



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZONA HUASTECA



“Efecto de las procianidinas como moduladores del crecimiento probiótico bajo simulación oro-gastrointestinal *in vitro*”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Presenta:

Ing. Sandy Rosalinda García Rodríguez

Director de tesis:

Dr. Jorge Enrique Wong Paz

Co-Directora de tesis:

Dra. Diana Beatriz Muñoz Marquez

Asesora de tesis:

Dra. Olga Miriam Rutiaga Quiñones



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZONA HUASTECA



“Efecto de las procianidinas como moduladores del crecimiento probiótico bajo simulación oro-gastrointestinal *in vitro*”

Presenta:

Ing. Sandy Rosalinda García Rodríguez

COMITÉ TUTORIAL:

Director de tesis:

Dr. Jorge Enrique Wong Paz

Co-Directora de tesis:

Dra. Diana Beatriz Muñoz Marquez

Asesora de tesis:

Dra. Olga Miriam Rutiaga Quiñones



Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

**“Efecto de las procianidinas como moduladores del crecimiento probiótico
bajo simulación oro-gastrointestinal *in vitro*”**

SINODALES:

Presidente:

Dra. Diana Beatriz Muñiz Marquez

Secretario:

Dra. Olga Miriam Rutiaga Quiñones

Vocal:

Dr. Jorge Enrique Wong Paz

Efecto de las procianidinas como moduladores del crecimiento probiótico bajo simulación oro-gastrointestinal *in vitro* © 2025 por Sandy Rosalinda García Rodríguez tiene licencia CC BY-NC-ND 4.0. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

AGRADECIMIENTO A SECIHTI

El programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (SNP) de la SECIHTI, registro 006289.

El presente trabajo fue realizado con apoyo de una beca académica otorgada por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e innovación (SECIHTI) con número 1307793.



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su amor, por mi vida, por los dones que me ha regalado, su presencia en cada etapa, por los desafíos y oportunidades que me han ayudado a ser mejor persona y así crecer tanto en el ámbito espiritual, social, personal, familiar y profesional.

A mis Padres, por toda su confianza y amor incondicional, por ser mi refugio y motor que me impulsa a ser realidad mis sueños, por sus oraciones y por nunca dejarme sola en cada etapa de mi vida, por su esfuerzo inhumano por darme una vida soñada. Agradezco inmensamente a Dios de tenerlos en mi vida.

A mi familia por creer en mí, agradezco profundamente la suerte que tengo de tenerlos en mi vida, apoyándome. Especialmente a mi abuelita Evelia, mi tía blanca, mi hermano y mi sobrina Victoria que alegra mis días con su sonrisa y su amor.

A mi guía espiritual por estar en los momentos que más necesito, por creer en mí y ayudarme a entender el amor de Dios, por todos los momentos impredecibles que nos regala la vida y todo su cariño.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Jorge Enrique Wong Paz, la Dra. Olga Miriam Rutiaga Quiñones y la Dra. Diana Beatriz Muñiz Márquez, por creer en mí, por dirigir este proyecto con mucho entusiasmo, su guía constante, paciencia y compromiso para llevar a cabo cada etapa de esta investigación. Su trayectoria, conocimiento, apoyo, disciplina y exigencia académica fueron fundamentales para la culminación de esta tesis.

Agradezco a la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y al programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto.

Al Laboratorio de Investigación de Alimentos de la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca – UASLP por todas las facilidades para el desarrollo del proyecto y por permitirme utilizar sus instalaciones

A la Unidad de Posgrado Investigación y Desarrollo Tecnológico (UPIDET) del Instituto Tecnológico de Durango por la oportunidad de desarrollar gran parte del proyecto en sus instalaciones durante la estancia de investigación.

A la Pastoral de Adolescentes y Jóvenes de mi diócesis, provincia y nacional, por ser una segunda familia y su confianza en mi persona que me ha ayudado a ser mejor cada día, el amor de Dios lo veo reflejado en cada uno de ustedes y en su testimonio para seguir construyendo juntos la civilización del amor.

Finalmente, a mis amigos, por creer en mí, por su apoyo y consejos para ser mejor, por alegrar mi vida. De manera especial también a los que hice durante estos dos años, en el laboratorio, mis estancias y congresos, cada uno de ellos ha tenido un impacto en mi vida. Gracias a quienes me recibieron y apoyaron con los brazos abiertos y con un corazón sincero. Dios los bendiga

Sandy Rosalinda García Rodríguez

RESUMEN

Los polifenoles son compuestos bioactivos presentes en frutas, verduras y coproductos, con importantes propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. Se pueden clasificar en tres grupos principales: ácidos fenólicos, no flavonoides y flavonoides (incluidos antocianinas, procianidinas, etc). Las procianidinas (PC's), también conocidas como taninos condensados a través de su presencia en extractos crudos han demostrado propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, antienvjecimiento y potencial para modular la microbiota intestinal, siendo candidatos para ser considerados prebióticos, sin embargo, se necesitan estudios adicionales especialmente *in vitro* para poder comprobarlo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de procianidinas purificadas como moduladores del crecimiento probiótico bajo simulación oro-gastrointestinal *in vitro*. Las PC's se obtuvieron mediante ultrasonido durante 20 minutos utilizando acetona como disolvente (70 % v/v) en una relación 1:10 con gramos de pulpa de café seca. A continuación, los extractos se purificaron mediante cromatografía en columna abierta rellena con Sephadex LH-20 utilizando caudales de agua y etanol, hasta recuperar la fracción de acetona, que mostró una alta concentración de PC's (96 % p/p) cuantificada mediante la prueba de HCl-butanol. La procianidinas recuperadas fueron secadas a 40 °C durante 24 h. Posteriormente las PC's purificadas se sometieron a digestión oro-gastrointestinal *in vitro*. Se caracterizaron las PC's purificadas y digeridas por medio de análisis de HPLC-ESI-MS. Para evaluar el potencial prebiótico se utilizaron cepas de *Bifidobacterium longum* y *Akkermansia muciniphila* en presencia de PC's purificadas. Para esto, una serie de fermentaciones se llevaron a cabo en medios específicos; para *B. longum* man, rogosa y sharpe (MRS) y para *A. muciniphila* anaerobe basal broth (ABB), inoculados cada uno con un 10 % del inóculo de cada bacteria correspondiente y 5 g/L de PC's digeridas como fuente de carbono, en la cinética en estudio se incluyó glucosa y la inulina como controles positivos. El crecimiento bacteriano se evaluó mediante mediciones del recuento viable a las 0, 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h. A la muestra de 48 h de estas fermentaciones se le determino los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y se cuantificaron por medio de UPLC-MS-TQS.

En los resultados se destaca el efecto prebiótico de las PC's digeridas con bacterias probióticas. Con *B. longum* se registró un incremento en el crecimiento bacteriano desde 7.97 ± 0.05 a 8.94 ± 0.02 Log UFC/mL tras 12 h de fermentación con PC's dig, correspondiente a un aumento de aproximadamente 1.0 Log UFC/mL (7.78×10^8 UFC/mL), equivalente a un incremento de casi

10 veces la biomasa bacteriana inicial, superando los valores de crecimiento observados con inulina y glucosa. Por otro lado, para *A. muciniphila* se observó un efecto más pronunciado. El crecimiento bacteriano con PC's dig aumento desde 7.33 ± 0.07 hasta 9.00 ± 0.008 Log UFC/mL en 12 h, alcanzando una biomasa de 1.70 Log UFC/mL (9.79×10^8 UFC/mL), la más alta entre los tratamientos evaluados (inulina y glucosa). Los cromatogramas obtenidos del HPLC-ESI-MS, mostraron que los picos característicos de las PC's se ven disminuidos de manera importante con la aparición de nuevas señales con tiempos de retención distintos, interesantemente no se pudieron ionizar los compuestos generados (biotransformados) bajo las condiciones estudiadas. Los AGCC presentes en ambas muestras son acetato (en mayor cantidad), propionato, butirato y valerato. Además, se llevó a cabo un ensayo antibacteriano, utilizando el método de difusión en disco contra *Salmonella* ser Typhirium (ATCC 14028), que demostró que las PC's digeridas inhiben a la bacteria patógena, potenciando la selección como posible prebiótico. Estos resultados indican que las procianidinas purificadas después de la digestión *in vitro* presentan un cambio en su estructura y una vez en la microbiota intestinal, promoviendo selectivamente el crecimiento de cepas probióticas beneficiosas como *A. muciniphila* y *B. longum*. Lo cual sustentan a las PC's como candidatos para ser considerados como prebióticos e ingrediente funcional con beneficios para la salud del huésped.

Palabras clave: Polifenoles, prebióticos, *Bifidobacterium longum*, *Akkermansia muciniphila*, pulpa de café, digestión *in vitro*, taninos condensados.

ABSTRACT

Polyphenols are bioactive compounds found in fruits, vegetables and co-products, with important antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. They can be classified into three main groups: phenolic acids, non-flavonoids and flavonoids (including anthocyanins, procyanidins, etc.). Procyanidins (PC's), also known as condensed tannins due to their presence in crude extracts, have demonstrated antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and anti-ageing properties, as well as the potential to modulate the intestinal microbiota, making them candidates for consideration as prebiotics. However, further studies, especially *in vitro*, are needed to verify this. Therefore, the objective of this study is to evaluate the effect of purified procyanidins as probiotic growth modulators under *in vitro* oro-gastrointestinal simulation. The PC's were obtained by ultrasound for 20 minutes using acetone as a solvent (70% v/v) in a 1:10 ratio with grams of dry coffee pulp. The extracts were then purified by open column chromatography filled with Sephadex LH-20 using water and ethanol flows until the acetone fraction was recovered, which showed a high concentration of PCs (96% w/w) quantified by the HCl-butanol test.

The recovered procyanidins were dried at 40 °C for 24 hours. Subsequently, the purified PC's were subjected to *in vitro* oro-gastrointestinal digestion. The purified and digested PC's were characterised by HPLC-ESI-MS analysis. To evaluate the prebiotic potential, strains of *Bifidobacterium longum* and *Akkermansia muciniphila* were used in the presence of purified PC's. For this purpose, a series of fermentations were carried out in specific media: for *B. longum*, man, rogosa and sharpe (MRS) and for *A. muciniphila*, anaerobe basal broth (ABB), each inoculated with 10% of the inoculum of each corresponding bacterium and 5 g/L of digested PC's as a carbon source. Glucose and inulin were included as positive controls in the kinetics under study. Bacterial growth was evaluated by measuring viable counts at 0, 3, 6, 9, 12, 24, and 48 h. Short-chain fatty acids (SCFAs) were determined in the 48 hours sample of these fermentations and quantified by UPLC-MS-TQS.

The results highlight the prebiotic effect of PC's dig with probiotic bacteria. With *B. longum*, an increase in bacterial growth was recorded from 7.97 ± 0.05 to 8.94 ± 0.02 Log CFU/mL after 12 hours of fermentation with PC dig, corresponding to an increase of approximately 1.0 Log CFU/mL (7.78×10^8 CFU/mL), equivalent to an increase of almost 10 times the initial bacterial biomass, exceeding the growth values observed with inulin and glucose. On the other hand, a

more pronounced effect was observed for *A. muciniphila*. Bacterial growth with dig PC's increased from 7.33 ± 0.07 to 9.00 ± 0.008 Log CFU/mL in 12 h, reaching a biomass of 1.70 Log CFU/mL (9.79×10^8 CFU/mL), the highest among the treatments evaluated (inulin and glucose). The chromatograms obtained from HPLC-ESI-MS showed that the characteristic peaks of PC's are significantly reduced with the appearance of new signals with different retention times. Interestingly, the compounds generated (biotransformed) could not be ionised under the conditions studied. The SCFAs present in both samples are acetate (in greater quantity), propionate, butyrate, and valerate. In addition, an antibacterial assay was performed using the disc diffusion method against *Salmonella* ser Typhirium (ATCC 14028), which demonstrated that digested PC's inhibit pathogenic bacteria, enhancing their selection as a possible prebiotic. These results indicate that procyanidins purified after *in vitro* digestion undergo a change in their structure and, once in the gut microbiota, selectively promote the growth of beneficial probiotic strains such as *A. muciniphila* and *B. longum*. This supports PCs as candidates to be considered as prebiotics and functional ingredients with health benefits for the host.

Keywords: Polyphenols, prebiotics, *Bifidobacterium longum*, *Akkermansia muciniphila*, coffee pulp, *in vitro* digestion, condensed tannins.

ÍNDICE GENERAL

1.	<i>Introducción</i>	1
2.	<i>Antecedentes</i>	4
2.1	La familia biotica.....	4
2.2	Probióticos.....	6
2.3	Prebióticos y sus beneficios en la salud humana.....	7
2.3.1	Criterios de selección de prebióticos.....	8
2.3.2	Fuentes prebióticas convencionales y de nueva generación.....	9
2.4	Potencial prebiotico de las procianidinas.....	12
2.4.1	Procianidinas de pulpa de café.....	15
3.	<i>Justificación</i>	16
4.	<i>Hipótesis</i>	17
5.	<i>Objetivos</i>	18
5.1	Objetivo general.....	18
5.2	Objetivos específicos.....	18
6.	<i>Materiales y métodos</i>	19
6.1	Recolección y preparación del material vegetal.....	19
6.2	Extracción asistida por ultrasonido (EAU) de procianidinas.....	19
6.3	Purificación de procianidinas con columna de Sephadex LH-20.....	19
6.4	Determinación de procianidinas (prueba de HCl-butanol).....	19
6.5	Análisis HPLC-ESI-MS para caracterización de procianidinas.....	20
6.6	Cinéticas de fermentación con cepas probióticas.....	20
6.7	Evaluación del potencial prebiótico de las PC's.....	21
6.7.1	Pretratamiento de digestión <i>in vitro</i>	21
6.8	Cuantificación de la producción de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC).....	23
6.9	Evaluación de la actividad antibacteriana de las procianidinas contra la bacteria <i>Salmonella ser Typhirium</i> (ATCC 14028).....	23
7.	<i>Resultados y discusión</i>	25
7.1	Purificación y determinación de procianidinas (PC's).....	25
7.1.2	Análisis de procianidinas mediante HPLC-ESI-MS.....	26
7.2	Evaluación de las procianidinas purificadas como moduladores en el crecimiento probiótico.....	27

7.3 Simulación del tránsito oro-gastrointestinal <i>in vitro</i> de las procianidinas y su efecto prebiótico.....	30
7.3.1 Simulación del transito oro-gastrointestinal <i>in vitro</i>	30
7.3.2 Propuesta del metabolismo y cambio en la estructura de las procianidinas antes y después de la digestión oro-gastrointestinal <i>in vitro</i> por HPLC-ESI-MS	31
7.3.3 Efecto prebiotico de las PC´s digeridas en el crecimiento de bacterias probióticas.....	35
7.3.4. Cuantificación de la producción de Ácidos Grasos de Cadena Corta	42
7.4 Actividad antibacteriana de los PC´s purificadas y digeridas para su aplicación como prebiótico natural.....	44
8. <i>Conclusiones</i>	46
9. <i>Bibliografía</i>	47
10. <i>Anexo 1</i>	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización e identificación mediante HPLC-ESI-MS/MS de las principales procianidinas oligoméricas presentes en la fracción de acetona purificada con Sephadex LH-20.	26
Tabla 2. Efecto de los PC's purificadas como moduladores del crecimiento probiótico por <i>B. longum</i> y <i>A. muciniphila</i>	29
Tabla 3. Resultados de crecimiento bacteriano de <i>A. muciniphila</i> y <i>B. longum</i> con distintas fuentes de carbono, cambio de pH de 0 a 12 h y cuantificación de PC's al inicio y termino de fermentación.	39
Tabla 4. Concentraciones de equilibrio previstas y parámetros cinéticos obtenidos en el modelo cinético de dos sitios de Gompertz.	40
Tabla 5. Evaluación del potencial prebiótico a través de la producción de AGCC (mM/L) por <i>B. longum</i> y <i>A. muciniphila</i> a partir del consumo de inulina y PC's como su única Fuente de carbono.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Familia biótica derivada de probióticos y prebióticos.	5
Figura 2. Requisitos para los posibles prebióticos (Markowiak and Ślizewska 2017).	9
Figura 3. Tipos de prebióticos convencionales y de nueva generación.	12
Figura 4. Unidades monoméricas de procianidina: a) (+) – catequinas, b) (-) – epicatequinas, c) PC's tipo A, d) PC's tipo B y PC's tipo C e) (Silvan et al., 2022).....	14
Figura 5. Simulación del tránsito oro-gastrointestinal in vitro.....	30
Figura 6. Cromatogramas por HPLC-ESI-MS de PC's purificadas (A) y PC's después de la digestión in vitro (B) en concentración de 5000 ppm.	33
Figura 7. Propuesta de la biotransformación de la procianidinas en el huésped.....	34
Figura 8. Evaluación del potencial prebiótico mediante cinética de crecimiento con inulina, PC' digeridas y glucosa como única fuente de carbono: A) <i>Bifidobacterium longum</i> y B) <i>Akkermansia muciniphila</i>	41
Figura 9. Evaluación antibacteriana mediante el método de difusión en disco: control negativo (DMSO) (A); PC's purificadas (B); PC's digeridas (C), y control positivo (ampicilina) (D) frente a la bacteria <i>S. typhi</i>	45
Figura 10. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 577 m/z representan el EIC para procianidinas.....	64
Figura 11. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 863 m/z representan el EIC para procianidinas.....	65
Figura 12. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 865 m/z representan el EIC para procianidinas.....	66
Figura 13. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 1153 m/z representan el EIC para procianidinas.....	67
Figura 14. Cromatogramas de PC's digeridas a 5000 ppm, 577 m/z representan el EIC para procianidinas.....	68
Figura 15. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 863 m/z representan el EIC para procianidinas.....	69
Figura 16. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 865 m/z representan el EIC para procianidinas.....	70

Figura 17. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 1441 m/z representan el EIC para procianidinas.....	71
Figura 18. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 1553 m/z representan el EIC para procianidinas.....	72
Figura 19. Análisis estadístico de la evaluación antibacteriana mediante el método de difusión en disco con las siguientes concentraciones de PC: 5 y 10 g/l (A), control negativo con DMSO (B) y control positivo con ampicilina (C) frente a bacterias como <i>S. typhi</i> mediante la prueba de Anova.....	73

1. Introducción

La microbiota intestinal humana es un complejo ecosistema de microorganismos que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la salud y el bienestar general (Gibson et al., 2017). Cada vez se reconoce más que las alteraciones en la microbiota intestinal como la genética del huésped, factores ambientales y un desorden alimenticio, contribuyen en una serie de problemas de salud, entre los que se incluyen trastornos metabólicos, disbiosis (un desequilibrio en la composición y la función de los microorganismos intestinales), enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad, disfunción inmunitaria, etc (Grosicki, Fielding, and Lustgarten 2018; Palepu and Dandekar 2022; Rothschild et al., 2018; Song and Chan 2019). En consecuencia, existe un interés creciente por las estrategias destinadas a modular la microbiota intestinal y restaurar sus funciones beneficiosas.

En este contexto, los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, aportan beneficios en la salud del huésped (Sharma et al., 2023). Actualmente el estudio de los probióticos se ha convertido en un enfoque prometedor para tratar la disbiosis, trastornos metabólicos, etc. Recientemente, ha surgido un gran interés en cepas probióticas aisladas del intestino humano como *Bifidobacterium longum* (protege contra enfermedades autoinmunes como la inflamación intestinal, la obesidad y la hiperlipidemia) y *Akkermansia muciniphila* (influye beneficiosamente en enfermedades inflamatorias intestinales, cardiovasculares, en el cáncer y el antienvjecimiento), debido a que ambas cepas promueven la producción de AGCC, mejoran la función de barrera intestinal y la salud metabólica (Bermúdez-Quñones et al. 2021; Ropot, Karamzin, and Sergeev 2020; Shaheen et al. 2025; Zhai et al. 2019; C. Zhang et al. 2019). La eficacia de los probióticos en la microbiota intestinal puede potenciarse mediante la administración oral en la dieta de prebióticos (Alexander and Turnbaugh 2020; Koh et al., 2016). Los prebióticos son compuestos o ingredientes que son utilizados por la microbiota y que produce un beneficio para la salud (Deehan et al. 2024a; Glenn R. Gibson et al. 2017a). Para ser considerado un prebiótico, un sustrato o compuesto debe cumplir ciertos criterios de selección, entre ellos se incluyen ser fermentado por la microbiota intestinal y tener un efecto beneficioso sobre la salud del huésped, así como la estimulación selectiva del crecimiento de bacterias probióticas. También debe ser estable en diversas condiciones de procesamiento de alimentos y servir como sustituto natural de los antibióticos

(Davani-Davari et al., 2019; Glenn R Gibson et al., 2017; Markowiak and Ślizewska 2017). Por último, el uso de modelos *in vitro* que simulan el tránsito oro-gastrointestinal humano es un criterio esencial para evaluar la viabilidad y la funcionalidad de los compuestos o ingredientes antes de su selección como posibles prebióticos orales y su aplicación *in vivo* (Bermúdez et al., 2021; Bove et al., 2013).

Los prebióticos más comunes son los fructanos (Biedrzycka and Bielecka 2004), los fructooligosacáridos (Koleva et al., 2012), los galactooligosacáridos (Panesar et al., 2018), los xilooligosacáridos (Palaniappan, Antony, and Emmambux 2021), los quitoooligosacáridos (Lodhi et al., 2014), la inulina (Bermúdez et al., 2021), oligosacáridos de leche humana (Okburan and Kızıler 2023), la lactulosa (Panesar and Kumari 2011), el almidón resistente (Zaman and Sarbini 2016) y, hasta hace poco, el concepto se limitaba solo a los ya mencionados anteriormente, pero en los últimos años se ha ampliado para incluir otros candidatos, como los polifenoles de origen vegetal ya que presentan un potencial significativo como prebióticos por sus complejas estructuras químicas y diversas actividades biológicas (Kesavan et al., 2018). Estos compuestos abundantes en fuentes alimenticias como frutas, verduras, frutos secos, semillas, té, café y vino (Mithul Aravind et al. 2021a; Sayers, Wijeyesekera, and Gibson 2021; H. Zhang and Tsao 2016), han despertado un considerable interés científico por sus beneficios para la salud, incluidos los efectos prebióticos sobre la microbiota intestinal. Los polifenoles se caracterizan químicamente con anillos aromáticos que contienen diversos subgrupos hidroxilo en su estructura, lo que los hace resistentes a la digestión en el tracto gastrointestinal superior (Alves-Santos et al., 2020). Al llegar al colón interactúan con la microbiota intestinal para desempeñar funciones cruciales como prebióticas promoviendo selectivamente el crecimiento de bacterias probióticas y la actividad metabólica de bacterias intestinales beneficiosas como *Lactocaseibacillus*, *Bifidobacterium* y *Akkermansia*, al tiempo que inhiben la proliferación de microorganismos nocivos. Esta modulación selectiva contribuye a una microbiota intestinal equilibrada y resistente (Alves-Santos et al., 2020; Moorthy et al., 2020; Rodríguez-Daza et al., 2021; Sayers, Wijeyesekera, and Gibson 2021).

Los polifenoles se pueden clasificar en tres grupos principales: ácidos fenólicos, no flavonoides y flavonoides (incluidos antocianinas, procianidinas, etc). Dentro de esta clasificación destacan las procianidinas o taninos condensados que se forman mediante la polimerización de tres

unidades elementales de flavan-3-ol: (+) - catequinas, (-) - epicatequinas y sus derivados (Nie & Stürzenbaum, 2019; Silvan et al., 2020).

Las procianidinas tienen varias funciones, entre ellas destacan las antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, de antienvjecimiento, y recientemente, se ha demostrado que modulan el crecimiento de la bacteria *A. muciniphila* con extractos ricos en procianidinas, sin embargo se requiere estudios que comprueben el efecto de las procianidinas purificadas y realizar pruebas en otras cepas probióticas para demostrar este efecto modulador (Abu Zarin et al., 2016; Junren Chen et al., 2023; Ngamsuk, Huang, and Hsu 2019; Shoji, Masumoto, and Miura 2024).

Dado que las procianidinas están ampliamente distribuidas en las matrices vegetales, pueden ser extraídas de fuentes como la piel del cacahuete, la pulpa del café, las semillas de uva, las manzanas, el espino chino, las hojas de té, la corteza de pino, la piel del lichi, etc (Castillo-Olvera et al., 2022; Han et al., 2023; Liu et al., 2020; Okino et al., 2021; Wang et al., 2023; Wong-Paz et al., 2021; Ye et al., 2022; Zhou et al., 2022). Resulta interesante considerar la recuperación de procianidinas a partir de coproductos como una alternativa sostenible para el desarrollo de ingredientes funcionales cuya capacidad prebiótica pueda ser demostrada y validada. Por lo tanto, este trabajo de investigación tiene como objetivo principal evaluar el efecto de las procianidinas purificadas de la pulpa del café como moduladores del crecimiento probiótico bajo simulación oro-gastrointestinal *in vitro*.

2. Antecedentes

2.1 La familia biótica

El intestino humano es un ecosistema complejo y dinámico, la cual incluye a la microbiota intestinal que ha ganado cada vez más atención en los últimos años debido a su papel crucial en el mantenimiento de la salud del ser humano, pero su composición y función pueden verse significativamente influenciadas por diversos factores, como hábitos alimenticios inadecuados, como el uso de antibióticos o la presencia de ciertas enfermedades (Chávarri et al., 2022). Los probióticos, como bacterias beneficiosas presentes en el intestino humano, disponen de un hábitat estable y rico en nutrientes a cambio de proporcionar beneficios para la salud del huésped (Żółkiewicz et al., 2020). Sin embargo, los cambios en la composición de la microbiota intestinal, son directamente ligados a la ingesta de alimentos de baja calidad y un estilo de vida sedentario, los cuales pueden tener graves consecuencias para la salud del huésped, por ello es esencial mantener una composición equilibrada de la microbiota intestinal (Sharma et al., 2023). En este sentido, existe un gran interés en el uso de métodos seguros y no invasivos, así como en la interacción microbiana con componentes bioactivos como los prebióticos, los probióticos, los simbióticos y sus derivados (Figura 1), que han proporcionado resultados prometedores (Palade et al., 2022; Sharma et al., 2023).

En los últimos años, los investigadores han tratado de implementar un nuevo grupo denominado “familia de los bióticos”, un término que hace referencia a los campos de la salud, la nutrición y la tecnología alimentaria basados en los probióticos y los prebióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, aportan beneficios para la salud del huésped (Hill et al., 2014). En el mismo sentido, los prebióticos actúan como alimento para los probióticos, estos son utilizados selectivamente por los microorganismos del huésped y proporcionan beneficios fisiológicos y significativos para su salud (Gibson et al., 2017a). En cuanto a los nuevos miembros de la familia biótica, los simbióticos conocidos como probióticos de nueva generación, son una mezcla de probióticos y prebióticos que actúan en sinergia para restaurar la microbiota intestinal (Swanson et al., 2020). Además, los postbióticos son productos solubles o moléculas bioactivas derivadas de subproductos metabólicos secretados o liberados por la lisis bacteriana de bacterias inactivas (probióticos) que ofrecen beneficios para la salud del huésped (Salminen et al., 2021). Con acciones específicas, los farmabióticos son productos probióticos con una acción farmacológica específica y probada

sobre la salud o la enfermedad del huésped (Chaudhari and Dwivedi 2022). De los productos derivados, los metabióticos, son metabolitos bioactivos producidos por bacterias probióticas que pueden modular la microbiota intestinal y mejorar la salud sin necesidad de administrar microorganismos vivos (Jang, Lee, and Paik 2024).

