

**Fermentación microbiana de compuestos
polifenólicos presentes en cacao (*Theobroma
cacao*) y mango (*Mangifera indica*)**

María Joselyn Castellón Chicas

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Fermentación microbiana de compuestos
polifenólicos presentes en cacao (*Theobroma
cacao*) y mango (*Mangifera indica*)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

María Joselyn Castellón Chicas

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Fermentación microbiana de compuestos polifenólicos presentes en cacao (*Theobroma cacao*) y mango (*Mangifera indica*)

Maria Joselyn Castellón Chicas

Resumen. Los polifenoles son investigados por su capacidad antioxidante y uso en la prevención de enfermedades crónicas. Los objetivos de este estudio fueron: evaluar la influencia de compuestos fenólicos de extractos de mango y cacao en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium bifidum*), evaluar la actividad tanasa del grupo de bacterias probióticas e investigar el efecto de los polifenoles de mango y cacao en la microbiota humana. Las bacterias probióticas se incubaron con ambos extractos a siete concentraciones (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/L GAE) y se midió el crecimiento a 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Los resultados muestran un efecto estimulante por parte de los extractos sobre el crecimiento de las bacterias probióticas. El grupo de bacterias se incubó con extracto de mango y se midió su producción de ácido gálico libre mediante ensayo de Rodanina a 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Los resultados demostraron actividad tanasa en las bacterias probióticas. Por otra parte, los compuestos polifenólicos de mango y cacao promovieron el crecimiento de *Bifidobacterium catenulatum*, *B. adolescentis*, *Ruminococcaceae*, *Euryarchaeota* y *Firmicutes*, mientras que la población de *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. prevotella*, *Eubacterium hallii*, *E. coli* y *Faecalibacterium* se redujo. En conclusión, los polifenoles de mango y cacao modulan la microbiota del intestino humano. Además, estos resultados indican el importante papel que desempeñan las bacterias probióticas en la farmacocinética de los compuestos fenólicos.

Palabras clave: Ácido gálico, epicatequina, microbiota humana, probióticos.

Abstract. Polyphenols have been investigated due to their antioxidant capacity and their potential use in the prevention of chronic diseases. The objectives of this study were to evaluate the influence of phenolic compounds from mango and cocoa extracts on the growth of a probiotic bacteria group (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* and *Bifidobacterium bifidum*), assess the tannase activity of probiotic bacteria group; and investigate the effect of polyphenols from both extracts on the human gut microbiota. Probiotic bacteria were incubated with both extracts at seven concentrations (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/L GAE) and measured the growth at 0, 1, 3, 6, 12, 24 and 48 hours. Results show that polyphenolic compounds from mango and cacao have a stimulatory effect on the growth of probiotic bacteria. Furthermore, probiotic bacteria were incubated with mango extract and measured by Rhodanine assay the production of free gallic acid at 0, 1, 3, 6, 12, 24 and 48 hours. Results demonstrated the presence of tannase enzyme in the probiotic bacteria. Moreover, polyphenolic compounds from mango and cocoa promoted the growth of *Bifidobacterium catenulatum*, *B. adolescentis*, *Ruminococcaceae*, *Euryarchaeota* and *Firmicutes*, whereas the population of *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. prevotella*, *Eubacterium hallii*, *E. coli* and *Faecalibacterium* was reduced. In conclusion, mango and cocoa polyphenols modulate the human gut's microbiota. In addition, these results indicate the important role that probiotic bacteria play in the pharmacokinetics of phenolic compounds.

Key words: Epicatechin, gallic acid, human microbiota, probiotics.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES	21
5. RECOMENDACIONES	22
6. LITERATURA CITADA.....	23
7. ANEXOS	28

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Conjunto de cebadores utilizados en este estudio para el análisis de PCR en tiempo real.	7
2. Efecto del extracto de mango (<i>Manguifera Indica</i> var. Ataulfo) a diferentes concentraciones en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas (<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>Bifidobacterium bifidum</i>).	11
3. Efecto del extracto de Cacao (<i>Theobroma cacao</i>) a diferentes concentraciones en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas (<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>Bifidobacterium bifidum</i>).	12
4. Actividad tanasa de las bacterias probióticas (<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>Bifidobacterium bifidum</i>) incubadas con extracto de mango (<i>Manguifera Indica</i> variedad Ataulfo).	14
5. Efecto del extracto de mango (<i>Manguifera indica</i> var. Ataulfo) en el crecimiento de la microbiota humana.	15
6. Efecto del extracto de mango (<i>Manguifera indica</i> var. Ataulfo) en el crecimiento de la microbiota humana a través del tiempo.	16
7. Efecto del extracto de mango (<i>Manguifera indica</i> var. Ataulfo) en el crecimiento de la microbiota humana con diferencias significativas en la interacción entre los tratamientos y el tiempo.	17
8. Efecto del extracto de Cacao (<i>Theobroma cacao</i>) en el crecimiento de la microbiota humana.	18
9. Efecto del extracto de Cacao (<i>Theobroma cacao</i>) en el crecimiento de la microbiota humana a través del tiempo.	18
10. Efecto del extracto de Cacao (<i>Theobroma cacao</i>) en el crecimiento de la microbiota humana con diferencias significativas en la interacción entre los tratamientos y el tiempo.	19
Figuras	Página
1. Cromatograma de HPLC-MS representativo a 280 nm de los compuestos fenólicos en el extracto de mango (<i>Mangifera indica</i> var. Ataulfo)..	8
2. Cromatograma de HPLC-MS representativo a 280 nm de los compuestos fenólicos en el extracto de cacao (<i>Theobroma cacao</i>)..	9

Anexos	Página
1. Curva de crecimiento del grupo de bacterias probióticas (<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>Bifidobacterium bifidum</i>).	28
2. Ensayo de Rodanina	28
3. Cuadros ANDEVA de los ensayos realizados.....	29
4. Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos (ADN) de las muestras fecales después de la incubación con los extractos de mango y cacao.	31

1. INTRODUCCIÓN

La composición de los alimentos es compleja y ampliamente investigada. Actualmente, existe una tendencia creciente en el consumo de alimentos saludables, incluyendo alimentos funcionales, los cuales pueden contener antioxidantes naturales o industrializados, junto a la adición de otros compuestos bioactivos (Coronado *et al.* 2015). Los antioxidantes, pueden ser clasificados en endógenos, aquellos que son sintetizados por las células, y exógenos, que ingresan al organismo a través de la cadena alimentaria. Dentro de estos últimos se encuentra la vitamina E, vitamina C, β carotenos, compuestos fenólicos, entre otros (García Bacallao *et al.* 2001).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en la mayoría de alimentos y bebidas de origen vegetal (Cheynier 2012). Estos compuestos pueden dividirse en, flavonoides, tales como flavonoles o antocianidinas, ácidos fenólicos como el ácido gálico y taninos. Este último puede sub dividirse en taninos condensados, como flavan-3-ols (-) -epicatequina y (+) – catequina; y taninos hidrolizables como galotaninos (Reis Giada 2013). Las fuentes de compuestos fenólicos en la dieta incluyen, legumbres (judías), cereales (harina de arroz, trigo), vegetales (cebolla, col rizada, *lechuga*, brócoli), zumos de frutas (manzanas fresas, uvas, naranja, mango) y bebidas (vino, té) (Martínez Valverde *et al.* 2000).

El mango (*Mangifera indica*) es un fruto accesible, altamente consumido en América Latina y caracterizado por desempeñar un papel importante en la economía de varios países de clima tropical (De la Cruz Medina y García 2002). Del mismo modo, se identifica como fuente de compuestos fenólicos y dependiendo de las partes del fruto (cáscara, pulpa, semilla) varía la cantidad presente de estos compuestos (Masibo y He 2008, Kim *et al.* 2016). El ácido gálico es uno de los compuestos fenólicos con mayor concentración en la pulpa del mango (Palafox-Carlos *et al.* 2012). Así mismo, los gallotaninos presentes en el mango son compuestos no absorbibles, los cuales pueden ser metabolizados mediante fermentación microbiana en ácido gálico y pirogalol (Nemec *et al.* 2016; Jiménez *et al.* 2013).

Por otra parte, el cacao (*Theobroma cacao*) es un fruto originario de Mesoamérica y es la base en la producción de chocolate y sus derivados (Nisao Ogata 2007). Además, posee gran importancia económica en muchos países de América Latina (FAO 2004). Este fruto ha sido ampliamente investigado debido a su alto contenido de compuestos fenólicos, incluyendo moléculas de bajo peso molecular como catequina y epicatequina (Jalil y Ismail 2008; Heo y Lee 2005). Estudios recientes han demostrado que el cacao y sus compuestos fenólicos imitan el efecto de prebióticos y probióticos modulando la composición de la microbiota intestinal humana (Hayek 2013).

En general, el interés en el estudio de los compuestos fenólicos se ha incrementado debido a su presencia en la mayoría de los alimentos de origen vegetal presentes en nuestra dieta y sus propiedades antioxidantes capaces de proveer beneficios a nuestra salud (Handique y Baruah 2002), incluyendo, su efecto en la prevención de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (Creus Gimeno 2004). Sin embargo, las propiedades de estos compuestos y su efecto dentro de nuestro organismo dependen del grado de polimerización y biodisponibilidad de los mismos (Cardona *et al.* 2013). La mayoría de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos se encuentra en forma de ésteres, glucósidos o polímeros los cuales deben ser hidrolizados mediante enzimas o la microbiota intestinal para poder ser absorbidos por el organismo (Manach *et al.* 2004).

La microbiota intestinal humana está dominada por tres principales phyla bacterianas, Firmicutes (comprende más de 200 géneros, incluyendo especies de *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus*, y *Clostridium*), Actinobacteria (incluye bacterias Gram-positivas) y Bacteroidetes (incluyen aproximadamente 20 géneros Gram-negativos) (Musso *et al.* 2010). Esta comunidad juega un papel clave en la salud humana ya que dentro de esta podemos encontrar ciertas bacterias tales como *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* los cuales actúan como probióticos dentro de nuestro organismo, manteniendo un balance en la composición de la microbiota intestinal (Lee *et al.* 2006). Sin embargo, algunos desordenes gastrointestinales tales como obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal entre otras, pueden ser causados debido a cambios en la composición de la microbiota intestinal.

Estudios recientes indican que los compuestos fenólicos pueden actuar como prebióticos metabólicos en la microbiota humana y demuestran un efecto positivo en el crecimiento de algunas bacterias probióticas tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Gwiazdowska *et al.* 2015). En vista del importante rol que desempeñan las bacterias probióticas y los compuestos fenólicos en la salud humana, es importante evaluar la relación existente entre ambos; por lo tanto, el presente estudio incluye los siguientes objetivos:

- Investigar la influencia de los taninos de gran tamaño molecular de los extractos de cacao y mango en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium bifidum*).
- Evaluar la actividad tanasa del grupo de bacterias probióticas utilizando los compuestos fenólicos presentes en el extracto de mango.
- Investigar la influencia de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de cacao y mango en la población de bacterias específicas de la microbiota humana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición del departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Texas A&M, localizada en la ciudad de College Station, estado de Texas, Estados Unidos de América.

