceda *et al.*, 2015)

En un estudio realizado por Manthey y Perkins-Veazie (2009) se evaluaron cinco variedades de mango, encontrando que el contenido de fenoles totales tuvo un rango de 19.5 a 166.7 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de peso fresco, para las variedades de Tommy Atkins, Kent, Keitt, Hayden y Ataulfo, siendo esta última la que tiene un mayor contenido.

Dentro de los principales CF identificados en la pulpa de mango destacan manguiferina, ácido gálico (AG), galotaninos, quercetina (QT), ácido elágico entre otros (Schieber, Ullrich, & Carle, 2000). Se ha identificado al AG como el principal CF presente en los frutos de mango, seguido de 6 taninos hidrolizables y otros ácido fenólicos como el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico (AF) (Kim *et al.*, 2009). Otro estudio realizado por Palafox-Carlos, Yahia, y González-Aguilar (2012), reporta que los ácidos fenólicos son los compuestos predominantes en la pulpa de mango cv. Ataulfo (**Figura 1**). Los ácidos fenólicos mayoritarios identificados en este estudio fueron AG, ácido clorogénico, ácido vanílico (AV) y ácido protocateico (AP). Por otro lado se ha

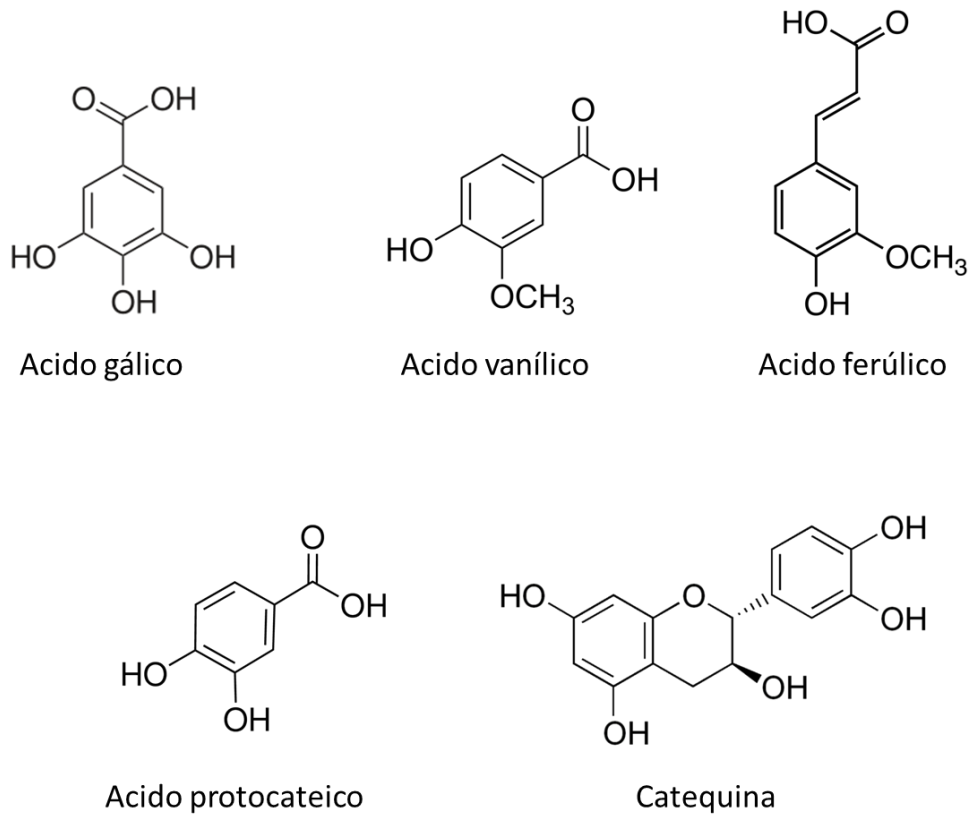


Figura 1 Principales CF identificados en mango cv. Ataulfo Palafox-Carlos *et al.* (2012).

reportado que el contenido de fenoles totales en mango es mayor en la cáscara que en la pulpa, con un contenido estimado de fenoles totales 4066 mg (EAG)/kg de materia seca (Berardini *et al.*, 2005). Dentro de los CF identificados en la cáscara de mango destacan mangiferina, quercetina, ácido elágico y kaempferol, AG y catequina (CQ) (Masibo & He, 2008).

Microbiota Intestinal (MI)

El tracto gastrointestinal es un ecosistema muy complejo en el que su condición y función son esenciales para el bienestar humano. Después del tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal es la segunda superficie más grande del cuerpo humano, alcanzando alrededor de 400 m². Esta superficie alberga una carga microbiana muy diversa, que llega a pesar más de 1 kg, denominada microbiota intestinal (MI). La MI desempeña importantes funciones para el hospedero y está compuesta por levaduras, hongos, virus, protozoarios y bacterias (Bäckhed *et al.*, 2004; Lopetuso, Scaldaferri, Petito, & Gasbarrini, 2013). Sin embargo, las bacterias son las más abundantes estimándose que hay 500-1000 especies diferentes. Las poblaciones dependen del órgano del aparato digestivo y van desde menos de 200 especies en la boca hasta 10¹²-10¹⁴ células en el colon (Leser & Mølbak, 2009; Salzman, Underwood, & Bevins, 2007).

El 98% de la MI está representada por los phylums Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria, con una pequeña proporción de los phylums Fusobacteria y Verrucomicrobia (Eckburg *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2010). Sin embargo, los principales grupos más abundantes pertenecen a los phylums Firmicutes y Bacteroidetes. Existen diversos factores que afectan la composición de la microbiota a través del tracto gastrointestinal. Entre ellos destacan el pH del hospedero, enzimas digestivas, ácidos biliares, el envejecimiento, así como también otros factores ajenos al huésped como la capacidad de adhesión, enzimas y actividad metabólica de las bacterias. La forma de nacer (parto natural

o cesárea), la alimentación y el estado de salud, son factores extrínsecos que también influyen en la composición de la MI (McConnell, Fadda, & Basit, 2008).

Existe una relación simbiótica entre el hospedero y la microbiota; mientras que el hospedero provee de un entorno seguro, la microbiota se encarga de mantener la homeostasis en el intestino, provee nutrientes y ofrece protección contra infecciones de patógenos (Leser & Mølbak, 2009). Una de las principales funciones metabólicas de la MI es la fermentación de residuos de la dieta no digeribles, que llegan al colon. A partir de dicha fermentación se generan ácidos grasos de cadena corta que entre otras cosas pueden actuar como fuente de energía para los colonocitos, aunque también se los relaciona con el mantenimiento de la homeostasis en el metabolismo de los lípidos. La MI también interviene en la síntesis de vitaminas (tales como K y B12), así mejora la absorción de Ca, Mg, Fe y algunos CF (Cani & Delzenne, 2009; Guarner & Malagelada, 2003; Miyazawa, Iwabuchi, & Yoshida, 1996). Por otra parte, Asano *et al.* (2012) encontraron que algunas especies de *Clostridium* pueden incrementar los niveles de catecolaminas, que son neurotransmisores que regulan distintas funciones en el cuerpo. Esto revela la importancia de la MI en el funcionamiento del Sistema Nervioso. Adicionalmente la microbiota juega un papel importante en la respuesta inmunológica, ya que regula el desarrollo de células productoras de IgA en el colon, este anticuerpo es una pieza clave en la defensa del intestino. Además bacterias comensales del genero *Clostridium spp.*, también promueven la formación de células T, que son células que protegen el intestino de patógenos, así como también desarrollan tolerancia a autoantígenos, y anulan enfermedades autoinmunes (Ivanov & Honda, 2012). Por consiguiente, es cada vez más aceptado de que la MI tiene un rol importante en el mantenimiento de la salud del hospedero, por lo que mantener la microbiota en un estado de balance parece ser un factor contribuyente a la salud.

Influencia de la Dieta sobre la Microbiota

La microbiota de un individuo sano se considera por lo general relativamente estable durante la edad adulta. Sin embargo, es bastante heterogénea durante los primeros años de vida y es directamente dependiente de los hábitos alimenticios (Ley, Peterson, & Gordon, 2006; Orrhage & Nord, 1999). Se ha reportado que la microbiota de recién nacidos que son alimentados con leche materna, es distinta a la de aquellos alimentados con fórmula. El género *Bifidobacterium* es dominante en aquellos infantes alimentados con leche materna, al contrario de aquellos alimentados con fórmula, que poseen una microbiota más diversa con menor prevalencia de *Bifidobacterium* (Hascoët *et al.*, 2011; Sela & Mills, 2010). Sin embargo, diversos factores como la ingesta de alimentos sólidos causan cambios en la composición de la microbiota, hasta que se asemeje a la microbiota estable de la adultez (**Figura 2**) (Yatsunenکو *et al.*, 2012).

La MI, es considerada altamente benéfica para la salud del hospedero. Sin embargo, los alimentos pueden modificarla de forma negativa (Feng, Wang, Schoeb, Elson, & Cong, 2010). Por ejemplo, dietas ricas en proteína animal y grasa (que promueven metabolitos relacionados con la putrefacción) y bajas en carbohidratos, se asocian con la disminución de bacterias benéficas (principalmente sacarolíticas), y con una alta producción de metabolitos dañinos que afectan la salud del hospedero (Kelsen & Wu, 2012). El metabolismo microbiano de proteínas y grasas en el colon, resulta en la formación de compuestos dañinos tales como nitrosaminas (compuestos carcinógenos). Los residuos de proteínas no digeridas que llegan al colon sirven de suministro de N_2 , favoreciendo al crecimiento de bacterias proteolíticas. Se ha reportado que las bacterias proteolíticas dominantes en heces fecales humanas son *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Propionibacterium spp.*, *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* (Scott, Gratz, Sheridan, Flint, & Duncan, 2013).