No solo los probióticos vivos generan beneficios para la salud, estos nuevos conceptos introducen los paraprobióticos, que se refieren a células probióticas inactivas o fragmentos celulares que pueden generar efectos beneficiosos para la salud del huésped sin requerir la viabilidad del microorganismo (Akan et al., 2025). La producción de algunos compuestos también ofrece beneficios, como los nutribióticos, que son probióticos que confieren funciones nutricionales al producir nutrientes esenciales como vitaminas, minerales, etc., y así convertir los precursores en metabolitos bioactivos (Chaudhari & Dwivedi, 2022). Sorprendentemente, a estos conceptos se suman los psicobióticos, que son probióticos que pueden influir directamente en la salud mental a través del eje cerebro-intestino, y pueden reducir la ansiedad y la depresión mediante la modulación de los neurotransmisores y la inflamación (Cocean and Vodnar 2024). Por último, los gerobióticos son postbióticos derivados de probióticos, o paraprobióticos, que tienen efectos positivos sobre el envejecimiento saludable, promoviendo la longevidad y reduciendo la inflamación relacionada con la edad (Tsai et al., 2021).

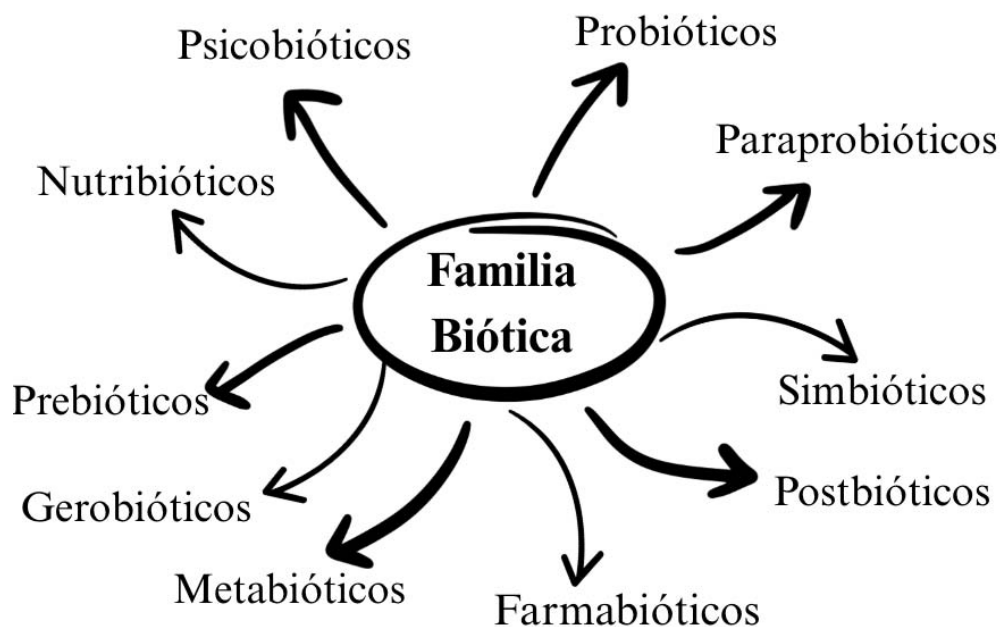


Figura 1. Familia biótica derivada de probióticos y prebióticos.

2.2 Probióticos

La Organización Mundial de la Salud ha definido los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, aportan un beneficio a la salud del huésped” (Sharma et al., 2023). Esta definición incluye una amplia gama de microbios y aplicaciones, al tiempo que capta la esencia de los probióticos microbianos, viables y beneficiosos para la salud. Es importante mencionar que, aunque los comensales del intestino suelen ser la fuente de las cepas probióticas, hasta que estas cepas no se aíslan, se caracterizan y se presenta un caso creíble de sus efectos sobre la salud, no se puede denominar “probiótico”. También son conocidos como complementos alimenticios microbianos vivos que benefician a la salud de los consumidores, destinados a mejorar el equilibrio microbiano intestinal, se consideran “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés), es decir, seguros para el consumo humano (Hill et al. 2014; R. Sharma and Padwad 2020).

En este contexto, se hace referencia a cepas de una serie de especies microbianas bien estudiadas que se administran en una dosis funcional para su uso como alimentos y suplementos en los consumidores. Las especies reportadas que aportan beneficios generales son *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve* y *longum*) y *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* and *salivarius*) (Ghyselinck et al., 2021; Hill et al., 2014; Jayanama and Theou 2020; Song et al., 2023). Entre estas destaca particularmente *Bifidobacterium longum*, una de las especies más documentadas por sus efectos benéficos sobre la salud intestinal y el equilibrio de la microbiota intestinal. Esta cepa probiótica puede proteger eficazmente contra enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal, síndromes metabólicos como la obesidad y la hiperlipidemia, y trastornos cerebro-intestino como el síndrome del intestino irritable y la colitis crónica (Song et al., 2020; C. Zhang et al., 2019).

De manera complementaria, en los últimos años también ha cobrado relevancia *Akkermansia muciniphila*, una bacteria comensal que, aunque no pertenece tradicionalmente al grupo de probióticos clásicos, ha demostrado importantes beneficios metabólicos. *A. muciniphila* se ha caracterizado por degradar la mucina y que reside en la capa mucosa del intestino, influye en el metabolismo del huésped, fortalece la integridad de la barrera intestinal, modula la composición microbiana y las respuestas inmunitarias. Además, se ha enfatizado su papel en afecciones como enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer, enfermedad cardiovascular y envejecimiento, reduce

la inflamación crónica y promueve la producción de AGCC como el propionato para la calcificación en la enfermedad cardiovascular (Shaheen et al. 2025; T. Zhang et al. 2019; Zhao et al. 2024).

La eficacia de los probióticos mencionados en la microbiota intestinal puede potenciarse mediante la administración oral en la dieta de prebióticos que son selectivamente utilizados por los microorganismos del huésped confiriendo un beneficio a su salud (de Melo Pereira et al., 2018).

2.3 Prebióticos y sus beneficios en la salud humana

Los primeros estudios en humanos demostraron que el consumo de carbohidratos conducía al enriquecimiento de las especies de *Lactobacillus* en la microbiota intestinal. Estos hallazgos también revelaron que los microorganismos anaeróbicos, especialmente los que habitan en el colon, obtenían energía mediante la fermentación de sustratos alimentarios, y esta investigación ayudó a establecer el concepto de que ciertos alimentos o compuestos (más allá de los carbohidratos) desempeñan un papel esencial en la configuración y el mantenimiento de la comunidad microbiana intestinal (Cheplin & Rettger, 1920). Posteriormente, Gibson & Roberfroid (1995) introdujeron por primera vez el concepto de “prebiótico” como ingrediente alimentario no digerible que es fermentado por los microorganismos intestinales y estimula selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, lo que proporciona beneficios para la salud del huésped.

El concepto siguió evolucionando en los años siguientes, incluyendo que solo estimulaban las bacterias nativas o que eran alimentos fermentados que modificaban la microbiota gastrointestinal (Rastall & Gibson, 2015; Roberfroid, 2007). En este contexto, en 2017 la ISAPP redefinió los prebióticos como “sustrato utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped que confiere un beneficio para la salud” (Gibson et al., 2017b). Hoy en día, el debate sobre la definición de prebióticos continúa, y la Asociación Global de Prebióticos, un importante centro de información e industria comprometido con la sensibilización sobre los prebióticos, sus beneficios y la eficacia de los productos alimenticios que los contienen, propone un concepto más amplio de prebióticos basado en las definiciones anteriores: “un compuesto o ingrediente que es utilizado por la microbiota y que produce un beneficio para la salud o el rendimiento”,

dando pie a la implementación de compuestos bioactivos como prebióticos (Deehan et al., 2024).

2.3.1 Criterios de selección de prebióticos.

La selección de compuestos o ingredientes con potencial prebiótico debe basarse en criterios científicos que garanticen su funcionalidad, seguridad y evidencia de beneficio para la salud (Deehan et al. 2024b).

El primer criterio es la resistencia a los procesos digestivos, que deben presentar resistencia a la acidez gástrica, la hidrólisis por enzimas de mamíferos y la absorción gastrointestinal. Es esencial verificarlo mediante métodos *in vitro* e *in vivo* para que sea aceptado como candidato prebiótico (Ellegård, Andersson, and Bosaeus 1997; Glenn R. Gibson et al., 2010) El segundo criterio a mencionar es la fermentación selectiva por bacterias beneficiosas en el colon, para saber que el candidato prebiótico ha sido consumido por el microorganismo se cuantifica en función del tiempo utilizando métodos químicos, fisicoquímicos o enzimáticos. Se recomienda la fermentación *in vivo* de carbohidratos no digeribles para estudios de laboratorio y con animales (Parente et al., 2022). El tercer y cuarto criterio se abordan conjuntamente, ya que se ha requerido la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de las bacterias intestinales y, a su vez, están potencialmente asociados con la salud y el bienestar del huésped (Valcheva and Dieleman 2016). El criterio final asume que los prebióticos deben ser capaces de soportar las condiciones de procesamiento de los alimentos disponibles para el metabolismo bacteriano en el intestino (Wang, 2009), y es importante que las condiciones de procesamiento del alimento modelo al que se añaden los prebióticos presenten estabilidad para los consumidores, ya que, cuando entran en contacto con la microbiota intestinal, los prebióticos candidatos tienen una actividad positiva si son metabolizados correctamente por los probióticos (por ejemplo, *Lactocaseibacillus*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia*, etc.), pero no por otras bacterias intestinales como las patógenas (Sharma et al., 2023; Zhang et al., 2019). Así, los criterios para seleccionar un ingrediente alimentario como candidato a prebiótico se resumen en la [figura 2](#).

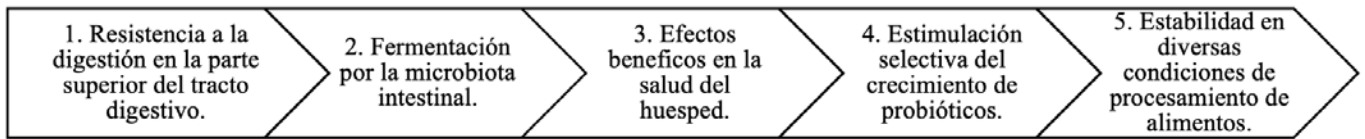


Figura 2. Requisitos para los posibles prebióticos (Markowiak and Ślizewska 2017).

2.3.2 Fuentes prebióticas convencionales y de nueva generación.

Los prebióticos han recibido atención recientemente y se han implementado en el desarrollo de alimentos funcionales (Neri-Numa et al., 2020). Los que más interés despiertan y que se utilizan por sus efectos beneficiosos para la salud son los carbohidratos no digeribles, como los galactooligosacáridos (GOS) y los fructooligosacáridos (FOS), que son GRAS (Gibson et al., 2017b; Kumar et al., 2015). Las investigaciones, los conceptos y los criterios de selección recientes permiten la inclusión de nuevos prebióticos, entre los que se encuentran compuestos bioactivos como los polifenoles, que han demostrado beneficios para la salud del huésped (Nguyen et al., 2022). A continuación se describe cada tipo de prebiótico (figura 3).

Los fructanos son polímeros naturales de fructosa que se utilizan en alimentos funcionales por sus propiedades prebióticas y sus beneficios para la salud del organismo. Son compuestos hidrosolubles de origen vegetal derivados de la sacarosa (Yoo et al., 2024). Se clasifican en dos tipos según su estructura: inulina (enlace $\beta 2 \rightarrow 1$), levan (enlace $\beta 2 \rightarrow 6$) y graminana (enlaces $\beta 2 \rightarrow 1$ y $\beta 2 \rightarrow 6$) (Bartolomeo et al., 2013). Dentro del grupo más amplio de los oligosacáridos, los fructooligosacáridos (FOS), más conocidos como FOS, que es el nombre común de los oligómeros de fructosa, son una serie de homólogos derivados de la sacarosa, normalmente designados con la fórmula química GF_n, que consisten en 1-kestosa (GF₂), nistosa (GF₃) y 1F- β -fructofuranosil nistosa (GF₄) con dos, tres y cuatro unidades de fructosilo unidas a la posición β -2,1 de la glucosa, respectivamente. Además, los galactooligosacáridos, conocidos principalmente como GOS, son carbohidratos no digeribles compuestos por entre 3 y 10 o más moléculas de galactosa y una molécula terminal de glucosa. Se producen mediante la catálisis de glicosidasas hidrolasas, normalmente con lactosa como sustrato, lo que da como resultado una mezcla de GOS con diferentes niveles de polimerización (Panesar et al., 2018). Los Xilooligosacáridos (XOS) son oligosacáridos lineales con unidades de d-xilosa unidas por cuatro enlaces glicosídicos β -1, su grado de polimerización es de 2 a 12 y se componen de xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa, xilopentosa, xilohexosa y xiloheptosa (Palaniappan, Antony,

and Emmambux 2021). Las propiedades prebióticas dependen de su estructura, el tipo de azúcares y el grado de polimerización (Riley et al., 2016). Además, los Quitoooligosacáridos (COS) son oligómeros de quitosano formados por la hidrólisis del quitosano con enlaces glicosídicos inestables, lo que se refiere a un grado de polimerización y un alto peso molecular (Lodhi et al., 2014), los COS tienen una gran ventaja debido a su solubilidad y menor peso molecular, lo que permite más aplicaciones biológicas, incluida la modulación de la composición de la microbiota intestinal mediante el aumento de *Bacteroides* y la inhibición de *Proteobacteria* y *Actinobacteria* (Liu et al., 2020). Por otro lado, la lactulosa es un polisacárido artificial compuesto por fructosa y galactosa, obtenido mediante la isomerización de la lactosa (Karakan, Tuohy, and Janssen-van Solingen 2021), métodos para elaborar la lactulosa incluyen técnicas químicas, enzimáticas y de electrooxidación (Aït-Aïssa and Aïder 2014). Es importante mencionar que el interés por la lactulosa se debe a que es resistente a la hidrólisis por los disacáridos que se encuentran en el intestino humano, por lo que llega intacta al colon, donde las bacterias probióticas, principalmente *Bifidobacterium* y *Lactocaseibacillus*, la metabolizan selectivamente para formar ácido láctico, dióxido de carbono, gas y AGCC (Panesar & Kumari, 2011). EL siguientes es el almidón resistente (RS), que son almidones y productos de degradación del almidón que no pueden ser absorbidos en el intestino delgado de huéspedes sanos, el almidón con propiedades digestibles se fermenta fácilmente en la microbiota intestinal, produciendo lactato y acetato, mientras que el almidón resistente se fermenta más fácilmente, produciendo butirato y acetato (Klostermann et al., 2024).

Hasta hace poco, el concepto se limitaba a ciertos carbohidratos no digeribles, pero en los últimos años se ha ampliado para incluir otros candidatos, como los polifenoles de origen vegetal ya que presentan un potencial significativo como prebióticos por sus complejas estructuras químicas y diversas actividades biológicas (Kesavan et al. 2018).

Los polifenoles son metabolitos químicos secundarios y los principales contribuyentes a la bioactividad antioxidante de las plantas, y son ricos en muchos alimentos vegetales, como frutas, verduras, cereales, café y té (Juanyun Chen et al., 2024; Mithul Aravind et al., 2021; Sayers, Wijeyesekera, and Gibson 2021). Se caracterizan por tener un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo en su estructura química (Alves-Santos et al. 2020). Múltiples estudios han demostrado que su consumo puede modular favorablemente la composición microbiana intestinal, proliferando bacterias probióticas beneficiosas como *Lactocaseibacillus*,

Bifidobacterium y *Akkermansia*, y al mismo tiempo inhibiendo microorganismos patógenos o proinflamatorios (Alves-Santos et al., 2020; Moorthy et al., 2020; Rodríguez-Daza et al., 2021; Sayers, Wijeyesekera, and Gibson 2021). Una vez ingeridos, los polifenoles solo se absorben parcialmente en el intestino delgado; una parte llega al colon, donde son metabolizados por la microbiota intestinal en diversos compuestos bioactivos y estas transformaciones microbianas generan metabolitos fenólicos y, de forma indirecta, promueven la producción de AGCC, ambos con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e inmunomoduladores (Zhang et al., 2023).

Los polifenoles se pueden clasificar en tres grupos principales: ácidos fenólicos, no flavonoides y flavonoides (incluidos antocianinas, procianidinas, etc). Dentro de esta clasificación destacan las procianidinas o taninos condensados que se forman mediante la polimerización de tres unidades elementales de flavan-3-ol: (+) - catequinas, (-) - epicatequinas y sus derivados (Nie & Stürzenbaum, 2019; Silvan et al., 2020). Masumoto et al., (2016) reportaron que la ingesta de procianidinas, un subgrupo específico de polifenoles se asoció con un incremento significativo en la abundancia de *Akkermansia muciniphila*.

Si bien estos hallazgos ponen en evidencia el potencial prebiótico de los polifenoles, se requieren más investigaciones *in vitro* e *in vivo* de compuestos aislados como las procianidinas para confirmar su potencial funcional (Alves-Santos et al., 2020).

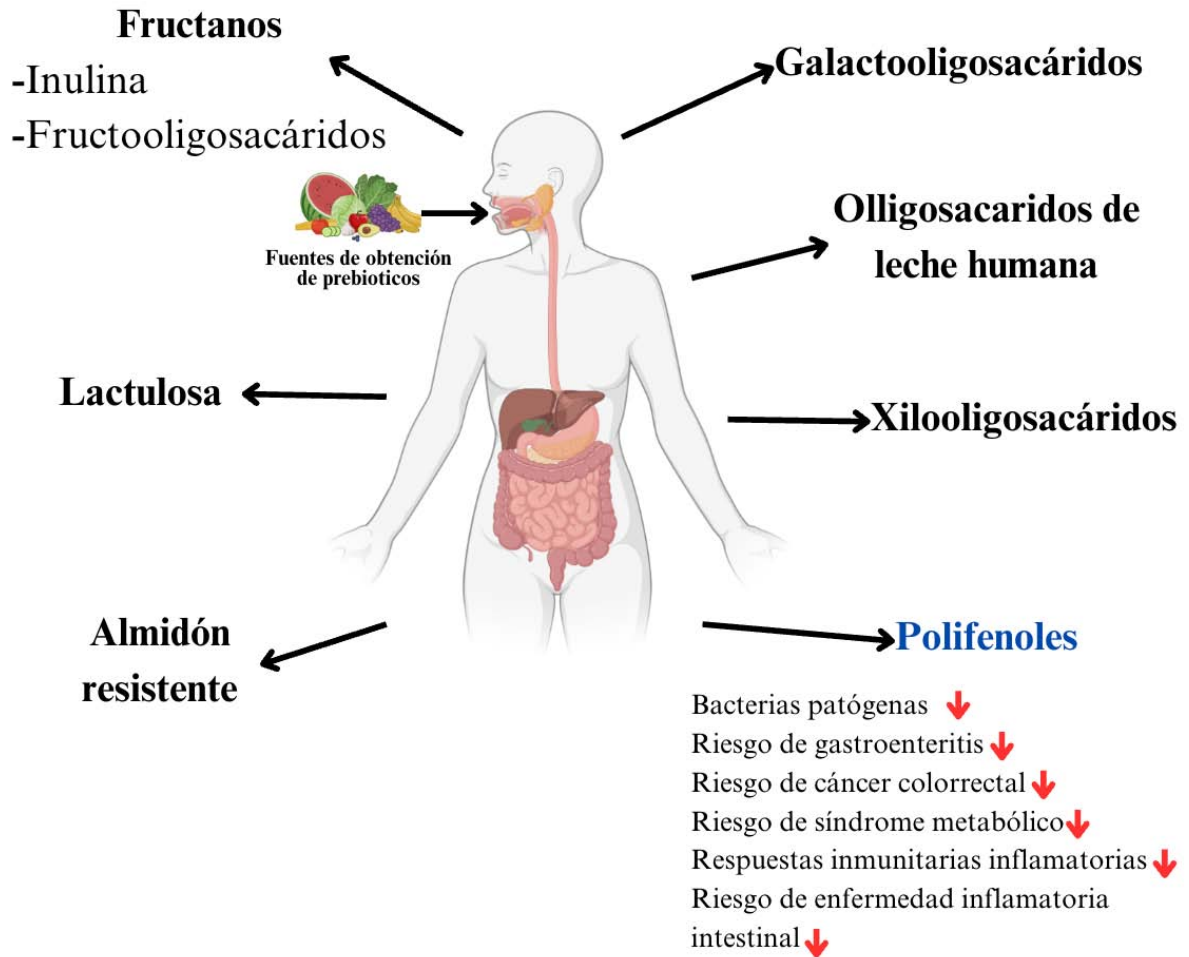


Figura 3. Tipos de prebióticos convencionales y de nueva generación.

2.4 Potencial prebiótico de las procianidinas

Las procianidinas (PC's) o taninos condensados, uno de los polifenoles más consumidos en la dieta humana, se forman por la polimerización de tres unidades elementales de flavan-3-ol: (+) - catequinas, (-) - epicatequinas y sus derivados (Figura 4) (Nie & Stürzenbaum, 2019; Silvan et al., 2020). Debido a las diferentes características de sus enlaces, se dividen en procianidinas de tipo A y B: los monómeros unidos por enlaces éter en las posiciones C2-O-C7/C2-O-C5 y C4-C8/C6 son de tipo A, por otro lado, los monómeros unidos por un enlace de C4-C8 o C4-C6 son de tipo B y, finalmente, los enlaces C4-C8/C4-C6 son de tipo C, sus estructuras se muestran en la figura 4 (Chen et al., 2024). Las procianidinas son una clase de compuestos polifenólicos que se encuentran en los alimentos de origen vegetal y pueden extraerse de fuentes como la piel

del cacahuete, la pulpa del café, las semillas de uva, las manzanas, el espino, las hojas de té, la corteza de pino, la piel del lichi, etc. (Castillo-Olvera et al., 2022; Han et al., 2023; Liu et al., 2020; Okino et al., 2021; Wang et al., 2023; Wong-Paz et al., 2021; Ye et al., 2022; Zhou et al., 2022).

Aunque tradicionalmente se clasifican como antioxidantes y antimicrobianas, nuevas investigaciones sugieren que las procianidinas pueden ser moduladoras selectivas de la microbiota intestinal, lo que ofrece un mayor potencial de beneficios para la salud, inflamación intestinal y la función de barrera (Redondo-Castillejo et al., 2023). El consumo de procianidinas previene la obesidad y modifica la composición de la microbiota intestinal (Zheng et al., 2018). Se confirmó que el consumo de procianidina tipo B2 reduce el aumento de peso y mejora la resistencia a la insulina en ratones obesos y diabéticos, y disminuye significativamente las bacterias Bacteroidetes en la microbiota intestinal, al mismo tiempo que mejora la microbiota intestinal, aumentando significativamente las proporciones de *A. muciniphila* (Xing et al., 2019). De igual forma se ha demostrado que las procianidinas de tipo A no solo mejoran la integridad de la barrera intestinal y reducen los marcadores inflamatorios, sino que también promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas como *Lacticaseibacillus*, *Bifidobacterium*, *A. muciniphila*, *Lachnospiraceae* y *Roseburia* (Huang et al., 2022; Liu et al., 2022; Man et al., 2020.; Tuohy et al., 2012; Zheng et al., 2018). El metabolismo microbiano de las procianidinas desempeña un papel importante en su funcionalidad, ya que la mayoría de las procianidinas no se absorben en el intestino delgado y llegan al colon, donde son degradadas por las bacterias intestinales en metabolitos fenólicos bioactivos, como los ácidos valerolactónicos y los ácidos fenólicos, que están asociados con efectos antioxidantes, antiinflamatorios y reguladores del metabolismo (Ou et al., 2014).

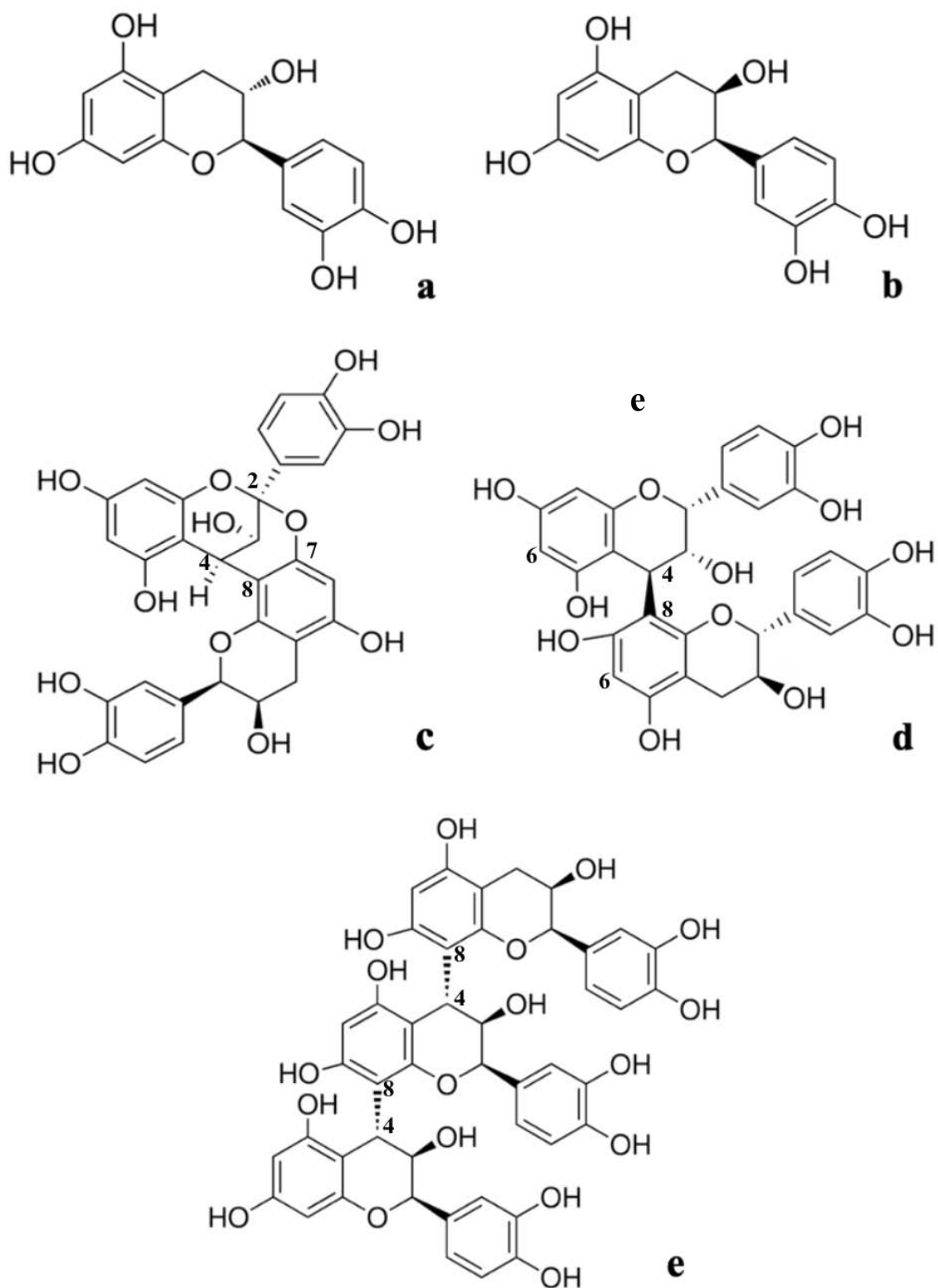


Figura 4. Unidades monoméricas de procianidina: a) (+) – catequinas, b) (-) – epicatequinas, c) PC's tipo A, d) PC's tipo B y PC's tipo C e) (Silvan et al., 2022)

2.4.1 Procianidinas de pulpa de café.

Las procianidinas son una clase de compuestos polifenólicos distribuidos en la naturaleza, se encuentran principalmente en frutas, semillas, corteza y diversos coproductos agroindustriales, como la cascara de litchi y la pulpa de café (Valencia-Hernandez et al. 2021; Yang et al. 2021). La pulpa de café, que representa hasta un 40 % del peso seco del fruto, ha sido identificada como una fuente particularmente rica en PC's. Los estudios de caracterización estructural han demostrado que las PC's presentes en este material están formadas principalmente por unidades de (-)-epicatequina unidas por enlaces C4-C8 y C4-C6, con grados de polimerización promedio entre 6 y 9 (Ramirez-Coronel et al., 2004; Wong-Paz et al., 2021). Estas características estructurales son importantes, ya que el grado de polimerización influye tanto en la bioactividad como en la biodisponibilidad.

