



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

**DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL Y FERMENTACIÓN *IN*
VITRO DE HARINAS PARA PANIFICACIÓN CON TRIGO,
AMARANTO Y CAMOTE NARANJA**

Por:

Valeria Luna Alcocer

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Valeria Luna Alcocer la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Ana María Calderón de la Barca
Directora de tesis



Dra. Alma Rosa Islas Rubio
Integrante de comité de tesis



Dra. Sandra V. Aguayo Patrón
Integrante de comité de tesis



Dr. Humberto F. Astiazarán García
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Digestión Gastrointestinal y Fermentación *In vitro* de Harinas para Panificación con Trigo, Amaranto y Camote Naranja” 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 de la autora Valeria Luna Alcocer, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado durante la realización del posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por brindarme un lugar para continuar mi preparación académica.

A la Dra. Ana María Calderón de la Barca por nuevamente brindarme la oportunidad de continuar en su laboratorio y seguir contribuyendo en mi crecimiento, por su apoyo y hospitalidad al estar lejos de casa.

A mi comité de tesis por el asesoramiento.

A la Dra. Sandra V. Aguayo por la disponibilidad en las innumerables veces que se necesitó, por el apoyo y enseñanzas.

A los participantes por su disposición para la realización de este trabajo.

Al Q. B. René Valenzuela por el apoyo técnico en la parte experimental, por su paciencia y por hacer amena esta parte.

Al M. C. Orlando Tortoledo por el apoyo en los análisis de HPLC, por las risas y consejos.

A la M. C. Adriana Bolaños por su ayuda y comprensión al atender siempre con una sonrisa las dudas.

A mis compañeros de laboratorio Érika, Diego y Laura María por los convivios y risas.

A Esme mi amiga y actual roomie, por motivarme y siempre estar para mí.

A las amistades que hice durante la maestría Rubí, Yessenia, Esmeralda, Vianey, Ricardo, Joel y Diego, por compartir momentos de estrés, horas de estudio, desveladas, convivencias, pero sobre todo por hacer este proceso divertido.

DEDICATORIA

A mis padres por alentarme, por su confianza, apoyo y amor incondicional que siempre me han dado.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	13
2.1. Fibra, Tipos y Composición	13
2.1.1. Acción de la Fibra.....	14
2.1.2. Beneficios de su Consumo	15
2.1.3. Ingestión Diaria Recomendada.....	16
2.2. Producción de Alimentos e Impacto en la Ingestión de Fibra.....	17
2.3. Productos de Panificación Convencionales.....	18
2.3.1. Composición.....	18
2.3.2. Efectos de su Ingestión	19
2.3.3. Otras Opciones Ultraprocesadas como Fuentes de Fibra.....	21
2.4. Productos de Panificación con Mezclas de Harinas.....	22
2.4.1. Tipos de Harinas y su Aporte de Fibra Dietaria	22
2.4.2. Beneficios.....	23
2.5. Métodos para Evaluar Efecto de la Fibra Dietaria.....	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo General.....	28
4.2. Objetivos Particulares.....	28
5. PARTICIPANTES Y MÉTODOS	29
5.1. Diseño y Selección de Participantes	29
5.2. Evaluación Dietética	29
5.3. Preparación de Harina Compuesta.....	30
5.4. Análisis de Harinas	30
5.5. Digestión Gastrointestinal <i>in vitro</i> de Harinas.....	30

CONTENIDO (continuación)

5.6. Fermentación <i>in vitro</i>	31
5.7. Análisis de Microbiota Fecal y Metabolitos.....	32
5.8. Análisis de Datos	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1. Participantes y Evaluación Dietética.....	35
6.2. Composición de la Microbiota por Patrón Dietario	37
6.3. Composición de las Harinas	38
6.4. Análisis del Proceso de Digestión Gastrointestinal <i>in vitro</i>	39
6.5. Extracción de ADN Genómico en Heces	41
6.6. Microbiota Intestinal después de Fermentación <i>in vitro</i>	42
6.7. Detección y Cuantificación de Metabolitos.....	45
6.7.1. Efecto del Tipo de Residuo Fibroso y Origen de Heces.....	45
6.7.2. Efecto del Tiempo de Fermentación.....	47
7. CONCLUSIONES	51
8. BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Abundancia relativa de <i>Bacteroides</i> , <i>Ruminococcus bromii</i> y <i>Prevotella</i> en heces de acuerdo a patrón dietario y residuo fibroso.....	43
2 Cromatogramas de los metabolitos producidos a las 12 h de fermentación, de los residuos fibrosos de harina de trigo (HT) y harina compuesta (HC) por la microbiota fecal participantes de los patrones dietarios saludable y ultraprocesado..	46
3 Cromatogramas de los metabolitos producidos a las 0, 12 y 24 h de fermentación, del residuo fibroso de harina compuesta (HC) con las heces de participantes de los patrones dietarios saludable o ultraprocesado.....	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Iniciadores de secuencias específicas para bacterias del estudio.....	33
2	Comparación de ingestión de energía y nutrientes entre patrones alimentarios.....	36
3	Microbiota fecal de acuerdo a patrón dietario saludable o ultraprocesado.....	38
4	Composición de las harinas (% base húmeda).....	38
5	Análisis de sobrenadantes de digestión <i>in vitro</i>	40
6	Contenido de fenoles, flavonoides y nitrógeno en residuo fibroso proveniente de harina de trigo y harina compuesta (peso seco)	41
7	Concentración de ADNg en heces.....	41

RESUMEN

El pan tradicional alto en fibra y micronutrientes, se transformó en un ultraprocesado de harina blanca baja en fibra, con exceso de azúcares y aditivos. Para mantener el equilibrio de una microbiota saludable, se requiere la fermentación colónica de la fibra. El objetivo de este estudio fue investigar los efectos del residuo fibroso de una mezcla óptima para panificación de harinas de trigo, amaranto y camote naranja, en la microbiota y sus metabolitos, durante la fermentación. Se reclutaron 10 participantes y de acuerdo con su dieta, se formaron en dos grupos: 5 con patrón dietario saludable y 5 ultraprocesado. Se procesaron camote naranja y amaranto reventado, para obtener harinas; se formuló una mezcla compuesta con harinas de trigo (68.7%), amaranto (22.7%) y camote (8.6%), el referente fue la de trigo (100%). Después de su digestión gastrointestinal *in vitro*, con enzimas proteolíticas y amilolíticas, se obtuvieron dos residuos fibrosos: uno de harina de trigo (HT) y otro de harina compuesta (HC), para usarse como sustrato en la fermentación *in vitro* por acción de la microbiota en las heces, por patrón dietario. Se tomaron alícuotas de cada fermentación a las 0, 12 y 24 h, para cuantificar *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus bromii* por qPCR y los metabolitos por cromatografía líquida de alta resolución. En general, el efecto de la fuente de fibra en las bacterias analizadas fue el mismo, presentaron valores más altos a las 12 h de fermentación, respecto a 24 h. Por su parte *Bacteroides* aumentó significativamente ($p < 0.05$) en los dos patrones dietarios independientemente del residuo fibroso, sobre todo del patrón ultraprocesado; en cambio, *Prevotella* fue significativamente ($p < 0.05$) menor en este patrón dietario comparado con el saludable. *Ruminococcus bromii*, permaneció muy bajo en ambos patrones dietarios. En cuanto a los metabolitos producidos evaluados como aminoácidos, los de cadena ramificada y lisina aumentaron a las 12 h de fermentación, sobre todo a partir del residuo fibroso HC. La producción de aminoácidos indispensables, tanto por hidrólisis proteica o por síntesis de la microbiota a partir de la fibra y compuestos bioactivos en HC, complementan la calidad nutricia de esta mezcla para panificación, previamente probada en cuanto a proteína e índice glicémico.

Palabras clave: Harinas para Panificación, Fibra, Microbiota, Metabolitos

ABSTRACT

The traditional bread high in fiber and micronutrients was transformed into an ultra-processed low-fiber white bread, with excess sugars and additives. To maintain the balance of a healthy microbiota, colonic fermentation of fiber is required. The objective of this study was to investigate the effects of the fibrous residue of an optimal mixture for bread making of wheat, amaranth and sweet potato flours, on the microbiota and its metabolites, during fermentation. Ten participants were recruited and according to their diet, they were formed into two groups: 5 with a healthy dietary pattern and 5 ultra-processed. Orange sweet potato and popped amaranth were processed to obtain flours; a mixture of wheat flours (68.7%), amaranth (22.7%) and sweet potato (8.6%) was formulated, the reference was that of wheat (100%). After its gastrointestinal digestion *in vitro*, with proteolytic and amylolytic enzymes, two fibrous residues were obtained: one from wheat flour (HT) and the other from composite flour (HC), to be used as a substrate in *in vitro* fermentation by the action of the microbiota in feces, by dietary pattern. Aliquots of each fermentation were taken at 0, 12 and 24 h, to quantify *Bacteroides*, *Prevotella* and *Ruminococcus bromii* by qPCR and the metabolites by high-performance liquid chromatography. In general, the effect of the fiber source in the bacteria analyzed was the same, they presented higher values at 12 h of fermentation, compared to 24 h. On the other hand, *Bacteroides* increased significantly ($p < 0.05$) in the two dietary patterns independently of the fibrous residue, especially the ultra-processed pattern; on the other hand, *Prevotella* was significantly ($p < 0.05$) lower in this dietary pattern compared to the healthy one. *Ruminococcus bromii*, remained very low in both dietary patterns. Regarding the metabolites produced evaluated as amino acids, those of the branched chain and lysine increased at 12 h of fermentation, especially from the fibrous residue HC. The production of essential amino acids, either by protein hydrolysis or by synthesis of the microbiota from fiber and bioactive compounds in HC, complement the nutritional quality of this mixture for baking, previously tested in terms of protein and glycemic index.

Key words: Bakery Flours, Fiber, Microbiota, Metabolites

1. INTRODUCCIÓN

La fibra dietaria se define como las partes comestibles de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción, con fermentación completa o parcial en el colon, que promueven efectos fisiológicos benéficos (AACC International, 2001).

A lo largo de la historia de la humanidad, la fibra estaba incluida en forma natural en los alimentos de origen vegetal, que se consumían frescos o muy poco procesados. Desde los inicios de la Revolución Industrial, en la segunda parte del siglo XVIII, con el refinamiento de las harinas fue disminuyendo la ingestión de fibra. Así llegamos a niveles muy lejanos del requerimiento, en el presente siglo (Arroyo, 2008). Por la insistencia en aumentar el consumo de fibra, la industria de los alimentos hace actualmente esfuerzos para incluirla en los alimentos ultraprocesados (Fardet, 2018), pero poco se hace para aumentar naturalmente su ingestión.

Además de la adición muy socorrida, de salvado de trigo al pan tradicional, se puede enriquecer con fibra y compuestos antioxidantes la harina de trigo sustituyéndola parcialmente con harinas de amaranto y camote, alimentos ancestrales en la dieta mexicana. Así, se optimizó una mezcla de esta harina compuesta y se preparó pan de caja, con éxito (Calderón de la Barca *et al.*, 2019). Aunque se cuantificó el contenido total de fibra en el pan producido, no se evaluó su efecto en la nutrición humana.

En este contexto, el propósito de esta tesis fue investigar el efecto de la fermentación gastrointestinal después de digerir *in vitro*, sobre la microbiota y sus metabolitos, de la fibra en harinas de trigo, amaranto y camote naranja, en proporciones óptimas para panificación.

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

2.1. Fibra, Tipos y Composición

La fibra se clasifica según su solubilidad en agua como soluble o insoluble. Esto es importante para entender su función en el tracto gastrointestinal, cuyo fluido es acuoso. La fibra soluble tiene la capacidad de absorber agua formando una solución viscosa, propiedad que es la resistencia al flujo cuando se aplica un esfuerzo de corte, puede variar dependiendo de la estructura de los polímeros que conforman la solución (Vilcanqui-Pérez y Vélchez-Perales, 2017). Esta característica es relevante fisiológicamente debido a que está involucrada en la cinética y absorción de nutrientes en el intestino delgado (Jovanovski *et al.*, 2020).

La fibra soluble incluye pectina, mucílago, gomas, β -glucanos, fructanos, y algunos almidones resistentes. Son compuestos que se encuentran principalmente en frutas, verduras, legumbres y cereales como avena y cebada (Soliman, 2019).

La fibra insoluble retiene poca agua en su matriz estructural generando poca viscosidad (McRorie y Mckeown, 2017); son ejemplos de este tipo, la hemicelulosa, celulosa y lignina. Su principal fuente alimentaria son granos integrales, trigo, salvado, nueces y semillas, así como algunas frutas y verduras (Soliman, 2019).

Otro tipo de fibra es la funcional, que consiste en carbohidratos no digeribles, aislados, extraídos o sintetizados en el laboratorio y que pueden tener efectos benéficos en la salud (McRorie y Mckeown, 2017). Las fibras funcionales abarcan β -glucanos, celulosa, quitinas, fructanos, gomas, lignina, pectina, polidextrosa, entre otros (Soliman, 2019); se añaden a los alimentos durante el procesamiento industrial.

La fibra dietaria puede ser parcial o totalmente fermentable o no fermentable. Este es un proceso que se lleva a cabo por las bacterias del colon en condiciones anaeróbicas, mediante sus enzimas

capaces de hidrolizar oligo- y polisacáridos. Dicho proceso es fundamental, dando como resultado el desarrollo de bacterias, que ayudan a mantener la integridad de las células epiteliales y la producción de metabolitos (García Pérez *et al.*, 2002).

2.1.1. Acción de la Fibra

El mecanismo de acción de la fibra depende de su tipo. Las diversas propiedades tendrán efectos fisiológicos y metabólicos dependiendo del grado de solubilidad, capacidad para unir moléculas orgánicas e inorgánicas y tipo de fermentación (Vilcanqui-Pérez y Vílchez-Perales, 2017).

El efecto del consumo de fibra abarca todas las funciones digestivas desde la masticación hasta la evacuación de heces. La fibra soluble como solución viscosa, retarda el vaciamiento gástrico y aumenta el volumen del bolo alimenticio, induciendo sensación de saciedad (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006). Además, dentro de la estructura de dicha solución quedan atrapadas diversas moléculas como lípidos, glucosa, proteínas y agentes tóxicos, lo que impide el acceso de las enzimas para su efectiva digestión. Así se limita su proximidad al enterocito y por tanto, la absorción. A esto se debe que disminuyan las concentraciones séricas de lípidos y glucosa, y se excreten en las heces (Axelrod y Saps, 2018).