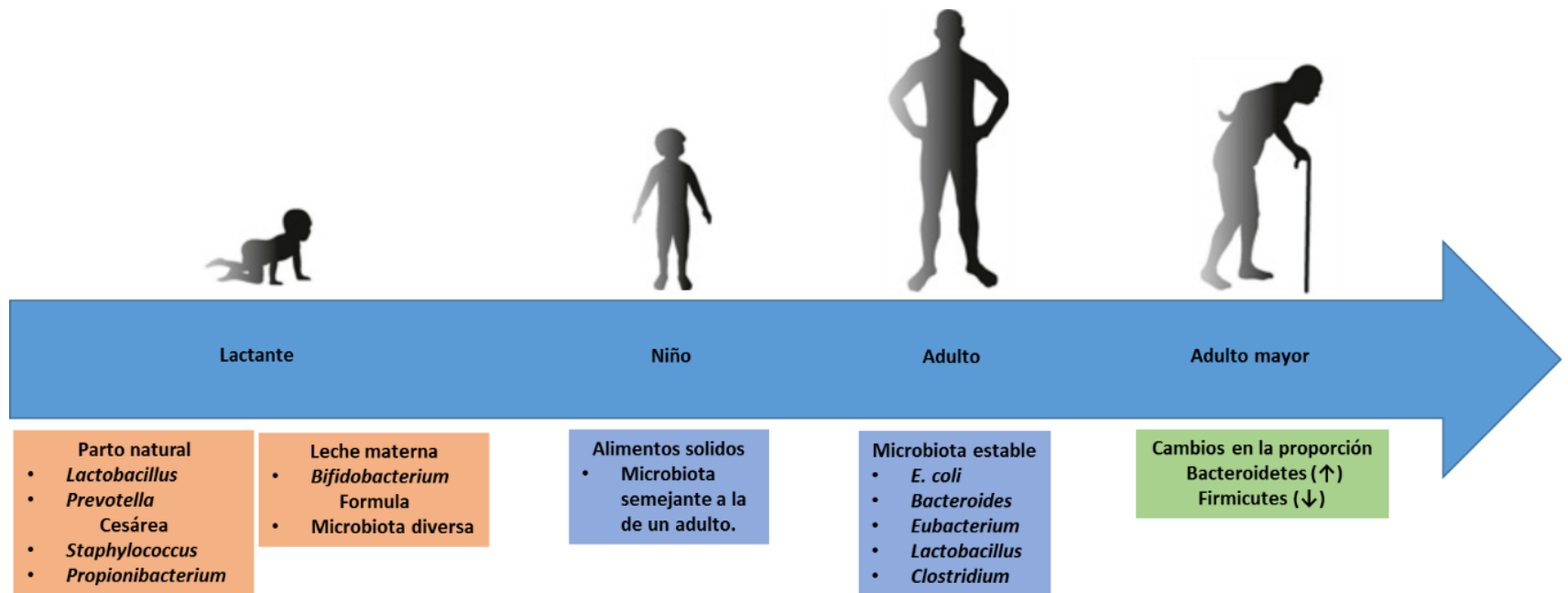


Figura 2. Cambios en la composición de la microbiota en el transcurso de la vida.

Se ha visto que la dieta tipo occidental (alta proteína y grasa animal, y baja en carbohidratos), está asociada a la baja producción de ácidos grasos de cadena corta en el colon y a una proliferación de bacterias patógenas como *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.* *Proteus spp.* y *Klebsiella spp.* las cuales son responsables de producción de nitrosaminas, colon inflamado y disbiosis (Scott *et al.*, 2013; Walker & Lawley, 2013; Wu, Bushmanc, & Lewis, 2013). Por esto, se requiere de una dieta balanceada, con un mayor consumo de carbohidratos que de proteína y grasa animal, para evitar y prevenir un desequilibrio en la MI (mayor incidencia de patógenos que bacterias comensales).

Por último, un alto consumo de azúcares refinados, proteína animal y grasas, puede afectar la composición de la MI, las interacciones entre el hospedero y esta así como también aumentar la incidencia de enfermedades y desordenes metabólicos (Walter & Ley, 2011). El desbalance o disbiosis en la MI se asocia con inflamación crónica y ruptura en la barrera de la mucosa epitelial (Frank, Zhu, Sartor, & Li, 2011). Aparentemente, patógenos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* se adaptan mejor a condiciones del colon inflamado que las bacterias anaeróbicas comensales, y también promueven un ciclo pro inflamatorio (Walker & Lawley, 2013).

Tratamientos Contra el Desbalance de la MI

Para restaurar la homeostasis en el colon, es necesario interrumpir el ciclo pro inflamatorio y restaurar la microbiota benéfica. A través de los años se han utilizado diferentes tratamientos con el fin solucionar esta condición. El tratamiento más popular para combatir patógenos y controlar infecciones son los antibióticos. Sin embargo, su administración no solamente afecta bacterias patógenas si no también afecta a las bacterias comensales de la microbiota, causando cambios en su composición (Jernberg, Löfmark, Edlund, & Jansson,

2010). El incremento de patógenos después del tratamiento con antibióticos se debe a la reducción de las bacterias comensales, y a que los genes de resistencia a los antibióticos se esparzan entre las bacterias debido las interacciones que hay entre ellas (Schumann *et al.*, 2005; Willing, Russell, & Finlay, 2011). Dethlefsen, Huse, Sogin, y Relman (2008) demostraron un decremento en la diversidad de la microbiota fecal de 5 voluntarios después de 5 días de administración del antibiótico ciprofloxacina. Por otra parte, en un estudio con ratones tratados con vancomicina, mostró un incremento de patógenos de los géneros *Enterococcus sp.*, *Clostridium sp.* y de la familia *Enterobacteriaceae*, de manera similar, en recién nacidos tratados con cefalexina se incrementa el género *Enterococcus* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Tanaka *et al.*, 2009; Ubeda *et al.*, 2010). Por lo tanto, los tratamientos prolongados con antibióticos o su uso indiscriminado promueven la colonización de patógenos más que erradicarlos; sin embargo, existen novedosos antibióticos como fidaxomicina, que afectan solamente a bacterias patógenas sin dañar a las bacterias comensales (Louie *et al.*, 2012).

Probióticos

Una alternativa para mejorar el balance de la microbiota, y subsecuentemente la salud del hospedero, es la administración de microorganismos benéficos, conocidos como probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos, que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del consumidor (Organization, 2001) El propósito de utilizar probióticos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la MI, es el de restaurar la homeostasis intestinal por medio de microorganismos benéficos. Los probióticos más utilizados comúnmente son bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, algunas levaduras como *Saccharomyces boulardii* también han sido utilizadas con buenos resultados (Pataky, Bobbioni-Harsch, Hadengue, Carpentier, & Golay, 2009). Los

probióticos, comúnmente son consumidos como parte de comidas fermentadas adicionadas con cultivos vivos de bacterias, tales comidas incluyen los yogurts, yogurt de soya y otros suplementos.

Los probióticos poseen distintos mecanismos de acción, tales como la inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos. Lo anterior debido a que establecen un ambiente restrictivo en el lumen (mediante la modificación del pH luminal), producen péptidos con propiedades antibacterianas, también inducen la respuesta inmune del hospedero (Ng, Hart, Kamm, Stagg, & Knight, 2009). El uso de probióticos para manipular la composición de la MI, es un tratamiento novedoso contra distintas enfermedades incluyendo la obesidad (Jia, Li, Zhao, & Nicholson, 2008). Sin embargo, considerar a todos los probióticos iguales, sin tomar en cuenta la especificidad de la cepa, perjudica el adecuado entendimiento de su verdadero potencial terapéutico. Diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, muestran evidencia suficiente que apoyan la variabilidad de las acciones, entre diferentes cepas (Cammarota, Ianaro, Bibbò, & Gasbarrini, 2014).

Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes de la dieta no digeribles que afectan benéficamente al quien los consume. Estos estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de un limitado número de especies de bacterias presentes en el colon (Gibson, Probert, Van Loo, Rastall, & Roberfroid, 2004). Los prebióticos más comúnmente utilizados en la nutrición humana son lactulosa, galactooligosacaridos, fructooligosacaridos, inulina y almidón resistente, para promover el crecimiento de bacterias benéficas como lactobacilos y bifidobacterias (Langlands, Hopkins, Coleman, & Cummings, 2004). Estimular el crecimiento de bacterias benéficas por medio de prebióticos provee de beneficios a la salud del hospedero, tales como incrementar la producción de ácidos grasos de cadena corta, bajar el pH en el colon, e inhibir el crecimiento de patógenos

como *C. perfringens* y *E. coli* O157:H7 (Buddington, Donahoo, & Buddington, 2002; De Vrese & Marteau, 2007; Hopkins & Macfarlane, 2003). Para que un ingrediente de la dieta se considerado como prebiótico debe de cumplir con los siguientes criterios: ser resistente a los ácidos gástricos y a la hidrolisis de las enzimas digestivas, ser fermentados por la MI, y estimular el crecimiento o las actividades de bacterias benéficas. Hoy en día, solo la inulina y los trans-galacto-oligosacáridos cumplen con estos requisitos (Slavin, 2013).

Componentes de la dieta

Otra innovadora forma de eliminar patógenos de la MI es el uso de algunos compuestos naturales que poseen actividad antimicrobiana. Algunos de estos componentes de la dieta como los CF, que son metabolitos secundarios de las plantas, poseen actividad antimicrobiana contra patógenos (Daglia, 2012). Recientemente ha crecido el interés en los CF debido a que son capaces de suprimir varios factores de virulencia tales como la neutralización de toxinas, inhibición de la formación de biopelículas, reducción en la adhesión de patógenos a la pared intestinal y sinergismo con los antibióticos (Rodriguez Vaquero, Aredes Fernandez, Manca de Nadra, & Strasser de Saad, 2010). Además, se ha reportado que los CF no afectan a las bacterias benéficas de la microbiota. En un estudio realizado por H. C. Lee, Jenner, Low, y Lee (2006) donde cultivaron patógenos (*C. perfringens*) y bacterias comensales (*Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*) en presencia de CF obtenidos de té, observaron que el crecimiento de los patógenos fue significativamente inhibido, mientras que las bacterias comensales no se vieron afectadas. Sin embargo, se sabe muy poco del mecanismo exacto de como los CF afectan positiva o negativamente el crecimiento bacteriano.