La caracterización mediante técnicas avanzadas como HPLC-ESI-MS, floroglucinólisis y tioglucólisis han revelado la presencia de dímeros, trímeros y pentámeros, incluyendo un trímero tipo A (m/z 863), descrito por primera vez en pulpa de café por (Wong-Paz et al. 2021). Estos compuestos presentan una estructura química basada en flavan-3-oles con enlaces interflavánicos que determinan su capacidad antioxidante y su posible resistencia a la digestión intestinal, permitiendo su llegada al colon donde pueden modular la microbiota intestinal (Vázquez-Nuñez et al. 2025).

El rendimiento, la estabilidad y la bioactividad relativamente altos de estos compuestos hacen de la pulpa de café una materia prima atractiva para estudios *in vitro* destinados a explorar efectos prebióticos y otros beneficios para la salud.

3. Justificación

Los polifenoles son compuestos bioactivos de gran interés científico por su capacidad de modular la microbiota intestinal y su efecto prebiótico. Estos metabolitos secundarios están ampliamente distribuidos en fuentes vegetales como los coproductos agroindustriales, dentro de los que destaca la pulpa de café que ha despertado un interés creciente como fuente sostenible de polifenoles. Estos polifenoles pueden favorecer el crecimiento y la actividad de microorganismos beneficiosos, contribuyendo al mantenimiento de la salud intestinal. No obstante, gran parte de la evidencia se base en el uso de extractos, lo que dificulta atribuir los efectos observados a compuestos específicos. Su aprovechamiento permite atender problemáticas ambientales relacionadas con la generación de residuos contaminantes, a la vez que se le da un valor agregado. En este sentido, se presenta la oportunidad de realizar investigaciones empleando polifenoles aislados y purificados, particularmente en ensayos *in vitro*. Es por ello, que la presente investigación busca estudiar de manera unitaria los polifenoles purificados de la pulpa de café como posibles moduladores de probióticos en ensayos *in vitro* simulando la digestión oro-gastrointestinal.

4. Hipótesis

Las procianidinas (PC's) extraídas de la pulpa de café (*Coffea arabica*) presentan efecto como moduladores del crecimiento probiótico bajo simulación del tránsito oro-gastrointestinal *in vitro*.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de procianidinas purificadas como moduladores del crecimiento probiótico bajo simulación oro-gastrointestinal *in vitro*.

5.2 Objetivos específicos

1. Extraer y purificar procianidinas a partir de la pulpa de café.
2. Evaluar efecto de las procianidinas como modulador en el crecimiento probiótico.
3. Simular el tránsito oro-gastrointestinal *in vitro* de las procianidinas y su efecto sobre el crecimiento probiótico.

6. Materiales y métodos

6.1 Recolección y preparación del material vegetal.

La pulpa de café fresca se obtuvo del municipio de Xilitla, S.L.P., México en agosto del 2023 y fue trasladada inmediatamente al Laboratorio de Investigación de Alimentos (FEPZH – UASLP). La muestra se deshidrató en un horno convencional 40°C durante 72 h. Posteriormente se molió hasta obtener un polvo fino y se almacenó en bolsas herméticas cerradas en condiciones de oscuridad hasta su uso.

6.2 Extracción asistida por ultrasonido (EAU) de procianidinas

La extracción de procianidinas se llevó a cabo según la metodología descrita por Ramírez-Coronel et al., (2004), Wong-Paz et al., (2021) y Valencia-Hernández et al., (2025). La extracción se realizó utilizando 1 L de acetona acuosa como disolvente (70 % v/v) y 100 g de pulpa de café seca. El método aplicado consistió en la sonicación en un baño ultrasónico a 40kHz (Branson) a temperatura ambiente durante 10 minutos. El extracto de acetona se filtró con un filtro de papel Whatman No. 1 y se concentró por evaporación al vacío a 50 °C.

6.3 Purificación de procianidinas con columna de Sephadex LH-20.

La recuperación de fracciones de procianidinas a partir de extractos crudos se realizó utilizando el método Sephadex LH-20 (Zhou et al., 2011, 2014). En primer lugar, los extractos crudos concentrados se pasaron a través de una columna empaquetada con Sephadex LH-20 (previamente equilibrado con agua). Posteriormente, se realizó la elución en la columna utilizando los siguientes disolventes: agua (400 ml); etanol (350 ml); acetona acuosa (70 %, v/v) (300 ml) para obtener la fracción rica en procianidinas. Las fracciones se recuperaron manualmente utilizando cada disolvente mencionado. La fracción de acetona se concentró en un rotaevaporador para eliminar el disolvente orgánico y se sometió a secado (40 °C, 24 h), y luego se almacenó en viales para su posterior implementación. Las fracciones de agua y etanol se desecharon.

6.4 Determinación de procianidinas (prueba de HCl-butanol).

La determinación del contenido de procianidinas se llevó a cabo mediante la técnica ampliamente utilizada de HCl-butanol (Porter, Hrstich, and Chan 1985). Primeramente, se añadieron 250 µl de muestra junto con 1.5 ml de HCl-butanol y 50 µl de reactivo férrico, se agitó la mezcla de reacción en un vórtex y se colocó en un baño de agua a 95 °C durante 40

minutos. Se dejó enfriar durante 30 minutos y, a continuación, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. Tras la lectura, se determinó el número de procianidinas utilizando la curva estándar con el estándar de procianidina C1 (Wong et al., 2021).

6.5 Análisis HPLC-ESI-MS para caracterización de procianidinas.

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa se realizaron en un sistema Varian HPLC que incluye un muestreador automático (Varian ProStar 410, EE. UU.), una bomba ternaria (Varian ProStar 230I, EE. UU.) y un detector de PDA (Varian ProStar 330, EE. UU.). También se utilizó un espectrómetro de masas de trampa de iones de cromatógrafo líquido (Varian 500-MS IT Mass Spectrometer, EE. UU.), equipado con una fuente de iones de electropulverización. Las muestras de PC'S se prepararon a 5g/L de las cuales se tomaron 5 µL y se inyectarán en una columna de Denali C18 (150 mm 2.1 mm, 3µm, Grace, EE. UU.). La temperatura del horno se mantuvo en 30 °C. Los eluyentes fueron ácido fórmico (0,2 %, v/v; disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Se aplicó el siguiente gradiente: inicial, 3% B; 0-5 min, 9% B lineal; 5-15 min, 16% B lineal; 15-45 min, 50% B lineal. La columna se lavó y reacondicionó. El caudal se mantuvo en 0,2 ml/min y la elución se controló a 245, 280, 320 y 550 nm. Todo el efluente (0.2 mL/min) fue inyectado en la fuente del espectrómetro de masas, sin división. Todos los experimentos de EM se llevaron a cabo en modo negativo [M-H]⁻¹. El nitrógeno se utilizó como gas nebulizador y el helio como gas amortiguador. Los parámetros de fuente de iones fueron: voltaje de pulverización 5.0 kV y, voltaje capilar y temperatura 90.0 V y 350 °C, respectivamente. Los datos se recopilaron y procesarán utilizando el software MS Workstation (V 6.9). Las muestras se analizaron en primer lugar en modo de barrido completo adquirido en el rango m/z 50-2000 (Hernandez et al., 2025).

6.6 Cinéticas de fermentación con cepas probióticas

Para la evaluación del potencial probiótico, se utilizaron para la simulación de fermentación colónica las cepas: *Bifidobacterium* subsp. *longum* DSM20219 y *Akkermansia muciniphila* DSMZ-22959 proporcionadas por la unidad de servicio de Alimentos Funcionales, del Laboratorio Nacional Conahcyt para la evaluación de productos Bióticos (LaNAEPBi)-TecnM-Instituto Tecnológico de Durango. Estas cepas se encontraban congeladas en una mezcla al 30 % V/V de glicerol. Para la reactivación de *B. longum* se preparó caldo MRS 51g/L (Sigma-Aldrich) y se suplementó con 0.5 g/L de L-cisteína (Sigma-Aldrich). En el caso de *A. muciniphila*, se preparó como medio de cultivo 35.4 g/L de caldo anaerobio basal (OXOID)

enriquecido con 5 g/L de glucosa. Las cepas fueron incubadas en estufa de CO₂ a una concentración de 10% a 37 °C por 24 h.

Para realizar las fermentaciones fue necesario la formulación de dos medios de cultivo adecuados para cada cepa. Para *B. longum* se formuló un medio de cultivo MRS compuesto por 10 g/L de peptona de caseína (MCD LAB), 8 g/L de extracto de carne (MCD LAB), 4 g/L de extracto de levadura (MCD LAB), 2 g/L de fosfato de potasio dibásico (Sigma-Aldrich), 5 g/L de acetato de sodio trihidratado (Fermont), 2 g/L de citrato de triamonio (Sigma-Aldrich), 0.2 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado (MEYER), 0.384 g/L de sulfato de manganeso monohidratado (MEYER), 1 mL/L de Tween 80 al 0.01% (MEYER), 0.5 g/L de L-cisteína (Sigma-Aldrich) y 5 g/L de las PC'S como fuente de carbono. Para la cepa de *A. muciniphila* se formuló un medio compuesto por 35.4 g/L de caldo anaerobio basal (OXOID) y 5 g/L de las PC's. Ambos medios se esterilizaron a 15 psi durante 15 min. Estas fermentaciones se llevaron a cabo con un volumen de trabajo de 1mL y fueron inoculadas con 10% de cada cepa con un crecimiento de 12 h. Los cultivos fueron incubados en una atmósfera de 10% de CO₂ a 37°C durante 48 h. Estas fermentaciones se realizaron por duplicado.

Durante la fermentación, se realizó la evaluación del cambio de pH y cinéticas de crecimiento por la técnica de cuenta viable por microgota en placa (Tong, 2012) a las 0, 24 y 48 h. Las placas Petri, fueron preparadas con 51 g/L de medio de MRS (Sigma-Aldrich), 0.5 g/L de L-cisteína (Sigma-Aldrich) y 13 g/L de agar bacteriológico (MCD LAB) para *B. longum*; mientras que para *A. muciniphila* se utilizaron 35.4 g/L de caldo anaerobio basal (OXOID), 5 g/L de glucosa y 12 g/L de agar bacteriológico (MCD LAB). Las placas una vez inoculadas se incubaron a 37 °C, 10% de CO₂ por 48 h.

6.7 Evaluación del potencial prebiótico de las PC's

6.7.1 Pretratamiento de digestión *in vitro*

La digestión de las procianidinas se llevó a cabo siguiendo el método de simulación del tránsito oro-gastrointestinal *in vitro* propuesto por Bove et al., (2012) con ligeras modificaciones.

Para emular el efecto de la saliva, se agregó lisozima obtenida de la clara de huevo de gallina (Sigma-Aldrich) (0.15 g/L), a una solución electrolítica gástrica con 500 mg de la muestra de PC's. Posteriormente, se recreó el ambiente gástrico incorporando pepsina (Sigma-Aldrich) (3 g/L). El pH se ajustó mediante adiciones sucesivas de HCl 2 M o NaHCO₃ 1 M, según fuera

necesario, hasta alcanzar un pH de 3, y se incubó bajo agitación a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, la solución se ajustó a pH 2 y se incubó durante otros 30 minutos.

Para simular el entorno intestinal, se introdujeron sales biliares (3 g/L) y pancreatina (1 g/L) (Sigma-Aldrich). El pH de la solución se ajustó a un rango de 6.5 a 6.7 y se incubó bajo las mismas condiciones durante 1 hora. Finalmente, se emuló el proceso de absorción en el intestino delgado diluyendo las muestras en una solución electrolítica intestinal, donde se mantuvieron en incubación durante 30 minutos, en las mismas condiciones de agitación y temperatura.

Una vez finalizada la simulación, la solución del digerido de las PC's se recuperaron por centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos y se secó a 30 °C en una estufa de convección por 24 h. A estas PC's-dig obtenidas se les realizó un análisis de caracterización por HPCL-ESI-MS descrito en la *sección 6.5* y posteriormente fueron utilizadas como fuente de carbono de las cepas probióticas seleccionadas. Para esto, se procedió a desarrollar una nueva cinética de fermentación bajo las condiciones descritas anteriormente (*sección 6.6*), con ligeras modificaciones, siendo esta vez la cuantificación por medio de la cuenta viable por microgota con los siguientes tiempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h. Adicionalmente se cuantificaron la cantidad de procianidinas por medio de la técnica de HCl-butanol a las 0 y 48 h de la cinética. En el tiempo final de esta fermentación a las 48 h se tomó 1 mL de cada cultivo por triplicado para la cuantificación de AGCC por medio de UPLC-MS-TQS, se conservaron en congelación a -20 °C hasta su análisis.

Por último, se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento de *B. longum* y *A. muciniphila*, a los que se aplicó el modelo de Gompertz, utilizado para describir el crecimiento microbiano (Menchetti et al., 2020). Este modelo permitió estimar parámetros clave como la tasa de crecimiento específico máxima. El modelo matemático utilizado fue:

$$Y = Y_M * (Y_0 / Y_M)^{\exp(-K * X)}$$

donde:

- **Y₀** es la población inicial (mismas unidades que Y)
- **Y_M** es la población máxima (mismas unidades que Y)
- **K** determina el tiempo de retraso (inverso de las unidades de tiempo X)
- **1/K** es el valor X del punto de inflexión

Los datos experimentales se ajustaron al modelo mediante regresión no lineal utilizando el software Prism 9.

6.8 Cuantificación de la producción de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC).

Para la cuantificación de AGCC se llevó a cabo una derivatización de las muestras de acuerdo con el método propuesto por Han et al., (2015). Se tomó una alícuota de 40 μL de la muestra a una concentración de 5g/L y se le adicionaron 20 μL de una solución 200 mM de 3 nitrofenilhidrazina (3NPH) y 20 μL de una solución 120 mM de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodimida (EDC) (el EDC se disuelve en una solución de piridina al 6%). Esta mezcla de 80 μL se incubó a 40°C durante 30 minutos en un baño seco. Posteriormente se colocaron en hielo durante 1 minuto para luego adicionar 120 μL de una mezcla acetonitrilo: agua (1:10). Por último, las muestras se filtraron con acrodiscos de PVDF, 13 MM 0.45 μm y se colocaron en viales con septa pre-horadada para su inyección en el equipo de cromatografía.

La cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta se llevó a cabo en un sistema de Acquity UPLC (Agua Corp., Milford, MA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas con tándem Xevo TQ-S triple cuadrupolo (Waters Corp. Milford, Massachusetts, USA.). El sistema LC está equipado con un colector de muestra (20 °C) y bomba de sistema binario. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna HSS C18 SB (2.1 x 100 mm, 1.7 μm) empleando como fase móvil: solvente “A” agua con ácido fórmico (100:0.01 v/v) y solvente B acetonitrilo con ácido fórmico (100:0.01, v/v). La velocidad de flujo fue de 0.35 mL/min, la temperatura de la columna fue de 40 °C. Se inyectaron muestras de 0.2 μL .

La concentración de los AGCC (acetato, propionato, butirato, y valerato) se cuantificó por medio de curvas estándar elaboradas a partir de soluciones patrón de concentración conocida.

6.9 Evaluación de la actividad antibacteriana de las procianidinas contra la bacteria *Salmonella* ser Typhirium (ATCC 14028).

Para la evaluación de la capacidad antibacteriana de las procianidinas purificadas y digeridas, se prepararon dos soluciones con DMSO (30% v/v) a concentraciones de 5 y 10 g/L, para posteriormente someterse al ensayo contra una de las bacterias patógenas más comunes en la microbiota intestinal, proporcionada por el Laboratorio de Investigación de Alimentos de la FEPZH–UASLP y correspondiente a la colección de microorganismos del Laboratorio Estatal de Salud Pública (COEPRIS). Una asada de la bacteria *Salmonella* ser Typhirium (ATCC

14028), fue inoculada en 5 mL en caldo nutritivo y se incubo a 35°C durante 24 h para su revitalización. Una vez activada la bacteria se inoculo una asada en placas de agar Muller Hinton y se incubo a 35°C por 24 h nuevamente. Posteriormente se tomaron una asada de inóculo y se transfirieron a tubos de vidrio con 5 mL de solución salina (0.855) hasta alcanzar una turbidez cercana a 0.5 según la escala de Mac Farland (1.5×10^8 UFC/mL) medida en un espectrofotómetro. Finalmente se llevó a cabo la determinación de la actividad antibacteriana contra *S. typhi* utilizando el método de difusión en disco por triplicado. Se prepararon de nuevo placas de agar Muller Hinton y se inocularon con la suspensión previamente ajustada de cada inóculo en toda la superficie (césped), utilizando un hisopo estéril. A continuación, se colocaron en las placas de agar los discos de papel filtro estéril impregnados con las concentraciones de las PC's purificas y digeridas a 5 y 10 g/L. Tras 15 minutos de reposo, las placas inoculadas se incubaron a 35°C durante 24 h. Se utilizaron discos de papel filtro con DMSO (10 y 30% v/v) como control negativo y ampicilina (5 y 10 g/L) como control positivo. Tras 24 h de incubación a 37°C, se midió el radio de los halos de inhibición y se expresó en mm de inhibición (Cockerill, 2012).

7. Resultados y discusión

7.1 Purificación y determinación de procianidinas (PC's)

Las PC's se obtuvieron a partir de pulpa de café seca mediante un proceso de extracción y purificación cromatográfica, utilizando una columna empaquetada con Sephadex LH-20. Esta metodología se basó en estudios descritos por Ramírez-Coronel et al., (2004) y Wong-Paz et al., (2021), con modificaciones en las condiciones de elución y el volumen de disolvente. Durante la purificación, se aplicaron tres fases de elución sucesivas: agua, etanol y acetona al 70 %, siendo esta última, la fracción de interés debido a su contenido reportado de procianidinas (Wong-Paz et al., 2021). La cuantificación se realizó mediante el método colorimétrico HCl-butanol, una prueba específica para la detección de flavan-3-oles condensados. De los resultados obtenidos por cada 100 g de pulpa de café se obtuvieron 32 mg de fracción de acetona que corresponde a las PC's purificadas (0.32% respecto al peso seco de la pulpa de café). De esta fracción se preparó una muestra a 500 ppm a la cual se le realizó la reacción de HCl-butanol resultando en 490.35 mg PC-1/L (96 % de pureza) de las PC's. Del mismo modo, Wong-Paz et al., (2021) lograron una fracción con un 98 % de pureza de procianidinas implementando extracción asistida con ultrasonido. Recientemente Bamikale et al., (2025) reportaron una pureza del 98.9 % pero implementado un método híbrido de extracción (extracción asistida por microondas y ultrasonido). Por tanto, el porcentaje de pureza en esta investigación es similar a lo reportado en diversos estudios, comprobando la eficiencia del método de extracción y procesos de purificación.

Por otro lado, aunque el rendimiento mencionado puede parecer bajo, es coherente con informes previos sobre matrices vegetales ricas en polifenoles, especialmente cuando se utilizan métodos de purificación específicos que eliminan otros compuestos no fenólicos. Por ejemplo, Ramírez-Coronel et al., (2004) informaron proantocianidinas a partir de pulpa de café fresca del 0.48%, determinado por cromatografía de alta resolución. De forma similar Valencia-Hernández et al., (2025b) describieron rendimientos entre 0.25 y 0.52% en función del solvente utilizado (etanol o acetona acuosa) y del grado de polimerización de las PC's. Mas recientemente Bamikale et al., (2025) optimizaron un proceso híbrido de extracción por microondas y ultrasonido, alcanzado una recuperación del 0.61% de PC's totales en base seca. En este contexto, el rendimiento del 0.32% reportado en este estudio se ubica dentro del rango inferior pero comparable con valores reportados en la literatura, considerando además que el proceso priorizo

la selectividad y pureza del extracto sobre la cantidad total recuperada, por lo que el rendimiento obtenido refleja una extracción selectiva para obtener compuestos de alta pureza sobre el volumen total recuperado.

7.1.2 Análisis de procianidinas mediante HPLC-ESI-MS.

La fracción de acetona (70%) después de la purificación en Sephadex LH-20 se analizó mediante HPLC-ESI-MS para identificar los pesos moleculares (m/z) y los tiempos de retención (t_r) de las PC's presentes en la muestra. La identificación de los compuestos se basó en el análisis de masas y en los datos científicos de la literatura existente. Como se muestra en la [tabla 1](#), en la fracción de acetona al 70% se detectaron dos iones destacados. El primero, con una carga molecular de 863 m/z y un t_r de 34.7 minutos, correspondiente al trímero de PC's tipo A. El segundo con 865 m/z y un t_r de 34.9 minutos, indica la presencia de la PC's C1.

Estos hallazgos ponen en relieve la presencia de diferentes tipos de PC's en la fracción implementada para este estudio. Investigaciones anteriores han documentado la extracción, purificación parcial y caracterización de las PC's de la pulpa de café utilizando HPLC-ESI-MS, lo que respalda los hallazgos de este estudio (Bamikale et al. 2025; Valencia-Hernández et al. 2025a; Wong-Paz et al. 2021). Se ha reportado que los trímeros de PC's poseen una serie de actividades biológicas, entre las que se incluye la neuroprotección, propiedades anticancerígenas, efectos analgésicos, antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes (Qiao et al. 2020a, 2020b; Wen et al. 2022).

Tabla 1. Caracterización e identificación mediante HPLC-ESI-MS/MS de las principales procianidinas oligoméricas presentes en la fracción de acetona purificada con Sephadex LH-20.

t_r (min)	Masa-carga (m/z)	Compuesto tentativo
34.7	863	Trímero de procianidina tipo A
34.9	865	Procianidina C1

7.2 Evaluación de las procianidinas purificadas como moduladores en el crecimiento probiótico.

Los resultados de la [tabla 2](#) muestran el efecto de las PC's purificadas como moduladores del crecimiento probiótico de *B. longum* y *A. muciniphila* a las 0 y 48 horas de incubación, en comparación con la glucosa como única fuente de carbono. En términos del logaritmo de unidades formadoras de colonias (Log UFC/mL) para ambos casos, el crecimiento de *B. longum* con PC's pasó de 8.014 ± 0.02 a 8.204 ± 0.00 , equivalente a un incremento de 0.190 (5.70×10^7 UFC/mL), menor a lo obtenido con glucosa de 7.935 ± 0.05 a 8.477 ± 0.00 , con incremento de 0.542 (2.14×10^8 UFC/mL). Por otro lado *A. muciniphila* mostró un aumento de 8.121 ± 0.07 a 8.881 ± 0.002 , correspondiente a 0.760 (6.28×10^8 UFC/mL), mayor a los resultados con glucosa de 7.418 ± 0.007 a 7.999 ± 0.04 , con incremento de 0.581 (7.35×10^7 UFC/mL). Estos resultados evidencian un efecto de las PC's como promotoras del crecimiento microbiano probiótico en mayor medida sobre *A. muciniphila* comparado con el sustrato convencional glucosa.

El comportamiento observado sugiere que las PC's pueden ser metabolizadas para generar condiciones favorables para el crecimiento de las bacterias probióticas. Estos resultados son relevantes porque, según estudios previos, la mayor parte de la investigación sobre polifenoles y microbiota se ha enfocado en extractos complejos (como de cacao, té, manzana o uva) pero no en PC's purificadas (Rodríguez-Daza et al., 2021; Shoji, Masumoto, and Miura 2024). La evidencia actual indica que los polifenoles, incluidos los compuestos tipo PC's, pueden servir como compuestos selectivos para géneros beneficiosos como *Bifidobacterium* y *Akkermansia*, promoviendo la proliferación y posiblemente la producción de metabolitos fermentativos beneficiosos para el huésped (Alves-Santos et al., 2020).

En cuanto al pH, se observó un descenso moderado en ambos casos con PC's de 5.920 ± 0.01 a 5.403 ± 0.01 para *B. longum* y de 5.897 ± 0.001 a 5.783 ± 0.001 para *A. muciniphila*. Cuando las bacterias probióticas fermentan compuestos o carbohidratos complejos, el descenso de pH suele ser menor comparado con azúcares simples como la glucosa. El cambio de pH con glucosa como fuente de carbono para *B. longum* fue de 5.550 ± 0.01 a 3.823 ± 0.01 y para *A. muciniphila* de 6.017 ± 0.06 a 4.243 ± 0.01 . Esto se debe a que la fermentación de carbohidratos o compuestos complejos tiende a generar menos ácido láctico y más AGCC (acetato, propionato o butirato) los cuales modifican en menor medida el pH de una solución (García-Núñez et al., 2022; Macfarlane and Macfarlane 2003; Reichardt et al., 2018).

Dado que no se ha encontrado información sobre estudios de la acción prebiótica directa de PC's extraídas de la pulpa en estas cepas probióticas, estos resultados adquieren un valor exploratorio importante representando una primera evidencia experimental de que las PC's purificadas de la pulpa de café pueden estimular el crecimiento de probióticos que son clave en la salud intestinal humana. Esto justifica la continuación de la investigación hacia la evaluación del efecto prebiótico de las PC's tras la digestión oro-gastrointestinal *in vitro*.