La fibra insoluble pasa por el tracto digestivo hasta el intestino grueso, en donde puede ser parcial o totalmente fermentada; esto, disminuye el tiempo de tránsito y aumenta el volumen fecal. Se recomienda su consumo para disminuir el riesgo a desarrollar cáncer de colon, esto porque reduce la concentración y el tiempo de contacto con potenciales agentes, que puedan inducir neoplasia (Ocvirk *et al.*, 2019). Hay también fibra insoluble no fermentable, que atrapa agua en el intestino y provoca la evacuación (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006).

Debido a sus efectos, se sugiere la fibra insoluble en el tratamiento de algunos problemas gastrointestinales como el estreñimiento. Es común en este tipo de problemas, recomendar la ingestión de salvado de trigo; Sin embargo, su mecanismo podría resultar contraproducente. Tal

fuelle de fibra, no absorbe agua, sino que debido al tamaño y forma de sus partículas, tiene efecto irritante sobre la mucosa del intestino grueso, propiciando la secreción de agua y concluyendo en un efecto laxante (McRorie y Mckeown, 2017). Esto no favorece a niños y adolescentes, ya que se pierden los micronutrientes que se lleva la fibra a las heces; tampoco favorece a las personas con colon irritable porque exacerba la inflamación de la mucosa intestinal (Eswaran *et al.*, 2013).

De acuerdo con las propiedades estructurales y específicas de la fibra, puede ser fermentable o no fermentable. La fermentación, se lleva a cabo por las bacterias del colon. Entre más soluble, es más fermentable, y por lo tanto actúa como prebiótico estimulando el crecimiento selectivo de bacterias, contribuyendo a los beneficios en la salud (Vilcanqui-Pérez y Vélchez-Perales, 2017).

Independientemente de si el tipo de fibra tiene o no efecto probiótico, toda la fibra dietaria tiene una influencia muy marcada sobre la conformación de la Microbiota intestinal, que varía de acuerdo a diversos factores, principalmente la dieta (Williams *et al.*, 2017). De acuerdo a Axelrod y Saps (2018), son excepciones de tal influencia la lignina, polifenoles y carotenoides. Sin embargo, un estudio pionero de microbiota y dieta, parece contradecir dicha afirmación. La composición de la microbiota de niños aborígenes de Burkina Faso, con alto consumo de fibra de ese tipo, contiene *Xilanibacter*, un género que fermenta hemicelulosa, que junto con lignina forma la pared celular en las plantas. Así mismo, es alta en *Prevotella*, asociada con altos consumos de fibra dietaria en poblaciones como la nuestra (De Filipo *et al.*, 2010; Mejía-León *et al.*, 2014).

Los fila predominantes en la microbiota intestinal o fecal, son Firmicutes (*Ruminococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*), Bacteroidetes (*Alistipes*, *Prevotella*, *Bacteriodes*), Proteobacterias y Actinobacterias (*Bifidobacterium*) (Donaldson *et al.*, 2016).

2.1.2. Beneficios de su Consumo

Entre los principales beneficios de la fibra dietaria, están la modulación del proceso digestivo normal, el desarrollo inmune, aumento de las defensas patogénicas y el desarrollo cerebral. Esto

generado por la microbiota a partir de la fermentación (Williams *et al.*, 2017) y en esta se hidrolizan los polisacáridos a monómeros por la acción de las enzimas de las bacterias en la microbiota del colon y estas a su vez producen diversos metabolitos. Son muy importantes en la fisiología humana, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como piruvato, acetato, propionato y butirato (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006).

El metabolismo de los AGCC comienza cuando son absorbidos por las células de la mucosa del colon, los colonocitos. El acetato puede inducir la apoptosis de células cancerígenas y prevenir el daño oxidativo (Williams *et al.*, 2017). Por su parte, se ha evidenciado que el propionato disminuye la síntesis hepática del colesterol, reduciendo sus concentraciones en sangre; además, participa en la gluconeogénesis (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006). Finalmente, el butirato es el principal metabolito que es fuente de energía de los colonocitos, por lo que ayuda en el mantenimiento de la mucosa y la integridad del epitelio intestinal (Manrique Vergara y González Sánchez, 2017). Influye para reducir la inflamación al inhibir la producción de algunas citocinas proinflamatorias, lo que conlleva a disminuir el riesgo de cáncer de colon (El-Salhy *et al.*, 2017).

2.1.3. Ingestión Diaria Recomendada

La Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda una ingestión de 25 gramos de fibra dietética al día. En México, aún cuando la importancia de su consumo se difunde, los adultos ingieren entre 16 y 18 g/d, una cantidad mucho menor a la recomendada, a pesar de la disponibilidad y accesibilidad de alimentos que son parte de la cultura alimentaria y que son altos en fibra (Secretaría de Salud, 2016).

Los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018-19, sobre la ingesta dietética de los mexicanos indican que más del 50% de la población en todos los subgrupos encuestados, consume cantidades excesivas de azúcares agregados y grasas saturadas, típicos componentes de los alimentos ultraprocesados más comunes (Shamah-Levy *et al.*, 2020). Además, esta población tiene nulo o muy bajo aporte de fibra, mucho menor a lo recomendado. Este patrón

alimentario es factor de riesgo en todos los grupos de edad, incluidos niños y adolescentes. Es factor para el desarrollo de obesidad y enfermedades crónicas no transmisibles como las cardiovasculares, diabetes tipo 2, dislipidemias e hipertensión, así como en el desarrollo de autoinmunidad (Malik y Hu, 2012; Brown *et al.*, 2011; Welsh *et al.*, 2011; Aguayo Patrón y Calderón de la Barca, 2017).

2.2. Producción de Alimentos e Impacto en la Ingestión de Fibra

El tipo de alimentación que hace referencia al México prehispánico, es un tema bien documentado por cronistas e historiadores como Bernal Díaz del Castillo y Fray Bernardino de Sahagún, quienes describen la diversidad de alimentos que se consumían. Estos eran maíz, chiles de diferentes especies, frutas y verduras, frijol, legumbres y granos; muchos con gran aporte de fibra. Además, también su forma de preparación y consumo, favorecía el contenido de fibra, ya sea crudos, asados o hervidos. Los antiguos mexicanos no acostumbraban a freír los alimentos, pues no disponían de aceites vegetales ni de mantecas animales (Red Nacional de Información Cultural, 2018).

No fue sino hasta la Revolución Industrial (siglo XVIII y XIX) que se caracterizó por sus transformaciones socioeconómicas, tecnológicas y culturales, que se dieron cambios sustanciales en la dieta (Deane, 1979). Por ejemplo, el descubrimiento de la máquina de vapor permitió la mecanización a gran escala de la producción de alimentos. Tal es el caso de la introducción de nuevos molinos al sector harinero, generando la transformación de los granos enteros a harinas refinadas (Heinrich y Reinhart, 2007). En este proceso, se separan componentes del cereal como el germen y salvado, que son fuentes importantes de fibra, vitaminas, minerales, ácidos grasos y compuestos bioactivos, quedando una harina blanca y de baja calidad nutricional. Esto, ocasionó un descenso importante en el consumo de fibra, en la población mundial (Cordain *et al.*, 2005; Cordain, 1999).

Así se fue modificando la dieta, al reemplazar los alimentos tradicionales por una diversidad de productos procesados (Glinsmann *et al.*, 1986). Estos son productos que han pasado por algún

tratamiento tecnológico, además de la adición de azúcares, sodio, aceites u otras sustancias (antioxidantes, conservadores), con la finalidad de mejorar sus cualidades sensoriales y como forma de preservación.

Muy importante en la evolución del consumo de fibra, es la última gran transición en la alimentación, con la entrada de los productos ultraprocesados los cuales están listos para comer, beber o calentar. Estos, han desplazado el consumo de alimentos naturales, en general más saludables (Monteiro *et al.*, 2016; Fardet, 2014; Aguayo Patrón y Calderón de la Barca, 2017).

Los productos ultraprocesados se caracterizan por ser bajos en fibra, proteínas, micronutrientes y altos en sodio, jarabes de fructosa, colorantes y edulcorantes; son energéticamente densos y contienen diversos aditivos. Su alta ingesta se asocia con obesidad y la prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas, al inducir un desequilibrio nutricional, además de la modificación en la microbiota intestinal. La población mas vulnerable ante los productos ultraprocesados, son los niños y adolescentes debido a la eficaz mercadotecnia y a las declaraciones de “saludables” (Fardet, 2018; Aguayo-Patrón y Calderón de la Barca, 2017).

2.3. Productos de Panificación Convencionales

2.3.1. Composición

El pan es un alimento antiguo consumido por el hombre desde épocas prehistóricas; surge de la cocción de una masa obtenida por la mezcla de harina de trigo, sal, agua y fermentación por levaduras (Arranz-Otaegui *et al.*, 2018). Para su elaboración, la harina se obtenía mediante una molienda rudimentaria, dando como resultado un pan obscuro integral y alto en fibra (Varela *et al.*, 1998). En la actualidad, las innovadoras técnicas industriales han introducido al mercado diversos tipos de pan ultrapocesados, aceptados por el consumidor, debido a sus cualidades organolépticas, dejando de lado el aporte nutricional (Monteiro *et al.*, 2013).

La composición nutricional del pan depende de diversos factores, como el tipo de cereal empleado para la obtención de harinas (Vilaplana Batalla, 2008). Dependiendo de la extracción para obtener la harina, se obtendrá un producto integral, en contraste con un producto de panadería blanco, con bajo aporte de fibra (Serna Saldívar, 2013). Otro factor importante, es la fortificación de las harinas con micronutrientes, como lo indica la NOM-247-SSA1-2008, que se pierden en el procesamiento tecnológico del pan. Por último, también influye en la composición, la adición de otros ingredientes para la preparación de variados productos de panadería (Varela *et al.*, 1998).

El principal componente del pan de harina de trigo, es el almidón, que representa 70-85% de su composición total; por lo tanto, proporciona la mayor fuente de energía. Contiene así mismo, 12-15% de proteínas. Como en otros cereales, la lisina es el aminoácido limitante, que puede compensarse si se consume junto con alimentos de origen animal o con leguminosas (Shewry y Hey, 2015). Además se le añade grasa vegetal o animal, lo que incrementa la densidad energética (Vilaplana Batalla, 2008). El pan, contiene también bajas proporciones de minerales (hierro, calcio, zinc, magnesio, selenio) y vitaminas (B1, B6, E, ácido fólico, niacina) (Shewry y Hey, 2015). Una diferencia importante entre el pan blanco y el integral, es el contenido de fibra, contribuyendo el segundo a la ingestión total de fibra, con los beneficios en la salud. Actualmente, hay productos de panificación con composición modificada, para mejorar su calidad nutricional (Scazzina *et al.*, 2013; Rannou *et al.*, 2018).

2.3.2. Efectos de su Ingestión

En el mundo, los productos de cereales son de los más consumidos (Scazzina *et al.*, 2013). En México, Flores *et al.* (2010), a partir de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006, identificaron tres patrones dietarios principales. El patrón de mayor ingesta fue el de alimentos refinados, dulces y productos de origen animal, el cual se asoció con sobrepeso u obesidad, dentro de este patrón se encuentran los productos de panadería. Resultados similares reportan Medina-Zacarías *et al.* (2020), en factores de riesgo asociados con sobrepeso y obesidad en adolescentes mexicanas.

Desde hace años, diversos estudios han evaluado el índice glicémico (IG) en productos a base de cereales. Holt y Miller (1994), observaron que cuanto mas refinada es la harina con la que se prepara un alimento, mayor es el área bajo la curva de glucosa y menor es el área bajo la curva de saciedad. Así, el procesamiento de cereales no solo es un determinante importante de la respuesta glucémica y de insulina, sino que también afecta los niveles de saciedad postprandial. González-Anton *et al.* (2015), compararon la respuesta a la ingestión de pan alto en fibra o pan blanco, en 30 adultos sanos. El consumo de pan alto en fibra aumentó la saciedad y mejoró la respuesta de algunas hormonas, en contraste con el pan blanco.

En el estudio de Aune *et al.* (2016), el riesgo relativo de padecer enfermedades cardiovasculares, coronarias y diabetes tipo 2, se asoció con el tipo de grano ingerido. Para pan integral y cereales de desayuno de grano entero, la asociación fue inversa (0.83 y 0.72); mientras que para pan blanco y cereales refinados el riesgo relativo fue de 1.07 y 1.15 (Aune *et al.*, 2016). Algo similar sucede con el riesgo relativo de padecer cáncer de colon, en donde una ingestión alta de fibra, en particular de cereales y productos integrales, se asoció con un menor riesgo de este cáncer (Aune *et al.*, 2011).

Respecto al efecto en la composición corporal, el consumo de granos refinados incrementa grasa corporal, respecto a la de quienes consumen granos integrales (Pol *et al.*, 2013). Resulta curioso que la dieta mediterránea, reconocida por sus beneficios a la salud, incluya pan. Por esto, Serra-Majem y Bautista-Castaño (2015) evaluaron patrones de alimentación, incluido el mediterráneo y encontraron que la menor ingestión de pan blanco, pero no del integral, se asocia con menores ganancias en peso y grasa abdominal. Los factores involucrados para explicar esto, son la densidad energética del producto, el índice glucémico, el contenido de fibra y su impacto en la microbiota intestinal. Así, el refinado deteriora el potencial de salud de los cereales, rompiendo la estructura del grano, lo que hace que el almidón se digiera y absorba más fácilmente, además de la pérdida de fibra dietaria (Fardet, 2018; Musa-Veloso *et al.*, 2018).

El consumo de los productos de panificación impacta la microbiota. Lappi *et al.* (2013), compararon la microbiota fecal, de personas que consumieron pan de trigo refinado o pan de centeno alto en fibra, detectando disminución de Bacteroidetes en el grupo con menor consumo de fibra. Este efecto también se ha modelado fermentando con heces, *in vitro*, masas de cebada entera

o refinada. Después de la digestión, la masa de cebada integral contenía más fibra, compuestos fenólicos y proteína; además después de la fermentación, fue mayor la abundancia relativa de *Bifidobacterium* (con efecto probiótico), que con la masa refinada (Gong *et al*, 2018). Morrison *et al.* (2020), compararon la transición de dieta estándar a una refinada carente de fibra, en modelo murino, afectando Bacteroidetes y aumentando Clostridia y Proteobacterias.

Así, el refinamiento de las harinas de cereales incrementa carga glicémica, reduce saciedad, aumenta el riesgo de enfermedades no transmisibles y puede afectar el peso y la grasa corporales. Es también el principal impulsor de las alteraciones de la microbiota intestinal, además de influir negativamente en la síntesis de metabolitos que participan en el metabolismo y en mecanismos inmunes.