Interacciones entre la MI y CF

Existen dos principales interacciones entre la MI y los CF. Los CF de la dieta se someten a un complejo metabolismo después de su ingestión, e interactúan con las enzimas humanas y microbianas, lo que conduce a la producción de un gran número de metabolitos y productos catabólicos que son excretados. Por otro lado, sus metabolitos pueden influir e inducir cambios en la composición de la MI por medio de varias interacciones (Hervert-Hernandez & Goni, 2011). La mayoría de las propiedades biológicas de los CF dependen de su biodisponibilidad; esta última está muy influenciada por las propiedades químicas y físicas y la conjugación de origen vegetal. Cabe señalar que los CF obtenidos de la dieta generalmente se encuentran en una forma conjugada (Scalbert & Williamson, 2000).

Al llegar al intestino delgado, los CF son separados de las moléculas de azúcar a las que se encuentran unidos, por medio de las enzimas intestinales lactasa, florizina hidrolasa y β -glucosidasa para formar agliconas, las cuales son absorbidas por difusión pasiva. Sin embargo, los CF unidos a azúcares como ramnosa, sólo pueden ser hidrolizados por enzimas secretadas (α -ramnosidasa) por la MI (Aura, 2008; Németh *et al.*, 2003). Una vez que las agliconas de CF son absorbidas en el intestino delgado o en el colon, pasan a los enterocitos, donde pueden pasar por difusión pasiva al torrente sanguíneo, o bien se someten al metabolismo fase II, donde sufren diferentes reacciones de conjugación en el hígado (sulfatación, o-metilación, s-metilación, glucuronidación y acetilación). Posteriormente, estos productos entran al sistema circulatorio por medio de la vena porta para ser distribuidos a los órganos y ser excretados en la orina (Marín, Miguélez, Villar, & Lombó, 2015). Por otra parte, algunos de los compuestos conjugados del hígado son excretados de regreso al colon (circulación entero-hepática) como componentes de la bilis, ahí son deconjugados por enzimas microbianas (β -glucosidasa y β -glucuronidasa), para formar nuevamente

agliconas que son nuevamente absorbidas, o continúan siendo transformadas por la MI Aura (2008).

El metabolismo microbiano de los CF y agliconas, consiste en la ruptura del anillo y la separación de los grupos funcionales (dehidroxilación, demetilación y descarboxilación). Además, el metabolismo de los CF por parte de la microbiota solo ocurre después de que se llevó a cabo la deglicosilación y deconjugación (Aura, 2008). Los CF en especial los flavonoides los cuales su estructura consiste dos anillos benzoicos (anillos A y B), unidos mediante una pirona heterocíclica (anillo C), son extensamente degradados por la MI para producir CF más simples a partir de los anillos A y B después de que el anillo C se ha roto. La ruptura del anillo del anillo C puede darse en las posiciones 1 y 2, 3 y 4 o 4 y 10 (Maria V Selma, Espin, & Tomas-Barberan, 2009). Los principales metabolitos microbianos producidos a partir de los flavonoides son ácidos fenólicos (**Figura 3**).

Los ácidos fenólicos presentes en colon son liberados de la matriz alimentaria, o bien son producto de la degradación de los flavonoides, estos se dividen en hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos. Los principales ácidos hidroxicinámicos provenientes de la dieta son el ácido *p*-cumárico, el AF, el ácido sinápico y el ácido cafeico. Los principales metabolitos microbianos del ácido cafeico son el ácido 3-hidroxifenilpropionico y el ácido benzoico. Ambos metabolitos también se obtienen de la degradación del ácido clorogénico, lo que sugiere que la esterificación no tiene ninguna influencia en el metabolismo del ácido cafeico por parte de la microbiota (Gonthier *et al.*, 2006). Los metabolitos más frecuentes del AF producidos por la MI son la vainillina y el ácido propiónico. Algunos derivados conjugados como la vainolliglicina y feruloglicina se han detectado en plasma y en la orina. En general los ácidos son liberados por esterasas bacterianas, después son metabolizados para reducir el doble enlace y dar lugar al ácido fenilpropiónico que después es descarboxilado para producir ácido fenilacético (Andreasen, Kroon, Williamson, & Garcia-Conesa, 2001).

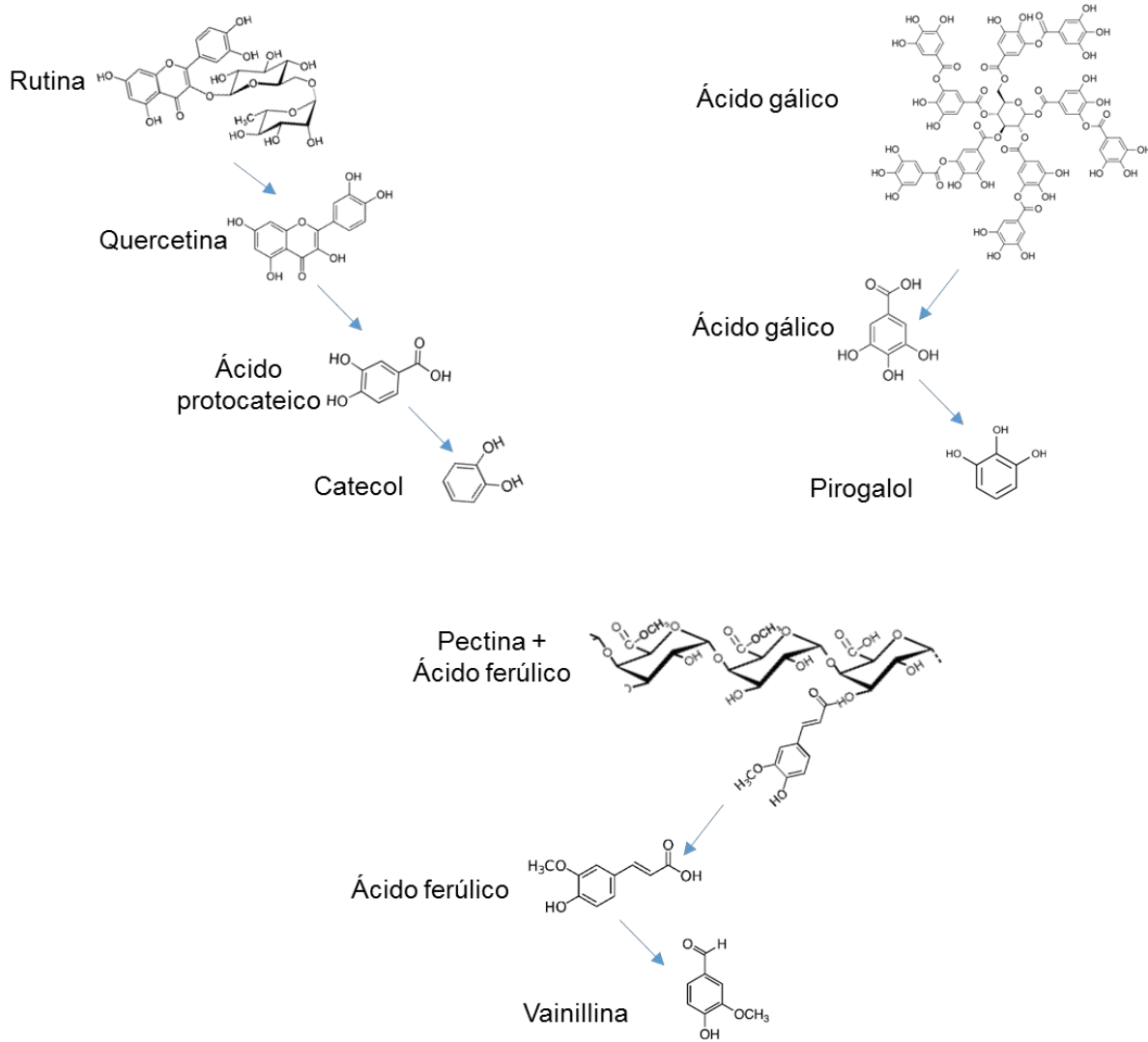


Figura 3. Generación de metabolitos a partir de la transformación de CF presentes en la dieta al ser expuestos a la MI.

Los principales ácidos hidroxibenzoicos son el AG, AP, AV y el ácido siríngico. En el colon estos son transformados por la MI cuando un grupo hidroxilo está presente en la posición 4 del anillo. Así, el AG produce pirogalol, y el AP produce catecol. Del mismo modo, el AV produce O-metilcatecol Aura (2005). Estos metabolitos son rápidamente absorbidos y excretados en la orina. Un estudio en cerdos reveló que la suplementación de ácidos hidroxibenzoicos incrementa en la orina la concentración de ácido hipúrico, como resultado de la conjugación del ácido benzoico con el aminoácido glicina (Torrallardona, Badiola, & Broz, 2007).