Tabla 2. Efecto de los PC's purificadas como moduladores del crecimiento probiótico por *B. longum* y *A. muciniphila*.

Bacteria	Fuente de Carbono	Log UFC/mL			pH	
		0 h	48 h	Δ de biomasa	0 h	48 h
<i>B. longum</i>	PC's	8.014 ± 0.02	8.204 ± 0.00	0.190	5.9 ± 0.01	5.4 ± 0.01
	Glucosa	7.935 ± 0.05	8.477 ± 0.00	0.542	5.5 ± 0.00	3.8 ± 0.01
<i>A. muciniphila</i>	PC's	8.121 ± 0.07	8.881 ± 0.02	0.760	5.8 ± 0.01	5.7 ± 0.01
	Glucosa	7.418 ± 0.07	7.999 ± 0.04	0.581	6.0 ± 0.06	4.2 ± 0.01

7.3 Simulación del tránsito oro-gastrointestinal *in vitro* de las procianidinas y su efecto prebiótico.

7.3.1 Simulación del tránsito oro-gastrointestinal *in vitro*

La simulación del tránsito oro-gastrointestinal *in vitro* se llevó a cabo con el fin de evaluar la estabilidad y el comportamiento de las PC's purificadas frente a condiciones fisiológicas simuladas del proceso digestivo humano. Para ello, se adicionaron 500 mg de PC's purificadas en la simulación *in vitro* y, tras finalizar la digestión, se recuperaron 435 mg del material seco. De manera visual, no se observaron pérdidas apreciables ni cambios notorios en el aspecto del extracto, lo que sugiere que las PC's presentan una alta resistencia a la degradación directa bajo condiciones del modelo empleado (figura 5). No obstante, es reconocido que los polifenoles de estructura compleja pueden sufrir transformaciones parciales durante la digestión gastrointestinal, principalmente por la acción de las enzimas, el pH variable y las sales biliares. Estas modificaciones pueden incluir reordenamiento en enlaces interflavánicos, oxidación o despolimerización parcial, sin que necesariamente ocurra una pérdida total del compuesto o de su actividad biológica (Cavia et al. 2023; Tagliazucchi et al. 2010).

Por lo tanto, aunque la masa final recuperada no muestra una disminución significativa respecto a la inicial, es probable que ocurran cambios intra e intermoleculares en la estructura de las PC's empleadas. Dichas transformaciones fueron estudiadas por medio del HPLC-ESI-MS.

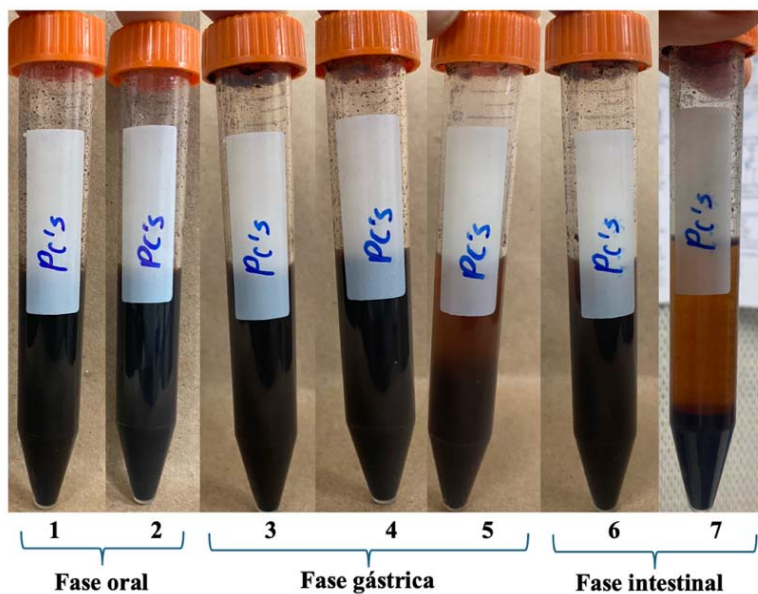


Figura 5. Simulación del tránsito oro-gastrointestinal *in vitro*.

7.3.2 Propuesta del metabolismo y cambio en la estructura de las procianidinas antes y después de la digestión oro-gastrointestinal *in vitro* por HPLC-ESI-MS

Para la caracterización por medio del HPLC-ESI-MS se emplearon PC's purificadas (figura 6A) y PC's sometidas a la digestión oro-gastrointestinal *in vitro* (figura 6B). Ambas muestras se prepararon a una concentración de 5000 ppm, la cual fue seleccionada en función de la cantidad a implementar en los ensayos posteriores en la evaluación de la modulación de bacterias probióticas. Los perfiles obtenidos permiten comparar los cambios estructurales de las PC's antes y después de la digestión, con el objetivo de comprender como estas transformaciones pueden influir en su biodisponibilidad y en el potencial de ser aprovechadas por la microbiota intestinal.

Las PC's están compuestas por unidades de catequina y epicatequina; cuando se ingieren, se someten a un metabolismo extenso en el tracto intestinal antes de su absorción. Su destino metabólico está influenciado por el grado de polimerización, la interacción con la microbiota intestinal y las transformaciones enzimáticas (Dasiman et al., 2022). Como se reportó en la sección 7.1.2, las PC's purificadas fueron caracterizadas por medio del HPLC-ESI-MS donde se identificaron la presencia de 2 tipos de PC's, la primera con una carga molecular de 863 *m/z* y un *t_r* de 34.7 minutos, correspondiente al trímero de PC's tipo A. El segundo con 865 *m/z* y un *t_r* de 34.9 minutos, indica la presencia de la PC's C1.

Con base en la literatura cuando se ingieren este tipo de procianidinas, se ha reportado que estas presentan un complejo proceso metabólico a través del tracto digestivo, aunque hasta la fecha no está esclarecido su proceso de transformación en su totalidad. Se cree que inicialmente, en la cavidad bucal, los procesos de hidrólisis están mediados por enzimas salivales como la lisozima, que liberan formas más simples, aunque la estructura polimérica principal permanece estable (Shoji, Masumoto, and Miura 2024). A continuación, en el estómago, en un entorno ácido (pH 2), se ha reportado que se produce una hidrólisis limitada y/o autooxidación, lo que produce una despolimerización parcial de las procianidinas, como demuestran los estudios que informan de su estabilidad en condiciones gástricas simuladas (Rios et al., 2002; Yongchuang Zhang et al., 2025). Al llegar al intestino delgado, se produce una hidrólisis enzimática adicional, que libera monómeros, procianidinas metiladas y formas conjugadas, algunas de las cuales atraviesan la barrera intestinal y pasan a la circulación portal y sistémica, mientras que la mayoría continúa su tránsito hacia el colon (Han et al., 2023). El intestino grueso se convierte

en el principal lugar de metabolización, donde las procianidinas no absorbidas se someten a fermentación por bacterias beneficiosas para ejercer un efecto de mejora en la salud en el huésped y, durante este proceso, se degradan en metabolitos fenólicos de bajo peso molecular, como ácidos fenilacéticos, ácidos valerolactónicos y ácidos fenólicos simples (Ou et al., 2014; Yaxiong Wang et al., 2025).

Interesantemente, tras la digestión oro-gastrointestinal *in vitro*, en esta investigación, el cromatograma obtenido evidencia cambios significativos en el perfil de las PC's (Figura 7B). Los picos principales característicos de las PC's se ven disminuidos de manera importante con la aparición de nuevas señales con tiempos de retención distintos, desafortunadamente los nuevos compuestos generados (biotransformados) no se pudieron ionizar bajo las condiciones estudiadas en el HPLC-ESI-MS, lo que indica que las condiciones enzimáticas y el ambiente gástrico promovieron la biotransformación de las PC's purificadas (Anexo 1).

La figura 7 resume este proceso: comienza con la ingestión de alimentos ricos en procianidinas, pasa por las etapas de hidrólisis salival y gástrica, seguida de la absorción parcial en el intestino delgado y, finalmente, la fermentación activa en el colon, donde se generan metabolitos fenólicos que pueden ser absorbidos, metabolizados en el hígado, distribuidos en la circulación general o excretados en la orina. Los metabolitos resultantes no solo aumentan la biodisponibilidad de los polifenoles, sino que también ejercen funciones antioxidantes y antiinflamatorias y confirman el efecto prebiótico, lo que repercute positivamente en la composición de la microbiota intestinal al proliferar bacterias beneficiosas que mejoran la salud del huésped (Niwano et al., 2022).

En conjunto, este metabolismo brinda importancia al tener en cuenta no solo la estructura inicial de las PC's, sino también sus productos de fermentación microbiana como factores clave en su efecto prebiótico y sus beneficios para la salud humana. Aún queda mucho por investigar sobre el metabolismo de las PC's en el tracto intestinal, lo que da lugar a futuras investigaciones para dar continuidad a trabajos anteriores con el fin de comprender la biotransformación de las PC's cuando son consumidas y absorbidas por la microbiota intestinal.

No obstante, aunque la presente investigación respalda la biotransformación de las PC's durante la digestión, persisten interrogantes sobre los mecanismos exactos de transformación y la contribución específica de cada metabolito en la modulación microbiana. Se requieren más estudios que integren modelos dinámicos de digestión *in vitro* e *in vivo*, junto con análisis

metabolómicos avanzados, para comprender en detalle como estas transformaciones impactan en la biodisponibilidad y la relación con bacterias intestinales de interés.

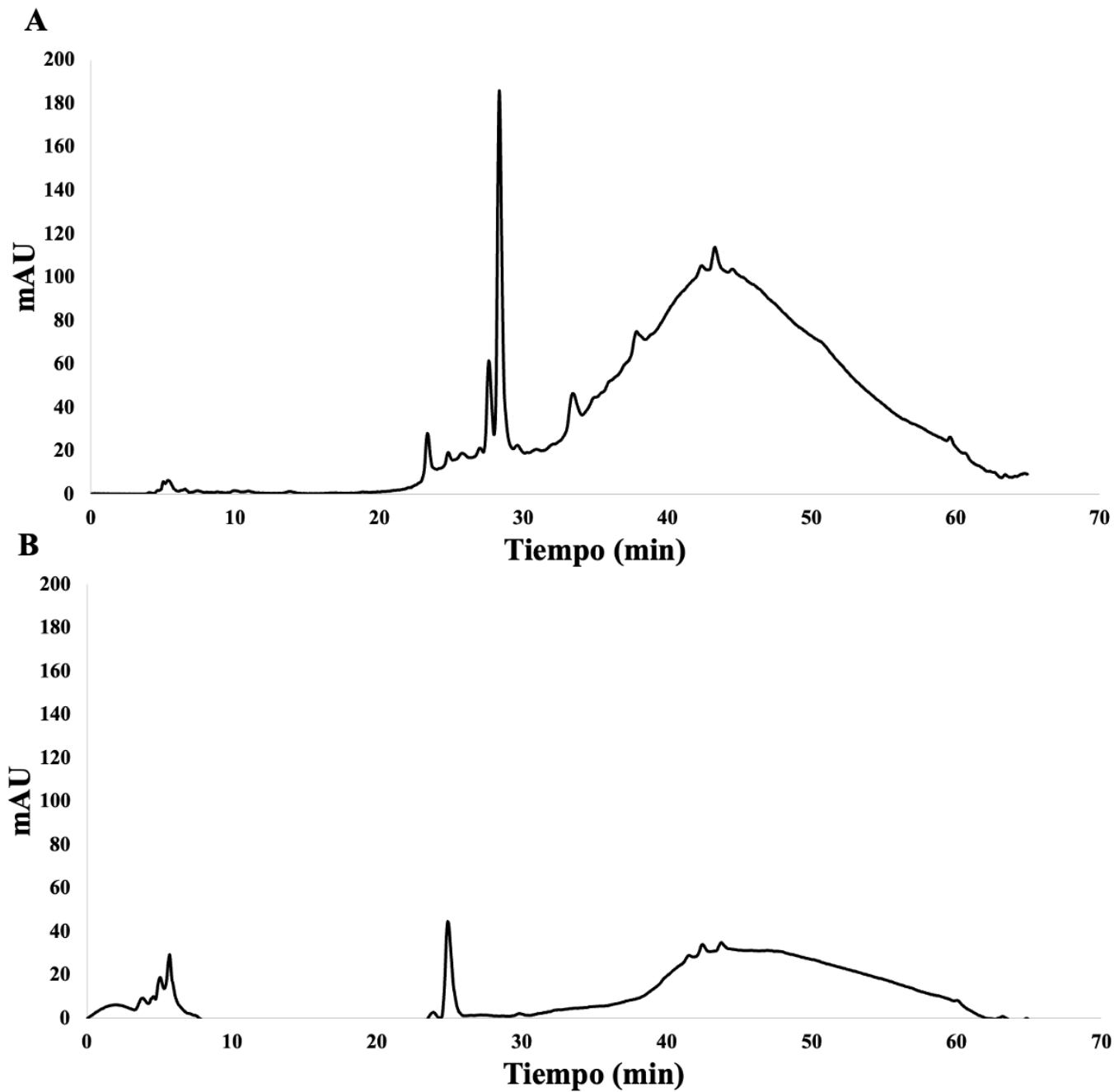


Figura 6. Cromatogramas por HPLC-ESI-MS de PC's purificadas (A) y PC's después de la digestión *in vitro* (B) en concentración de 5000 ppm.

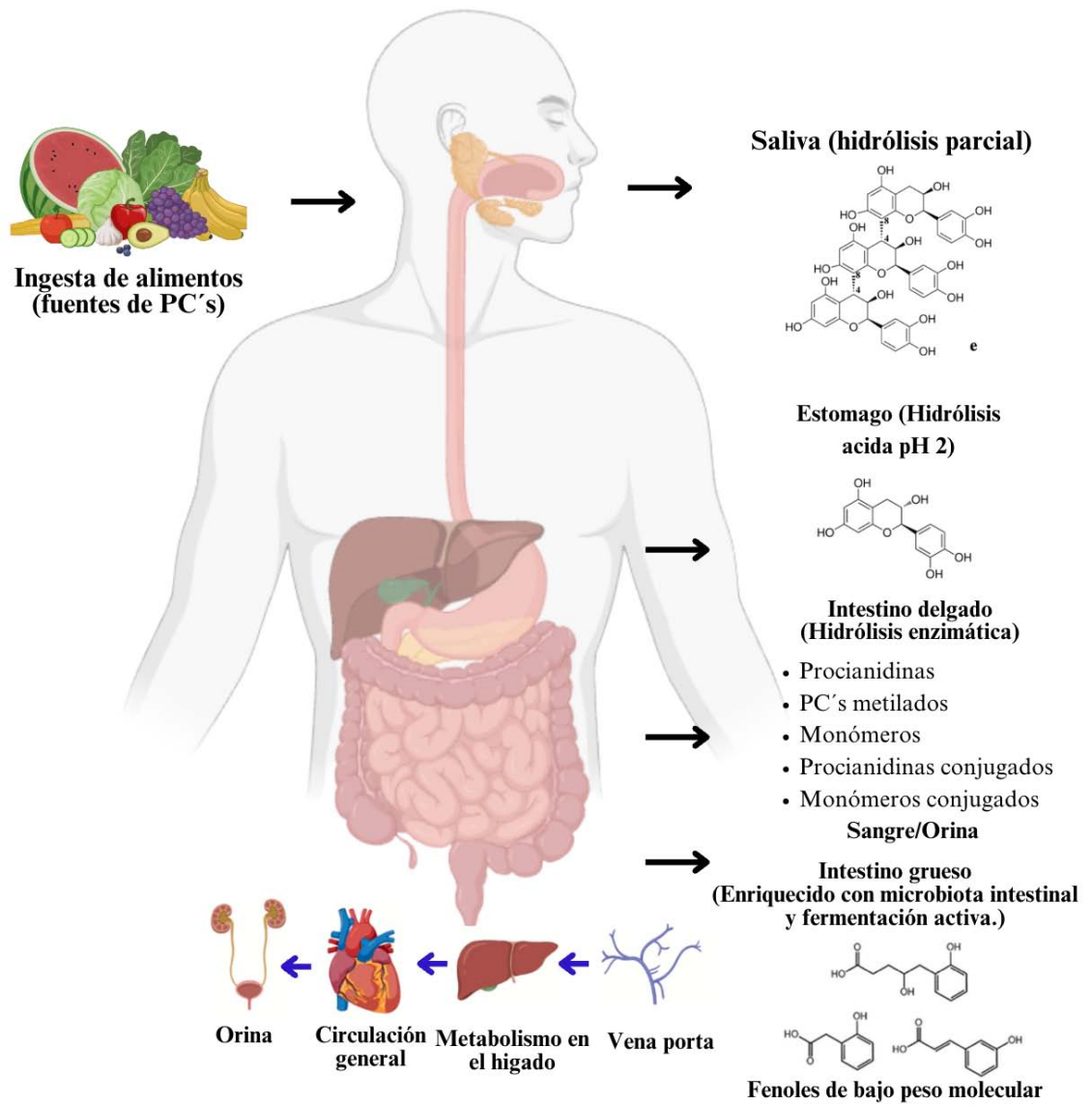


Figura 7. Propuesta de la biotransformación de las procianidinas en el huésped.

7.3.3 Efecto prebiótico de las PC's digeridas en el crecimiento de bacterias probióticas.

La evaluación del efecto prebiótico de las PC's digeridas (PC's dig) se llevó a cabo comparándolas con una fuente prebiótica ya reconocida como lo es la inulina y una fuente de carbono convencional, la glucosa, frente a las bacterias *Bifidobacterium longum* y *Akkermansia muciniphila*. Este enfoque permitió determinar la capacidad de las PC's dig para modular el crecimiento probiótico y compararlas contra un prebiótico ampliamente reconocido.

En el caso de *B. longum*, se registró un incremento en el crecimiento bacteriano desde 7.97 ± 0.05 a 8.94 ± 0.02 Log UFC/mL tras 12 h de fermentación con PC's dig, correspondiente a un aumento de aproximadamente 1.0 Log UFC/mL (7.78×10^8 UFC/mL), equivalente a un incremento de casi 10 veces la biomasa bacteriana inicial. Este valor es menor al alcanzado con inulina de 1.30 Log UFC/mL (5.58×10^8 UFC/mL), y superior al obtenido con glucosa de 0.75 Log UFC/mL (3.92×10^8 UFC/mL), lo que sugiere que las PC's dig pueden estimular el crecimiento de *B. longum* similarmente que con la inulina un prebiótico reconocido en el mercado. El pH descendió de 6.48 ± 0.01 a 5.79 ± 0.01 con las PC's dig, de manera similar de 6.70 ± 0.01 a 5.96 ± 0.00 para la inulina, indicando la producción de AGCC propios de la fermentación cuando se implementan compuestos complejos (Reichardt et al., 2018). Por otro lado, el descenso fue más pronunciado para la glucosa de 5.55 ± 0.00 a 3.82 ± 0.01 indicando la presencia de ácido láctico que es característico para acidificar este tipo de fermentación, pero no para una mayor producción de metabolitos benéficos (Tabasco et al., 2011). Asimismo, se observó un consumo del 70% de las PC's dig iniciales de 505 a 151 mg/mL en la modulación del crecimiento de *B. longum* al tiempo final de la fermentación (Tabla 3).

Para *A. muciniphila*, se observó un efecto más pronunciado. El crecimiento bacteriano con PC's dig aumento desde 7.33 ± 0.07 hasta 9.00 ± 0.008 Log UFC/mL en 12 h, alcanzando una biomasa de 1.70 Log UFC/mL (9.79×10^8 UFC/mL), la más alta entre los tratamientos evaluados, y superando incluso a la inulina con un Δ en biomasa de 1.30 (4.07×10^8 UFC/mL) y glucosa con 1.20 (3.89×10^8 UFC/mL). Este hallazgo refuerza el hecho de que las PC's dig estimulan de forma más efectiva el crecimiento de *A. muciniphila*, lo que resulta de suma importancia ya que esta bacteria es clave en la regulación del metabolismo energético y la integridad de la mucosa intestinal (T. Zhang et al. 2019; Zhao et al. 2024). El pH disminuyó de 6.34 ± 0.02 a 6.10 ± 0.03 , similar al de la inulina de 6.97 ± 0.00 a 6.31 ± 0.02 , los cuales son valores menos drásticos que el observado con glucosa (hasta 4.24 ± 0.01), lo cual sugiere un perfil fermentativo más

equilibrado y compatible con un ambiente intestinal saludable (Macfarlane and Macfarlane 2003; Shaheen et al., 2025). El contenido de PC's se redujo de 505 a 229 mg/L, lo que comprueba en consumo de las PC's dig durante la fermentación por parte de *A. muciniphila* (Tabla 3). Este comportamiento ha sido descrito en estudios recientes, donde *A. muciniphila* puede transformar PC's de alto peso molecular en metabolitos más simples (Alves-Santos et al. 2020; Shoji, Masumoto, and Miura 2024).

Los parámetros cinéticos derivados del modelo de Gompertz (Tabla 4) respaldan lo reportado anteriormente. En *B. longum*, los valores máximos de crecimiento (YM) fueron 8.734 ± 0.021 para inulina, 8.693 ± 0.011 para PC's dig y 8.567 ± 0.08 para glucosa. Aunque el crecimiento máximo alcanzado con los PC's dig fue ligeramente menor que con inulina, la diferencia entre ambos fue mínima, lo que indica que las PC's dig mantienen una capacidad fermentativa comparable a la del prebiótico de referencia. Este resultado evidencia que las PC's dig son utilizados de manera eficiente por la bacteria, permitiendo alcanzar densidades celulares elevadas y superiores a las obtenidas con glucosa. En conjunto, el YM observado para los PC's dig respalda su potencial funcional, ya que confirma que estos compuestos favorecen el crecimiento microbiano y pueden actuar como una fuente viable de carbono con características prebióticas. Se observó una estabilidad del modelo (R^2) elevadas (0.9761, 0.8021 y 0.9121, respectivamente). Estos resultados confirman la alta capacidad predictiva del modelo y con ello que las PC's dig presentan un cinética comparable a la inulina, aunque con una ligera reducción en la velocidad específica ($K=0.4497 \pm 0.024$ frente a 0.4517 ± 0.050 para inulina).

Para *A. muciniphila*, las PC's dig presentaron el mayor valor de crecimiento máximo (YM), alcanzando 8.737 ± 0.023 , lo que representa el desempeño más eficiente entre los tratamientos evaluados. Este valor superó ligeramente al obtenido con inulina (8.700 ± 0.018), un prebiótico bien establecido, lo que sugiere que las PC's dig son capaces de sostener un nivel de proliferación microbiana igual o incluso superior al del sustrato de referencia. Por otra parte, la glucosa mostró un YM considerablemente menor (8.627 ± 3.979), además de una alta variabilidad, indicando que no constituye una fuente de carbono óptima para promover el crecimiento de *A. muciniphila* bajo las condiciones evaluadas. En conjunto, estos resultados evidencian que los PC's dig poseen una alta capacidad fermentativa y favorecen un crecimiento robusto de *A. muciniphila*, respaldando su potencial funcional y sugiriendo un efecto prebiótico particularmente relevante para esta especie bacteriana.

Por otro lado, se presentó una estabilidad en el modelo para inulina y PC's dig (R^2 de 0.9881 y 0.9287, respectivamente). Las PC's dig potenciaron el crecimiento máximo alcanzable de la cepa, con una velocidad de crecimiento de $K=0.3817\pm 0.018$, similar al de la inulina $K=0.3844\pm 0.05$. El tratamiento con glucosa presentó inestabilidad en el ajuste, lo que sugiere una menor adecuación de esta fuente de carbono al metabolismo de la bacteria.

La cinética de crecimiento bacteriano para *B. longum* y *A. muciniphila* con las distintas fuentes de carbono en estudio se muestran en la [figura 8](#). En general, ambas bacterias siguieron una curva típica de crecimiento microbiano, con una fase exponencial inicial entre 0 y 12 horas, seguida de una fase estacionaria estable. En el caso de *B. longum* ([figura 8A](#)), el crecimiento fue más rápido durante las primeras 6 horas en los tratamientos con inulina y PC's digeridas, alcanzando valores cercanos a 8.8–8.9 Log UFC/mL a las 12 horas. La glucosa, en cambio, presentó un incremento más limitado (8.6 Log UFC/mL), lo que indica que las PC's dig favorecieron un metabolismo fermentativo más sostenido. A partir de las 12 horas, las curvas de inulina y PC's dig se mantuvieron relativamente estables, lo cual sugiere que estas fuentes de carbono mantienen un suministro progresivo de compuestos fermentables, evitando una caída abrupta del crecimiento, como sí ocurrió con la glucosa.

Hasta el momento, la evidencia disponible sobre el efecto modulador de las PC's en el crecimiento de *B. longum* es limitada. Si bien diversas investigaciones han demostrado que los polifenoles pueden favorecer el crecimiento de especies *bifidobacterium* (Alves-Santos et al. 2020; Calabriso et al. 2023; Plamada and Vodnar 2021). El presente estudio aporta evidencia científica para comprender su posible papel como modulador específicos de esta cepa probiótica. Sin embargo, es importante mencionar que no se encontraron estudios que confirmen que las PC's modulen el crecimiento de *B. longum*, lo que convierte a este trabajo de investigación en uno de los primeros en informar al respecto.

Por su parte, *A. muciniphila* ([figura 8B](#)) presentó un comportamiento cinético aún más destacado, con un crecimiento exponencial sostenido y un aumento de biomasa superior al de los otros tratamientos. El medio suplementado con PC's dig alcanzó un valor máximo de 9.0 Log UFC/mL a las 12 horas, superando a los tratamientos con inulina (8.7 Log UFC/mL) y glucosa (8.5 Log UFC/mL). Este incremento representa un aumento adicional de biomasa bacteriana respecto a la inulina, lo que demuestra la alta capacidad de *A. muciniphila* para aprovechar las PC's dig como fuente de carbono alternativa. Además, el crecimiento se mantuvo

estable hasta las 48 horas, lo cual contrasta con la ligera disminución observada en los tratamientos con inulina y glucosa, sugiriendo que las PC's dig proporcionaron una liberación progresiva de sustratos fermentables y una fermentación más controlada. El patrón observado coincide con investigaciones que han demostrado la interacción positiva entre compuestos polifenólicos y *A. muciniphila*. Anhê et al., (2015) reportaron que extractos ricos en polifenoles del arándano, incrementan significativamente la abundancia de *Akkermansia spp.* en modelos murinos, mejorando la integridad intestinal y la homeostasis metabólica. De igual forma, Shoji, Masumoto, and Miura (2024) describieron que los polifenoles complejos, incluidos los taninos condensados y procianidinas, pueden ser parcialmente metabolizados por *A. muciniphila*, generando compuestos fenólicos de bajo peso molecular que promueven su propio crecimiento. En conjunto, los hallazgos obtenidos indican que las PC's dig poseen un efecto prebiótico comparable al de la inulina, con un impacto particularmente destacado sobre *A. muciniphila*. Este comportamiento sugiere un papel relevante de las PC's como agentes moduladores selectivos de la microbiota intestinal.