Fase I. Efecto de los compuestos fenólicos del extracto de cacao y mango en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas.

Extractos de mango y cacao. Los extractos acuosos de mango (*Mangifera indica*, variedad Ataulfo) y cacao (*Theobroma cacao*) fueron facilitados por el laboratorio de fitoquímicos del Centro de Investigación de Frutas y Vegetales del Dr. Stephen Talcott en el Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la universidad de Texas A&M.

El extracto de mango se obtuvo de la pasta de pulpa de mango homogeneizada (10 gramos) con 50 ml de disolvente de extracción (metanol y acetona 1:1). La mezcla se homogeneizó, y se agitó durante 30 minutos, se filtró a través de papel de filtro Whatman número cuatro, y los sólidos restantes se volvieron a extraer dos veces bajo las mismas condiciones. Los disolventes reunidos se evaporaron a presión reducida a 45 °C y el concentrado se disolvió en 30 ml de agua con ácido fórmico al 0.01%. El cacao se obtuvo del producto Cocovanol (Diana Plant Sciences), el extracto cacao se encontraba disuelto en agua con ácido fórmico al 0.01%.

Caracterización de los extractos. El contenido total de fenoles en ambos extractos se cuantificó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Se prepararon diferentes concentraciones conocidas (0, 100, 200, 400 ppm) a partir de un estándar de ácido gálico (Sigma-Aldrich). Este análisis se desarrolló de la siguiente manera: en un tubo de ensayo se agregaron 50 µl de muestra y 0.5 ml de 0.25 N de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar 2 minutos. Se agregó 0.5 ml de carbonato de sodio (Na_2CO_3 , 1 N) y se dejó reposar 2 minutos. Se mezcló con un vortex y se leyó la absorbancia a 726 nm de longitud de onda. Éste ensayo se aplicó en todas las muestras, incluyendo las concentraciones estándares y las muestras de los extractos (cacao y mango). Se realizó una curva estándar con las concentraciones conocidas de estándares de ácido gálico. La absorbancia obtenida de las muestras de los extractos se correlacionó con la curva estándar para obtener mg/L de ácido gálico equivalente (GAE) como resultado.

La caracterización de los extractos se hizo mediante Cromatografía Líquida-espectrometría de masas (LC-MS). El extracto de mango fue filtrado a través de filtros de membrana Whatman de 0.45 μm y colocadas en viales de 1.5 ml. Se utilizaron estándares auténticos de ácido gálico, monogaloil-glucosa y pentagaloil-glucosa. Se utilizó un espectrómetro de masas de trampa iónica (Thermo Finnigan LCQ Deca XP Max MS), equipado con una fuente de ESI (Electrospray). Las separaciones se realizaron en fase inversa usando Finnigan Surveyor HPLC acoplada a un detector Surveyor PDA (detector de arreglo de diodos). Las separaciones de gradiente se realizaron usando una columna Waters Sunfire C₁₈, (250 x 4.6 mm, 2.6 μm) a temperatura ambiente. La fase móvil A fue ácido fórmico al 0.1% en agua y la fase móvil B fue ácido fórmico al 0.1% en metanol a 400 μl / minuto. Se llevó a cabo un gradiente de 0% de fase B durante 2 minutos y se cambió a 10% de fase B en 4 minutos y se mantuvo hasta 10 minutos, 10 a 40% de fase B en 25 minutos, 40 a 65% de fase B en 35 minutos y 65 a 85% de fase B en 41 minutos, y el 85% de Fase B se mantuvo a 49 minutos antes de volver a las condiciones iniciales. La interfaz de electrospray trabajó en modo de ionización negativa. Todos los compuestos fueron caracterizados a 280 nm de longitud de onda.

El extracto de cacao fue filtrado a través de filtros de membrana Whatman de 0.45 μm y colocadas en viales de 1.5 ml. Se utilizaron estándares auténticos de (+)- catequina, (-)-epicatequina, (-)- galactato de epigalocatequina, (-)- epigalocatequina, (-)- epicatequina galato, cafeína, rutina y quercetina, obtenidos todos de Sigma-Aldrich. La caracterización se llevó a cabo mediante un sistema de HPLC de alianza Waters 2695 utilizando una matriz de fotodiodos Waters 996 (PDA). La fase móvil A fue 100% agua y la fase móvil B 60% metanol y 40%, ajustados cada uno a pH 2.4 usando ácido ortofosfórico. Se llevó a cabo un gradiente de 0-50% de fase B en 10 minutos, 50-70% de fase B en 5 minutos y 70-100% en 15 minutos, durante un tiempo total de ejecución de 30 minutos. La columna también se equilibró funcionando 100% de fase A durante 2 minutos antes de la siguiente inyección. Todos los compuestos fueron caracterizados a 280 nm de longitud de onda.

Determinación de la viabilidad y curva de crecimiento de las bacterias probióticas. Se utilizó una cápsula que contenía una mezcla de bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium bifidum*), la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Nutrición de la Dra. Susanne Talcott en el Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la universidad de Texas A&M. El cultivo madre se preparó diluyendo el contenido de una cápsula de bacterias probióticas en caldo Man-Rogosa Sharpe (Lactobacilli broth MRS) a 37 °C por 24 h en condiciones anaeróbicas (intercambio gaseoso con CO₂). La suspensión de bacterias se mezcló 50% v/v con solución de congelación (50 % (v/v) agua destilada con glicerol) y se almacenó en crioviales (1 ml) a -80 °C.

Se desarrolló una curva de crecimiento del grupo de bacterias probióticas mediante el método de turbidez usando un lector de microplacas (Fluo Star Omega). La viabilidad de las bacterias probióticas se evaluó mediante conteo de unidades formadoras de colonia (CFU). Se diluyó un criovial (1 ml) de las bacterias probióticas en 30 ml de MRS durante 24 horas. Se realizó una dilución en serie, en la cual se tomó 0.1 ml del cultivo de 24 h y se diluyó en 0.9 ml de caldo MRS, obteniéndose una dilución de 10⁻¹. De la dilución obtenida

de 10^{-1} , se tomó 0.1 ml y se diluyó en 0.9 ml de caldo MRS, obteniéndose una dilución de 10^{-2} . Se siguió diluyendo sucesivamente hasta obtener una dilución de 10^{-9} . Luego de realizadas las diluciones, se toma 0.1 ml de cada dilución y se inocularon en placas Petri de agar soya triptica mediante siembra por superficie. Estas placas se incubaron a 37 °C durante 24h en un ambiente anaeróbico (GasPak™ EZ) y al finalizar las 24 horas se realizó el recuento de los platos Petri.

Evaluación del efecto de los compuestos fenólicos del mango (gallotaninos) y del cacao (epicatequina) en el crecimiento de las bacterias probióticas.

Se preparó un cultivo madre en el cual se diluyó un criovial (1 ml) de bacterias probióticas en 30 ml de caldo MRS, este fue incubado a 37 °C por 24 horas en condiciones anaeróbicas (intercambio gaseoso con CO₂). Después de 24 horas se midió la absorbancia, seguidamente la bacteria fue centrifugada, lavada con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y centrifugada nuevamente. El pellet de bacterias obtenido se reincorporó (en el mismo volumen inicial en el que se encontraba diluido) en un medio mínimo de aminoácidos (6 g de (NH₄)₂ SO₄ L⁻¹, 0.4 g MgSO₄·7H₂O L⁻¹, 7 g de KH₂ PO₄ L⁻¹, 0.02 g FeSO₄·7H₂O L⁻¹, 3 g de ácidos Casamino L⁻¹, ajustado a un pH de 6 con NaOH 1 M antes de esterilizar (121°C/15 min) (Lamia y Moktar 2002). La suspensión de bacterias probióticas obtenida fue utilizada para realizar el estudio de incubación con los extractos de mango y cacao.

Para evaluar el efecto de los compuestos fenólicos del mango y del cacao en el crecimiento de las bacterias probióticas, se realizó un estudio de incubación en el cual el medio mínimo de aminoácidos se mezcló con los extractos de mango y cacao obteniendo diferentes concentraciones (0, 12.5, 25, 50, 100 y 200 ppm o mg/L de ácido gálico equivalente), y se inoculó con la suspensión de bacterias probióticas (obteniendo una absorbancia inicial de OD₆₀₀=0.15). Los tratamientos se incubaron a 37 °C durante 48 horas en condiciones anaeróbicas (intercambio gaseoso con CO₂). Durante la incubación se midió la absorbancia a 600 nm en microplacas de 96 pozos a las 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 h. El control fue el tratamiento que contenía solamente la suspensión de bacterias probióticas. Los resultados se presentaron como el promedio de cuatro observaciones por repetición como porcentaje del control.

Diseño experimental y Análisis Estadístico.

Para cada extracto se usó un Diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) con medidas repetidas en el tiempo, seis tratamientos fueron evaluados con tres repeticiones para un total de 18 unidades experimentales. Para el análisis de las muestras se utilizó un análisis de varianza y una separación Duncan para comparar los tratamientos, y una separación de Cuadrados Mínimos (LSMEANS) para comparar las medias de cada tratamiento a través del tiempo. El nivel de significancia utilizado fue de $\alpha < 0.05$. Los resultados se analizaron con el "Statistical Analysis System" (SAS® Versión 9.4).

Fase II. Evaluación de la actividad tanasa del grupo de bacterias probióticas utilizando los compuestos fenólicos presentes en el extracto de mango.

Para evaluar la actividad tanasa de las bacterias probióticas a través de la producción de ácido gálico a partir del extracto de mango se utilizó un ensayo espectrofotométrico de rodantina específico para ácido gálico. Se preparó una suspensión de bacterias probióticas

(lavadas y resuspendidas en PBS como se describió en las Fase I). El medio mínimo de aminoácidos se mezcló con el extracto de mango (200 ppm o mg/L de ácido gálico equivalente), y se inoculó con la suspensión de bacterias probióticas (obteniendo una absorbancia inicial de $OD_{600}=0.15$). Se incubó a 37 °C durante 48 h en condiciones anaeróbicas (intercambio gaseoso con CO₂). El control fue el medio mínimo de aminoácidos con el extracto de mango (200 mg/L de ácido gálico equivalente). Durante la incubación se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 h) y en cada muestreo se aplicó el ensayo de rodanina mediante el método de Inoue y Hagerman (1988), usando NaOH en lugar de KOH.

Diseño experimental y Análisis Estadístico. Se usó un Diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) con medidas repetidas en el tiempo, dos tratamientos fueron evaluados con tres repeticiones para un total de seis unidades experimentales. Para el análisis de las muestras se utilizó un Análisis de Varianza y una separación Duncan para comparar los tratamientos y una separación de Medias usando Cuadrados Mínimos (LSMEANS) para comparar las medias de cada tratamiento a través del tiempo. El nivel de significancia utilizado fue de $\alpha < 0.05$. Los resultados se analizaron con el “Statistical Analysis System” (SAS® Versión 9.4).

Fase III. Evaluación del efecto de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de cacao y mango en la población de bacterias específicas de la microbiota humana.