2.3.3. Otras Opciones Ultraprocesadas como Fuentes de Fibra

En la actualidad el consumo de fibra es inadecuado y la presión sobre la industria de los alimentos es alta, por lo que se ha creado la fibra funcional. Así, productos adicionados con fibra “sintética” o aislada de otras fuentes, como en los cereales para desayuno, productos de panificación, lácteos y bebidas se han denominado “alimentos funcionales o prebióticos” (Zielinski y Rozema, 2013; Gousei *et al.*, 2019; Molina Montes y África Paz, 2007). La fibra funcional también se usa para suplementos en presentaciones en polvo o en cápsulas.

Los productos funcionales pueden parecer una opción para aumentar la ingestión de fibra, aunque no hay suficiente evidencia clínica que respalde los beneficios de su consumo para la salud, tal y como lo indica la definición de fibra dietaria (Chutkan *et al.*, 2012; Lambeau y McRorie, 2017).

Otro camino que ha tomado la industria de los alimentos, es sustituir parcialmente una harina refinada, como la de trigo, con harinas o granos integrales de otras fuentes. Por esta razón los productos ofertados en los supermercados, crean confusión en los consumidores, debido a que las etiquetas reportan mezclas de granos integrales entre otros ingredientes, lo que dificulta identificar las mejores opciones (Fontanelli *et al.*, 2020). Como parte de la mercadotecnia para atraer a los

consumidores, utilizan etiquetas como “fibra, alto en fibra, saludables”. Este tipo de propaganda se debe de regular mejor, ya que la industria está obliga a un etiquetado nutricional preciso y que cumpla con las normativas correspondientes (Zielinski y Rozema, 2013).

2.4. Productos de Panificación con Mezclas de Harinas

2.4.1. Tipos de Harinas y su Aporte de Fibra Dietaria

Los productos de panadería son parte del patrón alimentario, pero su calidad nutricia en general es deficiente, en particular si se considera que se consumen en gran cantidad, como lo es el pan de dulce. Una estrategia en la elaboración de pan, para aumentar sus cualidades, es sustituir parcialmente la harina de trigo por harinas con mejor perfil de aminoácidos, altas en fibra y compuestos bioactivos (Saleh, 2017). Tal es el diseño de panes a base de harinas no convencionales e ingredientes regionales, ya que son alternativas como vehículo de fuentes naturales de fibra y compuestos bioactivos (Zuleta *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2018). Las frutas, verduras y leguminosas, se pueden emplear como ingredientes una vez deshidratadas y pulverizadas (Ayala-Zavala *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2012). Sin embargo, es más fácil que la población se apegue a productos similares en aspecto y sabor, a los tradicionales.

Inglett *et al.* (2014), diseñaron galletas sustituyendo el 20% de harina de trigo por harina de chía y avena, la combinación de estos ingredientes aportó omega 3 y fibra (β -glucanos), con propiedades antiinflamatorias y asociadas a la prevención de enfermedades coronarias. Otra evaluación de galletas a base de frijol y lentejas demostró que se puede reemplazar parcial o completamente la harina de trigo refinada, ya que las características físicas de las galletas eran aceptables, además de mejorar su calidad nutricia por el aporte de fibra y proteínas (Zucco *et al.*, 2011).

Con la combinación de amaranto y quinoa, Alencar *et al.* (2015), elaboraron un pan, que al compararlo con el pan a base de harina de trigo, resultó con mayor contenido de proteínas. Esto,

debido a que el amaranto es rico en proteínas, con un perfil de aminoácidos y biodisponibilidad muy altos. Además, es una buena fuente de fibra y polifenoles (Sabbione *et al.*, 2018). Los productos elaborados con harina de amaranto también pueden ser una opción benéfica para los pacientes celíacos (Calderón de la Barca *et al.*, 2010).

El camote naranja, también se ha utilizado como harina para la elaboración de productos de panadería, debido a su aporte de betacarotenos, vitaminas y minerales, además de contribuir al color, sabor y poder edulcorante (Nogueira *et al.*, 2018). Igbabul *et al.* (2014), evaluaron la calidad de un pan elaborado a partir de harina de camote naranja (20%) y maíz amarillo (20%), con harina de trigo (60%). El resultado de la composición mostró el alto contenido de compuestos bioactivos, calcio, fibra y β -carotenos (precursor de la vitamina A). De manera que, el consumo de este tipo de pan mejoraría la salud, el crecimiento de los niños y el bienestar de los consumidores.

Dentro de un proyecto del grupo de trabajo en CIAD (Lab. de Proteínas, en el Depto. de Nutrición), se elaboró un pan sustituyendo parcialmente la harina de trigo y optimizando combinaciones, para obtener la mejor calidad. La mezcla óptima fue la que contenía 8.6% de la harina de camote naranja, 22.7% de la de amaranto y el resto (68.7%) fue harina de trigo (Mercado Gómez, 2019). El pan de caja resultante de esa combinación, en comparación con el de 100% harina de trigo, presentó mejor calidad proteica, más del doble de fibra dietaria y menor índice glicémico; contiene ácidos grasos insaturados, pro-vitamina A y otros antioxidantes. Su apariencia y textura fueron comparables a la del pan 100% harina de trigo, sin necesidad de aditivos para lograr esas características (Calderón de la Barca *et al.*, 2019).

2.4.2. Beneficios

Los productos de panadería preparados con harinas de leguminosas, chíá, quinoa, amaranto, camote naranja, no incrementan el índice glucémico después de su ingesta, lo que genera una respuesta de glucosa e insulina postprandial lenta y moderada, esto debido a su contenido de proteína y almidón resistente (Collar y Angioloni, 2014). Además, presentan alto contenido de compuestos bioactivos

(carotenoides, ácidos fenólicos, polifenoles), los cuales influyen en los mecanismos fisiológicos causando efectos benéficos en la salud. Por ejemplo, su alta actividad antioxidante reduce la tasa de muerte celular y, por lo tanto, se esperaría un efecto positivo en contra de las alteraciones celulares relacionadas con el envejecimiento, así como la prevención de algunas enfermedades (Saleh *et al.*, 2017; Herrera Chalé *et al.*, 2014).

Las deficiencias por vitaminas y minerales son problemas de salud pública, tal es el caso de la vitamina A. Debido a esto, Kidane *et al.* (2013), en Etiopía, diseñaron un pan enriquecido con 30% de harina de camote naranja, lo que contribuyó con 83 y 74% de los requerimientos diarios de vitamina A, en niños de 3 a 6 años. Esto puede sustituir el uso de suplementos comerciales.

Los beneficios de incorporar amaranto en la alimentación son diversos. Influye sobre la concentración de lípidos en sangre y en la glucosa postprandial. En un modelo murino, el grupo alimentado con pan de trigo presentó mayor concentración de LDL, en contraste con el grupo alimentado con un pan rico en amaranto, donde la concentración de HDL fue mayor. Esto es importante porque concentraciones bajas de LDL y altas en HDL, se relacionan con buen estado de salud cardiovascular que permite prevenir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Montero-Quintero *et al.*, 2015).

Gullón *et al.* (2016), evaluaron el potencial prebiótico de amaranto y quinoa. Estos se usaron como fuentes de carbono para microbiota en heces fecales. El potencial prebiótico se confirmó por los notables cambios en las poblaciones bacterianas (proliferación de *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus*) y el aumento de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato). La misma evaluación se realizó en camote y avena con resultados semejantes en bacterias y síntesis de metabolitos. El camote redujo la concentración de Firmicutes a Bacteroidetes, lo cual puede indicar efectos benéficos. Además, la avena es una fuente de polifenoles que puede contribuir a la modulación positiva de la microbiota intestinal (Liu *et al.*, 2020; Kristek *et al.*, 2019).

Otros compuestos con potencial prebiótico son los subproductos de partes de frutas y verduras (cáscaras, semillas, bagazos), que se componen por una variedad de fibras, adecuados para el consumo. Por ejemplo, el bagazo de naranja y la cáscara de maracuyá durante el periodo de

fermentación estimularon géneros bacterianos como *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Roseburia* y *Bacteroides*, lo que a su vez, reflejó mayores cantidades de ácidos grasos de cadena corta (Bussolo de Souza *et al.*, 2019). Hernández-Maldonado *et al.* (2019), sometieron a fermentación una barra de mango alta en fibra y compuestos fenólicos, que promovió la síntesis de ácidos grasos de cadena corta, además de la alta biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, al igual que el producto de mango evaluado por Herrera-Cázares *et al.* (2019). Productos elaborados con ingredientes de diferente naturaleza, son medios prometedores de salud y sostenibles para aumentar el consumo de fibra y compuestos bioactivos.

En otro estudio compararon la síntesis de ácidos grasos de cadena corta y ácidos fenólicos a partir de un pan alto en fibra (β -glucano) adicionado con té negro, al compararlo con el control (pan blanco), el pan adicionado produjo mayor concentración de propionato y polifenoles, componentes importantes que participan en la conformación de la microbiota y a su vez en la integridad del epitelio (Mhd Jalil *et al.*, 2019).

2.5. Métodos para Evaluar Efecto de la Fibra Dietaria

La fermentación y el potencial prebiótico de las fibras se puede probar por diversos métodos, uno de ellos es el modelo computarizado *in vitro* del colon proximal (TIM-2). Este modelo dinámico, simula las condiciones del colon como temperatura, pH, ambiente anaeróbico y movimientos peristálticos. El modelo consta de unidades de vidrio con una pared flexible en el interior, además de un sistema de entrada para la administración del producto y HCl, enzimas y bilis, para simular las condiciones gastrointestinales. Al comienzo de cada experimento, el modelo se inocula con la muestra fecal (Rehman *et al.*, 2012).

Rehman *et al.* (2012), en el modelo antes descrito (TIM-2), evaluaron la interacción de un fármaco junto con un probiótico. Para analizar la composición de la microbiota utilizaron un “chip intestinal” (I-Chip), el cual es un microarreglo de ADN que contiene secuencias de aproximadamente 400 microorganismos. Este análisis indicó los géneros bacterianos que son

estimulados o suprimidos por el antibiótico y/o probiótico. Las concentraciones de metabolitos fueron evaluadas por cromatografía de gases. En el mismo modelo, Bussolo de Souza *et al.* (2019), fermentaron fibra proveniente de subproductos de frutas. Tomaron muestras, aislaron ADN genómico y amplificaron por PCR el gen 16S rRNA para la composición microbiana, y mediante cromatografía de exclusión iónica, cuantificaron metabolitos.

En un sistema mucho más sencillo y replicable en cualquier laboratorio, Hernández-Maldonado *et al.* (2019), evaluaron digestión y fermentación de fibra de mango. El producto liofilizado se sometió a digestión enzimática (pepsina, pancreatina, amilasa) por un tiempo determinado. Después de centrifugar, la fracción no digerible se dializó para remover moléculas pequeñas, simulando parcialmente el proceso de absorción *in vivo*. Esta fracción se fermentó en presencia de materia fecal de donantes, en una cámara anaeróbica por 48 horas. Las concentraciones de ácidos grasos se detectaron por cromatografía de gases y por HPLC-DAD-MS los compuestos fenólicos.

Por su parte, Herrera-Cázares *et al.* (2019), llevaron a cabo una digestión *in vitro/ex vivo* de productos de mango. Para la fase oral, los voluntarios masticaron la muestra, el bolo alimenticio se recogió para seguir con la fase gástrica con HCl y pepsina. Se preparó una solución (bilis bovina, pancreatina, tampón Krebs-Ringer) para simular la fase intestinal, además de incubar con una parte del yeyuno proximal, extraído de ratas Wistar. Después, se recuperó por centrifugación el residuo no digerido, para su fermentación en presencia de muestras fecales homogenizadas obtenidas de donantes sanos. Para esto, el inóculo fecal se mezcló con medio de cultivo basal estéril y se fermentó en un baño de agua a 37°C durante 24 h. Los productos de fermentación se centrifugaron y se cuantificaron metabolitos en los sobrenadantes, por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y metabolómica no dirigida.

3. HIPÓTESIS

La fermentación por la microbiota fecal, después de digestión gastrointestinal *in vitro*, de una mezcla de harinas de trigo, amaranto y camote naranja en proporciones óptimas para panificación (68.7, 22.7 y 8.6%, respectivamente), con alto contenido de fibra dietaria y compuestos bioactivos, promueve la proliferación de bacterias benéficas y sus metabolitos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar *in vitro*, después de digestión gastrointestinal, el efecto de una mezcla de harinas de trigo, amaranto y camote naranja, en proporciones óptimas de panificación, sobre la microbiota intestinal y sus metabolitos.

4.2. Objetivos Particulares

Invitar participantes saludables, hacerles evaluación dietaria y de acuerdo a su patrón alimentario, ya sea saludable o ultraprocesado, conformar dos grupos. Solicitarles muestra de heces fecales.

Preparar y analizar las harinas de camote y amaranto, hacer la mezcla con la de trigo. Hacer digestión gastrointestinal *in vitro* de harina compuesta y harina de trigo. El residuo, conteniendo la fibra, fermentarlo *in vitro*, con heces por patrón dietario.

Evaluar composición de la microbiota en cuanto a generos: *Prevotella*, *Bacteroides* y *Ruminococcus bromii*, así como los metabolitos producidos; comparar entre grupos por patrón dietario donantes de las heces, a las 12 y 24 h de fermentación.

5. PARTICIPANTES Y MÉTODOS

5.1. Diseño y Selección de Participantes

Se realizó un estudio experimental con participantes de ambos sexos, sin enfermedades crónicas, ni dolencia obvia, entre 23 y 35 años de edad. Se incluyeron aquellos que aceptaron participar por medio del consentimiento informado y que no tuvieron tratamientos con antibióticos y/o suplementos (vitaminas) en el mes previo al muestreo. A cada participante se le solicitó dos muestras de heces fecales, una para confirmar la correspondencia con el patrón dietario y otra para la fermentación *in vitro*. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CEI/003-1/2021).