Como se mencionó anteriormente, gran cantidad de CF no logran ser absorbidos llegando hasta el colon, estos y sus metabolitos tienen un rol importante en el mantenimiento de la salud intestinal. La MI, además de la transformación del material derivado de la dieta, es capaz de realizar una serie de biotransformaciones en los CF que llegan al colon, afectando su absorción y biodisponibilidad (Laparra & Sanz, 2010). Sin embargo, sólo unas pocas especies de la MI son responsables del metabolismo de los CF, por ejemplo cepas de *Bacteroides ovatus*, *Streptococcus intermedius*, y *Ruminococcus productus*, así como, *Enterococcus faecium* EPI1 y *Lactobacillus mucosae* EPI2 aisladas de heces fecales humanas, son responsables de convertir daidzeína a equol (Atkinson, Frankenfeld, & Lampe, 2005). Por otra parte, el género *Clostridium* se ha reportado como el responsable de la ruptura del anillo C de los flavonoles en humanos. *Clostridium* y *Eubacterium* son los principales géneros que han sido identificados como los implicados en el metabolismo de muchos CF tales como isoflavonas, flavonoles (quercetina y kaempferol), flavanonas (naringenina), y flavan-3-oles (catequina y epicatequina) (María V Selma *et al.*, 2009).

Actualmente, la atención se ha centrado en la degradación microbiana de CF no flavonoides, ya que se ha reportado que una especie de *Butyrivibrio* aislada del rumen es capaz de metabolizar completamente taninos en ácidos grasos volátiles (Vasta *et al.*, 2009). Un estudio *in vitro* reportó 6 bacterias aisladas de heces humanas las cuales son capaces de liberar al AF del grupo etil éster. Por otra parte, ciertas bacterias de la MI incluyendo algunas que son reconocidas por sus

beneficios a la salud como especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, participan en la liberación de ácidos hidroxicinámicos en el colon. El uso de suplementos alimenticios como probióticos, puede modificar la MI incrementando el número de bacterias específicas capaces de transformar ácidos fenólicos, resultando en beneficios para la salud del hospedero. Se ha reportado que la aplicación de probióticos como *Eubacterium lutosum* en ratas libres de microbiota (no productoras de metabolitos microbianos), tiene como resultado la transformación de CF como el prenilflavonoide isoxantohumol en el fitoestrógeno 8-prenylnarigenina, el cual se ha demostrado tener propiedades anticancerígenas y preserva la densidad ósea (Keiler, Zierau, & Kretzschmar, 2013; Possemiers *et al.*, 2008).

La tasa de degradación de los CF está significativamente influenciada por el consumo diario de estos, así como por la diversidad de bacterias que componen la MI. Esto da a lugar a que existan diferencias en la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los CF y sus metabolitos, debido a las variaciones en las poblaciones de la microbiota entre individuos lo cual tiene como consecuencia una gran diversidad de beneficios a la salud.

Los CF y sus metabolitos que no absorbidos, además de ejercer un beneficio directo sobre los tejidos del organismo, también poseen un efecto modulador sobre la MI. Este es el caso de los CF presentes en el té, como la CQ, epicatequina, 3-O-metil ácido gálico, AG, y ácido cafeico, los cuales se han reportado que pueden suprimir el crecimiento de patógenos como *C. perfringens*, *Clostridium difficile* y *Bacteroides* spp. También, se ha reportado que estos mismos CF no afectan de manera negativa el crecimiento de comensales anaerobios como *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp., y probióticos como *Lactobacillus* spp. (H. C. Lee *et al.*, 2006). Un estudio presento resultados similares, en el cual se realizó un cultivo en presencia de (+) catequina, dando como resultado un incremento en el crecimiento del grupo *Clostridium coccooides-Eubacterium rectale*, y *Bifidobacterium* spp., mientras que tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Clostridium histolyticum* (Tzounis *et al.*, 2008).

El incremento en grupo de *C. coccoides-Eubacterium rectale* puede estar relacionado a su capacidad para metabolizar CF como flavonoides.

Los CF son ampliamente reconocidos por sus beneficios a la salud pero también por sus propiedades antimicrobianas, ya que pueden reprimir distintos patógenos presentes en el intestino (H. C. Lee *et al.*, 2006). La importancia de utilizar CF como antimicrobianos ha ido en aumento debido al hecho de que cada vez es más frecuente la resistencia a antibióticos por parte de varios patógenos. Los CF pueden tener acción bacteriostática o bactericida, o también pueden inhibir la adhesión de distintos patógenos a las células del intestino o en el tracto urinario. Un ejemplo son las antocianinas presentes en frutos de color rojo y púrpura tales como cerezas, granada, frambuesa y fresa, que han demostrado tener acción bacteriostática sobre los patógenos *Staphylococcus epidermis* y *Klebsiella pneumoniae* (Y.-L. Lee, Cesario, Wang, Shanbrom, & Thrupp, 2003). De igual forma, el extracto de zarzamora inhibió el crecimiento de diferentes patógenos como *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Helicobacter pylori*, y *Bacillus cereus* *in vitro* (Nohynek *et al.*, 2006).

Otro ejemplo, es el resveratrol, el cual posee un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de hongos ocratoxigénicos inoculados en uvas así como en diferentes patógenos humanos (Paulo, Ferreira, Gallardo, Queiroz, & Domingues, 2010; M. a. V. Selma *et al.*, 2008). Proantocianidinas de arándanos también mostraron ser efectivas al reducir la adhesión de *E. coli* en células de la vejiga así como la inhibición del patógeno *H. pylori* (Reid *et al.*, 2001). En un estudio *in vitro* donde se utilizó extracto de semilla de mango (*Mangifera indica* L.) rico en taninos y flavonoides, inhibido de manera efectiva patógenos Gram-negativos (Kabuki *et al.*, 2000). De igual forma los ácidos clorogénico, cafeico y *p*-cumárico inhibieron a los patógenos *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimorium* (Parkar, Stevenson, & Skinner, 2008).

Por otra parte, en los últimos años se ha reportado que los CF no afectan el crecimiento de bacterias benéficas, sino que además pueden estimular el

crecimiento de estas. Un estudio realizado en humanos revelo que el consumo de CF de vino tinto, incrementó significativamente el número de *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides uniformis*, y el grupo *E. rectale*, mientras que la cantidad de *Lactobacillus* no se vio afectada (Queipo-Ortuño *et al.*, 2012). El consumo de una bebida de mora azul por 6 semanas, aumento significativamente la cantidad de *Bifidobacterium* spp., lo que significa que los CF de este fruto tiene un rol importante en la modulación de la microbiota (Vendrame *et al.*, 2011). Otro estudio donde se utilizaron modelos de fermentación *in vitro* en presencia de un extracto de semilla de uva, tuvo como resultado un incremento en el crecimiento de *Lactobacillus* spp. y *Enterococcus* spp. y una reducción en el grupo de *Clostridium hystoliticum* Cueva *et al.* (2013). Estos cambios en la composición de la microbiota por parte de los CF traen consigo beneficios a la salud, por ejemplo, en un estudio donde se utilizaron CF provenientes de la fracción insoluble de cocoa, aumentaron las poblaciones de *Lactobacillus* sp y *Bifidobacterium* sp. así como la producción de butirato. Los cuales fueron asociados con una reducción en los niveles de triacilglicerol en plasma Fogliano *et al.* (2011). De esta manera se demuestra la influencia general de los CF provenientes de la dieta sobre la modulación de la MI.

HIPOTESIS

Los CF presentes en pulpa de mango cv. Ataulfo, modulan de forma selectiva el crecimiento de bacterias patógenas (↓) y probióticas (↑).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto *in vitro* de diversos CF identificados en pulpa de mango cv. Ataulfo, sobre el crecimiento de bacterias patógenas y probióticas.

Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de estándares de CF, individualmente (AG, AV, AP, AF, CQ y PG) y en combinaciones binarias identificados en pulpa de mango cv. Ataulfo sobre el crecimiento de dos probióticos: *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 y *L. acidophilus* NRRLB 4495.

Evaluar el efecto de los mismos estándares de CF individualmente y en combinaciones binarias sobre el crecimiento de dos patógenos: *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*

MATERIALES Y METODOS

Estándares de CF

Los CF AG, AF, AV, AP, PG, y CQ fueron adquiridos en la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EUA), estos estándares fueron utilizados en pruebas *in vitro* para determinar la actividad antimicrobiana y prebiótica respectivamente.

Bacterias y Medios de Cultivo

El probiótico *L. acidophilus* NRRLB 4495 fue donado por el Laboratorio de Calidad, Trazabilidad y Autenticidad de Alimentos, Química y Bioquímica de Productos Lácteos, CIAD A.C. *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 y los patógenos *E. coli* O157:H7 ATCC 4389 y *S. entérica* serovar Typhimurium ATCC 14028 fueron a adquiridos de la American Type Culture Collection.

Los medios de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y Mueller-Hinton se adquirieron de Difco (Difco laboratorios/Becton, Dickinson and Co, MD, EUA). El medio MRS sin dextrosa se obtuvo de Actero (Foodcheck Systems Inc. Calgary, AB, Canadá).

Actividad Antibacteriana y Prebiótica de Estándares de CF

Efecto de CF individuales presentes en mango cv. Ataulfo sobre el crecimiento de bacterias patógenas y probiótica.

Se determinó la capacidad antibacteriana y prebiótica de los estándares de CF contra las bacterias *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. acidophilus*, y *L. rhamnosus* GG. Para la preparación de los inóculos, se tomó una azada de cada bacteria y se inoculó en caldo Mueller Hinton para el caso de patógenos, y para probióticos se utilizó caldo MRS con 0.5 g/L de L-cisteína (MRS-cys), incubándose durante 19 h a 37°C. Posteriormente, la densidad óptica fue comparada con un tubo de 0.5 sobre la escala de McFarland (10^8 UFC/mL) para cada bacteria.