Se utilizaron muestras fecales congeladas (almacenadas a -80 °C) provenientes de personas saludables las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de Nutrición de la Dra. Susanne Talcott en el Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la universidad de Texas A&M.

En una cámara anaeróbica de vinilo COY, se pesaron porciones de 1-2 g de las muestras, y se diluyeron 1:10 (w/v) en PBS, obteniendo una suspensión de las muestras fecales. Esta suspensión se utilizó para inocular 1:1 v/v (Dall'Asta *et al.* 2012) un medio estéril pre-reducido a pH 7 (composición: peptona (2 g L⁻¹), -extracto de levadura (2 g L⁻¹), NaCl (0.1 g L⁻¹), K₂HPO₄ (0.04 g L⁻¹), KH₂PO₄ (0.04 g L⁻¹), NaHCO₃ (2 g L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (0.01 g L⁻¹), CaCl₂·6H₂O (0.01 g L⁻¹), Tween 80 (2 ml L⁻¹), hemina (50 mg L⁻¹), vitamina K (10 µl L⁻¹), L-cisteína (0.5 g L⁻¹), sales biliares (0.5 g L⁻¹), resazurina (1 mg L⁻¹), y agua destilada) (Hoyos y Noratto 2016). El inóculo obtenido se incubó a 37 °C por 24 horas en condiciones anaeróbicas (GasPak™ EZ). Después de 24 h se utilizó este cultivo para inocular 1:1 (v/v) los tres tratamientos: (i) medio pre reducido + extracto de cacao a 200 ppm EAG, (ii) medio pre reducido + extracto de mango a 200 ppm EAG, y (iii) control (medio pre reducido + cultivo de inoculación). Los tratamientos fueron incubados a 37 °C por 48 horas a condiciones anaeróbicas (intercambio gaseoso con CO₂). Durante la incubación se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 24 y 48 horas). Para la toma de muestras se usó el siguiente procedimiento: Se tomó 1 ml de la muestra y se centrifugo (3000 rpm, 10 minutos, 4 °C), se descartó el sobrenadante del pellet obtenido y este último se almacena a -20 °C hasta análisis posteriores.

Cuando todas las muestras fueron colectadas se cuantificó el ADN de cada muestra. La extracción de ADN se realizó siguiendo el Protocolo de aislamiento del ADN de las heces

para la detección de patógenos (QIAGEN 2012). Después de extraer el ADN, este se cuantificó mediante un NanoDrop y se estandarizaron las muestras a una concentración de cinco nanogramos por microlitro de ADN de cada muestra. Para evaluar cambios en bacterias específicas de la microbiota humana se realizó un análisis de PCR en tiempo real (qPCR) en 16 cebadores de diferentes bacterias (Cuadro 1). Los resultados obtenidos por cada cebador se correlacionaron con curvas estándares de cada cebador (las curvas estándares fueron proporcionadas por la Dra. Giuliana Noratto, investigadora asociada del laboratorio de Nutrición, departamento de Nutrición y ciencia de los alimentos de la universidad de Texas A&M). Los resultados se expresaron en promedio de dos observaciones por repetición en Log ADN (fentogramos).

Diseño experimental y Análisis Estadístico. Para cada extracto se usó un Diseño Completamente al azar (DCA) con medidas repetidas en el tiempo, dos tratamientos fueron evaluados, 15 cebadores y cuatro repeticiones para un total de 120 unidades experimentales. Para el análisis de las muestras se utilizó un Análisis de Varianza y una separación Duncan para comparar los tratamientos y una separación de Medias usando Cuadrados Mínimos (LSMEANS) para comparar las medias de cada tratamiento a través del tiempo. El nivel de significancia utilizado fue de $\alpha < 0.05$. Los resultados se analizaron con el “Statistical Analysis System” (SAS® Versión 9.4).

Cuadro 1. Conjunto de cebadores utilizados en este estudio para el análisis de PCR en tiempo real.

Cebadores	Clasificación
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Especie
<i>Bacteroides fragilis</i>	Especie
<i>Bacteroides prevotella</i>	Género
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Especie
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Especie
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Especie
<i>Eubacterium hallii</i>	Especie
<i>Ruminococcaceae</i>	Familia
<i>Clostridium butyricum</i>	Especie
<i>Euryarchaeota</i>	Filo
<i>Verrucomicrobia</i>	Filo
<i>Faecalibacterium</i>	Género
<i>Bacteroidetes</i>	Filo
<i>Firmicutes</i>	Filo
<i>E. coli</i>	Especie

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Efecto de los compuestos fenólicos del extracto de cacao y mango en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas.

Caracterización de los extractos de mango y cacao. La concentración del extracto de mango utilizado fue de 6000 mg/L GAE. Se analizó el extracto de mango mediante HPLC-MS a una absorbancia de 280 nm y se identificaron los siguientes compuestos: Monogaloil-glucosido (pico 1), ácido gálico (pico 2), 1,2,3,4,6-pentagaloil-glucosa (pico 3), hexa-O-Galoil-glucosa (pico 4), hepta-O-Galoil-glucosa (pico 5), octa-O-Galoil-glucosa (pico 6) y nona-O-Galoil-glucosa (pico 7) (figura 1).

Estudios relacionados también han identificado la presencia principalmente de ácido gálico libre y galotaninos en el mango, así como la presencia de los ácidos clorogénico, protocatequico y vainillico en la pulpa de mango variedad Ataulfo (Kim *et al.* 2009; Palafox-Carlos *et al.* 2012).

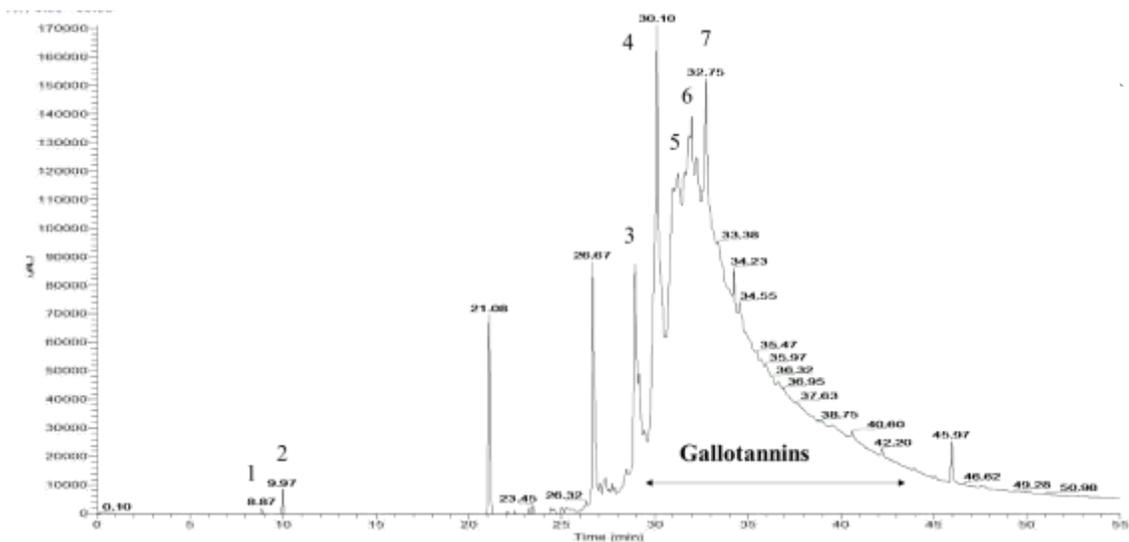


Figura 1. Cromatograma de HPLC-MS representativo a 280 nm de los compuestos fenólicos en el extracto de mango (*Mangifera indica* var. Ataulfo). Se identificaron los siguientes compuestos: (1) Monogaloil-glucosido, (2) ácido gálico, (2) 1,2,3,4,6-pentagaloil-glucosa, (4) hexa-O-Galoil-glucosa, (5) hepta-O-Galoil-glucosa, (6) octa-O-Galoil-glucosa y (7) nona-O-Galoil-glucosa.

El extracto de cacao presentó una concentración inicial de 4713 mg/L GAE. Se analizó mediante HPLC-MS a 280 nm de absorbancia. El extracto presentó en su composición taninos condensados tales como catequina, epicatequina (m/z 289) y derivados de estos compuestos los cuales mostraron en su estructura unidades de epicatequina (figura 2). Similar a estos resultados, otros estudios también identifican a la catequina, epicatequina y dímeros derivados de estos compuestos dentro de los compuestos fenólicos presentes en el cacao, al igual que algunos antioxidantes como quercetina, quercetina 3-glicósido, y quercetina 3-arabinósido (Sanbongi *et al.* 1998).

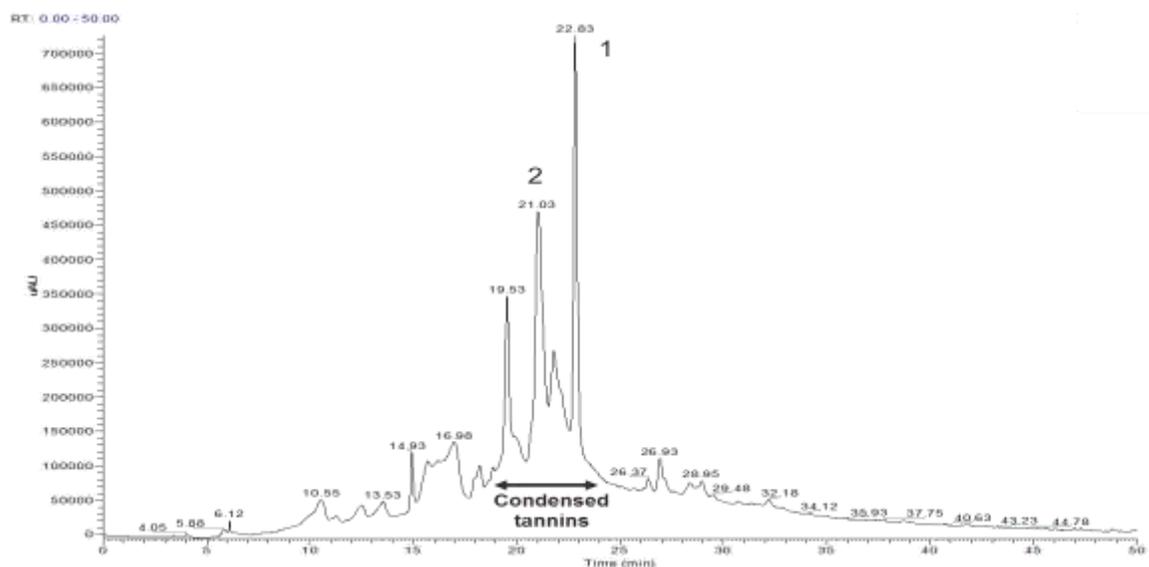


Figura 2 Cromatograma de HPLC-MS representativo a 280 nm de los compuestos fenólicos en el extracto de cacao (*Theobroma cacao*). Se identificaron los siguientes compuestos: (1) Compuesto A, derivado de catequina, (2) Compuesto B, derivado de catequina.