5.2. Evaluación Dietética

Debido a la contingencia por COVID-19, y buscando tomar las medidas de seguridad necesarias para minimizar riesgo de contagio, la evaluación de consumo de alimentos y bebidas se realizó por videollamada. Se realizaron tres recordatorios de 24 h no consecutivos, considerando un día de fin de semana. Se utilizaron modelos de medidas caseras usuales para estimar las porciones consumidas. La información obtenida se analizó con el método desarrollado por Ortega Vélez *et al.* (1999), para obtener proporciones de energía por el consumo de hidratos de carbonos, proteína, grasa total y saturada. Además los resultados de la evaluación dietética, se incluyeron en el análisis de componentes principales para identificar patrones de alimentos (Aguayo Patrón, 2017). Así mismo, se analizó por PCR tiempo real, la proporción de *Bacteroides* respecto a bacterias totales en sus heces, como se describe más adelante en el apartado 10.1. Esto, para verificar su correspondencia a los patrones dietarios saludable y ultraprocesado.

5.3. Preparación de Harina Compuesta

La harina de trigo (HT) y el amaranto reventado se obtuvieron de marcas comerciales de uso común. El camote naranja se adquirió de un súper mercado local. El amaranto reventado se molió en una licuadora convencional (Oster clásica, mod. 450-10) y se tamizó para tener un tamaño de partícula de 80 mesh en un tamizador de harinas (mod. DT168, Advantech Manufacturing, New Berlin, Wisconsin).

El camote naranja previamente lavado y pelado, se cortó en cubos para someterlos a blanqueamiento, que consistió en sumergirlos en agua caliente a 100 °C durante 1 min, después se sumergieron en hielo durante 30 s (Ruttarattanamongkol *et al.*, 2016). Se retiró el exceso de agua, se congeló y se liofilizó. Una vez deshidratados, se molieron y tamizaron de la misma forma que el amaranto reventado. Se prepararon 50 g de harina compuesta (HC) en las proporciones óptimas para panificación, trigo: 68.7%, amaranto: 22.7% y camote 8.6%.

5.4. Análisis de Harinas

A cada una de las harinas se le analizó el contenido de proteína (método 46-30B, AACC 2000), grasa (método 02-01.02, AACC 2000), cenizas (método 923.03, AOAC 1999) y fibra (Fibra dietaria total, juego de reactivos comercial K-TDFR-200A, Megazyme).

5.5. Digestión Gastrointestinal *in vitro* de Harinas

Se utilizó una harina compuesta por trigo, amaranto y camote naranja (en proporciones 68.7, 22.7 y 8.6%). Los reactivos de laboratorio fueron grado analítico de Sigma-Aldrich. La digestión de la harina de trigo (HT) y de la harina compuesta (HC), se realizó por fases. Se pesaron 4 g de cada

tipo de harina y se homogenizaron en 16 mL de agua por duplicado y se tomó una alícuota (1.5 mL) de cada harina homogenizada sin digerir.

Primeramente, la hidrólisis en fase gástrica se llevó a cabo con pepsina (0.28 mL de 300 mg/mL en KCl/HCl 0.2 M buffer, pH 1, por 1 h a 37 °C). La fase intestinal se simuló con una solución de pancreatina (1.4 mL de 5 mg/mL en PBS s/azida 0.1 M, pH 6.9, por 6 h a 37 °C) y amilasa pancreática (1.4 mL de 120 mg/mL en buffer tris-maleate, por 16 h a 37 °C). Después de las fases de digestión, las muestras fueron centrifugadas (15 min, 25 °C, 4000 rpm). Los precipitados se almacenaron a -20 °C para posterior fermentación. Una alícuota (500 µL) de cada sobrenadante, se analizó en comparación a su fuente como harinas HT y HC en suspensión, para evaluar el efecto de proteasas y amilasas, sobre el grado de hidrólisis proteica (como porcentaje) y de almidón (como concentración de glucosa).

Para simular la absorción y eliminar los productos de digestión de baja masa molecular, el sobrenadante se transfirió a tubos de diálisis con tamaño de poro de 12000 Da contra NaCl 0.01 M, y se dializó durante 48 h. Las fracciones no digeribles de cada tratamiento (FxHT y FxHC) se colectaron y sumaron a los precipitados antes obtenidos y congelaron a -70 °C para posteriormente usarlos como sustrato de fermentación (Camelo-Méndez *et al.*, 2018; Hernández-Maldonado *et al.*, 2019).

A los precipitados completos se les denominó residuos fibrosos y se les cuantificó humedad (método 44-15A, AACC 2000), fenoles totales, flavonoides (método Folin-Ciocalteu, Singleton y Rossi, 1965) y nitrógeno (Sweeney, 1989).

5.6. Fermentación *in vitro*

La fermentación *in vitro* se realizó en presencia de muestras fecales homogenizadas por grupo de patrón alimentario, que se incubó en medio anaeróbico. Brevemente, se preparó el medio de cultivo basal estéril que contenía (g/L): 2 mL agua de peptona, 2 g extracto de levadura, 0.1 NaCl, 0.04

K₂HPO₄, 0.04 KH₂PO₄, 0.01 MgSO₄ 7 H₂O, 0.01 CaCl₂ 2 H₂O, 2 Na HCO₃, 0.5 cisteína HCL, 0.5 sales biliares, 2 mL Tween 80, 0.2 g hematina (diluida en 5 mL NaOH). Cada tubo con 9 mL de medio de cultivo se mantuvo en condiciones anaeróbicas a 37 °C por 24 h.

La suspensión fecal se preparó con 3 g de muestra fecal homogenizada por patrón alimentario en 18 mL de buffer de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7. Los tubos que contenían el medio de cultivo basal estéril (9 mL) se inocularon con 1 mL de cada suspensión fecal y se añadieron 100 mg de las fracciones no digeribles FxHT y FxHC (residuos fibrosos) obtenidas de la digestión previa. Las fermentaciones se realizaron por duplicado. Se hicieron 12 cultivos, que fueron duplicados de 1: homogenado de heces de patrón saludable con: a) FxHT y b) FxHC; de 2: homogenado de heces de patrón ultraprocesado con: c) FxHT y d) FxHC; además de los blancos sin heces (6 cultivos), para cada fracción: e) FxHT y f) FxHC. Se tomaron alícuotas a las 0, 12 y 24 h y se congelaron a -70 °C, para el análisis de microbiota y aminoácidos fisiológicos (Campos-Vega *et al.*, 2009; Hernández-Maldonado *et al.*, 2019).

5.7. Análisis de Microbiota Fecal y Metabolitos

La evaluación de la microbiota se realizó mediante el protocolo de curva estándar en un sistema StepOnePlus Real-Time PCR. De las muestras de heces fecales de los participantes de ambos grupos, se extrajo el ADN, mediante el juego de reactivos comercial QuiAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (QUIAGEN, Hilden Germany). Se midió la cantidad de ADN extraído en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Pittsburgh, USA) y su calidad, por la relación de absorbancia 280/260. Se analizó *Bacteroides* para verificar su correspondencia con el patrón dietario. Antes y después de someter la mezcla de harinas a fermentación *in vitro*, en presencia de las muestras fecales, se extrajo el ADN de una alícuota de medio inoculado utilizando el DNA Mini Kit (QUIAGEN, Hilden Germany), para diluir seriadamente 1:10. Se preparó ADN, comenzando con 100 ng/μL. Los iniciadores específicos que se utilizaron para bacterias totales, *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus bromii* se presentan en el Cuadro 1.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) se utilizaron 10 µL de SYBR Green Supermix, 5 µM de cada iniciador, 1 µL de muestra de ADN (10 ng) y H₂O mili-Q para un volumen final de 20 µL. Las condiciones de amplificación para bacterias totales fueron de 50 °C por 2 min y 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. Para la amplificación de las bacterias mencionadas las condiciones fueron 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. Las reacciones de la curva estándar se realizaron por triplicado y las reacciones de las muestras por duplicado.

Cuadro 1. Iniciadores de secuencias específicas para bacterias del estudio.

Bacteria	Secuencia del iniciador	Referencia
<i>Bacteroides</i>	F- AAGGTCCCCCACTTGG	Manz <i>et al.</i> , 1996
	R- GAGCCGCAAACCTTTCACAA	Franks <i>et al.</i> , 1998
<i>Prevotella</i>	F- CACRGTAACGATGGATGCC	Matsuki <i>et al.</i> , 2002
	R- GGTCGGGTTGCAGACC	
<i>Ruminococcus bromii</i>	F5'- GGTCTTGACATCCAACTAACGAAGT -3' R5'- TTTTGTCAACGGCAGTCCTAT -3'	Mondot <i>et al.</i> , 2011
Bacterias totales	HDA-1 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT HDA-2 GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	Walter <i>et al.</i> , 2000

Para analizar metabolitos con grupos amino, incluyendo aminoácidos, las muestras se desproteinizaron: primero, se tomó 1 mL de cada alícuota y se mezcló con 1 mL de ácido tricloroacético al 24%, se dejó reposar por 10 min y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, se colectó el sobrenadante (Barrett *et al.*, 2012). Las muestras se derivatizaron con o-ftalaldehído (OPA). Se utilizaron estándares internos para detectar tiempos de retención de aminoácidos. Se inyectaron 20 µL de la muestra en un cromatógrafo de líquidos Thermo Scientific Ultimate 3000. Como fase móvil se utilizó gradiente de acetato de sodio 0.1 M pH 7.2 y metanol (9:1) y se empleó una columna C18 (100 x 4.6 mm x ¼ "Microsorb 100-3 C18). La detección de fluorescencia se realizó usando longitud de onda de excitación-emisión de 340 y 450 nm, respectivamente. Para la integración de los aminoácidos se utilizó el programa Varian versión 5.51, y se calculó la relación entre las áreas cromatográficas para cada muestra (Vázquez Ortiz *et al.*, 1995).

5.8. Análisis de Datos

Se realizaron pruebas de t para muestras independientes, para contrastar la ingestión de energía y nutrientes, así como la microbiota fecal entre patrón dietario. El análisis de sobrenadantes de digestión *in vitro* se realizó con la misma prueba. Las diferencias en las poblaciones bacterianas y concentraciones de metabolitos entre las muestras fermentadas se evaluaron mediante un ANOVA unidireccional y la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Las diferencias se establecieron a un 95% de confianza. Se utilizó el paquete estadístico NCSS 2019.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Participantes y Evaluación Dietética

Se reclutaron 10 participantes (6 del sexo femenino y 4 del masculino) originarios del estado de Sonora, con edad promedio de 25.9 ± 1.37 e IMC normal (23.8 ± 3.28), sin comorbilidades. De la población de estudio, 6 participantes se clasificaron en el patrón alimentario “ultraprocesado”, caracterizado por el elevado consumo diversos grupos de alimentos como, aceites y grasas, bebidas (azucaradas, carbonatadas, alcohólicas), embutidos, galletas y repostería, trigo y derivados, botanas, salsas procesadas, azúcares y golosinas. El segundo patrón alimentario denominado “saludable”, se asocia con el consumo de frutas, verduras, leguminosas, pollo, res, pescado, huevo, maíz, avena, papa y lácteos, dentro del cual se asignaron 4 participantes.

A pesar del limitado número de participantes, la tendencia de una dieta inclinada hacia los productos ultraprocesados es clara. A nivel mundial, la producción y venta de este tipo de productos ha aumentado ofreciendo amplia variedad y comodidad por su diseño, para su consumo inmediato. Están disponibles en todo tipo de comercios, por lo que pueden adquirirse con facilidad. Otro de sus atractivos es que son fáciles de almacenar, transportar y pueden consumirse en cualquier lugar. Es así, como la alimentación saludable ha sido desplazada por el auge de esta desenfrenada producción de ultraprocesados (Rapallo y Rivera, 2019; OPS, 2015).

Al comparar el consumo de energía y macronutrientes entre los dos grupos de patrón alimentario, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Los participantes del patrón alimentario ultraprocesado ($n=6$) presentaron un consumo promedio de 2300 ± 585.7 kcal, mientras que los del patrón alimentario saludable ($n=4$), consumieron 1868 ± 239.2 kcal, diariamente. Ambos grupos consumen las recomendaciones diarias tanto de nutrientes como de energía (Cuadro 2).

En el Cuadro 2 se muestra una variabilidad muy alta particularmente en el consumo de grasas totales, saturadas y sodio en los participantes con patrón ultraprocesado. Esto porque 2 de los 6 participantes de este patrón, tuvieron elevados consumos de grasas y uno de sodio, respecto a los

demás. Así mismo, dicha variabilidad y un tamaño de muestra tan pequeño, no dejó margen para diferencias significativas. Sin embargo, las principales diferencias podrían encontrarse en el análisis de microbiota, ya que las encuestas dietarias solo proporcionan un aproximado de la dieta habitual. Además, debido a la limitación de la base de datos empleada para el análisis dietario, no se consideraron aditivos, azúcares libres, compuestos bioactivos y fibra, componentes que influyen en la composición de la microbiota intestinal (Fardet 2018; Aguayo-Patrón y Calderón de la Barca, 2017).

Cuadro 2. Comparación de ingestión de energía y nutrientes entre patrones alimentarios.

	Patrón ultraprocesado n=6	Patrón saludable n=4	Valor de <i>p</i>
Energía	2300 ± 585.7	1868 ± 239.2	0.2060
Proteína (g)	100.7 ± 32.1	88.2 ± 11.08	0.4819
Carbohidratos (g)	248.6 ± 54.6	206.2 ± 85.4	0.3616
Grasas totales (g)	105.9 ± 34.5	80.4 ± 12.8	0.2021
Grasa saturada (g)	34.5 ± 12.4	28.9 ± 5.9	0.4381
Sodio (mg)	3658.7 ± 1968.7	3086 ± 237.05	0.5923

Prueba de *t* para muestras independientes, *valores de *p*<0.05 se consideran significativos

Para verificar la primera clasificación de los participantes por patrón dietario, se cuantificó la acumulación de *Bacteroides*. Como se ha mencionado, los componentes de la dieta influyen en la abundancia de las bacterias en la microbiota intestinal, por ejemplo, una dieta basada en proteínas, alto contenido de grasas, azúcares libres y baja en fibra, aumenta la proporción de *Bacteroides* (Lawrence *et al.*, 2014; Nakayama *et al.*, 2017). Así, tres participantes cambiaron de patrón dietario, quedando 5 en el patrón saludable y 5 en el patrón ultraprocesado. Para esta separación se tomó en cuenta la acumulación de *Bacteriodes*; cuando fue menor a 30%, los participantes se clasificaron dentro el patrón saludable, y cuando fue mayor, se relacionaron con el patrón ultraprocesado. Además, se analizaron de nuevo las encuestas dietarias, tomando en cuenta fuentes de fibra y cantidad de alimentos ultraprocesados consumidos por día promedio.