Tabla 3. Resultados de crecimiento bacteriano de *A. muciniphila* y *B. longum* con distintas fuentes de carbono, cambio de pH de 0 a 12 h y cuantificación de PC's al inicio y termino de fermentación.

Bacteria	Fuente de Carbono	Log UFC/mL			pH		mg PC-1/L	
		0 h	12 h	Δ biomasa de 12 h	0 h	12 h	0 h	48 h
<i>B. longum</i>	Inulina	7.49 ± 0.08	8.77 ± 0.00	1.30 a	6.70 ± 0.01	5.96 ± 0.00	-	-
	PC's dig	7.97 ± 0.05	8.94 ± 0.02	1.00 b	6.48 ± 0.01	5.79 ± 0.01	505 ± 0.01	151 ± 0.02
	Glucosa	7.94 ± 0.05	8.68 ± 0.07	0.75 c	5.55 ± 0.00	3.82 ± 0.01	-	-
<i>A. muciniphila</i>	Inulina	7.31 ± 0.05	8.63 ± 0.01	1.30 b	6.97 ± 0.00	6.31 ± 0.02	-	-
	PC's dig	7.33 ± 0.07	9.00 ± 0.08	1.70 a	6.34 ± 0.02	6.10 ± 0.03	505 ± 0.01	229 ± 0.02
	Glucosa	7.42 ± 0.07	8.59 ± 0.11	1.20 b	6.02 ± 0.06	4.24 ± 0.01	-	-

Tabla 4. Concentraciones de equilibrio previstas y parámetros cinéticos obtenidos en el modelo cinético de dos sitios de Gompertz.

Bacteria	Fuente de Carbono	Y0	YM	K	1/K	R²
<i>B. longum</i>	Inulina	7.504 ± 0.05 b	8.734 ± 0.02 a	0.4517 ± 0.05 a	2.214 ± 0.23 b	0.9761
	PC's Dig	7.969 ± 0.05 a	8.693 ± 0.01 a	0.4497 ± 0.02 a	2.224 ± 0.12 b	0.8021
	Glucosa	7.935 ± 0.04 a	8.567 ± 0.01 b	0.2840 ± 0.02 b	3.539 ± 0.28 a	0.9121
<i>A. muciniphila</i>	Inulina	7.316 ± 0.03 b	8.700 ± 0.02 a	0.3844 ± 0.05 b	2.602 ± 0.38 a	0.9881
	PC's Dig	7.318 ± 0.04 b	8.737 ± 0.02 a	0.3817 ± 0.02 b	2.620 ± 0.12 a	0.9287
	Glucosa	7.698 ± 0.44 a	8.627 ± 3.98 a	0.4040 ± 0.41 a	Inestable b	0.7237

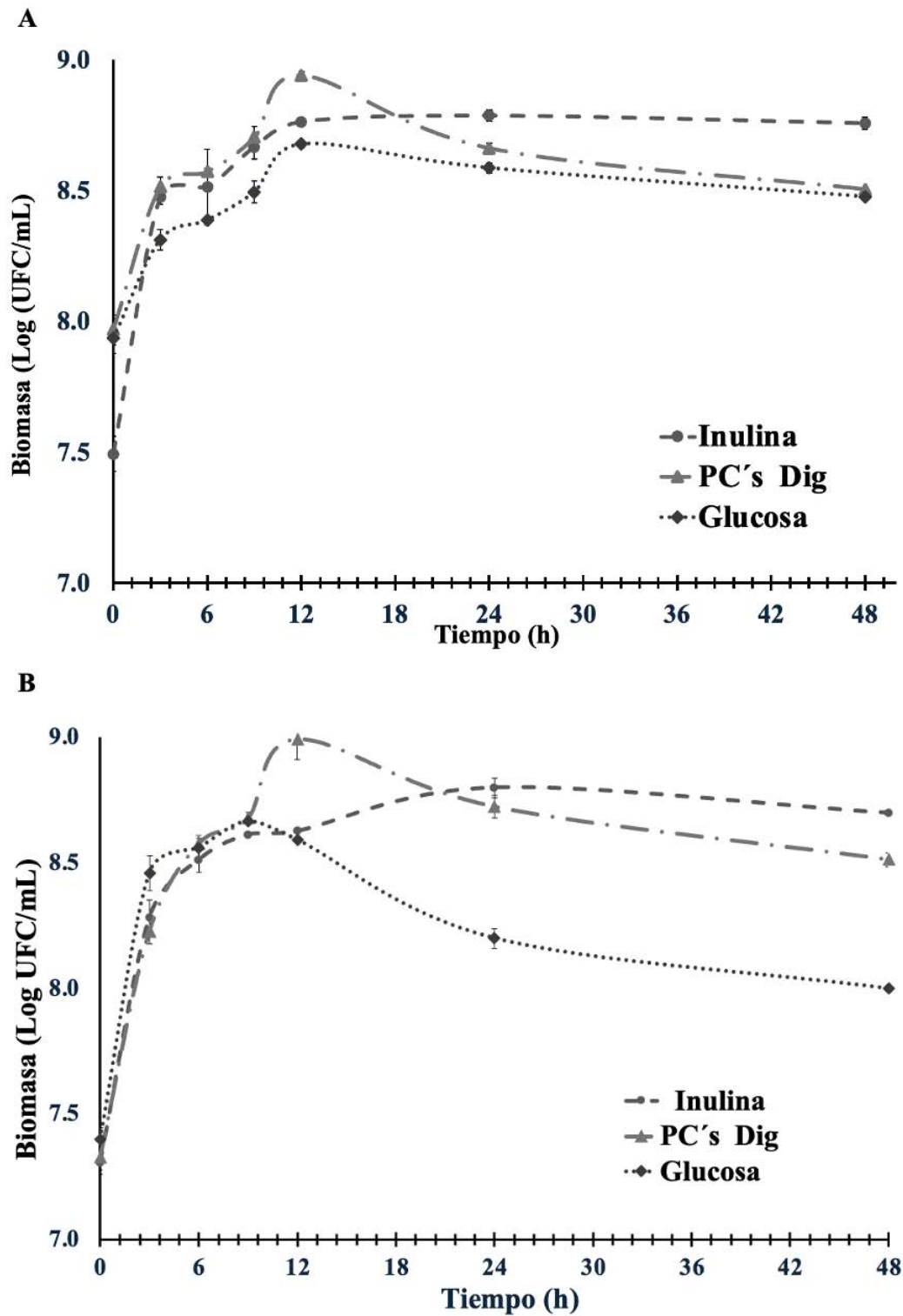


Figura 8. Evaluación del potencial prebiótico mediante cinética de crecimiento con inulina, PC⁷ digeridas y glucosa como única fuente de carbono: A) *Bifidobacterium longum* y B) *Akkermansia muciniphila*.

7.3.4. Cuantificación de la producción de Ácidos Grasos de Cadena Corta

La producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) tras 48 h de fermentación *in vitro* con *B. longum* y *A. muciniphila* en medios suplementados con PC's dig e inulina se presenta en la [tabla 5](#). Los principales AGCC que se lograron identificar son el acetato, propionato, butirato y valerato.

En *B. longum*, tanto la inulina como las PC's dig promovieron una alta producción de acetato (>5.0 mM/L), metabolito principal asociado con el crecimiento de esta especie (C. Zhang et al., 2019). Sin embargo, las PC's dig estimularon mayores concentraciones de propionato (0.061 ± 0.014 mM/L) y valerato (1.115 ± 0.174 mM/L) que la inulina, la cual produjo solo 0.017 ± 0.014 mM/L y 0.013 ± 0.001 mM/L, respectivamente. Aunque el butirato fue más alto con la inulina (0.381 ± 0.195 mM/L) que con PC's dig (0.151 ± 0.008 mM/L), la mayor producción de propionato y valerato indica un cambio en el perfil fermentativo derivado del metabolismo diferencial de las PC's dig. Estudios previos han reportado resultados similares, donde extractos ricos en polifenoles aumentaron la producción de AGCC, especialmente propionato y valerato, al modular la fermentación de *Bifidobacterium* (Z. He et al. 2022; Zahid et al. 2023).

En *A. muciniphila*, el perfil de AGCC mostró una marcada respuesta al uso de PC's dig. Al igual que en *B. longum*, la producción de acetato fue superior a 5.0 mM/L con ambas fuentes de carbono. Sin embargo, las PC's dig produjeron significativamente mayor el valerato (1.846 ± 1.317 mM/L) en comparación con la inulina (0.28 ± 0.018 mM/L), lo que representa un incremento de más de seis veces. Se propone la activación de rutas fermentativas asociadas a la degradación de compuestos fenólicos complejos, tal como se ha descrito en estudios recientes donde *A. muciniphila* metaboliza polifenoles para generar ACGG y derivados con efectos antiinflamatorios y moduladores del metabolismo energético (Anhê et al. 2015; Chadaideh et al. n.d.; Roopchand et al. 2015; Shaheen et al. 2025). Asimismo, la producción de propionato (0.027 ± 0.007 mM/L) y butirato (0.079 ± 0.003 mM/L) fue menor que con inulina, pero la capacidad de producir valerato en niveles elevados resalta una vía metabólica diferenciada.

Al comparar ambas bacterias utilizando PC's dig, se observa que *A. muciniphila* produjo mayores concentraciones de valerato (1.846 mM/L) que *B. longum* (1.115 mM/L), mientras que la producción de propionato fue más alta en *B. longum*. Esto indica que las PC's dig favorecen la especialización metabólica de cada microorganismo: *B. longum* canaliza los fenoles hacia la síntesis de propionato y *A. muciniphila* hacia la de valerato. Este comportamiento coincide con

estudios donde se ha observado que las procianidinas actúan como moduladores selectivos del microbioma intestinal, estimulando la producción de AGCC de forma especie-dependiente (Ruiz-Álvarez, Cattero, and Desjardins 2025; Shoji, Masumoto, and Miura 2024).

Los AGCC generados, especialmente el acetato, propionato y valerato, son compuestos clave para la salud intestinal y sistémica (Blaak et al. 2020; Du et al. 2024; J. He et al. 2020). El acetato participa en la regulación del pH intestinal y en la síntesis de lípidos (L. Liu, Fu, and Li 2019; Ziętek, Celewicz, and Szczuko 2021); el propionato contribuye al control de la glucemia y al metabolismo hepático (Yoshida, Ishii, and Akagawa 2019); y el valerato, se asocia con efectos antiinflamatorios y regeneración epitelial intestinal (Moting Liu et al. 2024; X. Wang et al. 2024).

La producción de estos metabolitos confirma la actividad prebiótica de las PC's, respaldando su potencial como fuente funcional capaz de modular positivamente el metabolismo bacteriano y generar compuestos bioactivos beneficiosos para la salud humana. El incremento de acetato y valerato observado, especialmente por *A. muciniphila*, sustenta a las PC's como prebiótico, diferenciándose del efecto clásico de la inulina.

Tabla 5. Evaluación del potencial prebiótico a través de la producción de AGCC (mM/L) por *B. longum* y *A. muciniphila* a partir del consumo de inulina y PC's como su única Fuente de carbono.

Concentración de AGCC	<i>Bifidobacterium longum</i>		<i>Akkermansia muciniphila</i>	
	Inulina	PC's	Inulina	PC's
Acetato	> 5.0	> 5.0	> 5.0	> 5.0
Propionato	0.017 ± 0.014	0.061 ± 0.014	0.045 ± 0.044	0.027 ± 0.007
Butirato	0.381 ± 0.195	0.151 ± 0.008	0.235 ± 0.253	0.079 ± 0.003
Valerato	0.013 ± 0.001	1.115 ± 0.174	0.028 ± 0.018	1.846 ± 1.317

7.4 Actividad antibacteriana de los PC's purificadas y digeridas para su aplicación como prebiótico natural.

Para reforzar el enfoque funcional de las PC's como prebióticos, se evaluó su efecto antimicrobiano contra *Salmonella* ser Typhirium (ATCC 14028), patógeno de relevancia clínica por provocar cambios importantes en la transcripción microbiana y la respuesta inmunitaria del huésped (Yan Zhang et al., 2018). La figura 9 muestra la inhibición del crecimiento de *S. typhi* con el control negativo de 10 y 30 % de DMSO (figura 9A), la muestra de estudio de PC's dig (figura 9B) y de PC's purificadas (figura 9C) a 5 y 10 g/L, con control positivo de un antibiótico estándar conocido como ampicilina (figura 9D), lo que permite comparar la eficacia relativa del extracto.

En el control negativo con DMSO, no se detectó formación de halos de inhibición, confirmando que este solvente no presenta actividad antimicrobiana. En contraste las PC's dig mostraron halos de inhibición evidentes en ambas concentraciones, siendo el diámetro mayor en 10 g/L ($10\text{mm} \pm 0.001$) comparadas con el control positivo de ampicilina a 5g/L ($11\text{mm} \pm 0.001$), no se mostró diferencia significativa, potenciando la actividad antibacteriana frente a un antibiótico comercial (anexo). En la concentración de PC's dig a 5 g/L se obtuvieron $8\text{ mm} \pm 0.02$, por otro lado, las PC's purificadas presentaron halos de inhibición en ambas concentraciones a 5 y 10 g/L ($5\text{mm} \pm 0.001$ y $6\text{ mm} \pm 0.02$ respectivamente) y no presentaron diferencia significativa entre las dos. Estos resultados confirman que la digestión oro-gastrointestinal *in vitro* potencia aún más la actividad antibacteriana de las PC's, probablemente debido a la liberación de metabolitos fenólicos más pequeños y bioactivos durante el proceso de la digestión, así como a la modificación estructural de las PC's. Finalmente, en el control positivo con ampicilina, se observaron halos de inhibición amplios y bien definidos, con un incremento marcado en 10 g/L ($17.5\text{ mm} \pm 0.001$) en comparación con 5 g/L ($11\text{ mm} \pm 0.001$). Los resultados obtenidos de las PC's se comprueban con el análisis estadístico Anova de una vía (Anexo) y concuerdan con informes recientes sobre polifenoles específicos obtenidos de fuentes vegetales. Por ejemplo, Owolabi et al., (2024) demostraron que las procianidinas ejercen efectos antimicrobianos a través de mecanismos de alteración de la permeabilidad de la membrana, quelación de iones esenciales y desnaturalización de proteínas bacterianas. Si bien la mayoría de los estudios han utilizado extractos de hojas o frutos, las fracciones enriquecidas en flavan-3-oles (como las catequinas y las procianidinas) muestran actividad contra cepas multirresistentes (Agarwal et

al., 2020). Esta investigación supone una importante contribución, dado que *S. typhi* ha desarrollado una resistencia cada vez mayor a múltiples antibióticos tradicionales (Karkey, Thwaites, and Baker 2018).

La eficacia observada con las PC's dig también puede estar relacionada con su posible cambio en la estructura química tras la digestión *in vitro* y, por lo tanto, presentar una mayor accesibilidad a bacterias críticas como *S. typhi*. En concreto, los oligómeros de PC's han demostrado una mayor capacidad para interactuar con la membrana de las bacterias patógenas que los polímeros más pesados (Chadaideh et al., 2021).

Además, la actividad observada en concentraciones tan bajas como 5 g/L refuerza el potencial de estos compuestos no solo como prebióticos, sino también como agentes antimicrobianos, con el objetivo principal de beneficiar la salud del huésped.

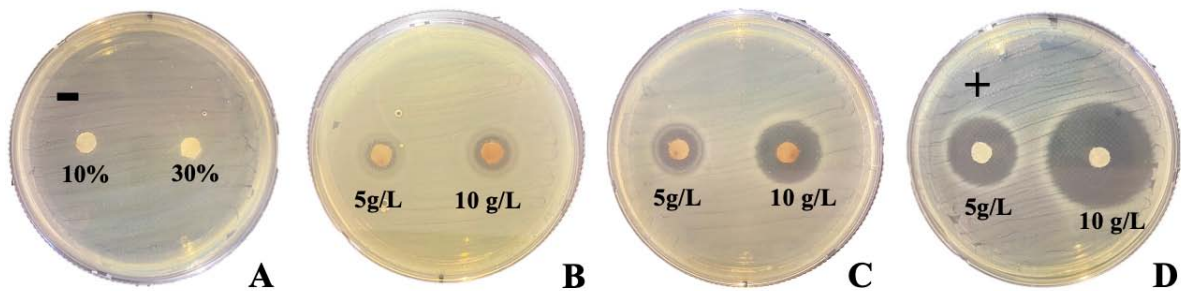


Figura 9. Evaluación antibacteriana mediante el método de difusión en disco: control negativo (DMSO) (A); PC's purificadas (B); PC's digeridas (C), y control positivo (ampicilina) (D) frente a la bacteria *S. typhi*.

8. Conclusiones

Los resultados de este estudio demuestran que la pulpa de café constituye un coproducto con potencial para la obtención de PC's mediante la purificación por cromatografía en Sephadex LH-20, alcanzando una pureza del 96 % y un rendimiento de 0.32 %. Se identificaron claramente por medio de HPLC-ESI-MS dos principales tipos de PC's (trímero de tipo A y C) en la muestra purificada. La caracterización de las PC's purificadas y digeridas por medio del HPLC-ESI-MS sugiere que, tras la simulación oro-gastro-intestinal, presentaron transformaciones parciales, sin embargo, los iones no pudieron ser identificados por medio del análisis, por lo que se requieren estudios posteriores para comprender el posible reordenamiento en enlaces interflavánicos, oxidación, despolimerización parcial o polimerización del compuesto.

Las PC's demostraron un efecto prebiótico antes y después de su digestión *in vitro*, al ser usadas como única fuente de carbono para las bacterias *B. longum* y *A. muciniphila*, haciendo evidente que las PC's digeridas favorecían su crecimiento alcanzando niveles de biomasa similares o superiores a los obtenidos con inulina, un prebiótico comercial de referencia. Además, las PC's mostraron tener actividad antimicrobiana significativa contra *S. typhi*, una bacteria patógena común en la microbiota intestinal.

Finalmente se puede decir que las PC's purificadas de pulpa de café cumplen con criterios de selección y pueden ser consideradas como un nuevo prebiótico que podría conferir un beneficio a la salud del huésped al ser selectivamente utilizadas por los microorganismos probióticos y no por patógenos.

9. Bibliografía

- Abu Zarin, Mazni, Ho Yin Wan, Azizul Isha, and Nurdin Armania. 2016. "Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Potential of Condensed Tannins from *Leucaena Leucocephala* Hybrid-Rendang." *Food Science and Human Wellness* 5(2): 65–75. doi:10.1016/j.fshw.2016.02.001.
- Agarwal, Mohit, Rajesh Singh Tomar, Anurag Jyoti, and Rama Kant Singh. 2020. "SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF GOLD NANOPARTICLES AGAINST *SALMONELLA* SER. TYPHI." 20(1): 1994–2000.
- Ait-Aissa, Amara, and Mohammed Aïder. 2014. "Lactulose: Production and Use in Functional Food, Medical and Pharmaceutical Applications. Practical and Critical Review." *International Journal of Food Science and Technology* 49(5): 1245–53. doi:10.1111/IJFS.12465.
- Akan, Ecem, Adem Yavaş, and Mustafa Dikme. 2025. "Bioactive Potentials of Paraprobiotic Kefir: Enhanced Protein Hydrolysis and Anticancer Efficacy." *International Dairy Journal* 163: 106169. doi:10.1016/J.IDAIRYJ.2024.106169.
- Alves-Santos, Aline Medeiros, Clara Sandra Araújo Sugizaki, Glaucia Carielo Lima, and Maria Margareth Veloso Naves. 2020. "Prebiotic Effect of Dietary Polyphenols: A Systematic Review." *Journal of Functional Foods* 74. doi:10.1016/j.jff.2020.104169.
- Appeldoorn, Maaïke M., Jean Paul Vincken, Anna Marja Aura, Peter C.H. Hollman, and Harry Gruppen. 2009. "Procyanidin Dimers Are Metabolized by Human Microbiota with 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)Acetic Acid and 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -Valerolactone as the Major Metabolites." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(3): 1084–92. doi:10.1021/JF803059Z/SUPPL_FILE/JF803059Z_SI_001.PDF.
- Di Bartolomeo, F., J. B. Startek, and W. Van Den Ende. 2013. "Prebiotics to Fight Diseases: Reality or Fiction?" *Phytotherapy research: PTR* 27(10): 1457–73. doi:10.1002/PTR.4901.
- Bermúdez-Quiñones, Gabriela, Luz Araceli Ochoa-Martínez, José Alberto Gallegos-Infante, Olga Miriam Rutiaga-Quiñones, Tania Ernestina Lara-Ceniceros, Efrén Delgado-Licon, and Silvia Marina González-Herrera. 2021. "Synbiotic Microcapsules Using Agavins and Inulin as Wall Materials for *Lactobacillus Casei* and *Bifidobacterium Breve*: Viability,

- Physicochemical Properties, and Resistance to in Vitro Oro-Gastrointestinal Transit.” *Journal of Food Processing and Preservation* 45(12). doi:10.1111/jfpp.16106.
- Biedrzycka, Elzbieta, and Maria Bielecka. 2004. “Prebiotic Effectiveness of Fructans of Different Degrees of Polymerization.” *Trends in Food Science and Technology* 15(3–4): 170–75. doi:10.1016/J.TIFS.2003.09.014.
- Bove, P., P. Russo, V. Capozzi, A. Gallone, G. Spano, and D. Fiocco. 2013. “Lactobacillus Plantarum Passage through an Oro-Gastro-Intestinal Tract Simulator: Carrier Matrix Effect and Transcriptional Analysis of Genes Associated to Stress and Probiosis.” *Microbiological Research* 168(6): 351–59. doi:10.1016/J.MICRES.2013.01.004.
- Bove, Pasquale, Anna Gallone, Pasquale Russo, Vittorio Capozzi, Marzia Albenzio, Giuseppe Spano, and Daniela Fiocco. 2012. “Probiotic Features of Lactobacillus Plantarum Mutant Strains.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 96(2): 431–41. doi:10.1007/s00253-012-4031-2.
- Calabriso, Nadia, Marika Massaro, Egeria Scoditti, and Maria Annunziata Carluccio. 2023. “Dietary Polyphenols and Their Role in Gut Health.” *Nutrients* 2023, Vol. 15, Page 2650 15(12): 2650. doi:10.3390/NU15122650.
- Castillo-Olvera, Guillermo, María Luisa Carrillo-Inungaray, Abigail Reyes-Munguia, Diana Beatriz Muñoz-Marquez, Leidy Johana Valencia-Hernández, and Jorge Enrique Wong-Paz. 2022. “Litchi (Litchi Chinensis): Generalidades, Actividad Biológica y Aplicaciones.” *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 25. doi:10.22201/fesz.23958723e.2022.508.
- Chadaideh, Katia S, Kevin E Eappen, Brandi E Moore, and Rachel N Carmody. “Common Proanthocyanidin-Rich Foods Modulate Gastrointestinal Blooms of Akkermansia 1 Muciniphila in a Diet-Dependent Manner 2 3.” doi:10.1101/2021.11.07.466338.
- Chaudhari, Archana, and Mitesh Kumar Dwivedi. 2022. “The Concept of Probiotics, Prebiotics, Postbiotics, Synbiotics, Nutribiotics, and Pharmabiotics.” *Probiotics in the Prevention and Management of Human Diseases: A Scientific Perspective*: 1–11. doi:10.1016/B978-0-12-823733-5.00013-1.
- Chávarri, María, Lucía Diez-Gutiérrez, Izaskun Marañón, María del Carmen Villarán, and Luis Javier R. Barrón. 2022. “The Role of Probiotics in Nutritional Health: Probiotics as

- Nutribiotics.” *Probiotics in the Prevention and Management of Human Diseases: A Scientific Perspective*: 397–415. doi:10.1016/B978-0-12-823733-5.00018-0.
- Chen, Hanlin, Jingrui Li, Shaofei Li, Xiaoqi Wang, Ge Xu, Molan Li, and Guangjie Li. 2024. “Research Progress of Procyanidins in Repairing Cartilage Injury after Anterior Cruciate Ligament Tear.” *Heliyon* 10(4): e26070. doi:10.1016/J.HELIYON.2024.E26070.
- Chen, Juanyun, Xiaoi Chen, Yanjun Zhang, Zhen Feng, Kexue Zhu, Fei Xu, and Chunhe Gu. 2024. “Bioactivity and Influence on Colonic Microbiota of Polyphenols from Noni (*Morinda Citrifolia* L.) Fruit under Simulated Gastrointestinal Digestion.” *Food Chemistry: X* 21. doi:10.1016/j.fochx.2023.101076.
- Chen, Junren, Kexin Zhong, Yiqi Jing, Shengmeng Liu, Siqi Qin, Fu Peng, Dan Li, and Cheng Peng. 2023. “Procyanidin B2: A Promising Multi-Functional Food-Derived Pigment for Human Diseases.” *Food Chemistry* 420: 136101. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2023.136101).
- Cheplin, Harry A., and Leo F. Rettger. 1920. “Studies on the Transformation of the Intestinal Flora, with Special Reference to the Implantation of *Bacillus Acidophilus*: II. Feeding Experiments on Man.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 6(12): 704–5. doi:10.1073/PNAS.6.12.704.
- Coccan, Ana Maria, and Dan Cristian Vodnar. 2024. “Exploring the Gut-Brain Axis: Potential Therapeutic Impact of Psychobiotics on Mental Health.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 134: 111073. doi:10.1016/J.PNPBP.2024.111073.
- Cockerill, F., and Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard*. Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://books.google.com.mx/books?id=RHekoAEACAAJ>.
- Dasiman, Razif, Norazmir Md Nor, Zolkapli Eshak, Siti Syairah, Mohd Mutalip, Nur Rohmah Suwandi, and Habsah Bidin. 2022. “A Review of Procyanidin: Updates on Current Bioactivities and Potential Health Benefits.” *Review* 12(5): 5918–40. doi:10.33263/BRIAC125.59185940.
- Davani-Davari, Dorna, Manica Negahdaripour, Iman Karimzadeh, Mostafa Seifan, Milad Mohkam, Seyed Jalil Masoumi, Aydin Berenjian, and Younes Ghasemi. 2019. “Prebiotics:

Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications.”
doi:10.3390/foods8030092.

Deehan, Edward C., Santa Al Antwan, Rhonda S. Witwer, Paula Guerra, Tania John, and Len Monheit. 2024a. “Revisiting the Concepts of Prebiotic and Prebiotic Effect in Light of Scientific and Regulatory Progress—A Consensus Paper From the Global Prebiotic Association.” *Advances in Nutrition* 15(12): 100329. doi:10.1016/J.ADVNUT.2024.100329.

Deehan, Edward C., Santa Al Antwan, Rhonda S. Witwer, Paula Guerra, Tania John, and Len Monheit. 2024b. “Revisiting the Concepts of Prebiotic and Prebiotic Effect in Light of Scientific and Regulatory Progress—A Consensus Paper From the Global Prebiotic Association.” *Advances in Nutrition* 15(12): 100329. doi:10.1016/J.ADVNUT.2024.100329.

