



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

---

**FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS,  
INGENIERÍA Y MEDICINA**

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN  
CIENCIAS AMBIENTALES**

**FRUCTANOS DE MAGUEY: EFECTO PREBIÓTICO  
Y METABÓLICO**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

**ING. JUAN ANTONIO RENDÓN HUERTA**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES**

COMITÉ TUTELAR:

**M.C. ROSA ELENA DELGADO PORTALES**

**DR. MIGUEL ANGEL RUIZ CABRERA**

**Proyecto realizado en:**

Instituto de Investigación de Zonas Desérticas y Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, ambos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

**Con financiamiento de:**

Fondos de Apoyo para la Investigación de la UASLP

Convenio C08-FAI-04-27.31

**Dedicatorias:**

**A mis padres,**

Eduardo Rendón Castillo y María Guadalupe Huerta Pérez por su constante apoyo incondicional, por darme una educación, comprensión, valiosos consejos para el desarrollo de mi vida y por ser mis amigos.

**A mis hermanos:**

Elba Cristina, Luciano y Oscar por todo su apoyo, por los momentos de carrilla sana, verdad Cristina y Chano?? jejeje, por el cariño que siempre me han dado, los quiero mucho.

**A mi novia:**

Maribel Aguirre Salinas, por su cariño, su sinceridad, por el apoyo recibido durante este tiempo, por ser el motor que mueve mi vida.

## **Agradecimientos:**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante estos dos años **(CVU/becario: 232253/208836)**.

Al Posgrado Multidisciplinario en Ciencias Ambientales PMPCA, en especial a los trabajadores del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la UASLP por brindarme su apoyo y amistad.

A la Dra. Bertha Irene Juárez por que ha sido un pilar importante en mi formación, por que nunca me ha dejado solo, siempre me ha apoyado en todo momento, por sus atinados consejos, por su amistad y por que es un excelente ser humano.

A la Maestra Rosa Elena Delgado (ciencias Químicas UASLP) por la confianza que me otorgó desde que llegue a su laboratorio, por sus sabios consejos, su amabilidad, por las atenciones prestadas y por ser una amiga en quien puedo confiar.

Al Dr. Miguel Ángel Ruiz, por colaborar en la asesoría y en las correcciones de este trabajo.

Al Dr. Juan Rogelio Aguirre por sus consejos, su apoyo y valiosas aportaciones en la realización de este trabajo (repazones). También por llevarme a las prácticas de etnobiología y a la mezcalera.

Al Dr. Gregorio Álvarez por su colaboración en el análisis estadístico y por los buenos momentos de chacoteo.

A los Doctores (Yolanda Jasso, Juan Carlos García, Juan Antonio Reyes y Pedro Castillo) y personal que laboran en el Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la UASLP por brindarme su apoyo y amistad.

A la Química Socorro Jasso por colaborar en el proceso del experimento con las ratitas.

A la QFB Maribel Aguirre Salinas por su valiosa colaboración en la parte experimental, por levantarme el ánimo cuando más lo necesité, por su sincera amistad, por los buenos momentos de alegría, por ser una parte emotiva e importante en mi vida (Te Quiero Mucho Amor).

A la Maestra Luz María Martínez (Facultad de Medicina) por su valiosa amistad y por conseguirme material para el primer experimento.

A la Maestra Juanita Tovar (Laboratorio de Microbiología QFB, C. Q.) por dejarme usar su laboratorio así como el material, sobre todo su espectrofotómetro.

Al Maestro Fidel Martínez (Laboratorio de Microbiología QFB, Ciencias Químicas) por su apoyo brindado en el comienzo del experimento y por mandarnos con una excelente asesora (Maestra Rosa Elena)

A los maestros del laboratorio de microbiología de alimentos (C.Q.), Maestra Alejandra y Maestra Rosalba por compartir sus conocimientos y por su amabilidad y disponibilidad cuando más lo necesite. Y a los compañeros Aldo, Elena, Georgina, Pablo y Jessica.

A la Dra. Norma Cárdenas por dejarnos usar su laboratorio (Altair) y a la QFB Flor Alejandra Hernández del Ángel por ayudarme a leer las muestras de plasma.

Al Dr. Cuahutemoc Oros Ovalle jefe del departamento de Patología del Hospital Central "Ignacio Morones Prieto" y a los doctores María Guadalupe Cruz Rubio y Francisco por analizar las muestras de hígado.

A mis compañeros de maestra los PMPCA-añeros Luis Olvera, Juan Carlos Torres, Claudia Montoya, Nelson Montoya, Sonia Castillo, Eric Gil, Elvia Zapata, Yolanda Rodríguez, Angélica Vargas, Paulina Guzmán y Andrés Jiménez, a todos gracias por su amistad, en serio que fue una experiencia buena para mi haberlos conocido.

A mis compañeros de cubículo Don Guillermo, Alejandra Covarrubias y Jorge Mora.