Viabilidad y curva de crecimiento de las bacterias probióticas. El grupo de bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium bifidum*) presentó una concentración inicial de 1.78×10^9 UFC/cápsula.

Evaluación del efecto de los compuestos fenólicos del mango (gallotaninos) y del cacao (epicatequina) en el crecimiento de las bacterias probióticas. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de mango en el crecimiento del grupo de bacterias probióticas. Se utilizó un BCA, donde cada bloque estuvo determinado por cada repetición, y los factores fueron seis tratamientos (concentraciones del extracto de mango) y siete tiempos. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre tratamientos, entre tiempos y en la interacción entre ambos factores (tratamientos y tiempos). En la interacción entre los factores, evaluada por LSMEAN, se encontró que el extracto de mango ejerce un efecto estimulante en el crecimiento de las bacterias probióticas con dependencia a la concentración del extracto y al tiempo. Es decir que a medida se incrementó la concentración del extracto de mango y el tiempo, el efecto positivo en el crecimiento de las bacterias fue mayor. Consecuentemente, a 48 horas de incubación con una concentración

de 200 mg/L GAE del extracto de mango se obtuvo el mayor efecto estimulante en las bacterias probióticas (Cuadro 2).

Del mismo modo, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de cacao en el crecimiento del grupo de bacterias probióticas. Al igual que con el extracto de mango, se aplicó un BCA, donde cada bloque estuvo determinado por cada repetición, y los factores fueron seis tratamientos (concentraciones del extracto de cacao) y siete tiempos. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre tratamientos, entre tiempos y en la interacción entre ambos factores (tratamientos y tiempos). La interacción entre los factores, evaluada por LSMEAN, presentó, al igual que en el extracto de mango, un efecto estimulante en el crecimiento de las bacterias probióticas con dependencia a la concentración del extracto y al tiempo. Por ende, a 48 horas de incubación con una concentración de 200 mg/L GAE del extracto de cacao se obtuvo el mayor crecimiento de las bacterias probióticas (Cuadro 3).

Estudios similares han demostrado que los compuestos fenólicos influyen en el crecimiento de algunas bacterias incluyendo probióticos. La Catequina (100 a 400 μM) ha presentado efecto estimulante en el crecimiento de *Lactobacillus casei* (Duda-Chodak *et al.* 2008). Del mismo modo, compuestos fenólicos, ácido gálico y (+) – catequina, a concentraciones normalmente presentes en el vino, presentaron un efecto estimulante en el crecimiento *Lactobacillus hilgardii* 5w (Alberto *et al.* 2001). Así mismo, compuestos fenólicos presentes en un extracto de semilla de uva enriquecido con flavan-3-ol (GSE) ejercieron efectos positivos en el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium breve* 26M2 y *Bifidobacterium bifidum* HDD541 (Tabasco *et al.* 2011).

Los probióticos son importantes en la industria debido a su incorporación en matrices de alimentos (leche, yogures, cereales, queso, salchichas, galletas, helados, entre otros) para garantizar su supervivencia óptima con el fin de proporcionar beneficios a la salud como disminuir el colesterol sérico, aliviar intolerancia a la lactosa, mejorar la salud intestinal y la prevención del cáncer (Vandenplas *et al.* 2015; Kechagia *et al.* 2013; O'Bryan *et al.* 2013). Los resultados de este estudio demostraron que los compuestos fenólicos (gallotaninos y epicatequina) presentes en los extractos de mango y cacao potenciaron el crecimiento de las bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* and *Bifidobacterium bifidum*). Estos resultados sugieren que la inclusión de probióticos en alimentos acompañado del consumo de frutos como cacao o mango (los cuales presentan en su composición compuestos fenólicos) probablemente potenciaría el crecimiento de estos probióticos incrementando sus efectos benéficos en la salud. Sin embargo, es necesario realizar una investigación enfocada a la evaluación de la ingesta de estos frutos acompañados con probióticos para poder asegurar estos resultados.

Cuadro 2. Efecto del extracto de mango (*Manguifera Indica* var. Ataulfo) a diferentes concentraciones en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* and *Bifidobacterium bifidum*).

Concentraciones (mg/L GAE ¹)	Crecimiento (absorbancia relativa expresada como porcentaje ²) según tiempo de incubación						
	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
0	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(ab)}	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}
12.5	95.98±2.69 ^{A(b)}	91.78±1.43 ^{A(b)}	96.04±2.43 ^{A(a)}	96.10±2.43 ^{A(a)}	107.27±1.10 ^{B(b)}	115.12±0.91 ^{C(b)}	119.11±8.82 ^{C(b)}
25	96.18±3.01 ^{A(b)}	95.01±3.56 ^{A(b)}	97.47±0.81 ^{A(a)}	102.49±2.71 ^{A(b)}	114.48±3.07 ^{B(c)}	114.77±3.62 ^{B(b)}	134.52±2.46 ^{C(c)}
50	98.43±2.37 ^{A(ab)}	100.52±3.36 ^{A(a)}	121.13±1.99 ^{B(b)}	128.99±3.86 ^{C(c)}	144.60±7.44 ^{D(d)}	147.36±10.8 ^{D(c)}	159.96±5.04 ^{E(d)}
100	105.10±2.58 ^{A(c)}	101.55±3.10 ^{A(a)}	126.54±3.90 ^{B(c)}	136.65±4.95 ^{C(d)}	144.12±0.71 ^{CD(d)}	148.23±11.24 ^{D(c)}	171.41±3.10 ^{E(d)}
200	109.46±4.24 ^{A(d)}	145.22±3.25 ^{B(c)}	171.44±3.68 ^{C(d)}	182.96±1.41 ^{D(e)}	197.20±5.65 ^{E(e)}	221.90±11.83 ^{F(d)}	247.71±13.62 ^{G(e)}

¹GAE: Acido gálico equivalente

²Los valores representan el valor de la absorbancia de la muestra que contiene el cultivo de bacterias probióticas con diferentes concentraciones del extracto de mango expresados como porcentaje con respecto al valor de absorbancia del control positivo (absorbancia de las baterías probióticas cultivadas en el medio en ausencia del extracto de mango). Los resultados se expresan como el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

^{ABC}Percentages seguido con diferentes letras mayúsculas entre las columnas presentan diferencias significativas (P <0,05) entre los tiempos de cada tratamiento.

^{Abc}Percentages seguido por diferentes letras minúsculas entre las filas muestran diferencias significativas (P <0.05) entre los tratamientos.

Cuadro 3. Efecto del extracto de Cacao (*Theobroma cacao*) a diferentes concentraciones en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* and *Bifidobacterium bifidum*).

Concentraciones (mg/L GAE ¹)	Crecimiento (absorbancia relativa expresada como porcentaje ²) según tiempo de incubación						
	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
0	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}	100.00 ^{A(a)}
12.5	99.42±1.85 ^{AB(ac)}	90.67±1.20 ^{A(b)}	108.22±5.13 ^{BC(a)}	112.78±14.89 ^{C(ab)}	112.62±7.16 ^{C(b)}	125.41±3.99 ^{D(b)}	137.55±7.58 ^{E(b)}
25	97.22±1.98 ^{A(b)}	89.82±0.17 ^{A(b)}	117.15±13.32 ^{BC(b)}	111.92±15.19 ^{B(ab)}	112.47±7.20 ^{B(b)}	127.09±3.02 ^{C(b)}	124.11±2.70 ^{C(c)}
50	99.32±1.72 ^{A(ac)}	91.25±1.21 ^{A(b)}	120.83±5.68 ^{BC(bc)}	116.28±8.21 ^{B(b)}	120.72±10.68 ^{BC(c)}	124.81±4.86 ^{BC(b)}	130.66±6.37 ^{C(d)}
100	97.63±1.12 ^{A(cd)}	91.59±1.64 ^{A(b)}	128.34±2.23 ^{B(c)}	111.11±13.57 ^{C(ab)}	115.97±6.13 ^{C(bc)}	130.22±5.61 ^{B(b)}	138.04±4.20 ^{B(b)}
200	102.11±1.18 ^{A(d)}	102.77±2.63 ^{A(c)}	145.72±6.42 ^{BC(d)}	138.76±19.14 ^{B(c)}	137.35±4.41 ^{B(d)}	150.28±7.59 ^{C(c)}	161.99±3.39 ^{D(e)}

¹GAE: Acido gálico equivalente.

²Los valores representan el valor de la absorbancia de la muestra que contiene el cultivo de bacterias probióticas con diferentes concentraciones del extracto de cacao expresados como porcentaje con respecto al valor de absorbancia del control positivo (absorbancia de las bacterias probióticas cultivadas en el medio en ausencia del extracto de cacao). Los resultados se expresan como el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

^{ABC}Porcentajes seguidos con diferentes letras mayúsculas entre las columnas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos de cada tratamiento.

^{abc}Porcentajes seguidos de diferentes letras minúsculas entre las filas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre los tratamientos.

Fase II. Evaluación de la actividad tanasa del grupo de bacterias probióticas utilizando los compuestos fenólicos presentes en el extracto de mango.

Los polifenoles normalmente se encuentran presentes en los alimentos en formas no biodisponibles con estructuras de alto peso molecular (taninos y flavonoides). Estos compuestos pueden ser metabolizados por nuestro organismo mediante enzimas intestinales y hepáticas, y la microflora intestinal (Manach *et al.* 2004). Tanasa (tanino acilhidrolasa), es una enzima que rompe específicamente los enlaces de ésteres de galoyl de los taninos. Esta enzima puede ser producida por hongos, levaduras y cepas bacterianas (incluyendo cepas bacterianas del tracto digestivo humano) (Osawa *et al.* 2000; Natarajan 2009)

Se evaluó la actividad tanasa en el grupo de bacterias probióticas mediante el ensayo espectrofotométrico de rodanina, en el cual la liberación de ácido gálico por acción de la tanasa presente en las bacterias reacciona con la rodanina (2-tio-4-cetotiazolidina) causando formación de cromógeno que se absorbe a 520 nm (Sharma *et al.* 2000). Se utilizó un BCA, donde cada bloque estuvo determinado por cada repetición, y los factores fueron dos tratamientos (medio con extracto de mango a 200 ppm GAE con y sin presencia de las bacterias probióticas) y siete tiempos.

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre tratamientos, entre tiempos y en la interacción entre ambos factores (tratamientos y tiempos) (Cuadro 4). En la interacción entre los factores, evaluada por LSMEAN, se encontró un incremento en la producción de ácido gálico libre a través del tiempo en el tratamiento (medio con extracto de mango a 200 ppm GAE en presencia de las bacterias probióticas) en comparación al control (medio con extracto de mango a 200 ppm GAE en ausencia de las bacterias probióticas).