La efectividad antibacteriana y la actividad prebiótica de los estándares de CF se determinaron empleando la técnica de microdilución en caldo. Se prepararon diferentes concentraciones de los estándares usando caldo Mueller-Hinton para los patógenos y caldo MRS sin dextrosa para observar el crecimiento de los probióticos en ausencia de fuente de carbono. El rango de concentración utilizado fue de 15 a 35 mM. Se tomaron 5 µL de inóculo preparado como se describió previamente y 295 µL de las diluciones de estándar, en placas Costar de 96 pozos y se incubaron durante 24 h a 37°C. La concentración más baja de cada uno de los estándares que evito el desarrollo del inóculo se tomó como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Una vez determinada la CMI de cada estándar para cada bacteria, se realizaron curvas de sensibilidad para conocer el efecto de los estándares sobre los parámetros de crecimiento bacteriano. El crecimiento bacteriano fue expresado como un aumento en la densidad óptica (DO) a 600 nm utilizando un lector de micro placas (FLOUstar Omega, BMG LABTECH), se tomaron lecturas de la absorbancia cada 30 min por 24 horas. Estos datos fueron procesados utilizando la función de Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994) calculando el tiempo de la fase

Lag (h), tasa de crecimiento (μ_{max} , DO/h), y el crecimiento máximo en la fase estacionaria (Y_{max} , DO) según la siguiente ecuación.

$$Y(t) = y_0 + \mu_{max} A(t) - \frac{l}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{(Y_{max} - Y_0)}} \right)$$

Función de Baranyi del crecimiento bacteriano a un tiempo dado [y (t)], donde: y_0 = DO al tiempo cero, μ_{max} = tasa máxima de crecimiento, m = tiempo de la curvatura al final de la fase lag, Y_{max} = la máxima DO en la fase estacionaria.

Efecto de la combinación de los estándares de CF presentes en mango cv. Ataulfo sobre el crecimiento de bacterias patógenas y probióticas

La actividad antibacteriana de combinaciones binarias de estándares de CF se realizó utilizando el método de checkerboard (Rand, Houck, Brown, & Bennett, 1993). Considerando las CMI obtenidas en el ensayo anterior para cada estándar sobre cada bacteria, se hicieron combinaciones de éstos (AG+AV, AG+AF, AG+AP, AG+CQ, AV+AP, AV+CQ, AV+AF, AP+AF, AP+CQ, AF+CQ, AP+CQ) a 0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, y 2.0 veces la CMI, respectivamente. Estas preparaciones fueron inoculadas e incubadas como se mencionó previamente para la determinación de la CMI; y fueron analizadas mediante la fórmula para calcular el índice de concentración inhibitoria fraccional (ICIF) de acuerdo a las siguientes fórmulas: $CIF_A = CMI_{A+B} / CMI_A$, $CIF_B = CMI_{B+A} / CMI_B$, $ICIF = CIF_A + CIF_B$. Donde el valor de la CMI_{A+B} es el CMI del compuesto A en presencia del compuesto B, y viceversa para la CMI_{B+A} . los valores del ICIF se interpretan como sinérgicos si el $ICIF < 0.5$, aditivo $0.5 < ICIF \leq 1$, indiferente cuando $1 < ICIF < 4$ y antagónico cuando el $ICIF > 4$ (van Vuuren & Viljoen, 2011). De esta manera se puede clasificar el efecto de las combinaciones de compuestos sobre el efecto

de una mezcla de compuestos o extractos de plantas sobre el crecimiento bacteriano.

El efecto de las combinaciones binarias de estándares de CF sobre la actividad prebiótica se evaluó utilizando el método descrito previamente. Las concentraciones de las combinaciones utilizadas fueron las mismas que en el caso de patógenos. Las combinaciones que se consideraron sinérgicas fueron aquellas que tuvieron mejor efecto sobre los parámetros de crecimiento (fase lag corta, mayor tasa de crecimiento y crecimiento máximo) respecto al control y al CF cuando se probó individualmente.

Análisis Estadístico

Para el total de los ensayos ejecutados se realizó un diseño experimental completamente al azar. Para cumplir con el primer objetivo se evaluó el efecto de los estándares de CF de manera individual sobre las CMI (*E. coli*, *Salmonella*. Typhimurium, *Lactobacillus acidophilus*, y *L. rhamnosus* GG) y los parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano (fase lag, μ_{max} , y Y_{max}). Mientras que para el segundo objetivo se evaluó el efecto de la combinación de estándares de CF sobre el crecimiento de las bacterias inoculadas (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG). Se realizó un ANOVA ($p \leq 0.05$) para estimar diferencias significativas entre los tratamientos y se aplicó la prueba de Tukey-Kramer. Se utilizó el software estadístico NCSS (2007) para el análisis de datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de CF Individuales Presentes en Mango cv. Ataulfo sobre el Crecimiento de Bacterias Patógenas y Probióticas

En el **Cuadro 1** se muestran los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* del efecto de los estándares de CF sobre el crecimiento de las 4 bacterias. Todos los CF probados en el estudio presentaron actividad antimicrobiana sobre las bacterias patógenas. Los AV y AP presentaron mayor efectividad contra *S. Typhimurium* inhibiendo su crecimiento con una concentración de 15 mM. Por su parte de los AV y AF inhibieron a *S. Typhimurium* con una CMI de 20 mM La CQ presentó menor efectividad contra *S. Typhimurium* ya que la CMI obtenida fue de 35 mM. En el caso de *E. coli*, la CQ fue también menos efectiva presentando una CMI de 35 mM. Los 4 ácidos fenólicos (AG, AV, AF y AP) inhibieron el crecimiento de *E. coli* a la CMI de 20 mM.

También se determinó el efecto de los CF en el crecimiento de los probióticos (**Cuadro 1**). Las concentraciones que inhibieron a *S. Typhimurium* y *E. coli* no inhibieron el crecimiento de *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*, a excepción de AF que inhibió el crecimiento de *L. acidophilus* en presencia de 20 mM y *L. rhamnosus* a una CMI de 25 mM. No se observó efecto inhibitorio a ninguna de las concentraciones probadas de ácido AV sobre *L. rhamnosus*, sin embargo, inhibió el crecimiento de *L. acidophilus* a la CMI de

Cuadro 1. CMI de estándares de CF individuales probados *in vitro* contra probióticos y patógenos.

Compuesto	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> Typhimurium
A. gálico	NI	NI	20 mM	20 mM
A. ferúlico	25 mM	20 mM	20 mM	20 mM
A. protocateico	NI	30 mM	20 mM	15 mM
A. vanílico	35 mM	25 mM	20 mM	15 mM
Catequina	NI	NI	35 mM	35 mM

NI- no se observó efecto inhibitorio dentro de las concentraciones probadas.

25 mM. El AP no inhibió el crecimiento de *L. rhamnosus* a la concentración de 35 mM. Mientras que para *L. acidophilus* el AP inhibió a la concentración de 30 mM. Por otra parte, el AG y la CQ no mostraron Inhibición sobre el crecimiento de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*, a ninguna de las concentraciones probadas.

Sin embargo, a pesar de que los ácidos AF, AV y AP inhibieron el crecimiento de ambos probióticos al ser expuestos a ciertas concentraciones, dichos compuestos no afectaron la viabilidad de las bacterias, ya que se realizaron cultivos en placa para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y ambos prebióticos seguían viables a la concentración de 35mM de los 3 ácidos fenólicos mencionados (**Cuadro 2**).

Los resultados obtenidos de AG y CQ sobre *E. coli* O157:H7, son similares a los reportados por Cheng, Bekhit, McConnell, Mros, y Zhao (2012) sobre la misma bacteria. Sin embargo, la CMI del AG fue menor en nuestro estudio, mientras que la CMI de CQ fue mayor a lo reportado por estos autores. En contraste Parkar *et al.* (2008) reportan que la CMI de CQ para *E. coli* y *S. Typhimurium* es de 3.4 mM y para *L. rhamnosus* es de 0.86 mM. Por otra parte, en un estudio realizado por Merkl, Hradkova, Filip, y ŠMIdRkal (2010), la CMI de AV, AF y AP para *E. coli*, fue la misma que se encontró en nuestro estudio (20mM). Sin embargo, ellos también observaron que dichos ácidos fenólicos aumentan su propiedad antimicrobiana al encontrarse en su forma butil éster.

En un estudio similar al nuestro donde se evaluó el efecto de AG y CQ sobre el crecimiento de *L. acidophilus* CECT 903, se probaron concentraciones mayores a las utilizadas en un nuestro estudio de ambos compuestos (100mg/mL), aun así, dicha concentración no inhibió el crecimiento de *L. acidophilus* CECT 903 por parte de ningún compuesto (Hervert-Hernández, Pintado, Rotger, & Goñi, 2009). En el mismo estudio, también se evaluó el efecto de un extracto de semilla de uva a la misma concentración, el cual tuvo un fuerte efecto estimulante en el crecimiento de *L. acidophilus* CECT 903. Sin embargo, en un estudio similar realizado por Tabasco *et al.* (2011), observaron que un extracto de semilla de uva

Cuadro 2. CMB de estándares de CF individuales probados *in vitro* contra probióticos y patógenos.

Compuesto	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>E. coli</i> 0157:H7	<i>Salmonella</i> Typhimurium
A. gálico	>35 mM	>35 mM	30 mM	30 mM
A. vanílico	>35 mM	>35 mM	25 mM	25mM
A. ferúlico	>35 mM	>35 mM	20 mM	25mM
A. protocateico	>35 mM	>35 mM	20 mM	20mM
Catequina	>35 mM	>35 mM	>35 mM	>35 mM

adicionado con AG y CQ, tuvo un efecto inhibitorio sobre diferentes especies de *Lactobacillus*, a una concentración de 5.49 mg AG/mL y 25 mg CQ/mL. El efecto de los CF sobre el crecimiento de las bacterias, depende de la dosis probada, la estructura del compuesto, diferencias entre su pared celular y especie (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001). Los CF poseen la habilidad de unirse a la pared celular de las bacterias, al hacer esto algunos CF pueden generar peróxido de hidrógeno, alterando la permeabilidad de la pared celular (Kemperman, Bolca, Roger, & Vaughan, 2010). Los CF también pueden interferir con el quorum sensing de las bacterias, lo cual logran produciendo pequeñas moléculas de señalización llamadas auto-inductores (González & Keshavan, 2006).