A mis amigos Juan Magdaleno Tovar y Familia, Leonel Tovar Glz. y Familia, a los cuales considero como mis hermanos y que han sido un ejemplo de superación a seguir.

Y a todas aquellas personas que he olvidado y han sido parte importante en mi vida.

## **Presentación de la obra:**

**Para un mejor manejo de la información, este trabajo se presenta estructurado en tres secciones, la primera de ellas corresponde a los antecedentes generales del maguey y de los fructanos que son la parte fundamental de las dos secciones siguientes, la sección dos, se refiere a la evaluación de fructanos en un experimento *in vitro*, por último, la sección tres es el estudio de los fructanos sobre el metabolismo energético de ratas obesas y diabéticas.**

<b>ÍNDICE</b>	<b>página</b>
Índice de figuras	iii
Índice de cuadros	v
1.0 Introducción general	1
1.1 Maguey	3
1.1.1 Importancia del maguey	3
1.1.2 Metabolismo Ácido de las Crasuláceas	5
1.2 Carbohidratos	6
1.2.1 Polisacáridos	7
1.2.2 Carbohidratos de reserva	7
1.2.2.1 Fructanos	8
1.2.2.2 Extracción	10
1.2.2.3 Biosíntesis	12
1.2.2.4 Clasificación	13
2.0 Literatura citada	16
Fructanos de maguey: efecto prebiótico	20
Resumen	21
1.0 Introducción	22
2.0 Antecedentes	24
2.1 Prebióticos	24
2.1.1 Efecto prebiótico de fructanos	25
2.1.2 Importancia de los prebióticos en alimentos	25
2.2 Probióticos	26
2.2.1 Rol de los probióticos ( <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> )	27

3.0 Justificación	28
4.0 Materiales y Métodos	29
5.0 Resultados y discusiones	31
6.0 Conclusiones	38
7.0 Literatura citada	39
Fructanos de maguey: efecto sobre el metabolismo	43
Resumen	44
1.0 Introducción	45
2.0 Antecedentes	47
2.1 Obesidad	47
2.1.1 factores etiológicos	48
2.2 Diabetes	49
2.2.1 factores etiológicos	50
2.3 Metabolismo de los lípidos	51
2.4 Metabolismo de los carbohidratos (Gluconeogénesis)	52
2.5 Composición de la microflora intestinal	53
2.5.1 Fermentación de fructanos	55
2.5.1.1 Rol del ácido propiónico	56
2.5.1.2 Rol del ácido butírico	57
2.5.1.3 Rol del ácido acético	57
3.0 Justificación	58
4.0 Materiales y Métodos	59
5.0 Resultados y discusión	68
6.0 Conclusiones	87
7.0 Literatura citada	88



## INDICE DE FIGURAS

### **Fructanos de maguey: efecto prebiótico**

Figura 1. Usos relevantes del maguey: a) aguamiel, b) gusanos, c) mezcal, d) dulce, quiote para golosina, e) construcción, tejas, f) pulque, g) ornato, h) confección de telas y ayates	4
Figura 2. Diagrama de extracción industrial de fructanos	11
Figura 3. Biosíntesis de fructanos en las vacuolas	13
Figura 4. Estructuras de los fructanos	15
Figura 5. Descenso de pH por los microorganismos de <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>B. lactis</i>	35
Figura 6. Incremento de la Densidad Óptica 600 nm por los microorganismos de <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>B. lactis</i>	36
Figura 7. Incremento de la biomasa en peso seco realizada por los microorganismos de <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>B. lactis</i>	37

### **Fructanos de maguey: efecto sobre el metabolismo**

Figura 1. Síntesis de ácidos grasos	52
Figura 2. Producción de ácidos grasos de cadena corta con distintas fuentes de carbono	56
Figura 3. Inoculación de los medios a) RCM, b) EMB, c) MRS+verde, d) RCM+azul	65
Figura 4. Fotografía del corte histológico de hígado	67
Figura 5. Ensayo de elección de la dosis con respecto a la variación del peso corporal	68
Figura 6. Variación del peso corporal en los tratamientos obesos (Sanos y diabéticos)	71
Figura 7. Variación del peso corporal en los tratamientos no obesos (Sanos y diabéticos)	71

Figura 8. Efecto de los fructanos de <i>C. intybus</i> , <i>H. tuberosus</i> y <i>A. tequilana</i> , sobre la concentración de glucosa sérica en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos	78
Figura 9. Efecto de los fructanos de <i>C. intybus</i> , <i>H. tuberosus</i> y <i>A. tequilana</i> , sobre la concentración de colesterol sérico en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos	79
Figura 10. Efecto de los fructanos de <i>C. intybus</i> , <i>H. tuberosus</i> y <i>A. tequilana</i> , sobre la concentración de triglicéridos sérico en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos	80
Figura 11. Efecto de los fructanos de <i>C. intybus</i> , <i>H. tuberosus</i> y <i>A. tequilana</i> , sobre la concentración de lipoproteínas de alta densidad HDL sérico en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos	81
Figura 12. Efecto de los fructanos de <i>C. intybus</i> , <i>H. tuberosus</i> y <i>A. tequilana</i> , sobre la concentración de lipoproteínas de baja densidad LDL sérico en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos	82
Figura 13. Presencia y abundancia de bacterias en muestras de copros tomados al inicio y al final del experimento, expresados en log <sub>10</sub> UFC/g	85