La producción de tanasa por medio de fuentes bacterianas es una de las más importantes ya que produce enzimas más estables y consistentes en comparación a otras fuentes de la misma enzima (Sabu *et al.* 2006). Los resultados obtenidos en esta investigación expresan la existencia de producción de tanasa dentro del grupo de bacterias probióticas. Estos resultados se confirman, ya que dentro de las especies bacterianas productoras de tanasa se encuentra *Lactobacillus* sp. incluyendo *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paraplantarum*, entre otros (Aguilar-Zárate *et al.* 2014). Además la presencia de esta enzima en este grupo de bacterias probióticas se podría relacionar con la conversión de los polifenoles presentes en nuestra dieta en metabolitos biodisponibles potenciando la absorción de estos compuestos en nuestro organismo. Sin embargo, se requeriría continuar estos resultados con otros estudios enfocados en identificar específicamente las bacterias capaces de producir esta enzima dentro del grupo de bacterias probióticas analizadas, y los metabolitos resultantes después de la fermentación con polifenoles para importancia en la salud.

Cuadro 4. Actividad tanasa de las bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* and *Bifidobacterium bifidum*) incubadas con extracto de mango (*Manguifera Indica* variedad Ataulfo).

Tiempo (horas)	Actividad tanasa ¹ según tratamientos	
	Control ²	BP ³
0	0.040±0.0014 ^{A(a)}	0.049±0.0013 ^{B(a)}
1	0.042±0.0016 ^{A(a)}	0.094±0.0099 ^{B(b)}
3	0.043±0.0018 ^{A(a)}	0.104±0.0049 ^{B(c)}
6	0.042±0.0026 ^{A(a)}	0.108±0.0042 ^{B(c)}
12	0.047±0.0032 ^{A(ab)}	0.144±0.0069 ^{B(d)}
24	0.055±0.0045 ^{A(b)}	0.176±0.0131 ^{B(e)}
48	0.092±0.0032 ^{A(c)}	0.215±0.0384 ^{B(f)}

¹Los valores representan la absorbancia a 520 nm de la formación de cromógeno por la reacción entre el ácido gálico liberado por acción de la tanasa y la rodanina. Los resultados se expresan como el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

²Control: medio con extracto de mango a 200 ppm de ácido gálico equivalente en ausencia de las bacterias probióticas,

³BP: medio con extracto de mango a 200 ppm de ácido gálico equivalente con presencia de las bacterias probióticas.

^{ABC}Medias seguidas con diferentes letras mayúsculas entre las columnas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.

^{abc}Medias seguidas de diferentes letras minúsculas entre las filas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos de fermentación.

Fase III. Evaluación del efecto de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de cacao y mango en la población de bacterias específicas de la microbiota humana.

Los compuestos fenólicos siendo metabolitos secundarios de la mayoría de alimentos de origen vegetal, presentan una interacción bidireccional con la microbiota intestinal humana, en la cual, las bacterias metabolizan estos compuestos y a su vez el crecimiento y la capacidad metabólica de estas bacterias se ven afectadas por estos compuestos y sus metabolitos (Cueva Sánchez *et al.* 2012). En este estudio se evaluó el efecto de los compuestos fenólicos del extracto de mango y cacao en la población de la microbiota humana en 15 cebadores. Se utilizó un DCA, donde las variables evaluadas fueron los dos tratamientos para cada extracto en 15 cebadores a través del tiempo (tres diferentes tiempos).

Se encontró diferencia estadística significativa entre el tratamiento control y el tratamiento con extracto de mango (P<0.05); éste último presentó una reducción en la población de las bacterias *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides prevotella*, *Eubacterium hallii* y *E. coli*, a diferencia de *Bacteroides Vulgatus*, *Bifidobacterium adolescencis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Ruminococcaceae*, *Euryarchaeota* y *Bacteroidetes* las cuales presentaron un incremento en su población en comparación al control (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del extracto de mango (*Manguifera indica* var. Ataulfo) en el crecimiento de la microbiota humana.

Bacterias	Log ADN (fg) ¹	
	Control ²	TM ³
<i>Bacteroides fragilis</i>	7.45±0.0933	6.92±0.4142*
<i>Bacteroides prevotella</i>	8.28±0.1215	7.99±0.2312*
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	7.70±0.1074	6.82±0.7742*
<i>Bacteroides vulgatus</i>	3.54±0.3492	4.07±0.4607*
<i>Bacteroidetes</i>	7.57±0.1993	7.72±0.2879*
<i>Bifidobacterium adolescencis</i>	2.18±0.2831	2.94±0.6334*
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	5.68±0.4470	6.27±0.2676*
<i>Eubacterium hallii</i>	5.09±0.0946	4.94±0.1250*
<i>E. coli</i>	7.01±0.4632	6.89±0.2785*
<i>Euryarchaeota</i>	7.49±0.4839	7.71±0.2698*
<i>Ruminococcaceae</i>	5.53±0.3159	5.85±0.4336*

¹Medias presentadas como logaritmos de ADN en fentogramos ± la desviación estándar.

²Control: Medio pre reducido + cultivo de inoculación.

³TM: medio pre reducido + extracto de mango a 200 ppm de ácido gálico equivalente.

*Diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

Se encontró diferencia estadística significativa entre tiempos (0, 24 y 48 horas) en los 15 cebadores analizados (P<0.05). Hubo una reducción poblacional a través del tiempo en *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Clostridium butyricum*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes* y *Verrucomicrobia*, mientras *Bacteroidetes* y *E. coli* incrementaron su población a través del tiempo y *Bacteroides prevotella*, *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium adolescencis*, *Eubacterium hallii*, *Faecalibacterium* y *Ruminococcaceae* presentaron cambios a las 24 horas sin embargo, a las 48 horas volvieron a su población inicial (Cuadro 6).

Así mismo, se evaluó el efecto del extracto de mango a través del tiempo y en comparación con el tratamiento control. Se encontró diferencia estadística significativa en 12 cebadores. El extracto de mango presentó un efecto reductivo en la población de *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium hallii*, *E. coli* y *Faecalibacterium* los cuales presentaron valores poblacionales menores a las 48 horas de incubación, en comparación al control. Además, *Bacteroides prevotella*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroidetes* y *Ruminococcaceae* presentaron cambios poblacionales a través del tiempo, sin embargo, a las 48 horas no se encontraron diferencias significativas en comparación al control. Por otra parte, *Bifidobacterium adolescencis*, *Bifidobacterium catenulatum* y *Euryarchaeota* incrementaron su población a las 24 horas pero presentaron una reducción a las 48 horas, sin embargo, siempre presentaron un incremento poblacional en comparación al control a excepción de *Euryarchaeota* el cual presenta una reducción a través del tiempo, sin embargo, en comparación al control presento una mayor población (Cuadro 7).

Cuadro 6. Efecto del extracto de mango (*Manguifera indica* var. Ataulfo) en el crecimiento de la microbiota humana a través del tiempo.

Bacterias	Log ADN (fg) ¹		
	0 h	24 h	48 h
<i>Bacteroides fragilis</i>	7.37±0.0487 ^A	7.00±0.5523 ^B	7.19±0.3818 ^C
<i>Bacteroides prevotella</i>	8.22±0.1407 ^A	8.04±0.3383 ^B	8.14±0.1578 ^{AB}
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	7.60±0.0480 ^A	6.82±0.9961 ^B	7.35±0.5102 ^C
<i>Bacteroides vulgatus</i>	3.64±0.2703 ^A	4.17±0.4233 ^B	3.59±0.5254 ^A
<i>Bacteroidetes</i>	7.34±0.0809 ^A	7.75±0.1705 ^B	7.84±0.1226 ^B
<i>Bifidobacterium adolescencis</i>	2.41±0.2200 ^A	2.99±0.8168 ^B	2.27±0.4424 ^A
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	6.24±0.1017 ^A	5.89±0.7126 ^B	5.79±0.2877 ^B
<i>Clostridium butyricum</i>	5.90±0.0790 ^A	5.21±0.0871 ^B	4.99±0.1547 ^C
<i>Eubacterium hallii</i>	5.07±0.1198 ^A	4.95±0.1102 ^B	5.03±0.1452 ^A
<i>E. coli</i>	6.54±0.0948 ^A	6.97±0.1321 ^B	7.34±0.2788 ^C
<i>Euryarchaeota</i>	8.01±0.2035 ^A	7.55±0.0707 ^B	7.23±0.3610 ^C
<i>Faecalibacterium</i>	3.51±0.1104 ^A	3.40±0.1136 ^B	3.47±0.1060 ^{AB}
<i>Firmicutes</i>	6.26±0.0347 ^A	6.25±0.0618 ^A	6.13±0.0903 ^B
<i>Verrucomicrobia</i>	4.60±0.3792 ^A	4.35±0.2007 ^A	3.99±0.3921 ^B
<i>Ruminococcaceae</i>	5.93±0.0596 ^A	5.37±0.0679 ^B	5.76±0.5854 ^A

¹Medias presentadas como logaritmos de ADN en fentogramos ± la desviación estándar.

^{ABC}Medias seguidas con diferentes letras mayúsculas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos en cada bacteria.

Del mismo modo, al evaluar el efecto del extracto de cacao en la población de la microbiota humana se encontró diferencia estadística significativa entre el tratamiento control y el tratamiento con extracto de cacao en *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides prevotella*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium adolescencis*, *Eubacterium hallii*, *E. coli*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes* y *Ruminococcaceae*. En el caso de *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides prevotella*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Eubacterium hallii* presentaron una reducción poblacional en presencia del tratamiento con extracto de cacao en comparación al control, mientras que *Bifidobacterium adolescencis*, *E. coli*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes* y *Ruminococcaceae* presentaron un incremento poblacional en presencia del tratamiento con extracto de cacao en comparación al control (Cuadro 8).

Se encontró diferencia significativa entre tiempos (0, 24 y 48 horas) en diez cebadores analizados, de los cuales *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides prevotella*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium butyricum*, *Euryarchaeota* y *Ruminococcaceae* presentaron una reducción en su población a través del tiempo. Por otra parte, *Bacteroidetes* y *E. coli* presentaron un incremento poblacional a través del tiempo, mientras *Bacteroides vulgatus* y *Bifidobacterium catenulatum* presentaron cambios poblacionales a las 24 horas, sin embargo a las 48 horas sus poblaciones no presentaron diferencia estadística significativa en comparación a la población inicial de cada uno (Cuadro 9).

Cuadro 7. Efecto del extracto de mango (*Manguifera indica* var. Ataulfo) en el crecimiento de la microbiota humana con diferencias significativas en la interacción entre los tratamientos y el tiempo.