6.2. Composición de la Microbiota por Patrón Dietario

La cuantificación de la proporción de las bacterias se realizó por qPCR en tiempo real mediante curva estándar. En el Cuadro 3, se muestra la abundancia de *Bacteroides spp*, *Ruminococcus bromii* y *Prevotella spp* en la microbiota fecal de los participantes, separados por patrón alimentario, antes de la fermentación *in vitro*. Al comparar la proporción de *Bacteroides* entre patrón dietario saludable y ultraprocesado, se encontró que los participantes del patrón ultraprocesado tuvieron mayor abundancia ($p<0.05$), que los del patrón saludable, resultado esperado debido al tipo de alimentación. Como se ha mencionado anteriormente la abundancia de esta bacteria se asocia con alto consumo de azúcares, grasas, proteína de origen animal, sodio y aditivos (Nakayama *et al.*, 2017).

Por su parte, *Prevotella* predominó significativamente ($p<0.05$) en la microbiota de los participantes del patrón saludable. En el caso de *Ruminococcus bromii* su proporción fue baja en ambos patrones dietarios, comparada con la acumulación de *Bacteroides* y *Prevotella*, lo que pudiera deberse a que *Ruminococcus spp* no es abundante en la microbiota de la región del estudio (Calderón de la Barca *et al.*, 2020). Se seleccionó *Ruminococcus* porque es un género bacteriano que desempeña un papel importante en la degradación de almidones resistentes (Ze *et al.*, 2012; Teichmann y Cockburn, 2021). Además, *Rumminococcus* es un género correspondiente al grupo taxonómico Firmicutes, mientras que *Bacteroides* y *Prevotella*, son Bacteroidetes, no se encontró diferencia significativa en la abundancia de *R. bromii* ($p<0.05$) en las heces de la dieta saludable en comparación con la ultra-procesada, porque las fuentes de fibra provenían de harinas con poco pero similar concentración de almidón resistente. Así mismo, la abundancia de *Prevotella*, se asocia con el consumo de fibra proveniente de frutas, verduras, legumbres y granos mínimamente procesados (Christensen *et al.*, 2019). En este trabajo de tesis, queda claro el efecto de la dieta saludable y su composición, sobre la acumulación de *Prevotella spp*.

Cuadro 3. Microbiota fecal de acuerdo a patrón dietario saludable o ultraprocesado.

Patrón dietario	<i>Bacteroides</i> %	<i>Rumunococcus bromii</i> %	<i>Prevotella</i> %
Saludable	10.75 ± 0.87*	6.91 ± 0.56	19.65 ± 1.41*
Ultraprocesado	23.4 ± 1.18	6.15 ± 0.92	5.31 ± 1.70

Prueba t para muestras independientes, * $p < 0.05$ se consideran significativos, por columna.

6.3. Composición de las Harinas

La composición de cada una de las harinas se muestra en la Cuadro 4. Comparando entre cada tipo de harina, empezando por la harina de trigo, principal componente de la panadería tradicional, aporta el 12% de proteína, la cual no es de alto valor biológico, y debido a su alto grado de refinamiento su aporte de fibra es bajo (3%) (Shewry y Hey, 2015), mientras que el amaranto aporta 18% de proteína y tiene mejor calidad nutricia por su perfil de aminoácidos, además de aportar minerales como zinc y hierro (Ávila Curiel *et al.*, 2018). Además, el aporte de grasas se debe principalmente a ácidos grasos insaturados. Otra característica importante es su contenido de fibra (15%) en comparación al 3% del trigo. Por su parte, el camote naranja es una fuente principal de compuestos bioactivos y carbohidratos, que contribuyen al sabor, poder edulcorante y a su aspecto (Nogueira *et al.*, 2018). Dentro del porcentaje de minerales (3%) que lo conforman, los principales son calcio, fósforo, hierro y magnesio (Koua *et al.*, 2018).

Cuadro 4. Composición de las harinas (% base húmeda).

Harina	Proteína	Grasa	Cenizas	Carbohidratos	Fibra*
Trigo	11.58 ± 0.03	1.5 ± 0.09	0.76 ± 0.01	77.18	2.94 ± 0.09
Amaranto	17.94 ± 0.02	7.35 ± 0.17	2.85 ± 0.01	68.24	15.73 ± 0.1
Camote	3.68 ± 0.08	0.26 ± 0.01	3.52 ± 0.02	83.46	2.99 ± 0.1

*Es una fracción de los carbohidratos.

Otros compuestos importantes que son parte de las harinas para panadería en estudio son los compuestos bioactivos como, polifenoles como fenoles y flavonoides. El contenido de fenoles totales en la harina de amaranto es de 44.5 y en la del camote es 235 mg AG/100 g. Además, ambas harinas tienen muy buena capacidad antioxidante, de 119.7 y 235.3 mg ET/100 g, analizado por capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC), respectivamente. Por su parte, la harina de camote naranja, como la usada en este estudio, presenta 14,692 µg/100 g de b-carotenos (Mercado Gómez, 2019).

6.4. Análisis del Proceso de Digestión Gastrointestinal *in vitro*

Como resultado de la digestión de cada tipo de harina (de trigo o compuesta), se obtuvieron dos fracciones, un sobrenadante conteniendo los productos digeridos y un precipitado formado de residuos fibrosos. El sobrenadante se analizó para evaluar el efecto de las enzimas digestivas, mientras que en el precipitado fibroso se evaluaron polifenoles y nitrógeno.

En el Cuadro 5 se muestra la evaluación del efecto de la digestión enzimática comparando entre las harinas sin digerir con los sobrenadantes de las harinas digeridas. En cuanto al grado de hidrólisis de proteína de la harina de trigo, aumentó de 1.45 a 33%, debido a la acción de las enzimas. Además, inicialmente ya había glucosa libre 80 µg/100 µL en la harina de trigo, que aumentó a 136.5 µg/100 µL por la hidrólisis del almidón.

En el caso de la harina compuesta la proteína no aumentó tras la digestión, esto porque la proteína del amaranto es soluble en soluciones acuosas y ya estaba presente cuando se mezcló con agua, por lo que solo se liberó 10% más de la estructura del grano. El grado de hidrólisis proteica inicial fue de 10.5% debido a que tanto el camote como el amaranto se sometieron a procesamiento térmico, pero aún así aumentó a 40.6% por la actividad enzimática. La concentración de glucosa también aumentó un 7%, porque la mayor parte ya estaba libre debido al previo tratamiento térmico del camote. Con estos resultados, se cumplió con el objetivo de la digestión *in vitro*, y solo la fracción no digerida conteniendo la fibra no digestible, se usó para fermentar en la siguiente etapa.

Cuadro 5. Análisis de sobrenadantes de digestión *in vitro*.

Harina	Proteína (mg/mL)	Grado de hidrólisis proteica (%)	Concentración de glucosa (µg/100 µL)
Trigo s/digerir	4.28 ± 0.12*	1.5 ± 0.1*	80.0 ± 0.46*
Trigo digerida	15.37 ± 0.36	32.9 ± 1.6	136.5 ± 2.68
Compuesta s/digerir	13.19 ± 0.5	10.5 ± 1.0*	150.3 ± 3.35*
Compuesta digerida	14.52 ± 0.5	40.6 ± 0.8	160.9 ± 0.67

Prueba de *t* para muestras independientes, *valores $p < 0.05$ se consideran significativos.

En cuanto a la composición de las fracciones no digeridas que contenían el residuo fibroso, se les analizaron fenoles totales y flavonoides, así como nitrógeno. Los polifenoles se pueden liberar de la matriz alimentaria y hacerse bioaccesibles; Sin embargo, la cantidad absorbida por el intestino delgado es muy reducida. Por eso llegan al colon tanto los polifenoles liberados como los que permanecen unidos a la fibra dietaria, en donde la microbiota intestinal, los fermenta en mayor o menor grado. Por eso, tienen gran influencia en la proliferación de algunos géneros y especies microbianas, y por tanto en la producción de metabolitos benéficos para el hospedero (Hernández-Maldonado *et al.*, 2019).

En el Cuadro 6 se muestran los resultados del análisis de fenoles, flavonoides y nitrógeno en las fracciones no digeribles de la harina de trigo y harina compuesta. Tras la digestión, los fenoles totales se concentraron al menos 10 veces, pasando de 25 mg/100 g en la harina de trigo, a 270 mg/100 g en el residuo fibroso que se fermentó. Debido a la naturaleza de los ingredientes en la harina compuesta como el amaranto y el camote naranja, aporta 33% más de fenoles y 7% de flavonoides, comparado con la harina de trigo. Además, las fracciones no digeribles de ambos tipos de harina contenían un 0.5% de nitrógeno, que pudiera provenir de proteínas complejas que se quedaron atrapadas en la fibra o de restos de compuestos amoniacales. En caso de que fueran proteínas, constituirían un 3.4% de la muestra de ensayo y trazas de compuestos activos; por tanto, más del 95% del residuo analizado, era fibra.

Cuadro 6. Contenido de fenoles, flavonoides y nitrógeno en residuo fibroso proveniente de harina de trigo y harina compuesta (peso seco).

Tipo de harina	Fenoles (mg AG*/100 g)	Flavonoides (mg Q**/100 g)	Nitrógeno (%)
Fx de Harina de Trigo	270	69	0.455
Fx de Harina Compuesta	359	74	0.542

* mg de ácido gálico (determinado en base a una curva estándar de ácido gálico).

** mg de quercetina (determinado en base a una curva estándar de quercetina).

6.5. Extracción de ADN Genómico en Heces

Se determinó la cantidad y calidad de ADN de las muestras fecales de los participantes (Cuadro 7). En 8 muestras la concentración de ADN extraído fue mayor a 30 ng/μL, cantidad suficiente para los estudios de microbiota. Además, la relación de absorbancia 260/280 de dichas 8 muestras indica pureza óptima, debido a que se encuentran dentro del rango (1.8-2). De las muestras 6 y 8 se obtuvo menor concentración de ADN, así como absorbancias fuera del rango, lo que indica posible contaminación por proteínas. Sin embargo, al cargarlas a la PCR, no hubo problema en su análisis mediante qPCR, por lo que no se repitió la extracción de ADN.

Cuadro 7. Concentración de ADNg en heces

Muestra	Concentración ng/μL	260/280
1	32.75	2.26
2	31.95	2.50
3	31.15	2.19
4	41.45	2.23
5	59.8	1.93
6	16.25	3.70
7	80.65	2.18
8	21.55	3.27
9	51.8	2.02
10	54.5	2.03

6.6. Microbiota Intestinal después de Fermentación *in vitro*

Los cambios cuantitativos en las poblaciones de bacterias fecales por patrón alimentario, derivados de la fermentación *in vitro* con residuo fibroso HT o HC en el tiempo 12 y 24 h, se presentan en la Figura 1. El panel A corresponde a los cambios influenciados por el residuo fibroso HT y el panel B por el residuo fibroso de HC. En los cultivos adicinados con HT (A), empezando por la abundancia de *Bacteroides*, fue similar en el patrón saludable a las 12 y 24 h; Mientras que en el patrón ultraprocesado, se redujo significativamente ($p<0.05$) en el mismo periodo. En ninguno de los dos patrones dietarios, se presentaron cambios en este género respecto a la proporción antes de la fermentación (Cuadro 3). El residuo fibroso HT no tuvo efecto en la acumulación de *Ruminococcus bromii* durante la fermentación, en donde no se observaron diferencias en ninguno de los dos patrones dietarios. En cambio, la acumulación de *Prevotella* fue significativamente menor ($p<0.05$) en el patrón ultraprocesado que en el saludable. Además, disminuyó significativamente ($p<0.05$) entre las 12 y 24 h de fermentación, en el patrón saludable.

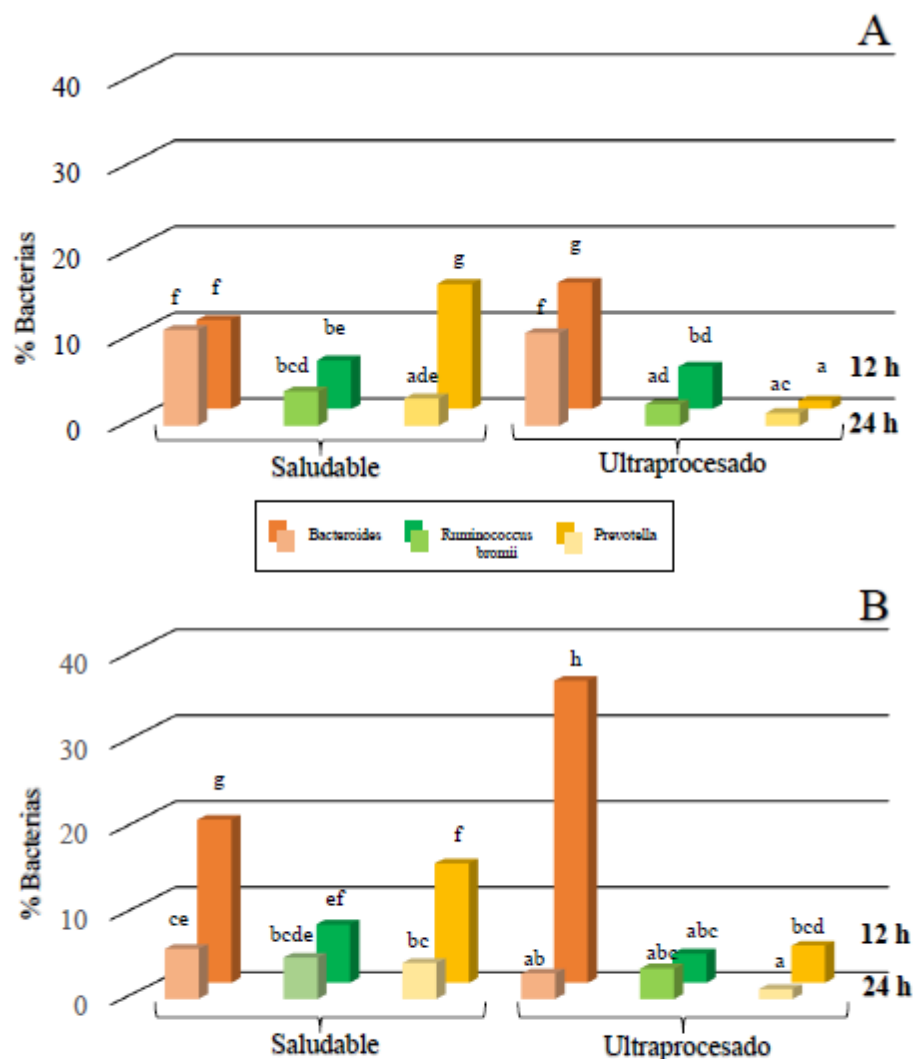


Figura 1. Abundancia relativa de *Bacteroides*, *Ruminococcus bromii* y *Prevotella* en heces de acuerdo a patrón dietario y residuo fibroso. Panel A: harina de trigo (HT), Panel B: harina compuesta (HC) . Prueba Tukey-Kramer. Diferencias por panel, $p < 0.05$, indicada por literales diferentes.