También, algunos CF poseen la capacidad de atrapar iones fierro, lo cual afecta a patógenos aerobios, que necesitan fierro para diferentes funciones, como la reducción del ribonucleótido precursor de ADN y para formar grupos hemo (Chung, Lu, & Chou, 1998). En el caso del patógeno *H. pylori* los CF, suprimen la actividad de la ureasa, afectando la proliferación bacteriana y dañando su pared celular, dejando más susceptible a la bacteria a compuestos como antibióticos (Lin, Vatter, Labbe, & Shetty, 2005).

Por otra parte, el mecanismo exacto de cómo los fenoles actúan sobre el crecimiento bacteriano aún no ha sido completamente elucidado; sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos. Uno de estos mecanismos propone, que algunas bacterias son capaces de utilizar a los CF como sustrato. Bacterias comensales de MI poseen enzimas específicas que pueden metabolizar a los CF para obtener energía a partir de ellos, así como también aumentar el consumo de nutrientes (García-Ruiz *et al.*, 2008). Las principales enzimas involucradas en este proceso son α -rhamnosidasa, β -glicosidasa, y β -glucuronidasa. Otras enzimas como esterasas, hidrogenasas, deshidrogenasas, deshidroxilasas, descarboxilasas e isomerasas se encargan de desglosar la estructura de los CF (María V Selma, Beltrán, García-Villalba, Espín, & Tomás-Barberán, 2014). Así mismo, algunos CF pueden mejorar la capacidad de adhesión de bacterias benéficas. Estos compuestos pueden imitar acil-homoserina lactonas, así los CF

funcionan como factores de regulación en la formación de biopelículas involucradas en la adhesión bacteriana (Huber, Eberl, Feucht, & Polster, 2003).

Para determinar el efecto de la CMI de los CF de mango cv. Ataulfo a sobre las diferentes fases de crecimiento bacteriano de los patógenos *E. coli* y *S. Typhimurium* se aplicó la función de Baranyi. Se observó un aumento en la fase lag para ambos patógenos en presencia de todos los CF utilizados. Además, de una disminución en la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max} DO/h) y en el crecimiento máximo (Y_{\max} , DO). Como se muestra en el **cuadro 3**, todos los CF de este estudio fueron más efectivos contra *S. Typhimurium* que contra *E. coli*, ya que se obtuvieron valores de 0 en los 3 parámetros de crecimiento. Los ácidos AV, AF y AP mostraron una efectividad similar entre sí, sobre los parámetros de crecimiento de *E. coli*. Por otro lado, el AG extendió significativamente la fase lag respecto al control (15.9 vs 5.9 h), CQ tuvo un resultado similar en la fase lag (16.4 h). Sin embargo, el AG fue más efectivo comparado con CQ, disminuyendo más la tasa de crecimiento (0.0004 vs 0.0034 μ_{\max} DO/h). Lo anterior demuestra que los CF presentes en mango cv. Ataulfo son efectivos contra patógenos, ya que afectan las diferentes fases del crecimiento bacteriano.

En el caso de los probióticos, los CF presentaron un efecto positivo sobre los parámetros de crecimiento de ambas bacterias, disminuyendo la fase lag y aumentando la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max} DO/h), dichos efectos se muestran en el **cuadro 4**. CQ fue el compuesto que tuvo mejor efecto

Cuadro 3. Efecto de CF individuales sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a patógenos.

Bacteria	Tratamiento	Lag (h)	μ_{max} (h)	Ymax (DO)
<i>E. coli</i> O157:H7	Control	5.97 a	0.088 a	1.33 a
	A. Gálico	15.93 b	0.0004 b	0.06 b
	A. Vanílico	0	0	0
	A. Protocateico	0	0	0
	A. ferúlico	0	0	0
	Catequina	16.42 b	0.0034 c	0.10 b
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Control	3.31	0.049	1.01
	A. Gálico	0	0	0
	A. Vanílico	0	0	0
	A. Protocateico	0	0	0
	A. Ferúlico	0	0	0
	Catequina	0	0	0

Cuadro 4. Efecto de los CF individuales sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a probióticos.

Bacteria	Tratamiento	Lag (h)	μ_{max} (h)	Ymax (DO)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Control	6.43 a	0.191 a	1.17 a
	Control 2	0 b	0.041 b	0.47 b
	A. Gálico	6.96 a	0.041 c	0.08 c
	A. Vanílico	7.92 a	0.012 b	0.08 c
	A. Protocateico	6.96 a	0.012 b	0.07 c
	A. ferúlico	10.62 c	0.001 d	0.07 c
	Catequina	3.80 d	0.022 e	0.31 d
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Control	11.54 ab	0.263 a	2.24 a
	Control 2	6.11 c	0.061 b	0.84 b
	A. Gálico	5.84 c	0.068 b	0.98 b
	A. Vanílico	10.19 a	0.054 b	0.54 c
	A. Protocateico	7.76 c	0.065 b	0.73 d
	A. Ferúlico	13.65 b	0.019 c	0.30 e
	Catequina	5.08 c	0.006 d	0.37 e

sobre la fase lag de los probióticos. No obstante, el AG tuvo mejor efecto sobre la tasa de crecimiento de *L. acidophilus* (0.041 $\mu\text{max DO/h}$) y *L. rhamnosus* (0.068 $\mu\text{max DO/h}$) respecto a los otros CF. Esto puede deberse a que los miembros del género *Lactobacillus* poseen la enzima galato descarboxilasa, la cual es capaz de degradar el AG a PG, el cual a su vez es degradado a ácido cis-aconítico que forma parte del ciclo de Krebs. El AG también puede ser degradado a oxaloacetato y piruvato. Por otra parte, el AF fue el único que afectó de manera negativa el crecimiento de los dos probióticos, ya que extendió la fase lag de ambos y disminuyó significativamente su tasa máxima de crecimiento.

Efecto de la Combinación de CF Presentes en Mango cv Ataulfo sobre el Crecimiento de Bacterias Patógenas y Probióticas

El efecto cuantitativo de la combinación de los CF se describe en términos de ICIF (**Cuadro 5**). El ICIF se encuentra en el rango de 0.25-1.0 lo que indica que hubo efectos sinérgicos y aditivos. La combinación de AG y AV presentó un efecto aditivo (antimicrobiano) contra *E. coli* (1.0) al igual que la combinación de AG+AP (1.0); solamente la combinación de AV+AP presentó un efecto aditivo en la inhibición del crecimiento de *E. coli* y *S. Typhimurium*. Las demás combinaciones probadas de los otros CF no tuvieron efecto sinérgico ni aditivo sobre ninguno de los dos patógenos utilizados en nuestro estudio. Sin embargo, dichas combinaciones afectaron los parámetros de crecimiento de *E. coli* y *S. Typhimurium*, la combinación de AG+AP fue la más efectiva en retrasar la fase lag de *E. coli* respecto a las otras dos combinaciones (15.6 h). Aun así, las combinaciones AV+AP y AV+AG, fueron más efectivas que la combinación de AG+AP, para reducir la tasa máxima de crecimiento de *E. coli* (0.007 vs 0.075 $\mu\text{max DO/h}$). En el caso de *S. Typhimurium* la combinación de ácido AV+AP aumento significativamente la fase lag respecto al control (11.5 vs 3.3 h). De igual manera también afectó crecimiento máximo de la bacteria (**Cuadro 6**).

Cuadro 5. ICIF de la combinación de CF sobre patógenos.

Bacteria	Combinación	CIF	Interacción
<i>E coli</i> O157:H7	G V	1.0	Aditivo
	G P	1.0	Aditivo
	P V	1.0	Aditivo
<i>Salmonella</i> Typhimurium	V P	1.0	Aditivo

Cuadro 6. Efecto de combinación de CF sobre los parámetros de crecimiento evaluados sobre patógenos.

Bacteria	Tratamiento	Lag (h)	μ_{max} (h⁻¹)	Y_{max} (DO)
<i>E. coli</i> O157:H7	Control	5.97	0.088	1.33
	G V	8.52	0.007	0.18
	G P	15.64	0.072	0.76
	V P	8.44	0.007	0.12
Salmonella Typhimurium	Control	3.31	0.049	1.01
	V P	11.56	0.032	0.51

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a los reportados por Rodríguez Vaquero, Aredes Fernández, y Manca de Nadra (2011) , quienes probaron las mismas combinaciones que las usadas en este estudio (AG+AV y AP+AV) sobre *Listeria monocytogenes* mostraron un efecto aditivo. Sin embargo, la combinación de AG+AP tuvo un efecto sinérgico sobre *L. monocytogenes*. A pesar de que las combinaciones evaluadas de los CF afectaron los parámetros de crecimiento de ambos patógenos, cada uno de los CF tuvo un mejor efecto, cuando se probaron individualmente sobre cada bacteria. Esto puede deberse a que los CF interactúan entre sí, y esto hace que disminuya su actividad antibacteriana. Cabe resaltar que las combinaciones evaluadas fueron de solo dos CF. Autores como Nohynek *et al.* (2006), Puupponen-Pimiä, Nohynek, Alakomi, y Oksman-Caldentey (2005) entre otros, han evaluado el efecto de extractos de CF sobre el crecimiento de diferentes patógenos, demostrando sus propiedades antimicrobianas, dichos extractos contienen una gran diversidad de CF en su composición, lo que nos indica que un extracto de mango cv. Ataulfo el cual es rico en CF, pudiera tener un buen efecto como antimicrobiano.