Ellegård, L., H. Andersson, and I. Bosaeus. 1997. “Inulin and Oligofructose Do Not Influence the Absorption of Cholesterol, or the Excretion of Cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or Bile Acids but Increases Energy Excretion in Ileostomy Subjects.” *European journal of clinical nutrition* 51(1): 1–5. doi:10.1038/SJ.EJCN.1600320.

Ghyselinck, Jonas, Lynn Verstrepen, Frédéric Moens, Pieter Van Den Abbeele, Arnout Bruggeman, Jawal Said, Barry Smith, et al. 2021. “Influence of Probiotic Bacteria on Gut Microbiota Composition and Gut Wall Function in an In-Vitro Model in Patients with Parkinson’s Disease.” *International Journal of Pharmaceutics: X* 3: 100087. doi:10.1016/J.IJPX.2021.100087.

Gibson, G. R., and M. B. Roberfroid. 1995. “Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics.” *The Journal of nutrition* 125(6): 1401–12. doi:10.1093/JN/125.6.1401.

Gibson, Glenn R, Robert Hutkins, Mary Ellen Sanders, Susan L Prescott, Raylene A Reimer, Seppo J Salminen, Karen Scott, et al. 2017. “Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics.” doi:10.1038/nrgastro.2017.75.

Gibson, Glenn R., Robert Hutkins, Mary Ellen Sanders, Susan L. Prescott, Raylene A. Reimer, Seppo J. Salminen, Karen Scott, et al. 2017a. “Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus

- Statement on the Definition and Scope of Prebiotics.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 14(8): 491–502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gibson, Glenn R., Robert Hutkins, Mary Ellen Sanders, Susan L. Prescott, Raylene A. Reimer, Seppo J. Salminen, Karen Scott, et al. 2017b. “Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 14(8): 491–502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gibson, Glenn R., Karen P. Scott, Robert A. Rastall, Kieran M. Tuohy, Arland Hotchkiss, Alix Dubert-Ferrandon, Melanie Gareau, et al. 2010. “Dietary Prebiotics: Current Status and New Definition.” *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods* 7(1): 1–19. doi:10.1616/1476-2137.15880.
- Grosicki, Gregory J., Roger A. Fielding, and Michael S. Lustgarten. 2018. “Gut Microbiota Contribute to Age-Related Changes in Skeletal Muscle Size, Composition, and Function: Biological Basis for a Gut-Muscle Axis.” *Calcified tissue international* 102(4): 433–42. doi:10.1007/S00223-017-0345-5.
- Guyot, Sylvain, Thierry Doco, Jean Marc Souquet, Michel Moutounet, and Jean François Drilleau. 1997. “Characterization of Highly Polymerized Procyanidins in Cider Apple (*Malus Sylvestris* Var. Kermerrien) Skin and Pulp.” *Phytochemistry* 44(2): 351–57. doi:10.1016/S0031-9422(96)00480-3.
- Han, Jun, Karen Lin, Carita Sequeira, and Christoph H. Borchers. 2015. “An Isotope-Labeled Chemical Derivatization Method for the Quantitation of Short-Chain Fatty Acids in Human Feces by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry.” *Analytica Chimica Acta* 854: 86–94. doi:10.1016/j.aca.2014.11.015.
- Han, Xue, Qian Zhou, Zhe Gao, Guanying Bianca Xu, Hong Chen, Bimal Chitrakar, Yasai Sun, et al. 2023. “Characterization of Procyanidin Extracts from Hawthorn (*Crataegus Pinnatifida*) in Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line Caco-2, Simulated Digestion, and Fermentation Identified Unique and Novel Prebiotic Properties.” *Food research international (Ottawa, Ont.)* 165. doi:10.1016/J.FOODRES.2022.112393.
- Hernandez, Fernando de Carlos, Terkel Hansen, Hanne Haslene-Hox, Patrik Appelblad, and Anna Nordborg. 2025. “Evaluating Zwitterionic Stationary Phases for Glycan Profiling of

- IgGs from Various Sources by HPLC-ESI-MS/MS.” *Journal of Chromatography A* 1761: 466393. doi:10.1016/J.CHROMA.2025.466393.
- Hill, Colin, Francisco Guarner, Gregor Reid, Glenn R. Gibson, Daniel J. Merenstein, Bruno Pot, Lorenzo Morelli, et al. 2014. “Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 11(8): 506–14. doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
- Huang, Bijun, Li Wang, Min Liu, Xin Wu, Qun Lu, and Rui Liu. 2022. “The Underlying Mechanism of A-Type Procyanidins from Peanut Skin on DSS-Induced Ulcerative Colitis Mice by Regulating Gut Microbiota and Metabolism.” *Journal of Food Biochemistry* 46(7): e14103. doi:10.1111/JFBC.14103.
- Jang, Hye Ji, Na Kyoung Lee, and Hyun Dong Paik. 2024. “A Narrative Review on the Advance of Probiotics to Metabiotics.” *Journal of Microbiology and Biotechnology* 34(3): 487–94. doi:10.4014/jmb.2311.11023.
- Jayanama, Kulapong, and Olga Theou. 2020. “Effects of Probiotics and Prebiotics on Frailty and Ageing: A Narrative Review.” *Current clinical pharmacology* 15(3): 183–92. doi:10.2174/1574884714666191120124548.
- Karakan, Tarkan, Kieran Michael Tuohy, and Gwendolyn Janssen-van Solingen. 2021. “Low-Dose Lactulose as a Prebiotic for Improved Gut Health and Enhanced Mineral Absorption.” *Frontiers in nutrition* 8. doi:10.3389/FNUT.2021.672925.
- Karkey, Abhilasha, Guy E. Thwaites, and Stephen Baker. 2018. “The Evolution of Antimicrobial Resistance in Salmonella Typhi.” *Current Opinion in Gastroenterology* 34(1): 25–30. doi:10.1097/MOG.0000000000000406.
- Kesavan, Pallavi, Antara Banerjee, Anushka Banerjee, Ramachandran Murugesan, Francesco Marotta, and Surajit Pathak. 2018. “An Overview of Dietary Polyphenols and Their Therapeutic Effects.” *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*: 221–35. doi:10.1016/B978-0-12-813006-3.00017-9.
- Klostermann, Cynthia E., Martha F. Endika, Dimitrios Kouzounis, Piet L. Buwalda, Paul de Vos, Erwin G. Zoetendal, Johannes H. Bitter, and Henk A. Schols. 2024. “Presence of Digestible Starch Impacts in Vitro Fermentation of Resistant Starch.” *Food & Function* 15(1): 223–35. doi:10.1039/D3FO01763J.

- Koh, Ara, Filipe De Vadder, Petia Kovatcheva-Datchary, and Fredrik Bäckhed. 2016. “From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites.” *Cell* 165(6): 1332–45. doi:10.1016/J.CELL.2016.05.041/ASSET/95008553-7832-494E-9FD9-91A065597DE1/MAIN.ASSETS/GR4.JPG.
- Koleva, Petya T., Rosica S. Valcheva, Xu Sun, Michael G. Gänzle, and Levinus A. Dieleman. 2012. “Inulin and Fructo-Oligosaccharides Have Divergent Effects on Colitis and Commensal Microbiota in HLA-B27 Transgenic Rats.” *The British journal of nutrition* 108(9): 1633–43. doi:10.1017/S0007114511007203.
- Kumar, Himanshu, Seppo Salminen, Hans Verhagen, Ian Rowland, Jim Heimbach, Silvia Bañares, Tony Young, Koji Nomoto, and Mélanie Lalonde. 2015. “Novel Probiotics and Prebiotics: Road to the Market.” *Current opinion in biotechnology* 32: 99–103. doi:10.1016/J.COPBIO.2014.11.021.
- Liu, Jinjin, Shengjie Qiu, Liang Zhang, Qiang He, Xiyao Li, Qiong Zhang, and Yongzhen Peng. 2022. “Intermittent PH Control Strategy in Sludge Anaerobic Fermentation: Higher Short-Chain Fatty Acids Production, Lower Alkali Consumption, and Simpler Control.” *Bioresource Technology* 345. doi:10.1016/j.biortech.2021.126517.
- Liu, Min, Bijun Huang, Li Wang, Qun Lu, and Rui Liu. 2022. “Peanut Skin Procyanidins Ameliorate Insulin Resistance via Modulation of Gut Microbiota and Gut Barrier in Type 2 Diabetic Mice.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 102(13): 5935–47. doi:10.1002/JSFA.11945.
- Liu, Mingli, Haofen Xie, Yan Ma, Hongye Li, Chongping Li, Lijiao Chen, Bin Jiang, et al. 2020. “High Performance Liquid Chromatography and Metabolomics Analysis of Tannase Metabolism of Gallic Acid and Gallates in Tea Leaves.” *Journal of agricultural and food chemistry* 68(17): 4946–54. doi:10.1021/ACS.JAFC.0C00513.
- Liu, Wei, Xiaoqiong Li, Zhonglin Zhao, Xionge Pi, Yanyu Meng, Dibo Fei, Daqun Liu, and Xin Wang. 2020. “Effect of Chitooligosaccharides on Human Gut Microbiota and Antiglycation.” *Carbohydrate polymers* 242. doi:10.1016/J.CARBPOL.2020.116413.
- Lodhi, Gaurav, Yon Suk Kim, Jin Woo Hwang, Se Kwon Kim, You Jin Jeon, Jae Young Je, Chang Bum Ahn, et al. 2014. “Chitooligosaccharide and Its Derivatives: Preparation and Biological Applications.” *BioMed research international* 2014. doi:10.1155/2014/654913.

- Man, Andy W C, Yawen Zhou, Ning Xia, and Huige Li. “Involvement of Gut Microbiota, Microbial Metabolites and Interaction with Polyphenol in Host Immunometabolism.” doi:10.3390/nu12103054.
- Markowiak, Paulina, and Katarzyna Ślizewska. 2017. “Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health.” *Nutrients* 9(9). doi:10.3390/nu9091021.
- Masumoto, Saeko, Akari Terao, Yuji Yamamoto, Takao Mukai, Tomisato Miura, and Toshihiko Shoji. 2016. “Non-Absorbable Apple Procyanidins Prevent Obesity Associated with Gut Microbial and Metabolomic Changes.” *Scientific reports* 6. doi:10.1038/SREP31208.
- de Melo Pereira, Gilberto Vinícius, Bruna de Oliveira Coelho, Antonio Irineudo Magalhães Júnior, Vanete Thomaz-Soccol, and Carlos Ricardo Soccol. 2018. “How to Select a Probiotic? A Review and Update of Methods and Criteria.” *Biotechnology Advances* 36(8): 2060–76. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2018.09.003.
- Menchetti, Laura, Barbara Padalino, Fabienne Brasileiro Fernandes, and Leonardo Nanni Costa. 2020. “Comparison of Nonlinear Growth Models and Factors Affecting Body Weight at Different Ages in Toy Poodles.” *Italian Journal of Animal Science* 19(1): 792–802. doi:10.1080/1828051X.2020.1799724/ASSET/D41480BA-36D8-42A5-BF83-38A37B9AE736/ASSETS/IMAGES/TJAS_A_1799724_F0004_B.JPG.
- Mendez-Encinas, Mayra A., Dora E. Valencia-Rivera, Elizabeth Carvajal-Millan, Humberto Astiazaran-Garcia, Valérie Micard, and Agustín Rascón-Chu. 2021. “Fermentation of Ferulated Arabinoxylan Recovered from the Maize Bioethanol Industry.” *Processes* 2021, Vol. 9, Page 165 9(1): 165. doi:10.3390/PR9010165.
- Mithul Aravind, S., Santad Wichienchot, Rong Tsao, S. Ramakrishnan, and S. Chakkaravarthi. 2021a. “Role of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota, Their Metabolites and Health Benefits.” *Food Research International* 142. doi:10.1016/j.foodres.2021.110189.
- Mithul Aravind, S., Santad Wichienchot, Rong Tsao, S. Ramakrishnan, and S. Chakkaravarthi. 2021b. “Role of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota, Their Metabolites and Health Benefits.” *Food Research International* 142. doi:10.1016/j.foodres.2021.110189.
- Moorthy, Mohanambal, Nathorn Chaiyakunapruk, Sabrina Anne Jacob, and Uma D. Palanisamy. 2020. “Prebiotic Potential of Polyphenols, Its Effect on Gut Microbiota and Anthropometric/Clinical Markers: A Systematic Review of Randomised Controlled

- Trials.” *Trends in Food Science and Technology* 99: 634–49. doi:10.1016/j.tifs.2020.03.036.
- Neri-Numa, Iramaia Angélica, Henrique Silvano Arruda, Marina Vilar Geraldi, Mário Roberto Maróstica Júnior, and Glaucia Maria Pastore. 2020. “Natural Prebiotic Carbohydrates, Carotenoids and Flavonoids as Ingredients in Food Systems.” *Current Opinion in Food Science* 33: 98–107. doi:10.1016/J.COFS.2020.03.004.
- Ngamsuk, Samuchaya, Tzou-Chi Huang, and Jue-Liang Hsu. “Determination of Phenolic Compounds, Procyanidins, and Antioxidant Activity in Processed Coffea Arabica L. Leaves.” doi:10.3390/foods8090389.
- Nguyen, Thi Tho, Phu Tho Nguyen, Minh Nhut Pham, Hary Razafindralambo, Quoc Khanh Hoang, and Huu Thanh Nguyen. 2022. “Synbiotics: A New Route of Self-Production and Applications to Human and Animal Health.” *Probiotics and antimicrobial proteins* 14(5): 980–93. doi:10.1007/S12602-022-09960-2.
- Nie, Yu, and Stephen R. Stürzenbaum. 2019. “Proanthocyanidins of Natural Origin: Molecular Mechanisms and Implications for Lipid Disorder and Aging-Associated Diseases.” *Advances in Nutrition* 10(3): 464. doi:10.1093/ADVANCES/NMY118.
- Niwano, Yoshimi, Hidetsugu Kohzaki, Midori Shirato, Shunichi Shishido, and Keisuke Nakamura. 2022. “Metabolic Fate of Orally Ingested Proanthocyanidins through the Digestive Tract.” *Antioxidants* 2023, Vol. 12, Page 17 12(1): 17. doi:10.3390/ANTIOX12010017.
- Okburan, Gozde, and Serap Kızıler. 2023. “Human Milk Oligosaccharides as Prebiotics.” *Pediatrics & Neonatology* 64(3): 231–38. doi:10.1016/J.PEDNEO.2022.09.017.
- Okino, Seiya, Mito Kokawa, Md Zohurul Islam, and Yutaka Kitamura. 2021. “Effects of Apple Juice Manufacturing Processes on Procyanidin Concentration and Nondestructive Analysis by Fluorescence Fingerprint.” *Food and Bioprocess Technology* 14(4): 692–701. doi:10.1007/S11947-021-02601-6.
- Ou, Keqin, Paul Sarnoski, Keith R. Schneider, Kaijie Song, Christina Khoo, and Liwei Gu. 2014. “Microbial Catabolism of Procyanidins by Human Gut Microbiota.” *Molecular Nutrition & Food Research* 58(11): 2196–2205. doi:10.1002/MNFR.201400243.
- Owolabi, Akinyomade Oladipo, Oghenerobor Benjamin Akpor, James Ajigasokoa Ndako, Stephen Oluwagbemiga Owa, Abimbola Peter Oluyori, Emmanuel Olorunleke Oludipe,

- Samson Olusegun Afolabi, and Rotdelmwa Maimako Asaleye. 2024. “Antimicrobial Potential of Hippocratea Indica Willd. Acetone Leaf Fractions against Salmonella Typhi: An in Vitro and in Silico Study.” *Scientific reports* 14(1): 25222. doi:10.1038/S41598-024-75796-1.
- Palade, Codrina-Madalina, Georgiana-Anca Vulpoi, Radu-Alexandru Vulpoi, Vasile Liviu Drug, Oana-Bogdana Barboi, and Manuela Ciocoiu. 2022. “The Biotics Family: Current Knowledge and Future Perspectives in Metabolic Diseases.” doi:10.3390/life12081263.
- Palaniappan, Ayyappan, Usha Antony, and Mohammad Naushad Emmambux. 2021. “Current Status of Xylooligosaccharides: Production, Characterization, Health Benefits and Food Application.” *Trends in Food Science and Technology* 111: 506–19. doi:10.1016/J.TIFS.2021.02.047.
- Palepu, Mani Surya Kumar, and Manoj P. Dandekar. 2022. “Remodeling of Microbiota Gut-Brain Axis Using Psychobiotics in Depression.” *European journal of pharmacology* 931. doi:10.1016/J.EJPHAR.2022.175171.
- Panesar, Parmjit S., Rupinder Kaur, Ram S. Singh, and John F. Kennedy. 2018. “Biocatalytic Strategies in the Production of Galacto-Oligosaccharides and Its Global Status.” *International journal of biological macromolecules* 111: 667–79. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2018.01.062.
- Panesar, Parmjit S., and Shweta Kumari. 2011. “Lactulose: Production, Purification and Potential Applications.” *Biotechnology advances* 29(6): 940–48. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2011.08.008.
- Parente, Inês A., Miguel Xavier, Dalila Roupar, Isabel R. Amado, Paulo Berni, Cláudia Botelho, José A. Teixeira, et al. 2022. “Effect of Prebiotic Fermentation Products from Primary Human Gut Microbiota on an in Vitro Intestinal Model.” *Journal of Functional Foods* 96. doi:10.1016/j.jff.2022.105200.
- Porter, Lawrence J., Liana N. Hrstich, and Bock G. Chan. 1985. “The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin.” *Phytochemistry* 25(1): 223–30. doi:10.1016/S0031-9422(00)94533-3.
- Ramirez-Coronel, Maria Ascencion, Nathalie Marnet, V. S.Kumar Kolli, Sevastianos Roussos, Sylvain Guyot, and Cristopher Augur. 2004. “Characterization and Estimation of Proanthocyanidins and Other Phenolics in Coffee Pulp (Coffea, Arabica) by Thiolysis-

- High-Performance Liquid Chromatography.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(5): 1344–49. doi:10.1021/jf035208t.
- Rastall, Robert A., and Glenn R. Gibson. 2015. “Recent Developments in Prebiotics to Selectively Impact Beneficial Microbes and Promote Intestinal Health.” *Current opinion in biotechnology* 32: 42–46. doi:10.1016/J.COPBIO.2014.11.002.
- Redondo-Castillejo, Rocío, Alba Garcimartín, Marina Hernández-Martín, María Elvira López-Oliva, Aránzazu Bocanegra, Adrián Macho-González, Sara Bastida, Juana Benedí, and Francisco J. Sánchez-Muniz. 2023. “Proanthocyanidins: Impact on Gut Microbiota and Intestinal Action Mechanisms in the Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome.” *International journal of molecular sciences* 24(6). doi:10.3390/IJMS24065369.
- Riley, Garrett Leonard, Michel Brienzo, Ana Flavia, Azevedo Carvalho, Franciane Cristina De Figueiredo, Pedro De, and Oliva Neto. 2016. “SUGARCANE BAGASSE HEMICELLULOSE PROPERTIES, EXTRACTION TECHNOLOGIES AND XYLOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION The Sugarcane Has Been Used for Centuries for Sugar Production and, in the Recent Decades, for Ethanol Fuel Production through Biotechnological Routes. From Sugar and Ethanol Industry a Large Amount.”
- Rios, Laurent Y., Richard N. Bennett, Sheryl A. Lazarus, Christian Rémésy, Augustin Scalbert, and Gary Williamson. 2002. “Cocoa Procyanidins Are Stable during Gastric Transit in Humans,,” *The American Journal of Clinical Nutrition* 76(5): 1106–10. doi:10.1093/AJCN/76.5.1106.
- Roberfroid, Marcel. 2007. “Prebiotics: The Concept Revisited1,,” *The Journal of Nutrition* 137(3): 830S–837S. doi:10.1093/JN/137.3.830S.
- Rodríguez-Daza, Maria Carolina, Elena C. Pulido-Mateos, Joseph Lupien-Meilleur, Denis Guyonnet, Yves Desjardins, and Denis Roy. 2021. “Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further.” *Frontiers in nutrition* 8. doi:10.3389/FNUT.2021.689456.
- Roopchand, Diana E., Rachel N. Carmody, Peter Kuhn, Kristin Moskal, Patricio Rojas-Silva, Peter J. Turnbaugh, and Ilya Raskin. 2015. “Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila* and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome.” *Diabetes* 64(8): 2847–58. doi:10.2337/DB14-1916.

- Ropot, Anastasiia V., Andrei M. Karamzin, and Oleg V. Sergeyev. 2020. "Cultivation of the Next-Generation Probiotic *Akkermansia muciniphila*, Methods of Its Safe Delivery to the Intestine, and Factors Contributing to Its Growth In Vivo." *Current Microbiology* 77(8): 1363–72. doi:10.1007/S00284-020-01992-7/METRICS.
- Rothschild, Daphna, Omer Weissbrod, Elad Barkan, Alexander Kurilshikov, Tal Korem, David Zeevi, Paul I. Costea, et al. 2018. "Environment Dominates over Host Genetics in Shaping Human Gut Microbiota." *Nature* 2018 555:7695 555(7695): 210–15. doi:10.1038/nature25973.
- Salminen, Seppo, Maria Carmen Collado, Akihito Endo, Colin Hill, Sarah Lebeer, Eamonn M.M. Quigley, Mary Ellen Sanders, et al. 2021. "The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Postbiotics." *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 18(9): 649–67. doi:10.1038/S41575-021-00440-6.
- Sayers, Briony, Anisha Wijeyesekera, and Glenn Gibson. 2021. "Exploring the Potential of Prebiotic and Polyphenol-Based Dietary Interventions for the Alleviation of Cognitive and Gastrointestinal Perturbations Associated with Military Specific Stressors." *Journal of Functional Foods* 87. doi:10.1016/j.jff.2021.104753.
- Shaheen, Nida, Waleed Khurshed, Bijay Gurung, and Shaohua Wang. 2025. "Akkermansia muciniphila: A Key Player in Gut Microbiota-Based Disease Modulation." *Microbiological Research* 301: 128317. doi:10.1016/J.MICRES.2025.128317.
- Sharma, Neha, Dae Kyung Kang, Hyun Dong Paik, and Young Seo Park. 2023. "Beyond Probiotics: A Narrative Review on an Era of Revolution." *Food Science and Biotechnology* 32(4): 413–21. doi:10.1007/s10068-022-01212-x.
- Sharma, Rohit, and Yogendra Padwad. 2020. "Probiotic Bacteria as Modulators of Cellular Senescence: Emerging Concepts and Opportunities." *Gut microbes* 11(3): 335–49. doi:10.1080/19490976.2019.1697148.
- Shoji, Toshihiko, Saeko, Masumoto, and Tomisato Miura. 2024. "Mechanism of Procyanidins for Health Functionality by Improving the Intestinal Environment | Enhanced Reader." *Oxford University Press on behalf of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*.

- Silvan, Jose Manuel, Alba Gutiérrez-Docio, Silvia Moreno-Fernandez, Teresa Alarcón-Cavero, Marin Prodanov, and Adolfo J Martinez-Rodriguez. “Procyanidin-Rich Extract from Grape Seeds as a Putative Tool against Helicobacter Pylori.” doi:10.3390/foods9101370.
- Song, Ang Xin, Long Qing Li, Jun Yi Yin, Jia Chi Chiou, and Jian Yong Wu. 2020. “Mechanistic Insights into the Structure-Dependant and Strain-Specific Utilization of Wheat Arabinoxylan by Bifidobacterium Longum.” *Carbohydrate Polymers* 249: 116886. doi:10.1016/J.CARBPOL.2020.116886.
- Song, Mingyang, and Andrew T. Chan. 2019. “Environmental Factors, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer Prevention.” *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 17(2): 275–89. doi:10.1016/J.CGH.2018.07.012.
- Song, Xiaoran, Yanan Liu, Xin Zhang, Peifang Weng, Ruilin Zhang, and Zufang Wu. 2023. “Role of Intestinal Probiotics in the Modulation of Lipid Metabolism: Implications for Therapeutic Treatments.” *Food Science and Human Wellness* 12(5): 1439–49. doi:10.1016/J.FSHW.2023.02.005.
- Swanson, Kelly S., Glenn R. Gibson, Robert Hutkins, Raylene A. Reimer, Gregor Reid, Kristin Verbeke, Karen P. Scott, et al. 2020. “The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Synbiotics.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 17(11): 687–701. doi:10.1038/s41575-020-0344-2.
- Tong, Zongtian. 2012. *2 Spot Assay for Yeast*. <http://www.bio-protocol.org/e16>.
- Tsai, Ying Chieh, Li Hao Cheng, Yen Wenn Liu, One Jang Jeng, and Yuan Kun Lee. 2021. “Gerobiotics: Probiotics Targeting Fundamental Aging Processes.” *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 40(1): 1–11. doi:10.12938/BMFH.2020-026.
- Tuohy, Kieran M., Lorenza Conterno, Mattia Gasperotti, and Roberto Viola. 2012. “Up-Regulating the Human Intestinal Microbiome Using Whole Plant Foods, Polyphenols, and/or Fiber.” *Journal of agricultural and food chemistry* 60(36): 8776–82. doi:10.1021/JF2053959.
- Usta-Gorgun, Buse, and Lutfiye Yilmaz-Ersan. 2020. “Short-Chain Fatty Acids Production by Bifidobacterium Species in the Presence of Salep.” *Electronic Journal of Biotechnology* 47: 29–35. doi:10.1016/J.EJBT.2020.06.004.