La acción del residuo fibroso HC (panel B) sobre las bacterias en las heces de ambos patrones dietarios, mostró mucha variabilidad. La acumulación de *Bacteroides* fue muy alta a las 12 h de fermentación en ambos patrones, de hecho, hubo aumento significativo ($p < 0.05$) de un 50% respecto a la acumulación antes de la fermentación. En ambos casos, la disminución entre las 12 y 24 h, fue significativa ($p < 0.05$), reduciéndose hasta 5 y 7%. *Ruminococcus bromii*, permaneció casi igual en ambos patrones dietarios, entre las 12 y las 24 h, con acumulación ligeramente menor en el patrón ultraprocesado que en el saludable, pero sin ser significativa. La acumulación de

Prevotella, que ya era significativamente menor ($p<0.05$) en heces del patrón ultraprocesado que en el saludable (Cuadro 3), mantuvo dicha diferencia a las 12 h y decayó significativamente a las 24 h de fermentación, en las heces de ambos patrones dietarios.

Comparando el efecto entre tipo de residuo fibroso HT y HC (panel A vs panel B), en general el efecto de la fuente de fibra en las bacterias analizadas fue el mismo, presentaron valores más altos a las 12 h de fermentación, respecto a 24 h. Este comportamiento se puede atribuir a que las fuentes de nutrientes en los residuos fibrosos para la fermentación microbiana se agotan, provocando la disminución de la proliferación bacteriana por la ausencia de sustrato. Por su parte *Bacteroides* presentó mayor abundancia en los dos patrones dietarios independientemente del residuo fibroso, sobre todo del patrón ultraprocesado como se muestra en la Figura 1. La abundancia de *Bacteroides* que ya era mayor al 23% en la microbiota en las heces del patrón ultraprocesado, aumentó con la fermentación con residuo HC, posiblemente modulada por los carbohidratos que se liberaron de la matriz fibrosa, por la acción fermentativa de la Microbiota (Kovatcheva-Datchavy *et al.*, 2015)

Otros estudios, donde fermentan residuos fibrosos provenientes de leguminosas, cereales o frutos, describen que las mismas bacterias cuantificadas por nosotros, tienden a proliferar durante las primeras 24 horas de fermentación. Algunos autores discuten que sus resultados son dosis dependiente fibra/bacteria o toman en cuenta la proliferación de dos bacterias juntas como *Bacteroides-Prevotella*, sin considerar la afinidad por la fibra u otro tipo de sustrato (Kristek *et al.*, 2019; Bussolo de Souza *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2018), ni que cada género bacteriano tiene curvas de crecimiento y tiempos de generación distintas. Además, en los estudios citados, los autores tampoco consideran la alimentación de los participantes, ni la composición microbiana antes de someter la materia fibrosa a fermentación. Aún así, estos estudios proporcionan evidencia de que los residuos fibrosos modulan selectivamente la microbiota intestinal y ésta a su vez sus metabolitos producidos.

6.7. Detección y Cuantificación de Metabolitos

De los múltiples metabolitos derivados de la fermentación por la microbiota intestinal, se separaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, en inglés), los extraídos de los residuos fibrosos, después de derivatizarlos con OPA para detectarlos por fluorescencia. Los cromatogramas, como los de la Figura 2, presentaron multitud de picos; sin embargo, solo 14 picos variaron entre tratamientos o tiempos de fermentación y fueron los seleccionados para su análisis. Siete de esos picos fueron identificados como los aminoácidos: 1: glutamina (Glu), 2: serina (Ser), 4: alanina (Ala), 6: valina (Val), 8: isoleucina (Ile), 9: leucina (Leu) y 12: lisina (Lys).

6.7.1. Efecto del Tipo de Residuo Fibroso y Origen de Heces

En la Figura 2 se presentan los cromatogramas del tiempo 12 h de fermentación, en el que A: residuo de harina de trigo fermentada con heces de participantes con dieta saludable (HT Saludable), B: residuo de harina compuesta con heces de participantes con dieta saludable (HC Saludable). C y D llevan el mismo orden, solo que se fermentaron con heces de participantes con dieta ultraprocesada; así, C: HT Ultraprocesada y D: HC Ultraprocesada.

Al comparar entre residuos fibrosos de HT y HC fermentados 12 h, con heces de la dieta saludable (Figura 2, A vs B), el pico 1 (Glu) fue menor, mientras los picos 8 (Ile) y 9 (Leu) se modificaron significativamente ($p < 0.05$) antecediéndose por picos no identificados (sin codificar). Mientras tanto, los picos 10 a 14, que incluyen Lys, aumentaron áreas, significativamente ($p < 0.05$). En resumen, se dieron cambios en metabolitos en el cromatograma, debido al tipo de residuo fermentado HT o HC, con heces del grupo saludable.

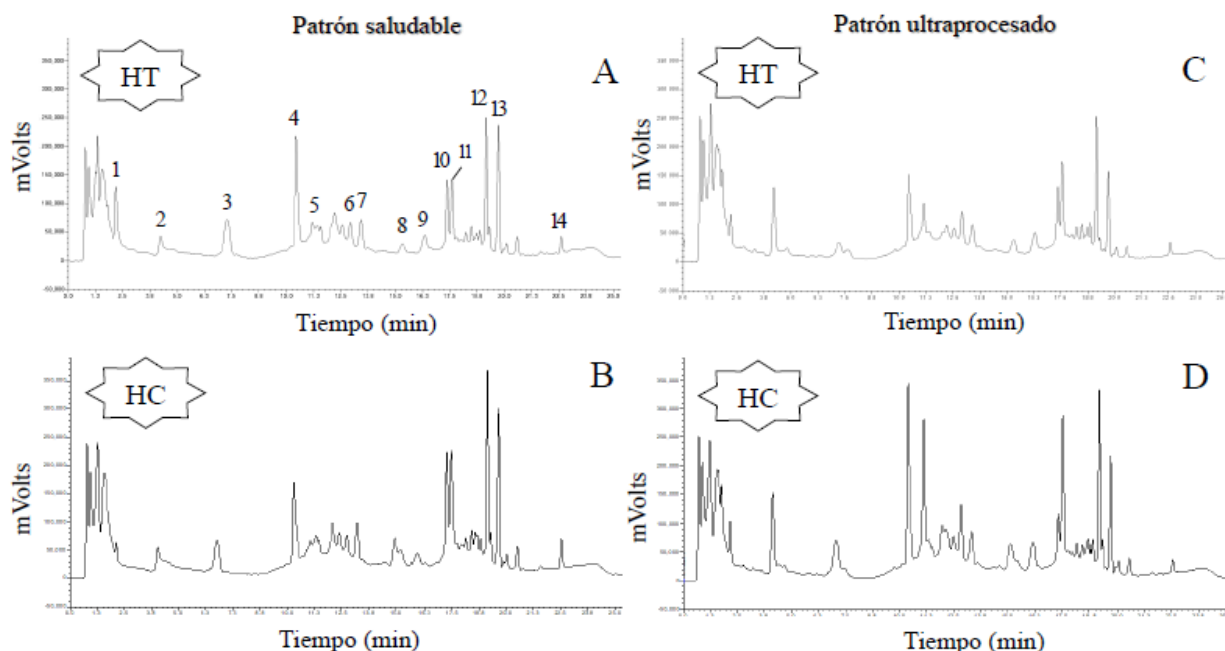


Figura 2. Cromatogramas de los metabolitos producidos a las 12 h de fermentación, de los residuos fibrosos de harina de trigo (HT) y harina compuesta (HC) por la microbiota fecal participantes de los patrones dietarios saludable y ultraprocesado. A: HT dieta saludable, B: HC dieta saludable, C: HT dieta ultraprocesada y D: HC dieta ultraprocesada.

Comparando el cromatograma de la Figura 2 recuadro C con el D, para evaluar el efecto del tipo de residuo fibroso, fermentado con heces de participantes con dieta ultraprocesada, los cambios fueron mucho más notorios que cuando las heces provenían de dieta saludable (A y B). Diez de los 14 picos tuvieron su área significativamente mayor ($p < 0.05$) en la fermentación con HC. Estos fueron, del 3 al 9 y del 11 al 13, incluyendo los aminoácidos Ala, Val, Ile, Leu y Lys. Se podría inferir la acción de bacterias proteolíticas que proliferaron, en solo 12 h, provenientes de heces de una dieta con exceso de proteína, que no se alcanzó a digerir y/o absorber en el intestino delgado y que podría haber sido hasta de 3.4% del residuo fibroso HC (Cuadro 6).

En cuanto a los efectos debidos a las heces usadas en la fermentación (de dietas saludable o ultraprocesada), se observan varios cambios entre el cromatograma A y el C de la Figura 2, ambos con residuo HT. Las áreas de los picos 1, 3, 4 y 13 fueron menores ($p < 0.05$) en C, mientras que 2 y 11 fueron mayores ($p < 0.05$) en A. El resto de los picos, mantienen áreas sin cambios significativos ($p > 0.05$). Entre los aminoácidos identificados, Glu y Ala disminuyen, cuando Ser

aumenta, debido a la fermentación con heces de los participantes con dieta ultraprocesada, en comparación a dieta saludable.

En resumen, el residuo fibroso de HC fue usado en la fermentación por las bacterias de las heces de cualquiera de los dos patrones dietarios, para producir principalmente aminoácidos de cadena ramificada (Leu, Ile y Val), así como lisina (Lys). Muy notorio en el panel D: HC ultraprocesado, fue el aumento de los picos 4 y 5, correspondientes a alanina (Ala) y otro compuesto nitrogenado no identificado.

6.7.2. Efecto del Tiempo de Fermentación

En la Figura 3 se presentan los cromatogramas de la fermentación de harina compuesta (HC) con heces de dieta saludable, a los 0, 12 y 24 h (recuadros A, B y C). En la misma Figura, en los recuadros D, E y F, se muestra el resultado de fermentar la misma HC con heces del patrón dietario ultraprocesado, durante 0, 12 y 24 h.

Las heces provenientes del patrón saludable indujeron cambios en el perfil de metabolitos a lo largo del tiempo (Figura 3, recuadros A a C). Los picos 1 (Glu) y 14, decrecieron significativamente ($p < 0.05$) conforme pasó el tiempo. Mientras tanto, los picos 2 (Ser) y 5 decrecieron un poco a las 12 h y aumentaron significativamente a las 24 h ($p < 0.05$). En cambio, el pico 4 (Ala) y los picos del 6 al 13, que incluyen Val, Ile, Leu y Lys, aumentaron significativamente ($p < 0.05$) a las 12 h y decrecieron después de 24 h de fermentación.

En el caso del efecto de las heces del patrón ultraprocesado sobre el residuo fibroso HC (Figura 3 cromatogramas del D al F), las áreas sin cambios significativos ($p > 0.05$) fueron las de los picos 1 (Glu) y 14. En estos cromatogramas, se observó un comportamiento similar al descrito antes para los recuadros A al C de fermentaciones con heces del patrón saludable. Los picos del 2 al 13 (Ser, Ala, Val, Ile, Leu, Lys y otros no identificados), aumentaron sus áreas significativamente ($p < 0.05$)

a las 12 h de fermentación, a excepción de los picos 10 y 11. En el tiempo 0, el pico 10 sobresale, caso contrario a las 12 y 24 h de fermentación, donde el pico 11 aumentó y el 10 decreció.

Independientemente del origen de las heces usadas en la fermentación, se nota el mismo comportamiento en la mayoría de los metabolitos, los cuales aumentaron significativamente ($p<0.05$) a las 12 h, decreciendo en general, a las 24 h. Esto, se pudo deber al agotamiento del sustrato, que impidió a las bacterias en la microbiota de las heces continuar su proliferación, como se muestra en la Figura 1 para *Bacteroides* y *Prevotella*.

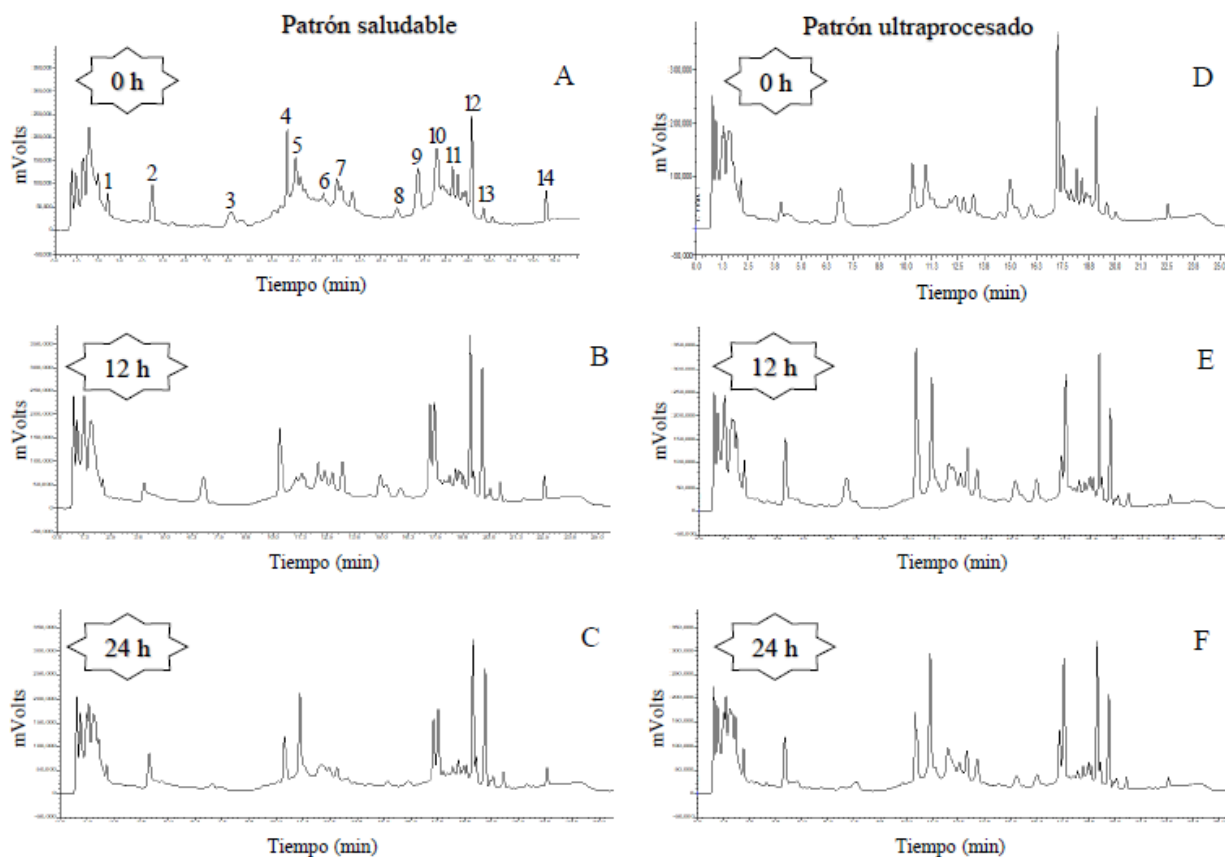


Figura 3. Cromatogramas de los metabolitos producidos a las 0, 12 y 24 h de fermentación, del residuo fibroso de harina compuesta (HC) con las heces de participantes de los patrones dietarios saludable o ultraprocesado. A: 0 h, dieta saludable; B: 12 h, dieta saludable; C: 24 h, saludable; D: 0 h, dieta ultra-procesada; E: 12 h, dieta ultraprocesada y F: 24 h, dieta ultraprocesada.