Bacterias	Trt ¹	Log ADN (fg) ²		
		0 h	24 h	48 h
<i>Bacteroides fragilis</i>	Control ³	7.37±0.0526 ^{Aa}	7.51±0.1090 ^{Aa}	7.48±0.0403 ^{Aa}
	TM ⁴	7.37±0.0526 ^{Aa}	6.50±0.1241 ^{Bb}	6.89±0.3276 ^{Cb}
<i>Bacteroides prevotella</i>	Control	8.22±0.1520 ^{Aa}	8.35±0.0739 ^{Aa}	8.26±0.1183 ^{Aa}
	TM	8.22±0.1520 ^{Aa}	7.73±0.0774 ^{Bb}	8.02±0.0683 ^{Ca}
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Control	7.60±0.5190 ^{Aa}	7.73±0.0961 ^{Aa}	7.75±0.1097 ^{Aa}
	TM	7.60±0.0519 ^{Aa}	5.91±0.2775 ^{Bb}	6.95±0.4095 ^{Ca}
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Control	3.64±0.2920 ^{Aa}	3.79±0.1247 ^{Aa}	3.18±0.2719 ^{Ba}
	TM	3.64±0.2920 ^{Aa}	4.56±0.1113 ^{Bb}	4.01±0.3286 ^{Ca}
<i>Bacteroidetes</i>	Control	7.34±0.0874 ^{Aa}	7.62±0.1485 ^{Ba}	7.74±0.0528 ^{Ba}
	TM	7.34±0.0874 ^{Aa}	7.88±0.0436 ^{Bb}	7.94±0.0817 ^{Ba}
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Control	2.41±0.2376 ^{Aa}	2.24±0.0786 ^{Aa}	1.89±0.2054 ^{Ba}
	TM	2.41±0.2376 ^{Aa}	3.76±0.0989 ^{Bb}	2.65±0.1720 ^{Ab}
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Control	6.24±0.1098 ^{Aa}	5.24±0.1104 ^{Ba}	5.56±0.1281 ^{Ca}
	TM	6.24±0.1098 ^{Aa}	6.54±0.2262 ^{Bb}	6.03±0.1616 ^{Ab}
<i>Eubacterium hallii</i>	Control	5.07±0.1294 ^{ABa}	5.03±0.0468 ^{Aa}	5.16±0.0332 ^{Ba}
	TM	5.07±0.1294 ^{Aa}	4.86±0.0852 ^{Bb}	4.90±0.0181 ^{Bb}
<i>E. coli</i>	Control	6.54±0.1024 ^{Aa}	6.90±0.0708 ^{Ba}	7.59±0.1089 ^{Ca}
	TM	6.54±0.1024 ^{Aa}	7.05±0.1478 ^{Ba}	7.09±0.0588 ^{Cb}
<i>Euryarchaeota</i>	Control	8.01±0.2198 ^{Aa}	7.53±0.0800 ^{Ba}	6.92±0.1326 ^{Ca}
	TM	8.01±0.2198 ^{Aa}	7.58±0.0591 ^{Ba}	7.54±0.1879 ^{Bb}
<i>Ruminococcaceae</i>	Control	5.93±0.0644 ^{Aa}	5.34±0.0681 ^{Ba}	5.29±0.1540 ^{Aa}
	TM	5.93±0.0644 ^{Aa}	5.39±0.0719 ^{Ba}	6.23±0.4416 ^{Ba}
<i>Faecalibacterium</i>	Control	3.51±0.1193 ^{Aa}	3.31±0.0755 ^{Ba}	3.54±0.0819 ^{Aa}
	TM	3.51±0.1193 ^{Aa}	3.50±0.0461 ^{Ab}	3.39±0.0635 ^{Bb}

¹Trt: Tratamientos.

²Medias presentadas como logaritmos de ADN en fentogramos ± la desviación estándar.

³Control: Medio pre reducido + cultivo de inoculación.

⁴TM: medio pre reducido + extracto de mango a 200 ppm de ácido gálico equivalente.

^{ABC}Medias seguidas con diferentes letras mayúsculas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos en cada bacteria.

^{abc}Medias seguidas de diferentes letras minúsculas entre las filas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.

Cuadro 8. Efecto del extracto de Cacao (*Theobroma cacao*) en el crecimiento de la microbiota humana.

Bacterias	Log ADN (fg) ¹	
	Control ²	TC ³
<i>Bacteroides fragilis</i>	7.45±0.9333	7.09±0.5498*
<i>Bacteroides prevotella</i>	8.28±0.1215	8.06±0.2869*
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	7.70±0.1774	7.16±0.7190*
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.18±0.2831	2.86±0.9720*
<i>Eubacterium hallii</i>	5.09±0.0946	4.98±0.1508*
<i>E. coli</i>	7.01±0.4632	7.10±0.4978*
<i>Euryarchaeota</i>	7.49±0.4839	7.70±0.3152*
<i>Firmicutes</i>	6.19±0.0963	6.30±0.0596*
<i>Ruminococcaceae</i>	5.53±0.3159	5.87±0.4021*

¹Medias presentadas como logaritmos de ADN en fentogramos ± la desviación estándar.

²Control: Medio pre reducido + cultivo de inoculación.

³TC: medio pre reducido + extracto de cacao a 200 ppm de ácido gálico equivalente.

*Diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

Cuadro 9. Efecto del extracto de Cacao (*Theobroma cacao*) en el crecimiento de la microbiota humana a través del tiempo.

Bacterias	Log ADN (fg) ¹		
	0 h	24 h	48 h
<i>Bacteroides fragilis</i>	7.37±0.0487 ^A	7.51±0.0724 ^A	6.93±0.6228 ^B
<i>Bacteroides prevotella</i>	8.22±0.1407 ^A	8.30±0.1279 ^A	7.99±0.3131 ^B
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	7.60±0.0481 ^A	7.70±0.0847 ^A	6.98±0.8458 ^B
<i>Bacteroides vulgatus</i>	3.64±0.2703 ^{AB}	3.85±0.3008 ^A	3.38±0.2848 ^B
<i>Bacteroidetes</i>	7.34±0.0809 ^A	7.50±0.1660 ^B	7.82±0.0905 ^C
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	6.24±0.1017 ^A	5.20±1.1497 ^B	5.75±0.2390 ^{AB}
<i>Clostridium butyricum</i>	5.90±0.0790 ^A	5.19±0.1255 ^B	5.03±0.3327 ^B
<i>E. coli</i>	6.54±0.0948 ^A	7.29±0.4220 ^B	7.34±0.3007 ^B
<i>Euryarchaeota</i>	8.01±0.2035 ^A	7.63±0.1663 ^B	7.14±0.2559 ^C
<i>Ruminococcaceae</i>	5.93±0.0596 ^A	5.37±0.0600 ^B	5.80±0.5529 ^C

¹Medias presentadas como logaritmos de ADN en fentogramos ± la desviación estándar.

^{ABC}Medias seguidas con diferentes letras mayúsculas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos en cada bacteria.

Así mismo, se evaluó el efecto del tratamiento con extracto de mango en comparación al control a través del tiempo encontrándose diferencia estadística significativa en nueve cebadores. El tratamiento con extracto de cacao presentó una reducción en la población de *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides prevotella* y *Eubacterium hallii*, los cuales, presentaron valores poblacionales menores a través del tiempo y en comparación al control. *E. coli* presentó un incremento poblacional a las 24 horas, pero a las 48 horas presentó una reducción poblacional, y en comparación al control presentó

valores poblacionales menores. *Faecalibacterium* y *Bacteroidetes* presentaron un incremento a las 24 horas en comparación al control, aunque a 48 horas no presentaron diferencias estadísticas significativas en comparación al control. Por otro lado, *Firmicutes* y *Ruminococcaceae* presentaron un incremento poblacional a las 48 horas en comparación al control (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto del extracto de Cacao (*Theobroma cacao*) en el crecimiento de la microbiota humana con diferencias significativas en la interacción entre los tratamientos y el tiempo.

Bacterias	Trt ¹	Log ADN (fg) ²		
		0 h	24 h	48 h
<i>Bacteroides fragilis</i>	Control ³	7.37±0.0526 ^{Aa}	7.51±0.1090 ^{Aa}	7.48±0.0403 ^{Aa}
	TC ⁴	7.37±0.0526 ^{Aa}	7.51±0.0183 ^{Aa}	6.38±0.3209 ^{Bb}
<i>Bacteroides prevotella</i>	Control	8.22±0.1520 ^{Aa}	8.35±0.0739 ^{Aa}	8.26±0.1183 ^{Aa}
	TC	8.22±0.1520 ^{Aa}	8.24±0.1563 ^{Aa}	7.72±0.1280 ^{Bb}
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Control	7.60±0.0519 ^{Aa}	7.73±0.0961 ^{Aa}	7.75±0.1097 ^{Aa}
	TC	7.60±0.0519 ^{Aa}	7.67±0.0657 ^{Aa}	6.20±0.2428 ^{Bb}
<i>Bacteroidetes</i>	Control	7.34±0.0874 ^{Aa}	7.62±0.1485 ^{Ba}	7.74±0.0528 ^{Ba}
	TC	7.34±0.0874 ^{Aa}	7.38±0.0544 ^{Ab}	7.89±0.0495 ^{Ba}
<i>Eubacterium hallii</i>	Control	5.07±0.1294 ^{ABa}	5.03±0.0468 ^{Aa}	5.16±0.0332 ^{Ba}
	TC	5.07±0.1294 ^{Aa}	5.04±0.0768 ^{Aa}	4.83±0.1220 ^{Bb}
<i>E. coli</i>	Control	6.54±0.1024 ^{Aa}	6.90±0.0708 ^{Ba}	7.59±0.1089 ^{Ca}
	TC	6.54±0.1024 ^{Aa}	7.68±0.0642 ^{Bb}	7.09±0.1651 ^{Cb}
<i>Faecalibacterium</i>	Control	3.51±0.1193 ^{Aa}	3.31±0.0755 ^{Ba}	3.54±0.0819 ^{Aa}
	TC	3.51±0.1193 ^{Aa}	3.58±0.0976 ^{Ab}	3.43±0.1531 ^{Ba}
<i>Firmicutes</i>	Control	6.26±0.0375 ^{Aa}	6.23±0.0660 ^{Aa}	6.09±0.0769 ^{Ba}
	TC	6.26±0.0375 ^{Aa}	6.26±0.0133 ^{Aa}	6.37±0.0410 ^{Bb}
<i>Ruminococcaceae</i>	Control	5.93±0.0644 ^{Aa}	5.35±0.0681 ^{Ba}	5.29±0.1540 ^{Ba}
	TC	5.93±0.0644 ^{Aa}	5.38±0.0559 ^{Ba}	6.31±0.0775 ^{Cb}

¹Trt: Tratamientos.

²Medias presentadas como logaritmos de ADN en fentogramos ± la desviación estándar.

³Control: Medio pre reducido + cultivo de inoculación.

⁴TC: medio pre reducido + extracto de cacao a 200 ppm de ácido gálico equivalente.

^{ABC}Medias seguidas con diferentes letras mayúsculas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos en cada bacteria.

^{abc}Medias seguidas de diferentes letras minúsculas entre las filas presentan diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.

Algunos estudios indican que los compuestos fenólicos pueden actuar como prebióticos metabólicos en la microbiota humana mostrando un efecto positivo en el crecimiento de algunas bacterias probióticas, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Gwiazdowska *et al.* 2015). Resultados similares se obtuvieron en este estudio con un incremento poblacional en *Bifidobacterium adolescentis*, en el caso del extracto de cacao y en el del extracto de

mango presento un incremento poblacional en *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium catenolatum*. No obstante, se presentó en ambos extractos una reducción en *Eubacterium halii*, la cual es una bacteria importante en la formación de ácidos grasos cortos, producción de butirato e hidrógeno en nuestro organismo (Engels *et al.* 2016).