- Valcheva, Rosica, and Levinus A. Dieleman. 2016. "Prebiotics: Definition and Protective Mechanisms." *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 30(1): 27–37. doi:10.1016/J.BPG.2016.02.008.
- Valencia-Hernández, Leidy Johana, Jorge E. Wong-Paz, J. Alberto Ascacio-Valdés, Arely Prado-Barragan, Mónica L. Chávez-González, and Cristóbal N. Aguilar. 2025. "Fungal Biodegradation of Procyanidin in Submerged Fermentation." *Fermentation* 2025, Vol. 11, Page 75 11(2): 75. doi:10.3390/FERMENTATION11020075.
- Valencia-Hernandez, Leidy Johana, Jorge E. Wong-Paz, Juan Alberto Ascacio-Valdés, Mónica L. Chávez-González, Juan Carlos Contreras-Esquivel, and Cristóbal N. Aguilar. 2021. "Procyanidins: From Agro-Industrial Waste to Food as Bioactive Molecules." *Foods* 2021, Vol. 10, Page 3152 10(12): 3152. doi:10.3390/FOODS10123152.
- Vázquez-Nuñez, María de los Ángeles, Nuria E. Rocha-Guzmán, Pedro Aguilar-Zárate, Romeo Rojas, Guillermo Cristian G. Martínez-Ávila, Abigail Reyes, and Mariela R. Michel. 2025. "Biopolymer-Based Microencapsulation of Procyanidins from Litchi Peel and Coffee Pulp: Characterization, Bioactivity Preservation, and Stability During Simulated Gastrointestinal Digestion." *Polymers* 17(5): 687. doi:10.3390/POLYM17050687/S1.
- Wang, Mengting, Haiguang Mao, Zhijian Ke, Rui Huang, Jianchu Chen, Lili Qi, and Jinbo Wang. 2023. "Effect of Proanthocyanidins from Different Sources on the Digestibility, Physicochemical Properties and Structure of Gelatinized Maize Starch." *International Journal of Biological Macromolecules* 248: 125935. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2023.125935.
- Wang, Yanbo. 2009. "Prebiotics: Present and Future in Food Science and Technology." *Food Research International* 42(1): 8–12. doi:10.1016/J.FOODRES.2008.09.001.
- Wang, Yaxiong, Liangchao Li, Chenxu Bao, Boqian He, Yi He, and Qian Wu. 2025. "A Study on the Qualitative Analysis of Lotus Seedpod Oligomeric Procyanidins during Digestion, Absorption and Colonic Fermentation Based on UPLC-Q-Exactive/MS." *Food Chemistry* 472: 142864. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2025.142864.
- Wong-Paz, Jorge E., Sylvain Guyot, Pedro Aguilar-Zárate, Diana B. Muñoz-Márquez, Juan C. Contreras-Esquivel, and Cristóbal N. Aguilar. 2021. "Structural Characterization of Native and Oxidized Procyanidins (Condensed Tannins) from Coffee Pulp (*Coffea Arabica*) Using

- Phloroglucinolysis and Thioglycolysis-HPLC-ESI-MS.” *Food Chemistry* 340. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127830.
- Xia, Yun, Xuxiang Zhang, Mingxin Jiang, Hongbo Zhang, Yinfeng Wang, Yuyu Zhang, Robert Seviour, and Yunhong Kong. 2021. “In Vitro Co-Metabolism of Epigallocatechin-3gallate (EGCG) by the Mucin-Degrading Bacterium *Akkermansia muciniphila*.” *PLoS ONE* 16(12 December). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0260757,.
- Xing, Ya Wei, Qing Hua Wu, Yu Jiang, Man Xiang Huang, and Guang Tao Lei. 2019. “Procyanidin B2 Protects against Diet-Induced Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease via the Modulation of the Gut Microbiota in Rabbits.” *World Journal of Gastroenterology* 25(8): 955–66. doi:10.3748/wjg.v25.i8.955.
- Yang, Haixia, Xingxia Tuo, Lingbo Wang, Rosa Tundis, Maria P. Portillo, Jesus Simalgandara, Yan Yu, et al. 2021a. “Bioactive Procyanidins from Dietary Sources: The Relationship between Bioactivity and Polymerization Degree.” *Trends in Food Science & Technology* 111: 114–27. doi:10.1016/J.TIFS.2021.02.063.
- Yang, Haixia, Xingxia Tuo, Lingbo Wang, Rosa Tundis, Maria P. Portillo, Jesus Simalgandara, Yan Yu, et al. 2021b. “Bioactive Procyanidins from Dietary Sources: The Relationship between Bioactivity and Polymerization Degree.” *Trends in Food Science & Technology* 111: 114–27. doi:10.1016/J.TIFS.2021.02.063.
- Ye, Huanfeng, Lin Luo, Jiao Wang, Kun Jiang, Tianli Yue, and Haihua Yang. 2022. “Highly Galloylated and A-Type Prodelphinidins and Procyanidins in Persimmon (*Diospyros Kaki* L.) Peel.” *Food Chemistry* 378: 131972. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2021.131972.
- Yoo, Suyeon, Suk Chae Jung, Kihyuck Kwak, and Jun Seob Kim. 2024. “The Role of Prebiotics in Modulating Gut Microbiota: Implications for Human Health.” *International Journal of Molecular Sciences* 25(9). doi:10.3390/ijms25094834.
- Zaman, Siti A., and Shahrul R. Sarbini. 2016. “The Potential of Resistant Starch as a Prebiotic.” *Critical reviews in biotechnology* 36(3): 578–84. doi:10.3109/07388551.2014.993590.
- Zhai, Qixiao, Saisai Feng, Narbad Arjan, and Wei Chen. 2019. “A next Generation Probiotic, *Akkermansia muciniphila*.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(19): 3227–36. doi:10.1080/10408398.2018.1517725;WEBSITE:WEBSITE:TFOPB;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.

- Zhang, Chengcheng, Zhiming Yu, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Qixiao Zhai, and Wei Chen. 2019. "Colonization and Probiotic Function of Bifidobacterium Longum." *Journal of Functional Foods* 53: 157–65. doi:10.1016/J.JFF.2018.12.022.
- Zhang, Fenghua, and Dali Wang. 2023. "Potential of Akkermansia Muciniphila and Its Outer Membrane Proteins as Therapeutic Targets for Neuropsychological Diseases." *Frontiers in Microbiology* 14: 1191445. doi:10.3389/FMICB.2023.1191445/XML.
- Zhang, Hua, and Rong Tsao. 2016. "Dietary Polyphenols, Oxidative Stress and Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects." *Current Opinion in Food Science* 8: 33–42. doi:10.1016/j.cofs.2016.02.002.
- Zhang, Huan, Shiqi Zhang, Li Chen, Rui Xu, and Jiangjiang Zhu. 2024. "LC-HRMS-Based Metabolomics and Lipidomics Analyses of a Novel Probiotic Akkermansia Muciniphila in Response to Different Nutritional Stimulations." *Journal of Microbiological Methods* 223. doi:10.1016/j.mimet.2024.106975.
- Zhang, Ting, Qianqian Li, Lei Cheng, Heena Buch, and Faming Zhang. 2019. "Akkermansia Muciniphila Is a Promising Probiotic." *Microbial Biotechnology* 12(6): 1109–25. doi:10.1111/1751-7915.13410.
- Zhang, Xiaoping, Junjing Shao, Qinghua Cui, Wenting Ni, Ying Yang, and Beibei Yan. 2023. "Bioactivities of Dietary Polyphenols and Their Effects on Intestinal Microbiota." *Mini reviews in medicinal chemistry* 23(3): 361–77. doi:10.2174/1389557522666220811123115.
- Zhang, Yan, Arthur Brady, Cheron Jones, Yang Song, Thomas C. Darton, Claire Jones, Christoph J. Blohmke, et al. 2018. "Compositional and Functional Differences in the Human Gut Microbiome Correlate with Clinical Outcome Following Infection with Wild-Type Salmonella Enterica Serovar Typhi." *mBio* 9(3). doi:10.1128/MBIO.00686-18/SUPPL_FILE/MBO002183863SF2.PDF.
- Zhang, Yongchuang, Mengna Li, Haoyuan Liu, Yongfu Fan, and Huan Huan Liu. 2025. "The Application of Procyanidins in Diabetes and Its Complications: A Review of Preclinical Studies." *Frontiers in Pharmacology* 16. doi:10.3389/fphar.2025.1532246.
- Zhao, Yanqing, Huijun Yang, Peng Wu, Shuguo Yang, Wenkun Xue, Biao Xu, Sirui Zhang, Bin Tang, and Daoxiu Xu. 2024. "Akkermansia Muciniphila: A Promising Probiotic

- against Inflammation and Metabolic Disorders.” *Virulence* 15(1). doi:10.1080/21505594.2024.2375555,.
- Zheng, Shujuan, Kunlun Huang, Changhui Zhao, Wentao Xu, Yao Sheng, Yunbo Luo, and Xiaoyun He. 2018. “Procyanidin Attenuates Weight Gain and Modifies the Gut Microbiota in High Fat Diet Induced Obese Mice.” *Journal of Functional Foods* 49: 362–68. doi:10.1016/j.jff.2018.09.007.
- Zhou, Bin, Yvette Alania, Mariana Reis, Shu Xi Jing, James B. McAlpine, Ana K. Bedran-Russo, Shao Nong Chen, Daneel Ferreira, and Guido F. Pauli. 2022. “Seco B-Type Oligomers from *Pinus Massoniana* Expand the Procyanidin Chemical Space and Exhibit Dental Bioactivity.” *Journal of natural products* 85(12): 2753–68. doi:10.1021/ACS.JNATPROD.2C00664.
- Zhou, Hai Chao, Yi Ming Lin, Shu Dong Wei, and Nora Fung Yee Tam. 2011. “Structural Diversity and Antioxidant Activity of Condensed Tannins Fractionated from Mangosteen Pericarp.” *Food Chemistry* 129(4): 1710–20. doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.036.
- Zhou, Hai Chao, Nora Fung Yee Tam, Yi Ming Lin, Zhen Hua Ding, Wei Ming Chai, and Shu Dong Wei. 2014. “Relationships between Degree of Polymerization and Antioxidant Activities: A Study on Proanthocyanidins from the Leaves of a Medicinal Mangrove Plant *Ceriops Tagal*.” *PLoS ONE* 9(10). doi:10.1371/journal.pone.0107606.
- Żółkiewicz, Jakub, Aleksandra Marzec, Marek Ruszczyński, and Wojciech Feleszko. 2020. “Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics.” *Nutrients* 12(8): 1–17. doi:10.3390/NU12082189.

10. Anexo 1

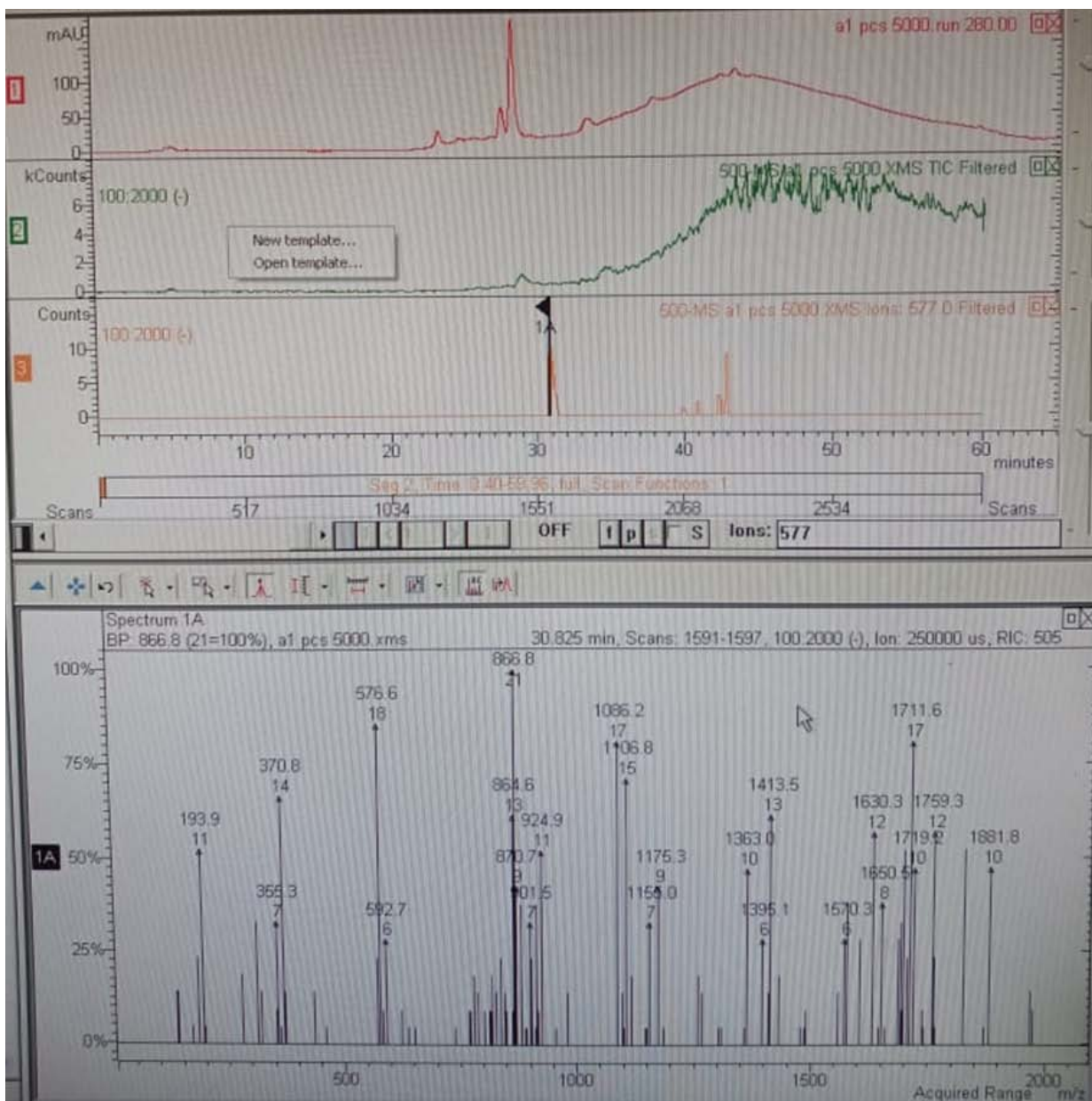


Figura 10. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 577 m/z representan el EIC para procianidinas.

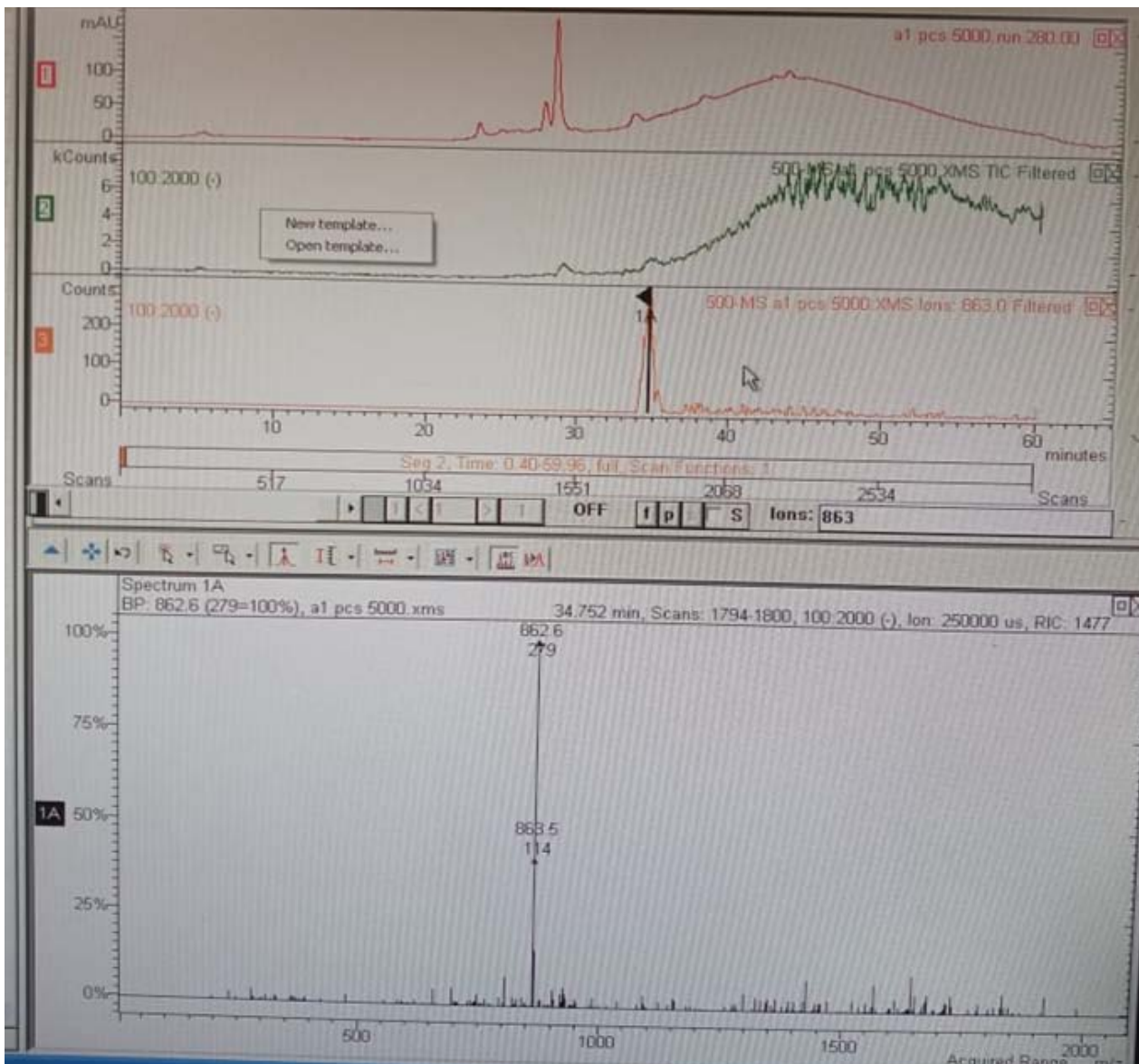


Figura 11. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 863 m/z representan el EIC para procianidinas.

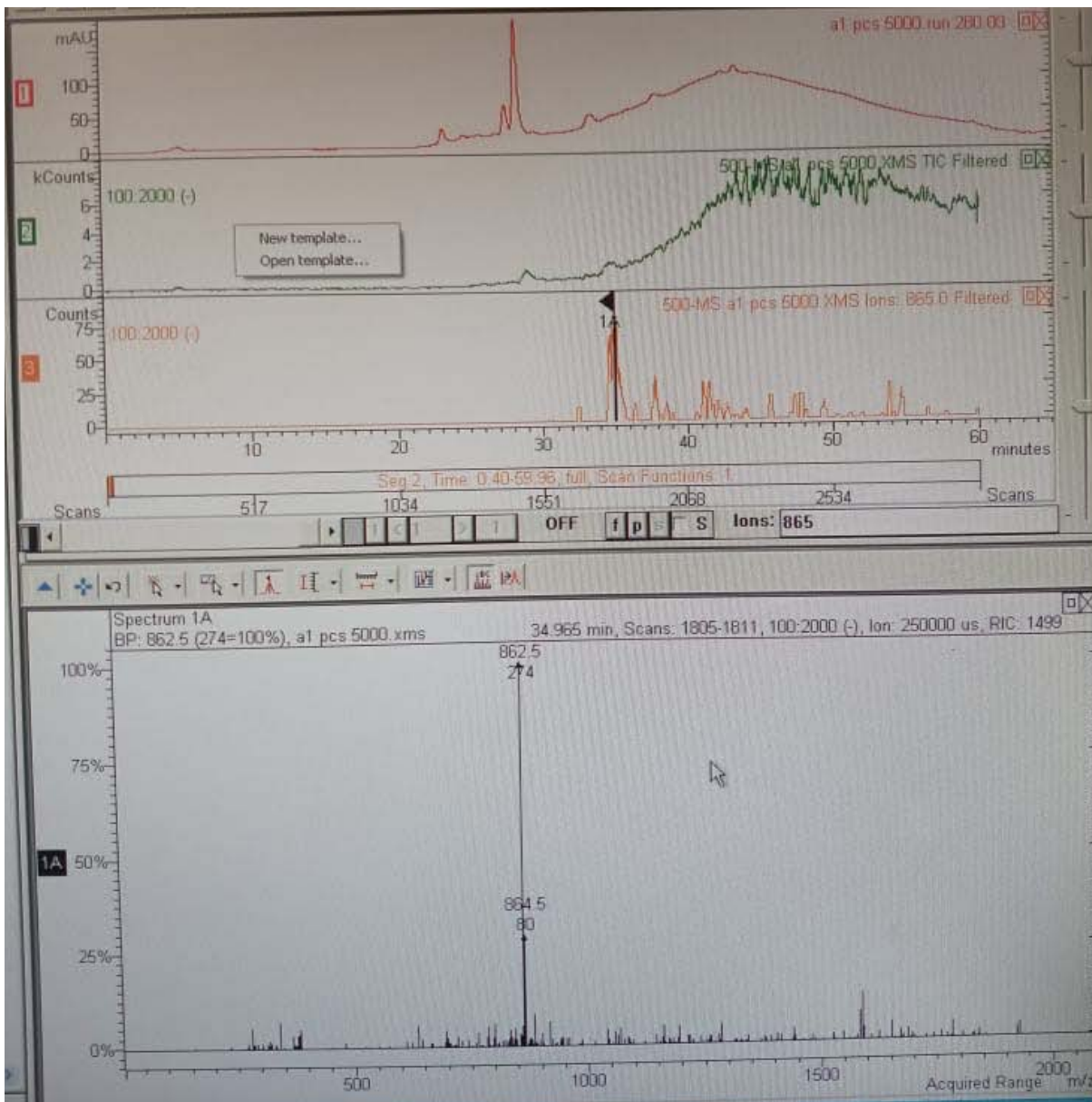


Figura 12. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 865 m/z representan el EIC para procianidinas.

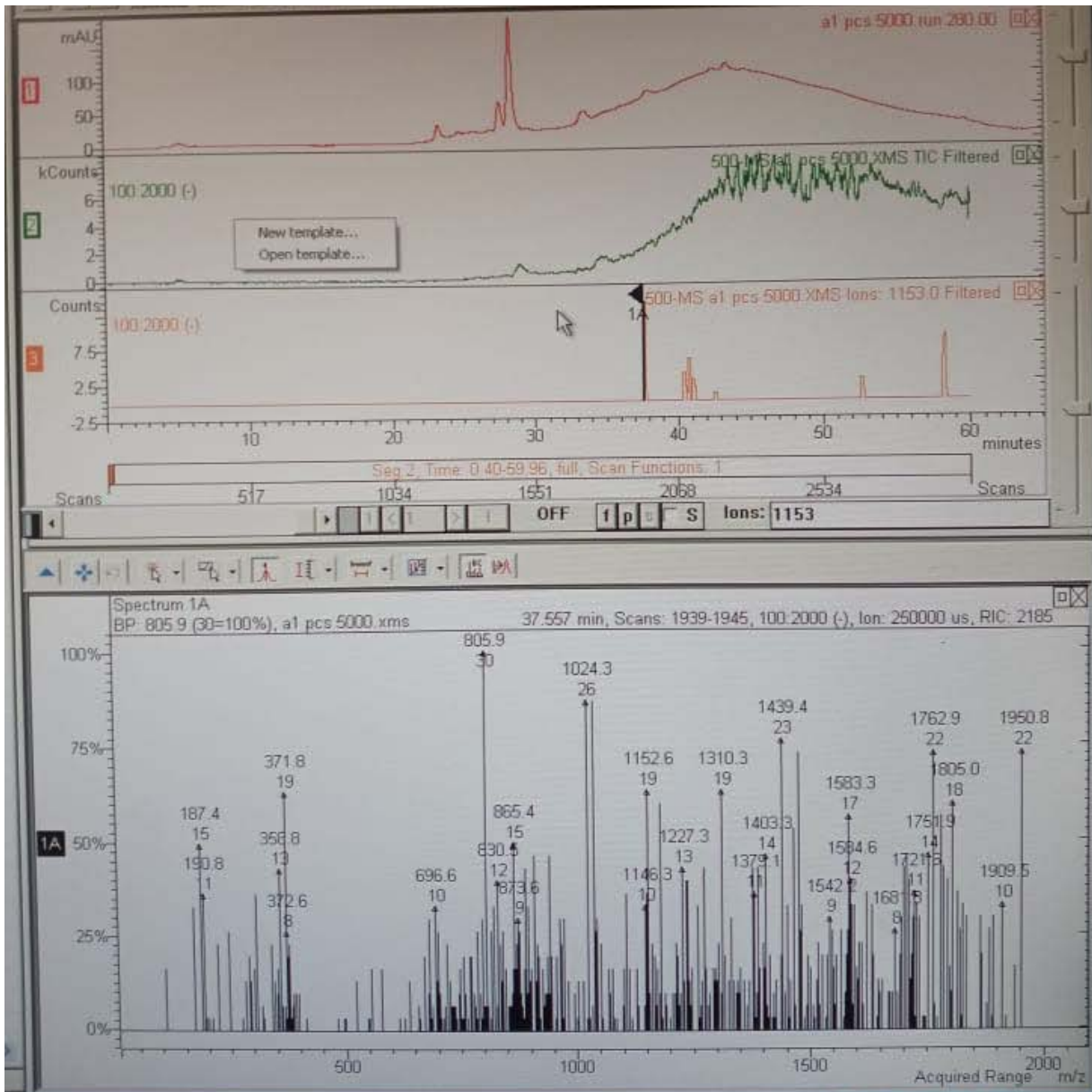


Figura 13. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 1153 m/z representan el EIC para procianidinas.

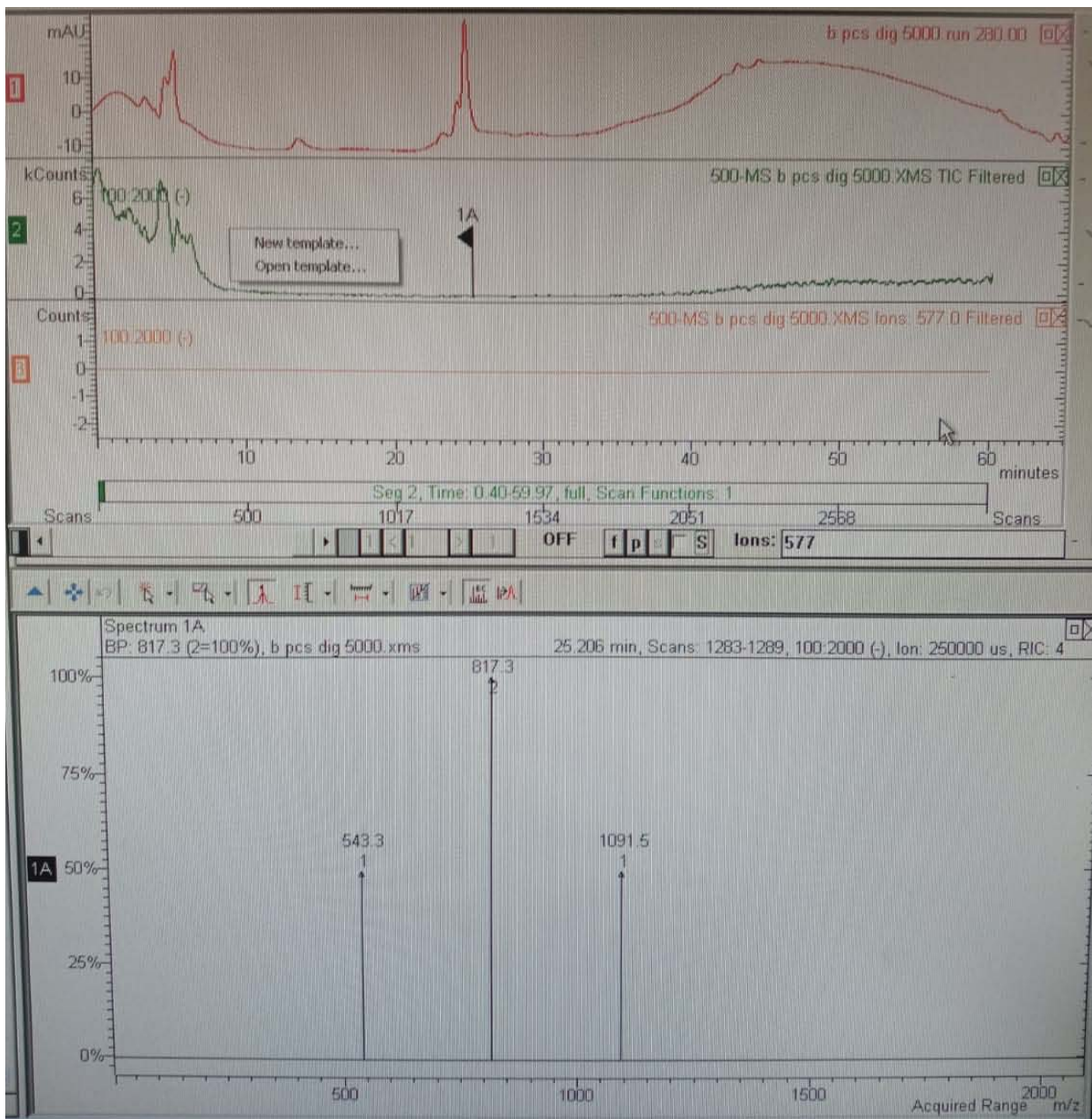


Figura 14. Cromatogramas de PC's digeridas a 5000 ppm, 577 m/z representan el EIC para procianidinas.