La utilización de combinación de CF para obtener un sinergismo antibacteriano, es para reducir la cantidad necesaria para inhibir el crecimiento y supervivencia bacteriana. El efecto de la combinación de CF, sobre los parámetros de crecimiento de los probióticos, se muestra en el **cuadro 7**. Se utilizaron combinaciones de los CF de mango cv. Ataulfo, con la finalidad de potenciar su efecto estimulador sobre el crecimiento *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*. En el caso de *L. rhamnosus*, la combinación de AG+AP fue la que menos aumentó la fase lag respecto a las demás combinaciones (9.5 h), dicha concentración tampoco afectó la tasa de crecimiento máxima respecto al control sin dextrosa (0.044 vs. 0.061 μ_{max} DO/h). Por otra parte, las combinaciones de AV+CQ, y AP+CQ mejoraron la tasa de crecimiento de *L. acidophilus* respecto al control sin

Cuadro 7. Efecto de combinaciones de CF sobre los parámetros de crecimiento evaluados sobre probióticos.

Bacteria	Tratamiento	Lag (h)	μ_{max} (h⁻¹)	Y_{max} (DO)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Control	11.54	0.263	2.24
	Control 2	6.11	0.061	0.84
	G P	9.49	0.044	0.62
	G C	14.54	0.040	0.7
	V C	13.61	0.043	0.63
	P C	14.87	0.043	0.61
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Control	6.43	0.191	1.017
	Control 2	0	0.014	0.47
	V C	8.54	0.04	0.5
	P C	6.66	0.033	0.51

dextrosa (0.04 vs. 0.014 $\mu\text{max DO/h}$), (0.033 vs. 0.014 $\mu\text{max DO/h}$). El AG tuvo el mismo efecto sobre la tasa de crecimiento de *L. rhamnosus* individualmente y en combinación. Sin embargo, en combinación extendió la fase lag del probiótico. CQ fue el CF que estuvo presente en la mayoría de las combinaciones, presentó un mejor efecto individualmente sobre la fase lag de ambas bacterias, pero tuvo mejor efecto sobre la tasa de crecimiento en combinación con otro fenol. Los AV y AP también presentaron un mejor efecto sobre la tasa de crecimiento estando en combinación que individualmente.

La información sobre el efecto de los CF en combinaciones específicas, para mejorar el crecimiento de bacterias benéficas es muy poca. No obstante, existen algunos estudios donde se ha evaluado el efecto de diferentes extractos ricos en CF sobre la estimulación del crecimiento de probióticos, obteniendo resultados prometedores (de Lacey, Pérez-Santín, López-Caballero, & Montero, 2014). Ya que varios de los CF presentes en mango cv. Ataulfo tuvieron un efecto estimulante sobre los parámetros de crecimiento de *L. acidophilus* y *L. rhamnosus* de manera individual o en combinación, podemos suponer que un extracto de cv. Ataulfo tendría un mayor efecto estimulante sobre el crecimiento de ambos probióticos. De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio, y a la evidencia generada por diversos estudios, podemos suponer que consumir mango cv. Ataulfo tendría un efecto modulador sobre la MI, aumentando las poblaciones de bacterias benéficas a la salud y disminuyendo el número de patógenos. Sin embargo, queda pendiente probarlo.

CONCLUSIÓN

Los CF afectaron el crecimiento de bacterias patógenas y probióticas, dichos efectos pueden causar cambios en la ecología del intestino humano. El mecanismo de acción de los CF difiere dependiendo del tipo de cepa, la pared celular de la bacteria, así como también la estructura del CF. Los CF presentes en mango cv. Ataulfo, son una posible opción como prebióticos, ya que lograron inhibir el crecimiento de patógenos importantes como *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*, mientras que no afectaron el crecimiento de probióticos como *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*, siendo este último el más resistente al efecto de los CF. El AG y CQ fueron los CF con mejor efecto positivo en el crecimiento de ambos probióticos.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio donde los CF de mango cv. Ataulfo, ejercieron un efecto tipo prebiótico individualmente y en combinación, ya que estimularon selectivamente el crecimiento de bacterias probióticas e inhibieron el crecimiento de patógenos; sin embargo, es importante elucidar el mecanismo exacto por el cual los CF estimulan el crecimiento de bacterias benéficas, de igual manera evaluar su efecto en un modelo *in vivo*, así como también probar el efecto de un extracto de mango sobre el restauramiento de la homeóstasis de la MI en un modelo *in vivo*

REFERENCIAS

- Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G., & Garcia-Conesa, M.-T. (2001). Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11), 5679-5684.
- Anhê, F. F., Desjardins, Y., Pilon, G., Dudonné, S., Genovese, M. I., Lajolo, F. M., & Marette, A. (2013). Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. *PharmaNutrition*, 1(4), 105-114.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199-212.
- Asano, Y., Hiramoto, T., Nishino, R., Aiba, Y., Kimura, T., Yoshihara, K., . . . Sudo, N. (2012). Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(11), G1288-G1295.
- Atkinson, C., Frankenfeld, C. L., & Lampe, J. W. (2005). Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Experimental biology and medicine*, 230(3), 155-170.
- Aura, A.-M. (2005). *In vitro digestion models for dietary phenolic compounds*: VTT Technical Research Centre of Finland.
- Aura, A.-M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 407-429.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., . . . Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718-15723.

- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology*, 23(3), 277-294.
- Berardini, N., Schieber, A., Klaiber, I., Beifuss, U., Carle, R., & Conrad, J. (2005). 7-O-Methylcyanidin 3-O-beta-D-Galactopyranoside, a Novel Anthocyanin from Mango (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins') Peels. *ZEITSCHRIFT FUR NATURFORSCHUNG B*, 60(7), 801.
- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., . . . Schulze, M. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European journal of nutrition*, 51(6), 637-663.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Buddington, K. K., Donahoo, J. B., & Buddington, R. K. (2002). Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *The Journal of nutrition*, 132(3), 472-477.
- Cammarota, G., Ianiro, G., Bibbò, S., & Gasbarrini, A. (2014). Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation? *Internal and emergency medicine*, 9(4), 365-373.
- Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current pharmaceutical design*, 15(13), 1546-1558.
- Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G. R., Martín-Álvarez, P. J., . . . Moreno-Arribas, M. V. (2013). In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS microbiology ecology*, 83(3), 792-805.
- Cheng, V. J., Bekhit, A. E.-D. A., McConnell, M., Mros, S., & Zhao, J. (2012). Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the

- antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food chemistry*, 134(1), 474-482.
- Chung, K.-T., Lu, Z., & Chou, M. (1998). Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 36(12), 1053-1060.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Davis, C. D., & Milner, J. A. (2009). Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(10), 743-752.
- de Lacey, A. M. L., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2014). Biotransformation and resulting biological properties of green tea polyphenols produced by probiotic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 633-638.
- De Vrese, M., & Marteau, P. R. (2007). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *The Journal of nutrition*, 137(3), 803S-811S.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., & Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS biology*, 6(11), e280.
- Dosil-Díaz, O., Ruano-Ravina, A., Gestal-Otero, J. J., & Barros-Dios, J. M. (2008). Consumption of fruit and vegetables and risk of lung cancer: a case-control study in Galicia, Spain. *Nutrition*, 24(5), 407-413.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., . . . Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638.
- FAOstat, F. (2009). agriculture organization of the United Nations. *Statistical database*.
- Feng, T., Wang, L., Schoeb, T. R., Elson, C. O., & Cong, Y. (2010). Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *The Journal of experimental medicine*, 207(6), 1321-1332.

- Fogliano, V., Corollaro, M. L., Vitaglione, P., Napolitano, A., Ferracane, R., Travaglia, F., . . . Gibson, G. (2011). In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. *Molecular nutrition & food research*, *55*(S1), S44-S55.
- Frank, D. N., Zhu, W., Sartor, R. B., & Li, E. (2011). Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses. *Trends in microbiology*, *19*(9), 427-434.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, *19*(9), 835-841.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev*, *17*(2), 259-275.
- Gonthier, M.-P., Remesy, C., Scalbert, A., Cheynier, V., Souquet, J.-M., Poutanen, K., & Aura, A.-M. (2006). Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *60*(9), 536-540.
- González-Aguilar, G., Robles-Sánchez, R., Martínez-Téllez, M., Olivas, G., Alvarez-Parrilla, E., & De La Rosa, L. (2008). Bioactive compounds in fruits: health benefits and effect of storage conditions. *Stewart Postharvest Review*, *4*(3), 1-10.
- González, J. E., & Keshavan, N. D. (2006). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(4), 859-875.
- Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, *361*(9356), 512-519.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, *55*(6), 481-504.
- Hascoët, J.-M., Hubert, C., Rochat, F., Legagneur, H., Gaga, S., Emady-Azar, S., & Steenhout, P. G. (2011). Effect of formula composition on the

- development of infant gut microbiota. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 52(6), 756-762.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Hervert-Hernandez, D., & Goni, I. (2011). Dietary polyphenols and human gut microbiota: a review. *Food reviews international*, 27(2), 154-169.
- Hervert-Hernández, D., Pintado, C., Rotger, R., & Goñi, I. (2009). Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *International journal of food microbiology*, 136(1), 119-122.
- HongLian, S., Noguchi, N., Niki, E., Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). Introducing natural Antioxidants. *Antioxidants in food: practical applications*, 147-158.
- Hopkins, M. J., & Macfarlane, G. T. (2003). Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1920-1927.
- Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., & Polster, J. (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C*, 58(11/12), 879-884.
- Ivanov, I. I., & Honda, K. (2012). Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell host & microbe*, 12(4), 496-508.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., & Jansson, J. K. (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, 156(11), 3216-3223.
- Jia, W., Li, H., Zhao, L., & Nicholson, J. K. (2008). Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 123-129.
- Kabuki, T., Nakajima, H., Arai, M., Ueda, S., Kuwabara, Y., & Dosako, S. i. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food chemistry*, 71(1), 61-66.