El tipo de bacterias y los diversos metabolitos provenientes de la fermentación forman un microambiente intestinal. La alteración en cantidad y naturaleza de los metabolitos respecto a un perfil saludable podría causar diversos problemas intestinales en el hospedero (Ahluwalia *et al.*, 2021). Los resultados de nuestro estudio se caracterizan por un aumento en la concentración de los aminoácidos escindidos, sobre todo en las fermentaciones con heces de los participantes que llevan una dieta inclinada al consumo de ultraprocesados y alimentos altos en proteínas. Por esto, aumenta el catabolismo proteico por acción de las bacterias como *Bacteroides spp*, que resultaron predominantes en la microbiota, como se comentó en la descripción inicial de las heces de los participantes con dieta ultraprocesada, en el presente estudio.

La alteración en la concentración de los aminoácidos como alanina, glicina, prolina, así como los aminoácidos de cadena ramificada (valina, isoleucina y leucina), pueden estar implicados en alteraciones fisiológicas como el síndrome metabólico y síndrome de intestino irritable (Ahluwalia *et al.*, 2021). Así mismo, Pedersen *et al.* (2016), encontraron asociación entre la producción de aminoácidos de cadena ramificada y resistencia a la insulina, con *Bacteroides vulgatus* y *Prevotella copri* como las principales especies involucradas. En un estudio con roedores alimentados con una dieta alta en grasa, pero suplementados con un compuesto bioactivo extraído de cítricos, se alivió la disbiosis, lo que a su vez reguló la síntesis de aminoácidos ramificados. Además, disminuyó el tejido adiposo en los roedores (Zeng *et al.*, 2020).

Lo anterior destaca la importancia de la harina compuesta rica en polifenoles derivados del camote naranja, probada en nuestro estudio. Sin embargo, debe considerarse que los metabolitos generados a partir de estos sustratos, dependerán de la composición de la microbiota intestinal de cada individuo. Quizás, por esto, en nuestros resultados se observó un incremento en los aminoácidos de cadena ramificada, incluso en la fermentación de la HC. Es decir, en una persona con disbiosis como los del patrón ultraprocesado en nuestro estudio, inicialmente la fermentación en colon de la HC conduciría a un incremento en la producción de aminoácidos de cadena ramificada. No obstante, si se siguiera consumiendo la HC, los compuestos bioactivos a su vez podrían actuar modulando la microbiota y corrigiendo la disbiosis. Una limitante de nuestro estudio, que no nos permitió observar este efecto, fue que el período de fermentación fue de tan solo 24 h.

Por su parte, se ha probado que distintos compuestos bioactivos tienen potencial en la modulación de la microbiota intestinal (Tomás-Barberán *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2020). Así, en individuos con eubiosis, la HC contribuiría a la manutención de este balance. En este modelo, aunque exista la producción de aminoácidos de cadena ramificada, también se encuentran especies capaces de transportarlos y absorberlos, tales como *Butyrivibrio crossotus* y *Eubacterium siraeum* (Pedersen *et al.*, 2016).

Los aminoácidos de cadena ramificada encontrados en este estudio, son aminoácidos indispensables. Por lo tanto, su producción controlada por una microbiota intestinal equilibrada, podría beneficiar desde el punto de vista nutricional al hospedero.

7. CONCLUSIONES

Debido a que el análisis de la microbiota fecal fue limitado ya que solo se analizaron *Bacteroides spp*, *Prevotella spp* y *Ruminococcus bromii*, los efectos observados lo son también. Se dio un aumento significativo de *Bacteroides* a las 12 h de fermentación, disminuyendo a las 24 h, independientemente del tipo de residuo analizado y de la fuente de las heces. *R. bromii* permaneció sin cambios. Por su parte, *Prevotella* solo permaneció sin cambios durante 12 h, disminuyendo a las 24 h, en el patrón ultraprocesado cuando se fermentó el residuo de la harina compuesta, mientras que en el de la harina de trigo desapareció casi por completo desde las 12 h. Aparentemente la fuente de nutrientes se agotó en las primeras 12 h de fermentación y no hubo remanente para mostrar cambios a más largo plazo.

En cuanto a los metabolitos derivatizables con OPA (con grupos amino primarios), se puede inferir que los aminoácidos sí fueron producidos por la microbiota completa. Lo más interesante, fue un aumento significativo de aminoácidos de cadena ramificada y lisina, a las 12 h de fermentación, a partir del residuo de harina compuesta, en comparación a los de harina de trigo. Esto, pudiera ser positivo o negativo dependiendo de la composición de la microbiota que realiza la fermentación. Positivo porque son aminoácidos indispensables, que no puede producir el organismo sino que se toman de los nutrientes y en este caso, los produjeron las bacterias de la microbiota, a través de la fermentación del residuo fibroso de harina compuesta de trigo, amaranto y camote. En cambio, podría ser negativo si hay disbiosis de la microbiota y los aminoácidos de cadena ramificada se producen en exceso, pudiendo conducir a síndrome metabólico, entre otros problemas de salud.

Así, los hallazgos apoyan la incorporación de fuentes ricas en fibra y compuestos bioactivos a la formulación de productos de panadería, como herramienta para mejorar o mantener la salud gastrointestinal a través de la modulación de la microbiota intestinal y sus metabolitos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AACC International. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th ed. AACC, St. Paul, MN.
- AACC International. 2001 The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*. 46(3):112-126.
- Aguayo Patrón SV. 2017. Dieta y microbiota intestinal como factores de riesgo para el desarrollo de autoinmunidad en enfermedad celiaca o diabetes tipo 1. Tesis de doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora.
- Aguayo-Patrón SV, Calderón de la Barca AM. 2017. Old fashioned vs. ultra-processed-based current diets: possible implication in the increased susceptibility to type 1 diabetes and celiac disease in childhood. *Foods*. 6(11):100.
- Ahluwalia B, Iribarren C, Magnusson MK, Sundin J, Clevers E, Savolainen O, Ross AB, Törnblom H, Simrén M, Öhman L. 2021. A distinct faecal microbiota and metabolite profile linked to bowel habits in patients with irritable bowel syndrome. *Cells*. 10(6):1459.
- Alencar N, Steel C, Alvim I, Morais E, Bolini H. 2015. Addition of quinoa and amaranth flour in gluten-free breads: Temporal profile and instrumental analysis. *LWT*. 62(2): 1011-1018.
- AOAC. 1999. Official methods of analysis of AOAC international, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Arranz-Otaegui A, Gonzalez Carretero L, Ramsey MN, Fuller DQ, Richter T. 2018. Archaeobotanical evidence reveals the origins of bread 14,400 years ago in northeastern Jordan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 115(31):7925-7930.
- Arroyo P. 2008. La alimentación en la evolución del hombre: su relación con el riesgo de enfermedades crónico degenerativas. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 65(6):431-440.
- Aune D, Chan DS, Lau R, Vieri R, Greenwood DC, Kampamn E, Norat T. 2011. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*. 343: d6617.
- Aune D, Keum N, Giovannucci E, Fadnes LT, Boffetta P, Greenwood DC, Tonstad S, Vatten LJ, Riboli E, Norat T. 2016. Whole grain consumption and risk of cardiovascular disease, cancer, and all cause and cause specific mortality: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*. 353:i2716.
- Ávila-Curiel A, Galindo-Gómez C, Juárez-Martínez L, Osorio-Victoria ML. 2018. Síndrome metabólico en niños de 6 a 12 años con obesidad, en escuelas públicas de siete municipios del Estado de México. *Salud Publica Mex*, 60, 395-403.
- Axelrod CH, Saps M. 2018. The role of fiber in the treatment of functional gastrointestinal disorders in children. *Nutrients*. 10, 1650.
- Ayala-Zavala JF, Rosas-Domínguez C, Vega-Vega V, González-Aguilar. 2010. Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own by products: looking for integral exploitation. *J Food Sci*. 75(8): R175-R181.

- Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. 2012. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol.* 113(2):411-7.
- Brown IJ, Stamler J, Van Horn L, Robertson CE, Chan Q, Dyer AR, Huang CC, Rodriguez BL, Zhao L, Daviglus ML, Ueshima H, Elliott P. 2011. Sugar-sweetened beverage, sugar intake of individuals, and their blood pressure: international study of macro/micronutrients and blood pressure. *Hypertension.* 57(4):695-701.
- Bussolo de Souza C, Jonathan M, Isay Saad M, Schols AH, Venema K. 2019. Degradation of fibers from fruit by-products allows selective modulation of the gut bacteria in an in vitro model of the proximal colon. *J Funct Food.* 57: 275-285.
- Calderón de la Barca AM, Castillo-Fimbres RS, Mejía-León ME, Quihui-Cota L, Ochoa-Leyva A, Aguayo-Patrón SV. 2020. Enteric parasitic infection disturbs bacterial structure in Mexican children with autoantibodies for type 1 diabetes and/or celiac disease. *Gut Pathog.* 2020; 12:37.
- Calderón de la Barca AM, Mercado-Gómez E, Heredia-Sandoval NG, Islas-Rubio AR. 2019. Mexican ancestral ingredients added to wheat flour produce bread with bioactive compounds, a high nutritional quality and good appearance. *AACC International Congress (Poster P-315).*
- Calderón de la Barca AM, Rojas-Martínez ME, Islas-Rubio AR, Cabrera-Chávez F. 2010. Gluten-free breads and cookies of raw and popped amaranth flours with attractive technological and nutritional qualities. *Plant Foods Hum Nutr.* 65: 241-246.
- Camelo-Méndez GA, Agama-Acevedo E, Rosell CM, Perea-Flores MJ, Bello-Pérez LA. 2018. Starch and antioxidant compound release during in vitro gastrointestinal digestion of gluten-free pasta. *Food Chem.* 263:201-207.
- Campos-Vega R, Reynoso-Camacho R, Pedraza-Aboytes G, Acosta-Gallegos JA, Guzman-Maldonado SH, Paredes-Lopez O, Oomah BD, Loarca-Piña G. 2009. Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Sci.* 74(7): T59-65.
- Christensen L, Vuholm S, Roager HM, Nielsen DS, Krych L, Kristensen M, Astrup A, Hjorth MF. 2019. Prevotella abundance predicts weight loss success in healthy, overweight adults consuming a whole-grain diet ad libitum: a post hoc analysis of a 6-wk randomized controlled trial. *J Nutr.* 149(12):2174-2181.
- Chutkan R, Fahey G, Wrigth WL, McRorie J. 2012. Viscous versus nonviscous soluble fiber supplements: mechanisms and evidence for fiber-specific health benefits. *J Am Acad Nurse Pract.* 24(8): 476-87.
- Collar C, Angioloni A. 2014. Nutritional and functional performance of high β -glucan barley flours in breadmaking: Mixed breads versus wheat breads. *Eur Food Res Technol.* 238: 459-469.
- Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, Brand-Miller J. 2005. Origins and evolution of the western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr.* 81(2):341-54.
- Cordain L. 1999. Cereal grains: humanity's double-edged sword. *World Rev Nutr Dieta.* 84:19-73.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Pouillet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini

- G, Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(33):14691-14696.
- Deane PM. 1979. The first industrial revolution. 2ª. Cambridge: Cambridge University. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/articulos/cuanta-fibra-dietetica-se-debe-consumir> Fecha de consulta 20 de mayo del 2020.
- Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 14(1):20-31.
- El-Salhy M, Ystad SO, Mazzawi T, Gundersen D. 2017. Dietary fiber in irritable bowel syndrome (Review). *Int J Mol Med*. 40(3):607-613.
- Escudero Álvarez E, González Sánchez P. 2006. La fibra dietética. *Nutr Hosp*. 21(2):61-72.
- Eswaran S, Muir J, Chey WD. 2013. Fiber and functional gastrointestinal disorders. *Am J Gastroenterol*. 108(5):718-27.
- Fardet A. 2014. How can both the health potential and sustainability of cereal products be improved? A French perspective. *J Cereal Sci*. 60(3):540–548.
- Fardet A. 2018. Characterization of the degree of food processing in relation with its health potential and effects. *Adv Food Nutr Res*. 85:79-129.
- Flores M, Macias N, Rivera M, Lozada A, Barquera S, Rivera-Dommarco J, Tucker KL. 2010. Dietary patterns in mexican adults are associated with risk of being overweight or obese. *J Nutr*. 140(10):1869-73.
- Fontanelli MM, Micha R, Sales CH, Liu J, Mozaffarian D, Fisberg RM. 2020. Application of the $\leq 10:1$ carbohydrate to fiber ratio to identify healthy grain foods and its association with cardiometabolic risk factors. *Eur J Nutr*. 59(7):3269-3279.
- Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. 1998. *Appl Environ Microbiol*. 64:3336-3345.
- García Perez P, Bretón Lesmes I, de la Cuerda Compes C, Cambor Álvarez M. 2002. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutr Hosp*. 17(2):11-16.
- Glimsman WH, Irausquin H, Park YK. 1986. Evaluation of health aspects of sugars contained in carbohydrate sweeteners. Report of sugar task force, 1986. *J Nutr*. 116(11): S1-216.
- Gong L, Cao W, Gao J, Wang J, Zhang H, Sun B, Yin M. 2018. Whole tibetan hull-less barley exhibit stronger effect on promoting growth of genus bifidobacterium than refined barley in vitro. *J Food Sci*. 83(4):1116-1124.
- González-Anton C, Lopez-Millan B, Rico MC, Sanchez-Rodriguez E, Ruiz-Lopez MD, Gil A, Mesa MD. 2015. An enriched, cereal-based bread affects appetite ratings and glycemic, insulinemic, and gastrointestinal hormone responses in healthy adults in a randomized, controlled trial. *J Nutr*. 145(2):231-8.
- Gullón B, Gullón P, Tavaría FK, Yáñez R. 2016. Assessment of the prebiotic effect of quinoa and amaranth in the human intestinal ecosystem. *Food Funct*. 7(9):3782-3788.
- Heinrich EJ, Reinhart P. 2007. Six thousand years of bread: its holy and unholy history. USA: Skyhorse Publishing.