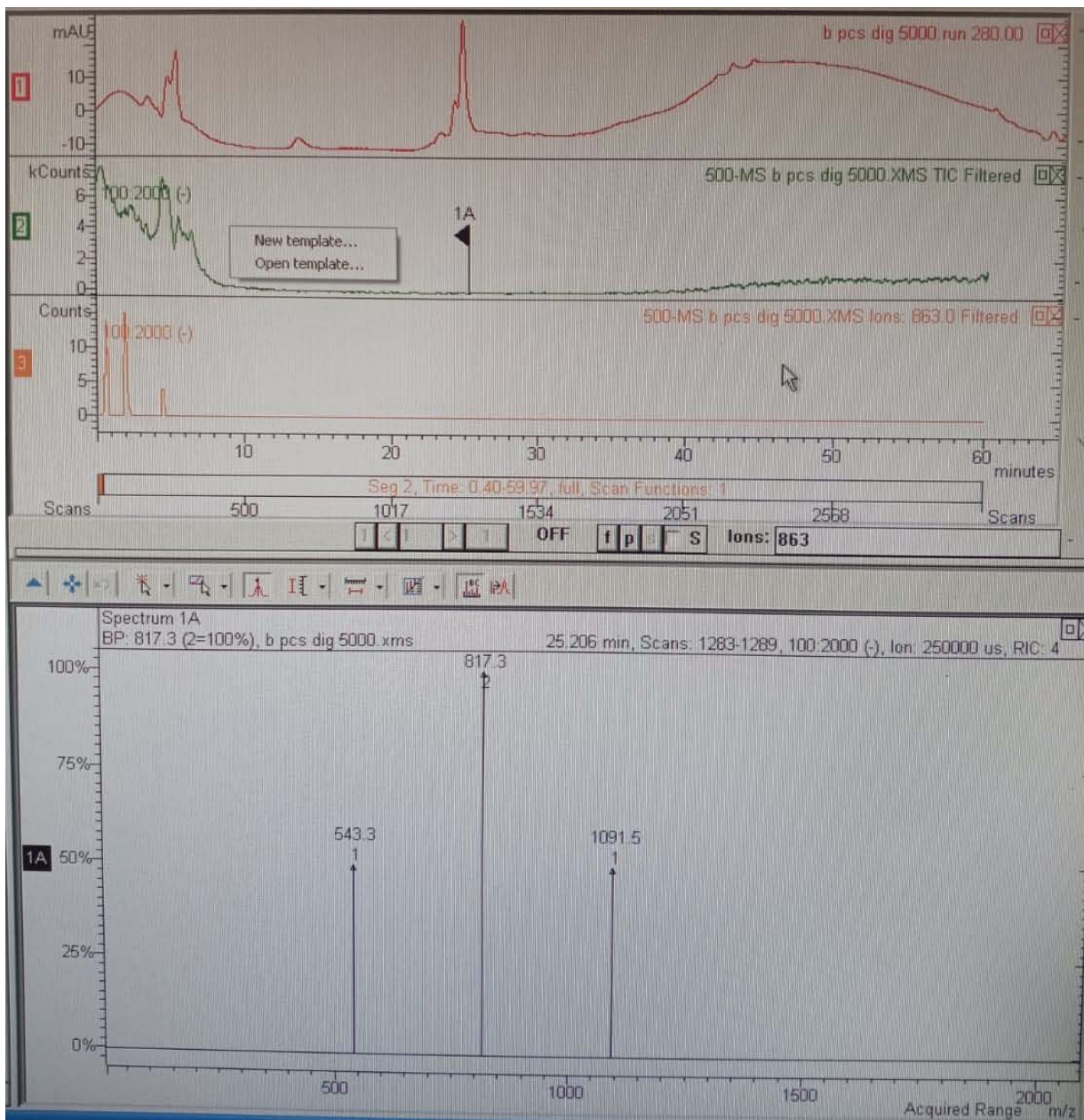


Figura 15. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 863 m/z representan el EIC para procianidinas.

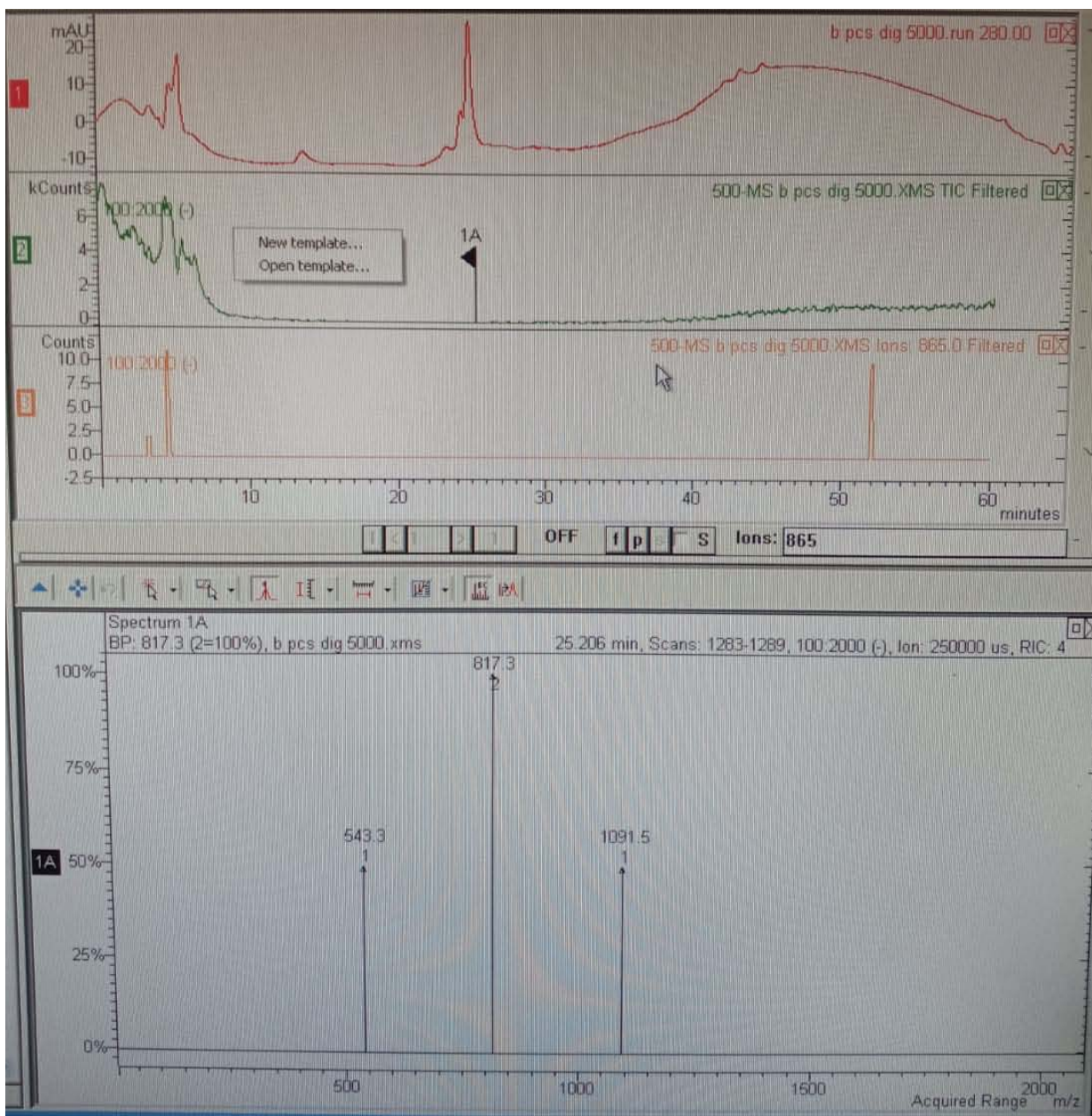


Figura 16. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 865 m/z representan el EIC para procianidinas.

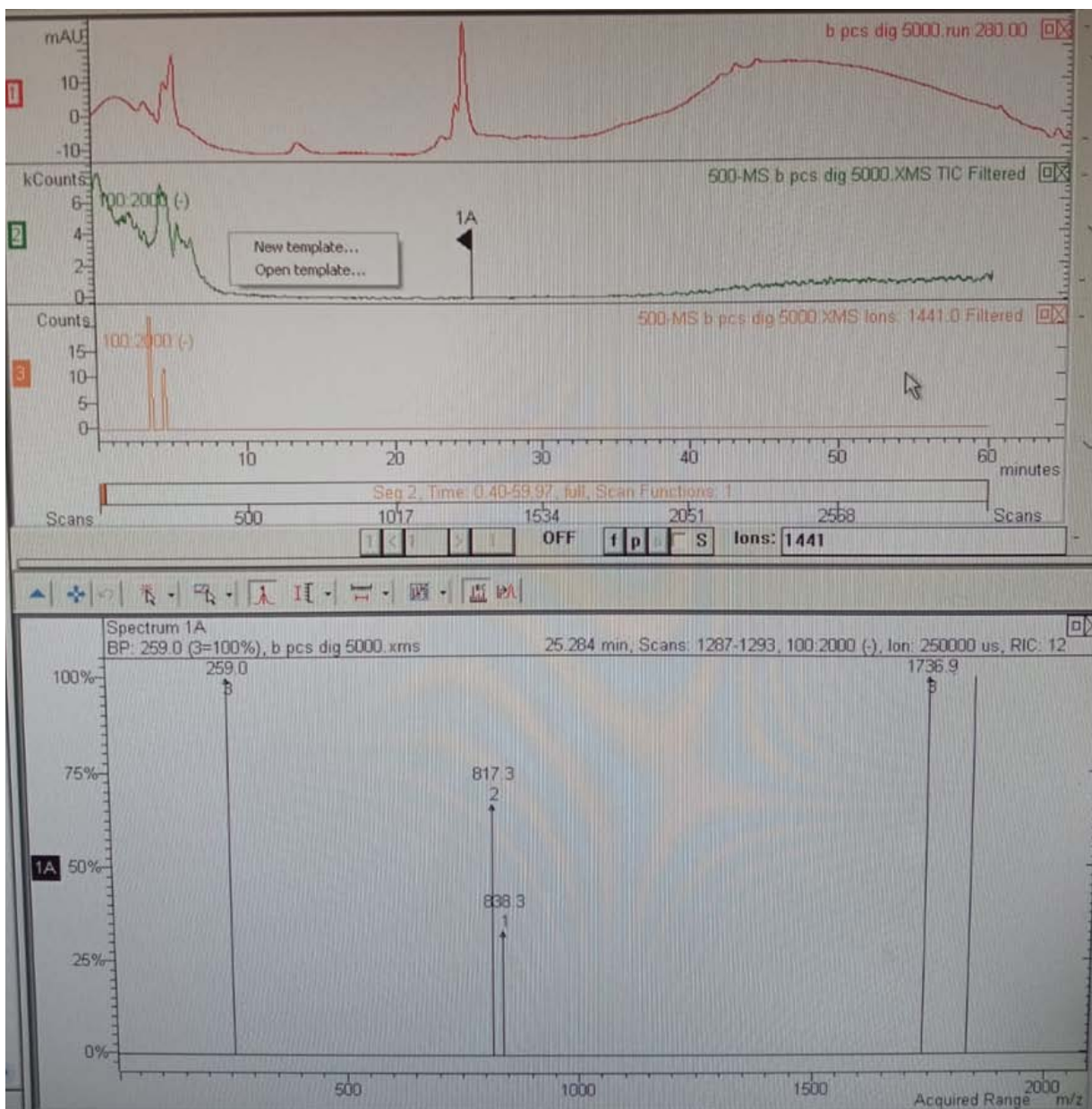


Figura 17. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 1441 m/z representan el EIC para procianidinas.

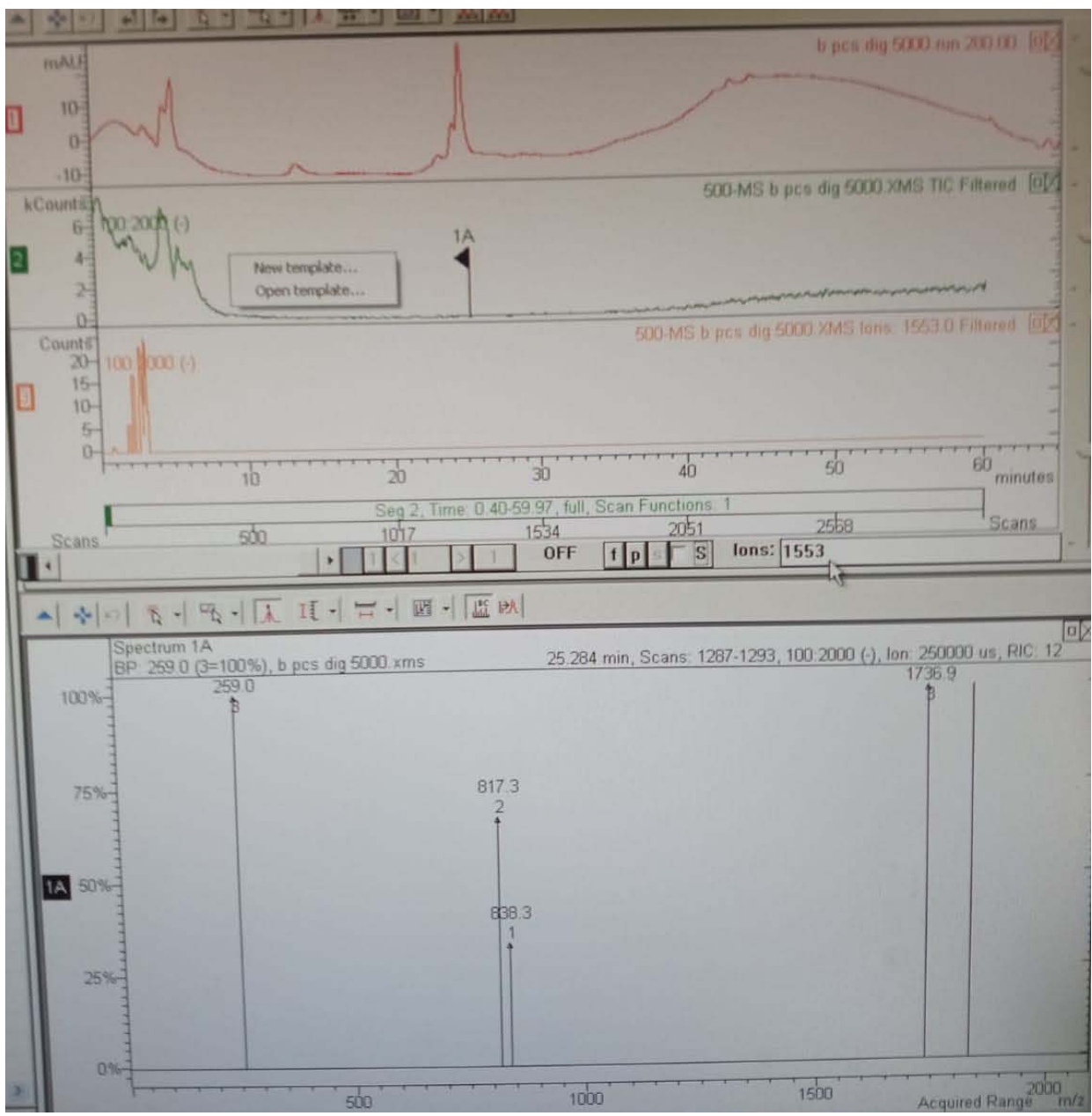


Figura 18. Cromatogramas de PC's purificadas a 5000 ppm, 1553 m/z representan el EIC para procianidinas.

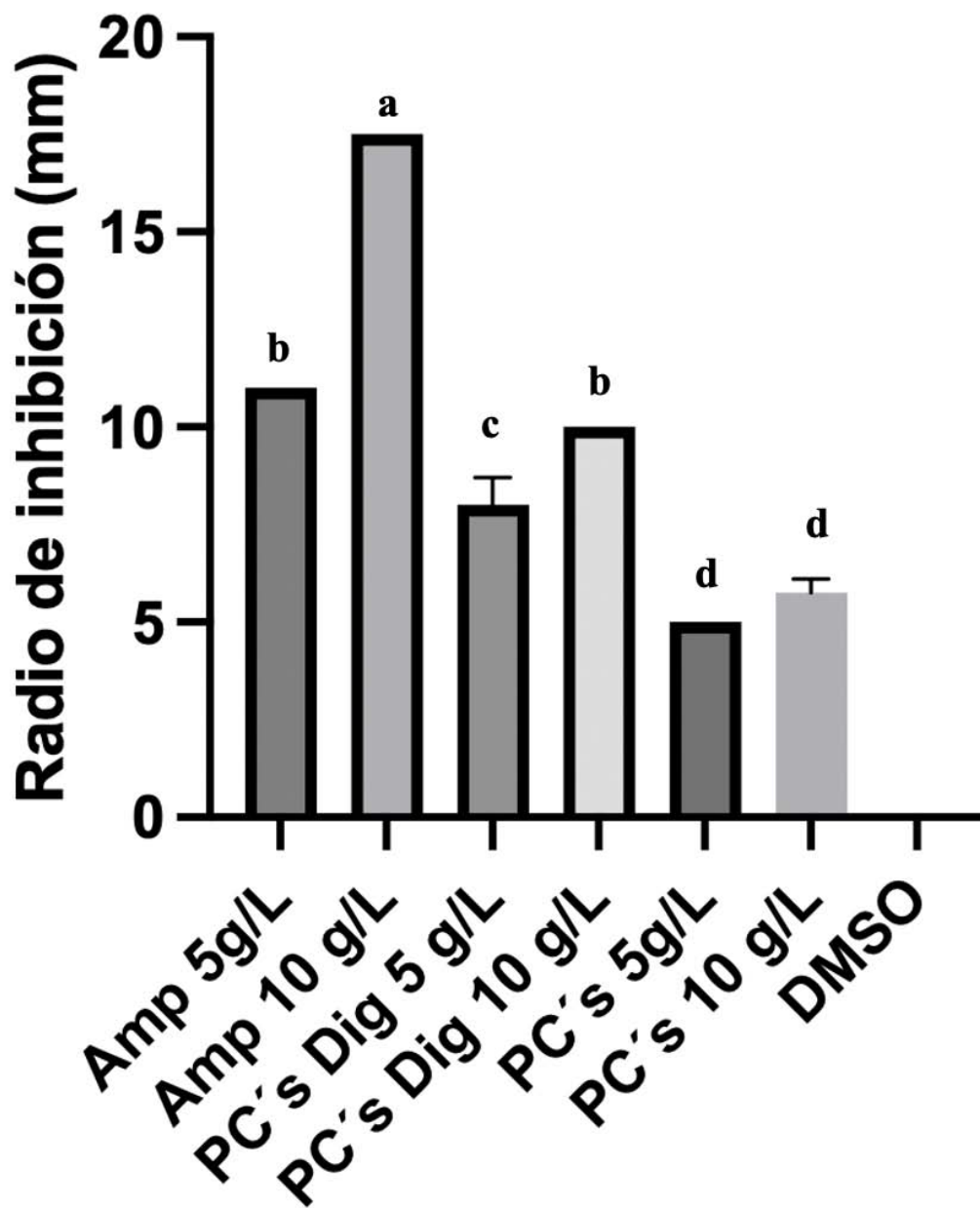


Figura 19. Análisis estadístico de la evaluación antibacteriana mediante el método de difusión en disco con las siguientes concentraciones de PC: 5 y 10 g/l (A), control negativo con DMSO (B) y control positivo con ampicilina (C) frente a bacterias como *S. typhi* mediante la prueba de Anova.

CHAPTER 6

Sustainable and Innovative Food Packing Materials Based in Agroindustrial By-Products

SANDY R. GARCÍA-RODRÍGUEZ¹, ALAIN MARTÍNEZ-PÉREZ²,
CHRISTIAN I. CANO-GÓMEZ¹, DIANA B. MUÑIZ-MÁRQUEZ¹, and
JORGE E. WONG PAZ¹

¹*Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Ciudad Valles, San Luis Potosí, México*

²*Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, TecNM/Instituto Tecnológico de Durango, Durango, Durango, México*

ABSTRACT

The utilization of agroindustrial by-products and alternative materials in the evolution of novel food packaging represents a sustainable approach, given the substantial environmental problems associated with certain conventional materials. Concurrently, contemporary food industries necessitate the evolution of innovative packaging designs to align with consumer preferences. In this context, the incorporation of sustainable packaging materials, such as biopolymers derived from plant-based sources, proves instrumental in the creation of edible films, bioadhesives, coatings, plastic films, and various other emerging forms of food packaging. This strategic integration aims to mitigate the accumulation of food wastes generated across diverse industries. This chapter elucidates the pivotal role played by innovative food packaging in addressing and

Polymers and Functional Materials for a Cleaner Environment and Human Health: Sustainable Technologies and New Research. Ruby Varghese, Ann Rose Abraham, Shrikaant Kulkarni, & A. K. Haghi (Eds.)

© 2025 Apple Academic Press, Inc. Co-published with CRC Press (Taylor & Francis)

Non Commercial Use

Apple Academic Press

Author Copy



Instituto Tecnológico de Durango
Laboratorio Nacional Conacyt de Apoyo
a la Evaluación de Productos Bióticos
(LANAEPBI)

Durango, Durango, 29/noviembre/2024

Dr. Jorge Enrique Wong Paz
Profesor Investigador
Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca

PRESENTE

Por medio de la presente, escribimos respetuosamente para informarle que la estudiante **Ing. Sandy Rosalinda García Rodríguez** conduyó satisfactoriamente su estancia en el TecNM/Instituto Tecnológico de Durango en la Unidad de Posgrado Investigación y Desarrollo Tecnológico (5 de agosto al 29 de noviembre de 2024). Como parte de los compromisos establecidos con antelación, se resumen las actividades desarrolladas en la Estancia de Investigación:

- Evaluación de procianidinas como modulador en el crecimiento probiótico
- Simulación oro-gastrointestinal
- Asistencia a clase "Probióticos y Prebióticos", aprobada con calificación de 100
- Participación en el Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica (Saltillo, Coahuila)
- Participación en Seminarios de Investigación de la Maestría en Ciencias y Tecnología en Alimentos Funcionales

Sin mas por el momento, reciba un cordial saludo y quedo atenta si requiere mayor información.

ATENTAMENTE

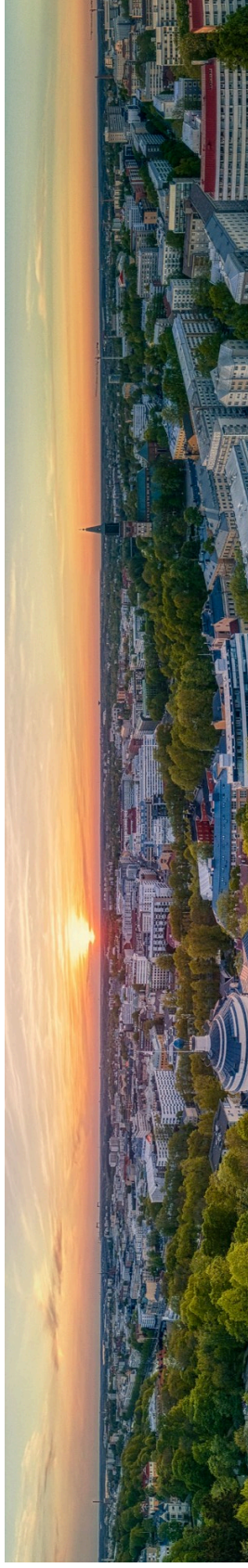


Dra. Olga Miriam Rutaga Quiñones
Profesora Investigadora
TecNM/Instituto Tecnológico de Durango



Bldv. Felipe Pescador No. 1830 Ote., Durango, Dgo., C.P. 34080 Tels. 618-818-69-36 ext. 112
e-mail: lanaepbi@itdurango.edu.mx tecnm.mx | itdurango.edu.mx





CERTIFICATE

This is to certify that

Sandy Rosalinda García Rodríguez

Attended the XXXII International Conference on Polyphenols - ICP2025 TURKU in Turku, Finland, on 7-10 July 2025, and presented a POSTER titled: EFFECT OF PURIFIED PROCYANIDINS AS MODULATORS OF PROBIOTIC GROWTH. Affiliation: Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Salminen'.

Professor Juha-Pekka Salminen

Conference Chair, Natural Chemistry Research Group, University of Turku

Dear Jorge E. Wong-Paz,

Thank you for your submission.

Submission ID 251622995

Manuscript Title **Procyanidins are regulators of the gut microbiota. Recent advances towards its prebiotic effect.**

Journal **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**

If you made the submission, you can check its progress and make any requested revisions on the [Author Portal](#)

Thank you for submitting your work to our journal.

If you have any queries, please get in touch with journalshelpdesk@taylorandfrancis.com.

Kind Regards,

Critical Reviews in Food Science and Nutrition Editorial Office

Ciudad Valles, S.L.P., a 23 de enero de 2024

García Rodríguez Sandy Rosalinda
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente


En relación con la solicitud de registro de tema de tesis y la conformación del Comité Tutelar le comunico que el Comité Académico del PMCBQ el día 27 de octubre de 2023, aprobó:

- 1. Su propuesta del tema de tesis:**
Efecto de las procianidinas como moduladores del crecimiento probiótico bajo simulación oro-gastro-intestinal *in vitro*
- 2. Su propuesta del Comité Tutelar conformado por:**

Director: Dr. Jorge Enrique Wong Paz
Codirector: Dra. Diana Beatriz Muñoz Márquez
Asesor: Dra. Olga Miriam Rutiaga Quiñón

Sin otro particular por el momento, le envió un saludo cordial.

Atentamente



FACULTAD DE ESTUDIOS
PROFESIONALES
ZONA HUASTECA
UASLP

Dr. Alejandro Hernández Morales
Coordinador de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
**EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS**

c.c.p. Dra. Gabriela Pérez Flores– Jefa de Posgrado
c.c.p. Comité Tutelar aprobado
c.c.p. Archivo

Romualdo del Campo No. 501, Frac. Rafael Curiel, 79060 Ciudad Valles, S.L.P. México.
TELS. (482) 381-23-48 Ext. 105