- Keiler, A. M., Zierau, O., & Kretzschmar, G. (2013). Hop extracts and hop substances in treatment of menopausal complaints. *Planta Med*, 79(7), 576-579.
- Kelsen, J. R., & Wu, G. D. (2012). The gut microbiota, environment and diseases of modern society. *Gut microbes*, 3(4), 374-382.
- Kemperman, R. A., Bolca, S., Roger, L. C., & Vaughan, E. E. (2010). Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology*, 156(11), 3224-3231.
- Kim, Y., Lounds-Singleton, A. J., & Talcott, S. T. (2009). Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). *Food chemistry*, 115(3), 989-993.
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Kumada, K., Kobayashi, F., Mtui, G., & Nakamura, Y. (2007). Novel extraction method of antioxidant compounds from *Sasa palmata* (Bean) Nakai using steam explosion. *Process Biochemistry*, 42(10), 1449-1453.
- Langlands, S., Hopkins, M., Coleman, N., & Cummings, J. (2004). Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut*, 53(11), 1610-1616.
- Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61(3), 219-225.
- Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C., Lodovici, M., Moneti, G., & Dolara, P. (2009). Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular nutrition & food research*, 53(8), 1044-1054.
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in microbiology*, 157(9), 876-884.
- Lee, Y.-L., Cesario, T., Wang, Y., Shanbrom, E., & Thrupp, L. (2003). Antibacterial activity of vegetables and juices. *Nutrition*, 19(11), 994-996.

- Leser, T. D., & Mølbaek, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental microbiology*, *11*(9), 2194-2206.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, *124*(4), 837-848.
- Lim, Y., Lim, T., & Tee, J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food chemistry*, *103*(3), 1003-1008.
- Lin, Y., Vatter, D., Labbe, R., & Shetty, K. (2005). Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. *Process Biochemistry*, *40*(6), 2059-2065.
- Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V., & Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathogens*, *14*, 31-33.
- Louie, T. J., Cannon, K., Byrne, B., Emery, J., Ward, L., Eyben, M., & Krulicki, W. (2012). Fidaxomicin preserves the intestinal microbiome during and after treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI) and reduces both toxin reexpression and recurrence of CDI. *Clinical infectious diseases*, *55*(suppl 2), S132-S142.
- 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.
- Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed research international*, 2015.

- 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.
- McConnell, E. L., Fadda, H. M., & Basit, A. W. (2008). Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 364(2), 213-226.
- Merkl, R., Hradkova, I., Filip, V., & ŠMldRkal, J. (2010). Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech J Food Sci*, 28(4), 275-279.
- Miljkovic, D., & Bignami, G. (2002). Containing relatively high levels of health-enhancing substances are obtained by novel extraction processes from the by-products of tropical crops: Google Patents.
- Miyazawa, E., Iwabuchi, A., & Yoshida, T. (1996). Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorus, calcium and magnesium in germfree and conventionalized rats. *Nutrition research*, 16(4), 603-613.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 95-111.
- Németh, K., Plumb, G. W., Berrin, J.-G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H. Y., . . . Kroon, P. A. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European journal of nutrition*, 42(1), 29-42.
- Ng, S., Hart, A., Kamm, M., Stagg, A., & Knight, S. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory bowel diseases*, 15(2), 300-310.
- Nohynek, L. J., Alakomi, H.-L., Kähkönen, M. P., Heinonen, M., Helander, I. M., Oksman-Caldentey, K.-M., & Puupponen-Pimiä, R. H. (2006). Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and cancer*, 54(1), 18-32.

- Organization, W. H. (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Orrhage, K., & Nord, C. (1999). Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatrica*, 88(s430), 47-57.
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E., & González-Aguilar, G. (2012). Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food chemistry*, 135(1), 105-111.
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E., & Skinner, M. A. (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International journal of food microbiology*, 124(3), 295-298.
- Pataky, Z., Bobbioni-Harsch, E., Hadengue, A., Carpentier, A., & Golay, A. (2009). [Gut microbiota, responsible for our body weight?]. *Revue medicale suisse*, 5(196), 662-664, 666.
- Paulo, L., Ferreira, S., Gallardo, E., Queiroz, J. A., & Domingues, F. (2010). Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1533-1538.
- Possemiers, S., Rabot, S., Espín, J. C., Bruneau, A., Philippe, C., González-Sarrías, A., . . . Verstraete, W. (2008). *Eubacterium limosum* activates isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in rat intestine. *The Journal of nutrition*, 138(7), 1310-1316.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H.-L., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2005). Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 8-18.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of

- phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*, 90(4), 494-507.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., . . . Yamada, T. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65.
- Queipo-Ortuño, M. I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Clemente-Postigo, M., Estruch, R., . . . Tinahones, F. J. (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American journal of clinical nutrition*, 95(6), 1323-1334.
- Quiros-Sauceda, A., Ayala-Zavala, J. F., Astiazaran-Garcia, H., Ornelas-Paz, J., Wall-Medrano, A., Alvarez-Parrilla, E., & Gonzalez-Aguilar, G. (2015). Bioaccessibility, Bioavailability and Antioxidant Stability of Phenolic Compounds Present in Mango (cv.'Ataulfo') Following an in Vitro Digestion and Microbial Fermentation. *The FASEB Journal*, 29(1 Supplement), 606.604.
- Rand, K., Houck, H., Brown, P., & Bennett, D. (1993). Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(3), 613-615.
- Reid, G., Hsieh, J., Potter, P., Mighton, J., Lam, D., Warren, D., & Stephenson, J. (2001). Cranberry juice consumption may reduce biofilms on uroepithelial cells: pilot study in spinal cord injured patients. *Spinal Cord*, 39(1), 26-30.
- Rodríguez Vaquero, M. J., Aredes Fernández, P. A., & Manca de Nadra, M. C. (2011). Effect of phenolic compound mixtures on the viability of *Listeria monocytogenes* in meat model. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 83-88.
- Rodriguez Vaquero, M. J., Aredes Fernandez, P. A., Manca de Nadra, M. C., & Strasser de Saad, A. M. (2010). Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 6048-6052.

- Salzman, N. H., Underwood, M. A., & Bevins, C. L. (2007). *Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa*. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Saura-Calixto, F. (2010). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(1), 43-49.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, 69(1), 52-60.
- Schieber, A., Ullrich, W., & Carle, R. (2000). Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(2), 161-166.
- Schumann, A., Nutten, S., Donnicola, D., Comelli, E. M., Mansourian, R., Cherbut, C., . . . Garcia-Rodenas, C. (2005). Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiological genomics*, 23(2), 235-245.
- Sela, D. A., & Mills, D. A. (2010). Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends in microbiology*, 18(7), 298-307.
- Selma, M. a. V., Freitas, P. M., Almela, L., González-Barrio, R. o., Espín, J. C., Suslow, T., . . . Gil, M. a. I. (2008). Ultraviolet-C and induced stilbenes control ochratoxigenic *Aspergillus* in grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 9990-9996.

- Selma, M. V., Beltrán, D., García-Villalba, R., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2014). Description of urolithin production capacity from ellagic acid of two human intestinal *Gordonibacter* species. *Food & function*, 5(8), 1779-1784.
- Selma, M. V., Espin, J. C., & Tomas-Barberan, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6485-6501.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435.
- Tabasco, R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V., Peláez, C., & Requena, T. (2011). Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. *Food microbiology*, 28(7), 1345-1352.
- Tanaka, S., Kobayashi, T., Songjinda, P., Tateyama, A., Tsubouchi, M., Kiyohara, C., . . . Nakayama, J. (2009). Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 56(1), 80-87.
- Thériault, M., Caillet, S., Kermasha, S., & Lacroix, M. (2006). Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food chemistry*, 98(3), 490-501.
- Tomás-Barberán, F. A., & Espin, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853-876.
- Torrallardona, D., Badiola, I., & Broz, J. (2007). Effects of benzoic acid on performance and ecology of gastrointestinal microbiota in weanling piglets. *Livestock Science*, 108(1), 210-213.
- Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G. G., George, T., Leonczak, J., Gibson, G. R., . . . Spencer, J. P. (2008). Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British Journal of Nutrition*, 99(04), 782-792.
- Ubeda, C., Taur, Y., Jenq, R. R., Equinda, M. J., Son, T., Samstein, M., . . . Kamboj, M. (2010). Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of

- intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *The Journal of clinical investigation*, 120(12), 4332.
- van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research*, 77(11), 1168.
- Vasta, V., Mele, M., Serra, A., Scerra, M., Luciano, G., Lanza, M., & Priolo, A. (2009). Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. *Journal of Animal Science*, 87(8), 2674.
- Velderrain-Rodríguez, G. (2013). *Efecto de la fibra dietaria en la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos de frutos tropicales durante un modelo de digestión in vitro*. (Maestría en ciencias), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Hermosillo, Sonora, México.
- Velderrain-Rodríguez, G., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J., Chen, C. O., Robles-Sánchez, M., . . . González-Aguilar, G. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & function*, 5(2), 189-197.
- Vendrame, S., Guglielmetti, S., Riso, P., Arioli, S., Klimis-Zacas, D., & Porrini, M. (2011). Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 12815-12820.
- Villa-Corrales, L., Flores-Prieto, J., Xamán-Villaseñor, J., & García-Hernández, E. (2010). Numerical and experimental analysis of heat and moisture transfer during drying of Ataulfo mango. *Journal of Food Engineering*, 98(2), 198-206.
- Walker, A. W., & Lawley, T. D. (2013). Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological Research*, 69(1), 75-86.
- Walter, J., & Ley, R. (2011). The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual review of microbiology*, 65, 411-429.

- Willing, B. P., Russell, S. L., & Finlay, B. B. (2011). Shifting the balance: antibiotic effects on host–microbiota mutualism. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 233-243.
- Wu, G. D., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2013). Diet, the human gut microbiota, and IBD. *Anaerobe*, 24, 117-120.
- Xu, J., & Gordon, J. I. (2003). Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10452-10459.
- Yahia, E. M. (2010). The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. *Fruit and vegetable phytochemicals (. represents 25% of the established ADI. It was therefore concluded that currently adult Belgian consumers are not at risk of excessive lycopene intake.*
- Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., . . . Anokhin, A. P. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222-227.