La importancia de las bacterias probióticas presentes en la microbiota humana se debe a los efectos positivos que ejercen en el tránsito luminal manteniendo homeostasis intestinal y evitando disbiosis (perturbaciones en la composición de la microbiota) (Hemarajata y Versalovic 2013). Estudios recientes han relacionado la disbiosis con trastornos intestinales (tales como, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable (IBS) y enfermedad celíaca) y extra intestinales (alergia, asma, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y obesidad) (Carding *et al.* 2015; Cani y Delzenne 2009). Además, las bacterias probióticas también ayudan en la desintoxicación de xenobióticos (compuestos químicos extraños al organismo (van Baarlen *et al.* 2013; Hardy *et al.* 2013).

Por otra parte, en un estudio *in vitro* de los polifenoles en té (Epicatequina, catequina, 3-O metilo ácido gálico, ácido gálico) se presentan efectos inhibitorios en *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides spp*, *Clostridium spp.* y *Staphylococcus*, mientras *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son menos afectados (Lee *et al.* 2006). Estos resultados presentan relación con los obtenidos en esta investigación ya que en el mango y cacao se presentó un efecto reductivo en *Bacteroides fragillis*, *Bacteroides thetaromicron*, *Bacteroides prevotella*, esto debido a que el té posee algunos de los compuestos fenólicos presentes en el mango (ácido gallico) y cacao (epicatequina y catequina). Sin embargo, en ambos extractos el phyla *Bacteroidetes* presentó un incremento poblacional. Esto se puede explicar ya que en otros estudios realizados en ratas, el efecto de dietas enriquecidas con taninos presentó un efecto positivo en el crecimiento de Gram negativas como *Bacteroidetes* y *Enterobacteriaceae* y una reducción en el número de Gram negativas como *C. leptum* (Smith y Mackie 2004)

Al igual que este estudio, diferentes investigaciones reportan un efecto prebiótico de los compuestos fenólicos presentes en diferentes alimentos en bacterias benéficas presentes en la microbiota intestinal humana (Anhê *et al.* 2015; Bialonska *et al.* 2010; Dueñas *et al.* 2015; Larrosa *et al.* 2010). Los resultados en este estudio demuestran que los compuestos fenólicos presentes en el mango y cacao pueden ser usados como potenciales prebióticos dentro de nuestra dieta, favoreciendo el crecimiento de ciertas bacterias benéficas presentes en la microbiota humana, y por consiguiente, mantener la homeostasis intestinal. No obstante, es necesario continuar un estudio clínico para confirmar estos resultados.

4. CONCLUSIONES

- Los polifenoles del mango y cacao (galotaninos y epicatequina) ejercen un efecto estimulador en el crecimiento del grupo de bacterias probióticas evaluadas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* and *Bifidobacterium bifidum*).
- Se evidenció la existencia de actividad de tanasa en el grupo de bacterias probióticas evaluadas.
- Los compuestos fenólicos del cacao y mango pueden ayudar a modular la composición de la microbiota humana, ejerciendo efectos positivos en el crecimiento de *Bifidobacterium catenulatum*, *B. adolescentis*, *Ruminococcaceae*, *Euryarchaeota* y *Firmicutes*; y un efecto negativo en la población de *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. prevotella*, *Eubacterium hallii*, *E. coli* y *Faecalibacterium*.
- Los compuestos polifenólicos del mango y cacao pueden ser utilizados como potenciales prebióticos en la dieta.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de los compuestos fenólicos del mango y cacao en el crecimiento individual de cada una de las bacterias probióticas evaluadas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium bifidum*).
- Evaluar el efecto de los compuestos fenólicos del mango y del cacao en otras bacterias pertenecientes a la microbiota humana.
- Evaluar el efecto de los compuestos fenólicos del mango y del cacao en la proporción de *Firmicutes/Bacteroidetes* en la microbiota humana.
- Medir las expresiones de tanasa/ácido gálico descarboxilasa por (mRNA) en las diferentes bacterias de la microbiota humana después de su incubación con extracto de mango.
- Realizar un estudio *in vivo* en el cual se evalué el efecto de la ingesta de compuestos fenólicos (provenientes de cacao y mango) acompañados de probióticos, en la microbiota humana.

6. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Zárate P, Cruz-Hernández AM., Montañez CJ., Belmares-Cerda ER., Aguilar NC. 2014. Bacterial tannases: production, properties and applications. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. [Citado 2017 Junio 13]. 13(1):63–74. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62031166005>
- Alberto MR, Farías ME, Manca de Nadra, MC. 2001. Effect of Gallic Acid and Catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w: Growth and Metabolism of Organic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 49(9):4359–4363. doi:10.1021/jf0101915.
- Anhê FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, Garofalo C, Moine Q, Desjardins Y, Levy E, Marette A. 2015. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. 64(6):872–883. eng. doi:10.1136/gutjnl-2014-307142.
- Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR, Ferreira D. 2010. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *Int J Food Microbiol.* 140(2-3):175–182. eng. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.038.
- Cani PD, Delzenne NM. 2009. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol.* 9(6):737–743. eng. doi:10.1016/j.coph.2009.06.016.
- Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. 2015. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis.* 26:26191. eng.
- Cardona F, Andres-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuno MI. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem.* 24(8):1415–1422. eng. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.05.001.
- Cheyrier V. 2012. Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochem Rev.* 11(2-3):153–177. doi:10.1007/s11101-012-9242-8.
- Coronado HM, Vega y León S, Gutiérrez TR, Vázquez FM, Radilla VC. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición.* 42(2):206–212. doi:10.4067/S0717-75182015000200014.

- Creus Gimeno E. 2004. Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *Revista de la oficina de Farmacia*. [Citado 2017 Mayo 22]. 23(6):80–84. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>
- Cueva Sánchez C, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. 2012. Interacción de los compuestos fenólicos del vino con la microbiota intestinal: Papel de las bacterias lácticas [Tesis]. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid. 14 p.
- Dall'Asta M, Calani L, Tedeschi M, Jechiu L, Brighenti F, Del Rio D. 2012. Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition*. 28(2):197–203. eng. doi:10.1016/j.nut.2011.06.005.
- De la Cruz Medina J, García HS. 2002. Mango: Post-harvest Operations. AGSI/FAO. [2017 Mayo 22]. www.fao.org/3/a-av008e.pdf
- Duda-Chodak A, Tarko T, Statek M. 2008. The effect of antioxidants on *Lactobacillus casei* cultures. *Acta Scientiarum Polonorum*. [2017 Junio 6]. 7(4):39–51. http://www.food.actapol.net/pub/5_4_2008.pdf
- Dueñas M, Muñoz-González I, Cueva C, Jiménez-Girón A, Sánchez-Patán F, Santos-Buelga C, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B. 2015. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *Biomed Res Int*. 2015:850902. eng. doi:10.1155/2015/850902.
- Engels C, Ruscheweyh H-J, Beerenwinkel N, Lacroix C, Schwab C. 2016. The Common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to Intestinal propionate formation. *Front Microbiol*. 7:713. eng. doi:10.3389/fmicb.2016.00713.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas de la Agricultura y la Alimentación. 2004. Perspectiva a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Roma: FAO. 95 p. [2017 Junio 6]. <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s00.htm>
- García Bacallao L, García Gómez LV, Rojo Domínguez DM, Sánchez García E. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Cubana Invest Biomed*. [2017 Mayo 17]. 3(20):231–235. http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/plantas_con_propiedades_antioxidantes.pdf
- Gwiazdowska D, Jus K, Jasnowska-Malecka J, Kluczynska K. 2015. The impact of polyphenols on *Bifidobacterium* growth. *Acta Biochim Pol*. 62(4):895–901. eng. doi:10.18388/abp.2015_1154.
- Handique JG, Baruah JB. 2002. Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive and functional polymers*. 52:163–188. eng. doi:10.1016/S1381-5148(02)00091-3.
- Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. 2013. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 5(6):1869–1912. eng. doi:10.3390/nu5061869.

- Hayek N. 2013. Chocolate, gut microbiota, and human health. *Front Pharmacol.* 4:11. eng. doi:10.3389/fphar.2013.00011.
- Hemarajata P, Versalovic J. 2013. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol.* 6(1):39–51. eng. doi:10.1177/1756283X12459294.
- Heo HJ, Lee CY. 2005. Epicatechin and catechin in cocoa inhibit amyloid beta protein induced apoptosis. *J Agric Food Chem.* 53(5):1445–1448. eng. doi:10.1021/jf048989m.
- Hoyos LC, Noratto G. D. 2016. Aged American Cheddar cheese as source of protein derived compounds that modulate obese mice fecal bacteria and colon inflammation *in vitro*. *Journal of Nutritional Health & Food Science.* 4(5):1–10. eng. doi:10.15226/jnhfs.2016.00176.
- Inoue K, Hagerman A. 1988. Determination of Gallotannin with Rhodanine. *Analytical Biochemistry.* 169(363-369). eng. doi:10.1016/0003-2697(88)90296-5.
- Jalil AMM, Ismail A. 2008. Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules.* 13(9):2190–2219. eng. doi:10.3390/molecules13092190.
- Jiménez N, Curiel JA, Reveron I, Las Rivas B de, Muñoz R. 2013. Uncovering the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 gallate decarboxylase involved in tannin degradation. *Appl Environ Microbiol.* 79(14):4253–4263. eng. doi:10.1128/AEM.00840-13.
- Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM. 2013. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutr.* 2013:481651. eng. doi:10.5402/2013/481651.
- Kim H, Banerjee N, Barnes RC, Pfent CM, Talcott ST, Dashwood RH, Mertens-Talcott SU. 2016. Mango polyphenolics reduce inflammation in intestinal colitis-involvement of the miR-126/PI3K/AKT/mTOR axis *in vitro* and *in vivo*. *Mol Carcinog.* 56(1):197–207. eng. doi:10.1002/mc.22484.
- Kim Y, Lounds-Singleton AJ, Talcott ST. 2009. Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry.* 115(3):989–993. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.019.
- Lamia A, Moktar H. 2002. Culture conditions of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnology Letters.* 24(21):1763–1765. doi:10.1023/A:1020696801584.
- Larrosa M, González-Sarriás A, Yáñez-Gascón MJ, Selma MV, Azorín-Ortuño M, Toti S, Tomás-Barberán F, Dolara P, Espín JC. 2010. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem.* 21(8):717–725. eng. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.04.012.

- Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol.* 157(9):876–884. eng. doi:10.1016/j.resmic.2006.07.004.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition.* [2017 Mayo 22]. 79(5):727–747. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113710>
- Martínez Valverde I, Periago MJ, Ros G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. . *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* [2017 Mayo 17]. 50(1):727–747. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113710>
- Masibo M, He Q. 2008. Major Mango Polyphenols and Their Potential Significance to Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 7(4):309–319. doi:10.1111/j.1541-4337.2008.00047.x.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. 2010. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care.* 33(10):2277–2284. eng. doi:10.2337/dc10-0556.
- Natarajan K. 2009. Tannase: A tool for instantaneous tea. *Current Biotica.* [2017 Julio 6]. 3 (1):96–103. https://www.researchgate.net/publication/266493076_Tannase_A_tool_for_instantaneous_tea
- Nemec MJ, Kim H, Marciante AB, Barnes RC, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. 2016. Pyrogallol, an absorbable microbial gallotannins-metabolite and mango polyphenols (*Mangifera Indica L.*) suppress breast cancer ductal carcinoma in situ proliferation in vitro. *Food Funct.* 7(9):3825–3833. eng. doi:10.1039/c6fo00636a.
- Nisao Ogata. 2007. El Cacao. *Biodiversitas.* [2017 Mayo 22]. (72):1–5. <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv72art1.pdf>.
- O’Bryan CA, Pak D, Crandall PG, Lee, Sun Okand Ricke, Steven C. 2013. The Role of Prebiotics and Probiotics in Human Health. *J Prob Health.* 01(02); 1-8. eng. doi:10.4172/2329-8901.1000108.
- Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). 2004. *Perspectiva a plazo medio de los productos básicos agrícolas.* ISBN 92-5-305077-2 [Citado 2017 Febrero 17]. <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s00.htm>.
- Osawa R, Kuroiso K, Goto S, Shimizu A. 2000. Isolation of Tannin-Degrading Lactobacilli from Humans and Fermented Foods. *Appl Environ Microbiol.* 66(7):3093–3097. eng. doi:10.1128/AEM.66.7.3093-3097.2000.
- Palafox-Carlos H, Yahia EM, González-Aguilar GA. 2012. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant

activity during ripening. *Food Chemistry*. 135(1):105–111. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.103.

QIAGEN. 2012. QIAamp DNA Stool Handbook: For DNA purification from stool samples. [Lugar desconocido]: QIAGEN. 44 p. <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiaamp-dna-stool-mini-kit/#orderinginformation>

Reis Giada MdL. 2013. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In: Morales-Gonzalez JA, editor. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech. eng. doi: 10.5772/51687.

Sabu A, Augur C, Swati C, Pandey A. 2006. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 41(3):575–580. doi:10.1016/j.procbio.2005.05.011.

Sanbongi C, Osakabe N, Natsume M, Takizawa T, Gomi S, Osawa T. 1998. Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. *J. Agric. Food Chem*. 46(2):454–457. doi:10.1021/jf970575o.

Sharma S, Bhat TK, Dawra RK. 2000. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical Biochemistry*. 279(1):85–89. eng. doi:10.1006/abio.1999.4405.

Smith AH, Mackie RI. 2004. Effect of Condensed Tannins on Bacterial Diversity and Metabolic Activity in the Rat Gastrointestinal Tract. *Appl Environ Microbiol*. 70(2):1104–1115. doi:10.1128/AEM.70.2.1104-1115.2004.

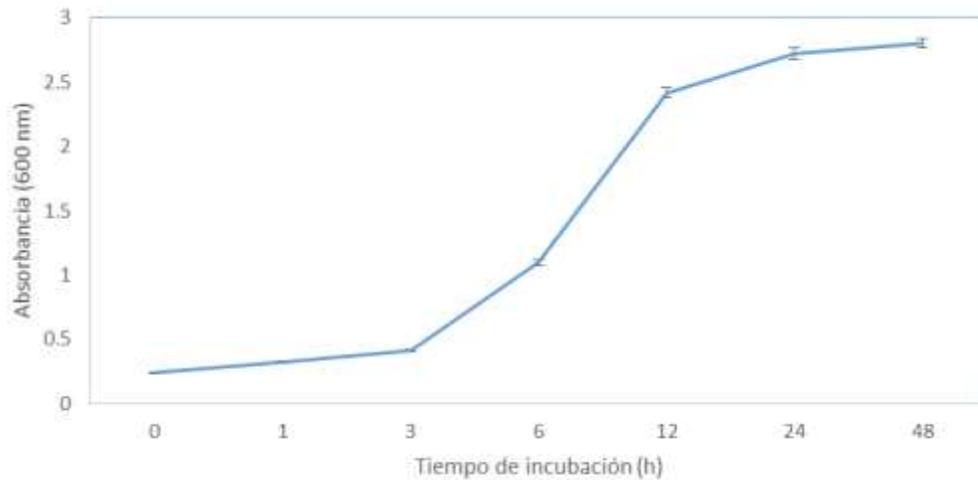
Tabasco R, Sánchez-Patán F, Monagas M, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV, Peláez C, Requena T. 2011. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* growth: resistance and metabolism. *Food Microbiol*. 28(7):1345–1352. eng. doi:10.1016/j.fm.2011.06.005.

Van Baarlen P, Wells JM, Kleerebezem M. 2013. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends Immunol*. 34(5):208–215. eng. doi:10.1016/j.it.2013.01.005.

Vandenplas Y, Huys G, Daube G. 2015. Probiotics: an update. *J Pediatr (Rio J)*. 91(1):6–21. eng. doi:10.1016/j.jpmed.2014.08.005.

7. ANEXOS

Anexo 1. Curva de crecimiento del grupo de bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium bifidum*).



Anexo 2. Ensayo de Rodanina

El volumen de la muestra debe ser de 1 ml. El ensayo de Rodanina se desarrolla de la siguiente manera:

1. En un tubo de ensayo se agrega 1.5 ml de solución de rodanina (0.667% (w/v) en metanol) a la muestra.
2. Después de 5 minutos, se agrega 1 ml de NaOH 1 M.
3. Después de 5 minutos, se diluye con agua destilada hasta obtener un volumen final de 10 ml
4. Se lee la absorbancia a 520 nm de longitud de onda.

Anexo 3. Cuadros ANDEVA de los ensayos realizados.

Fuentes de variación		Pr>F¹
Efecto del extracto de Mango en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas		
Concentración		<0.0001
Bloque		0.1454
Tiempo		<0.0001
Concentración*Tiempo		<0.0001
R-cuadrado	0.92	Coefficiente de Variación 6.15
Efecto del extracto de Cacao en el crecimiento de un grupo de bacterias probióticas		
Concentración		<0.0001
Bloque		0.1150
Tiempo		<0.0001
Concentración*Tiempo		<0.0001
R-cuadrado	0.99	Coefficiente de Variación 3.78
Actividad tanasa		
Concentración		<0.0001
Bloque		0.7729
Repetición		0.8172
Tiempo		<0.0001
R-cuadrado	0.99	Coefficiente de Variación 6.37

¹Pr>F=Valores menores a 0.05 presentan interacción.

Efecto del extracto de mango en la microbiota humana					
Cebadores	Fuentes de variación (Pr>F¹)				R cuadrado
	Trt²	Repetición	Tiempo	Trt*tiempo	
<i>Bacteroides fragillis</i>	<0.0001	0.9745	0.0003	<0.0001	0.88
<i>Bacteroides prevotella</i>	<0.0001	0.5282	0.0386	0.0011	0.9255
<i>Bacteroides thetaromicron</i>	<0.0001	0.9517	<0.0001	<0.0001	0.92
<i>Bacteroides Vulgatus</i>	0.0001	0.1582	0.0006	0.0076	0.88
<i>Bacteroidetes</i>	0.0023	0.9727	<0.0001	0.0496	0.74
<i>Bifidobacterium adolescencis</i>	<0.0001	0.4015	<0.0001	<0.0001	0.89
<i>Bifidobacterium catenolatum</i>	<0.0001	0.9845	0.0005	<0.0001	0.93
<i>Clostridium butyricum</i>	0.2754	0.0900	<0.0001	0.4814	0.29
<i>Eubacterium halii</i>	0.0003	0.0266	0.0144	0.0093	0.92
<i>E. coli</i>	0.0154	0.3042	<0.0001	0.0001	0.92
<i>Euryarchaeota</i>	0.0061	0.2929	<0.0001	0.0047	0.87
<i>Faecalibacterium</i>	0.7376	0.0239	0.0365	0.0022	0.81
<i>Firmicutes</i>	0.0561	0.4240	0.0005	0.1929	0.56
<i>Ruminococcaceae</i>	0.0014	0.9202	0.0002	0.0005	0.79
<i>Verrucomicrobia</i>	0.4525	0.2315	0.0152	0.8353	0.46

Efecto del extracto de cacao en la microbiota humana					
Cebadores	Fuentes de variación (Pr>F)				R cuadrado
	Trt	Repetición	Tiempo	Trt*tiempo	
<i>Bacteroides fragillis</i>	<0.0001	0.8889	<0.0001	<0.0001	0.92
<i>Bacteroides prevotella</i>	0.0023	0.4017	0.0021	0.0049	0.87
<i>Bacteroides thetaromicron</i>	<0.0001	0.7793	<0.0001	<0.0001	0.97
<i>Bacteroides Vulgatus</i>	0.1368	0.2152	0.0140	0.3192	0.63
<i>Bacteroidetes</i>	0.4397	0.9799	<0.0001	0.0075	0.91
<i>Bifidobacterium adolescencis</i>	0.0375	0.5331	0.4774	0.2889	0.53
<i>Bifidobacterium catenolatum</i>	0.7376	0.2803	0.0329	0.7682	0.39
<i>Clostridium butyricum</i>	0.4020	0.0480	<0.0001	0.4130	0.55
<i>Eubacterium halii</i>	0.0104	0.0806	0.2930	0.0029	0.89
<i>E. coli</i>	0.0047	0.0007	<0.0001	<0.0001	0.98
<i>Euryarchaeota</i>	0.0199	0.9113	<0.0001	0.1160	0.95
<i>Faecalibacterium</i>	0.2278	0.0457	0.4533	0.0055	0.74
<i>Firmicutes</i>	<0.0001	0.0011	0.1289	<0.0001	0.91
<i>Ruminococcaceae</i>	<0.0001	0.0267	<0.0001	<0.0001	0.98
<i>Verrucomicrobia</i>	0.2454	0.5243	0.3208	0.3064	0.47

¹Pr>F=Valores menores a 0.05 presentan interacción.

²Trt= tratamiento

Anexo 4. Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos (ADN) de las muestras fecales después de la incubación con los extractos de mango y cacao.

Tratamientos	Tiempo (horas)	ng/ μ l	razón 260/280
⁰ Control ₁	0	14.33	1.93
	24	19.11	2.02
	48	22.48	2.01
Control ₂	0	13.65	2.05
	24	17.54	1.98
	48	26.27	1.93
^u TC ₁	0	14.33	1.93
	24	19.12	1.94
	48	20.26	1.90
TC ₂	0	13.65	2.05
	24	20.55	2.04
	48	23.41	1.97
^v TM ₁	0	14.33	1.93
	24	22.09	1.98
	48	19.18	2.10
TM ₂	0	13.65	2.05
	24	22.95	1.95
	48	22.17	2.05

⁰Control₁= Medio pre reducido + cultivo de inoculación.

^uTC₁=medio pre reducido + extracto de cacao a 200 ppm de ácido gálico equivalente.

^vTM₁= medio pre reducido + extracto de mango a 200 ppm de ácido gálico equivalente.

_{1,2}Tratamientos seguidos de diferentes números significa el número de réplica de cada tratamiento.