- Hernández-Maldonado LM, Blancas-Benítez FJ, Zamora-Gasga VM, Cárdenas-Castro AP, Tovar J, Sáyago-Ayerdi SG. 2019. In vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation of high dietary fiber and antioxidant-rich mango (*Mangifera indica* L.) “ataulfo”-based fruit bars. *Nutrients*. 11:1564.
- Herrera Chalé F, Betancur Ancona D, Segura Campos MR. 2014. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad: péptidos biológicamente activos. *Nutr Hosp*. 29(1):10-20.
- Herrera-Cázares LA, Ramírez-Jiménez AK, Wall-Medrano A, Campos-Vega R, Loarca-Piña G, Reyes-Vega ML, Vázquez-Landaverde PA, Gaytán-Martínez M. 2019. Untargeted metabolomic evaluation of mango bagasse and mango bagasse-based confection under in vitro simulated colonic fermentation. *J Funct Foods*. 45: 271-280.
- Holt SH, Miller JB. 1994. Particle size, satiety and the glycaemic response. *Eur J Clin Nutr*. 48(7):496-502.
- Igbabul B, Num G, Amove J. 2014. Quality evaluation of composite bread produced from wheat, maize and orange fleshed sweet potato flours. *Am J Food Technol*. 2(4): 109-115.
- Inglett GE, Chen D, Liu S. 2014. physical properties of sugar cookies containing chia-oat composites. *J Sci Food Agric*. 94(15):3226-33.
- Joshi V, Kumar A, Kumar V. 2012. Antimicrobial, antioxidant and phyto-chemicals from fruit and vegetable wastes: A review. *Int J Food Ferment Technol*. 2(2):123-136.
- Jovanovski E, Mazhar N, Komishon A, Khhayyat R, Li D, Blanco Mejia S, Khan T, L Jenkins A, Smircic-Duvnjak L, L Sievenpiper J, Vuksan V. 2020. Can dietary viscous fiber affect body weight independently of an energy-restrictive diet? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 111(2):471-485.
- Kidane G, Abegaz K, Mulugeta A, Singh P. 2013. Nutritional analysis of vitamin A enriched bread from orange flesh sweet potato and locally available wheat flours at samre woreda, northern Ethiopia. *Curr Res Nutr Food Sci*. 1(1):49-57.
- Koua GAY, Zoué TL, Mégnanou RM, Niamké SL. 2018. Nutritive profile and provitamin a value of sweet potatoes flours (*Ipomoea batatas* Lam) consumed in Côte d’Ivoire. *J Food Res*. 7, 36-48.
- Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, Hallen A, Martens E, Björck I, Bäckhed F. 2015. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of prevotella. *Cell Metab*. 22(6):971-82.
- Kristek A, Wiese M, Heuer P, Kosik O, Schar MY, Soykan G, Alsharif S, Kuhnle GGC, Walton G, Spencer JPE. 2019. Oat bran, but not its isolated bioactive β -glucans or polyphenols, have a bifidogenic effect in an in vitro fermentation model of the gut microbiota. *Br J Nutr*. 121(5):549-559.
- Lambeau KV, McRorie JW Jr. 2017. Fiber supplements and clinically proven health benefits: how to recognize and recommend and effective fiber therapy. *J Am Assoc Nurse Pract*. 29(4):216-223.
- Lappi J, Salojärvi J, Kolehmainen M, Mykkanen H, Poutanen K, de Vos WM, Salonen A. 2013. Intake of whole-grain and fiber-rich rye bread versus refined wheat breads does not

- differentiate intestinal microbiota composition in Finnish adults with metabolic syndrome. *J Nutr.* 143(5):648-55.
- Liu M, Li X, Zhou S, Wang TTY, Yang K, Li Y, Tian J, Wang J. 2020. Dietary fiber isolated from sweet potato residues promotes a healthy gut microbiome profile. *Food Funct.* 11(1):689-699.
- Malik VS, Hu FB. 2012. Sweeteners and risk of obesity and type 2 diabetes: the role of sugar-sweetened beverages. *Curr Diab Rep.* 12:195-203.
- Manrique Vergara D, González Sánchez ME. 2017. Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales. *Nutr Hosp.* 34(4):58-61.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology.* 142:1097-1106.
- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H, Tanaka R. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol.* 68(11):5445-51.
- McRorie JW Jr, Mckeown NM. 2017. understanding the physics of functional fibers in the gastrointestinal tract: An evidence-based approach to resolving enduring misconceptions about insoluble and soluble fiber. *J Acad Nutr Diet.* 117(2): 251-264.
- Medina-Zacarías MC, Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Méndez Gómez-Humarán I, Hernández-Cordero SL. 2020. Factores de riesgo asociados con sobrepeso y obesidad en adolescentes mexicanas. *Salud Pública Mex.* 62:125-136.
- Mejía-Leon ME, Petrosino JF, Ajami NJ, Domínguez-Bello MG, de la Barca AM. 2014. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Sci Rep.* 22(4):3814.
- Mercado Gómez LE. 2019. Optimización por superficie de respuesta de mezclas de harina de trigo e ingredientes con bioactividad, para formular pan. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora.
- Mhd Jalil, Combet E, Edwards AC, Garcia AL. 2019. Effecto of β -glucan and black te in a functional bread on short chain fatty acid production by the gut microbiota in a gut digestión/fermentation model. *Int J Environ Res Public Health.* 2:227.
- Molina Montes ME, Africa Paz MI. 2007. La fibra dietética procesada como alimento funcional. *Offarm.* 26(1):70-77.
- Mondot S, Kang S, Furet JP, Aguirre de Carcer D, McSweeney C, Morrison M, Marteau P, Doré J, Leclerc M. 2011. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 17(1):185-92.
- Monteiro C, Cannon G, Levy R, Moubarac JC, Jaime P, Martins AP, Canella D, Louzada M, Parra D. 2016. The star shines bright. *World Nutrition.* 7(1–3): 28–38.
- Monteiro CA, Moubarac JC, Cannon G, NG SW, Popkin B. 2013. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. *Obes Rev.* 14(2):21-8.

- Montero-Quintero KC, Moreno-Rojas R, Molina EA, Colina-Barriga MS, Sánchez-Urdaneta AB. 2015. Efecto del consumo de panes integrales con amaranto (*Amaranthus dubius* mart; ex thell;) sobre la respuesta glicémica y parámetros bioquímicos en ratas Sprague dawley. *Nutr Hosp*. 31(1):313-320.
- Morrison KE, Jašarević E, Howard CD, Bale TL. 2020. It's the fiber, not the fat: significant effects of dietary challenge on the gut microbiome. *Microbiome*. 8(1):15.
- Musa-Veloso K, Poon T, Harkness LS, O'Shea M, Chu Y. 2018. The effects of whole-grain compared with refined wheat, rice, and rye on the postprandial blood glucose response: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 108(4):759-744.
- Nogueira AC, Sehn GAR, Rebellato AP, Coutinho JP, Godoy HT, Chang YK, Steel CJ, Clerici MTPS. 2018. Yellow sweet potato flour: use in sweet bread processing to increase β -carotene content and improve quality. *An Acad Bras Cienc*. 90(1):283-293.
- Gouseti O, Lovegrove A, Kosik O, Fryer PJ, Mills C, Gates F, Tucker G, Latty C, Shewry P, Bakalis S. 2019. Exploring the role of cereal dietary fiber in digestion. *J Agric Food Chem*. 67(30):8419-8424.
- Ocvirk S, Wilson AS, Appolonia CN, Thomas TK, O'Keeje SJD. 2019. Fiber, Fat, and Colorectal Cancer: New Insight into Modifiable Dietary Risk Factors. *Curr Gastroenterol Rep*. 21(11):62.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2015. Alimentos y bebidas ultraprocesados en América Latina: tendencias, efecto sobre la obesidad e implicaciones para las políticas públicas.
- Ortega Vélez MI, Morales GG, Quizán PT, Preciado M. 1999. Cálculo de ingestión dietaria y coeficientes de adecuación a partir de registro de 24 horas y frecuencia de consumo de alimentos. Estimación del consumo de alimentos. Cuaderno de trabajo No.1. Serie de evaluación del consumo de alimentos. Dirección de nutrición. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora.
- Serna Saldívar SRO. 2013. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. 2ª. México: AGT Editor.
- Pedersen H, Gudmundsdottir V, Nielsen H, Benjamin AH. 2016. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 535:376-381.
- Pol K, Christensen R, Bartels EM, Raben A, Tetens I, Kristensen M. 2013. Whole grain and body weight changes in apparently healthy adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled studies. *Am J Clin Nutr*. 98(4):872-84.
- Rannou C, Texier F, Marzin C, Nicklaus S, Cariou V, Courcoux P, Prost C. 2018. Effect of salt reduction on children's acceptance of bread. *J Food Sci*. 83(8):2204-2211.
- Rapallo, R. y Rivera, R. 2019. Nuevos patrones alimentarios, más desafíos para los sistemas alimentarios. 2030-Alimentación, agricultura y desarrollo rural en América Latina y el Caribe, No. 11. FAO. 25.
- Red Nacional de Información Cultural, Coordinación Nacional de Desarrollo Institucional/SIC. 2018. La cocina prehispánica. Cocina mexicana e historia. Disponible en:

https://sic.cultura.gob.mx/ficha.php?table=gastronomia&table_id=89 Fecha de consulta: 18 de abril del 2020.

- Rehman A, Heinsen FA, Koenen ME, Venema K, Knecht H, Hellming S, Schreiber S, Ott SJ. 2012. Effects of probiotics and antibiotics on the intestinal homeostasis in a computer-controlled model of the large intestine. *BMC Microbiol.* 12:47.
- Ruttarattanamongkol K, Chittrakorn S, Weerawatanakorn M, Dangpium N. 2016. Effect of drying conditions on properties, pigments and antioxidant activity retentions of pretreated orange and purple-fleshed sweet potato flours. *J Food Sci Technol.* 53, 1811-1822.
- Sabbione A, Suarez S, Añon M, Scilingo A. 2018. Amaranth functional cookies exert potential antithrombotic and antihypertensive activities. *Int J Food Sci Technol.* 54 (5), 1506-1513.
- Saleh ASM, Wang P, Wang N, Yang S, Xiao Z. 2017. Technologies for enhancement of bioactive components and potential health benefits of cereal and cereal-based foods: research advances and application challenges. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 59 (2): 207-227.
- Scazzina F, Siebenhandl-Ehn S, Pellegrini N. 2013. The effect of dietary fibre on reducing the glycaemic index of bread. *Br J Nutr.* 109(7):1163-74.
- Secretaría de Salud. ¿Cuánta fibra dietética se debe consumir? 2016. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/articulos/cuanta-fibra-dietetica-se-debe-consumir> Fecha de consulta 5 de mayo del 2021.
- Serra-Majem L, Bautista-Castaño I. 2015. Relationship between bread and obesity. *Br J Nutr.* 113(S2): S29-S35.
- Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, Santaella-Castell JA, Rivera-Dommarco J. 2020. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Shewry PR, Hey SJ. 2015. The contribution of wheat to human diet and health. *Food Energy Secur.* 4(3):178-202.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 16:144-158.
- Soliman GA. 2019. Dietary fiber, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Nutrients.* 11(5):1155.
- Sweeney RA. 1989. Generic Combustion Method for Determination of Crude Protein in Feeds: Collaborative Study. *JAOAC.* 72 (5): 770-774.
- Teichmann J, Cockburn DW. 2021. In vitro Fermentation Reveals Changes in Butyrate Production Dependent on resistant starch source and microbiome composition. *Front Microbiol.* 12:640253.
- Tomás-Barberán FA, Selma MV, Espín JC. 2016 Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 19(6):471-476.
- Varela G, Carbajal A, Beltrán B. 1998. Del pan tradicional al pan de molde. Repercusiones nutricionales. Fundación Española de la Nutrición.
- Vázquez-Ortiz FA, Caire G, Higuera-Ciapara I, Hernández G. 1995. High Performance Liquid

- Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 18:10, 2059-2068.
- Vilaplana Batalla M. 2008. Hidratos de carbono simples y complejos recomendaciones dietéticas. *OFFARM.* 27(2):54-57.
- Vilcanqui-Pérez F, Vílchez-Perales C. 2017. Fibra dietaria: nuevas definiciones, propiedades funcionales y beneficios para la salud Revisión. *ALAN.* 67(2):146-153.
- Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol.* 66:297-303.
- Welsh JA, Sharma A, Cunningham SA, Vos MB. 2011. Consumption of added sugars and indicators of cardiovascular disease risk among US adolescents. *Circulation.* 123(3): 249-57.
- Williams BA, Grant LJ, Gidley MJ, Mikkelsen D. 2017. Gut Fermentation of dietary fibres: physico-chemistry of plant cell walls and implications for health. *Int J Mol Sci.* 18(10):2203.
- Ze X, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. 2012. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME.* 6(8):1535-43.
- Zeng S, Li S, Xiao P, Cai Y, Chu C, Chen B, Li P, Li J, Liu E. 2020. Citrus polymethoxyflavones attenuate metabolic syndrome by regulating gut microbiome and amino acid metabolism. *Sci Adv.* 6(1): eaax6208.
- Zielinski G, Rozema B. 2013. Review of fiber methods and applicability to fortified foods and supplements: choosing the correct method and interpreting results. *Anal Bioanal Chem.* 405(13):4369-72.
- Zucco F, Borsuk Y, Arntfield S. 2011. Physical and nutritional evaluation of wheat cookies supplemented with pulse flours of different particle size. *Food Science and Technology.* 44: 2070-2076.
- Zuleta A, Binaghi J, Greco C, Aguirre C, Casa L, Tadini C, Patricia A, De Ferrer R. 2012. Diseño de panes funcionales a base de harinas no tradicionales. *Rev Chil Nutr.* 39:58-64.