## INDICE DE CUADROS

### **Fructanos de maguey: efecto prebiótico**

Cuadro 1. Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales	9
Cuadro 2. Contenido de inulina en diferentes especies de maguey.	9
Cuadro 3. Propiedades funcionales de la inulina	26
Cuadro 4. Cuadrados medios y resultados de la prueba de F del descenso de pH, DO600 nm y biomasa de caldo de fermentación MRS sin glucosa suplementado con fructanos de <i>C. intybus</i> , <i>A. tequilana</i> y <i>H. tuberosus</i> .	31

### **Fructanos de maguey: efecto sobre el metabolismo**

Cuadro 1. Tratamientos distribuidos según la condición corporal y el estado de salud.	60
Cuadro 2. Cuadrados medio y resultados de la prueba de F de la ganancia de peso para los tratamientos obesos (Sanos y diabéticos) y no obesos (Sanos y diabéticos).	70
Cuadro 3. Cuadrados medios y resultados de la prueba de F para la concentración (mg/mL) de compuestos en sangre de ratas obesas sanas y diabéticas) y ratas no obesas (sanas y diabéticas) suplementados con fructanos de <i>C. intybus</i> , <i>H. tuberosus</i> y <i>A. tequilana</i> .	72
Cuadro 4. Resultados de esteatosis hepática en ratas obesas, obesas diabéticas, no obesas y no obesas diabéticas.	86

## 1.0 Introducción general

El maguey es originario del continente americano, está considerado como una de las especies vegetales más importantes de zonas áridas y semiáridas debido a la variedad de usos que se le atribuyen, en un principio, cuando los recolectores del altiplano observaron que por encima de la vegetación sobresalía el qurote durante la floración y que esas magueyeras eran visitadas por animales consumidores de néctar, Mylie K. Walton (1977, en Aguirre *et al.*, 2001) supone que estos grupos de gente comenzaron a cortarlos y a consumirlos. Aguirre *et al.* (2001) intuyen que los primeros pobladores cortaban el qurote, lo pelaban y lo comían crudo “chupado” porque el jugo no contenía saponinas. Posteriormente, observaron que si era asado, resultaba más dulce y nutritivo. Después se fueron descubriendo más formas de aprovechamiento, así que, desde antes de la llegada de los españoles ya se tenía un amplio conocimiento de sus usos.

El maguey para enfrentar la escasez del agua produce carbohidratos de reserva conocidos como fructanos, que son sintetizados principalmente cuando la planta sufre estrés por frío. La síntesis se lleva a cabo cuando existe un exceso de sacarosa en las vacuolas, en la que interviene la enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa. Su estructura química consiste en unidades de fructosa unidas a por enlaces  $\beta(2\rightarrow1)$  y/o  $\beta(2\rightarrow6)$ , generalmente presentan en su estructura una fracción de glucosa interna o terminal. Se clasifican dependiendo de las unidades estructurales que conforman la molécula en: inulina, levanos, graminanos, inulina neoserie, levano neoserie y agavinas, esta última sintetizada por especies del género *Agave* (Mancilla-Margalli y López, 2006).

Los fructanos usados en la industria alimentaria son extraídos de las raíces tuberizadas de *Helianthus tuberosus*, *Cichorium intybus*, *Allium cepa*, entre otras. Se extraen por difusión en agua caliente, refinación, purificación, evaporación y secado por aspersion (Madrigal y Sangronis, 2007). Los fructanos estimulan el crecimiento selectivo de Bifidobacterias y Lactobacilos en el colon, por lo cual se consideran ingredientes alimenticios no digeribles que benefician a un hospedero (Gibson *et al.*, 2004). Por consiguiente, se han buscado estrategias para promover

el crecimiento de estas bacterias, ya que como ingrediente de alimentos cumplen funciones como espesantes, sustitutos de azúcares, sustituto de grasas, emulsificantes etc., que al mezclarlos con alimentos mejoran la palatabilidad y cuerpo de los productos (Frank, 2002).

Los productos que contienen fructanos al ser consumidos, son fermentados en el tracto gastrointestinal por la flora bacteriana benéfica, que generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el colon, siendo los principales acetato, butirato, lactato y gases como producto del metabolismo anaerobio, los AGCC han demostrado tener efecto en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, elevar la concentración de glucagon similar al péptido-1 (GLP-1), estimular la saciedad, mejorar el perfil lipídico en sangre, incrementar la concentración de insulina, así como, la neogénesis de células  $\beta$  en el páncreas (Delzenne, 2005). Por lo cual, el objetivo general de esta investigación fue, comparar el efecto de fructanos obtenidos de *Agave angustifolia* var *tequilana*, *C.intybus* y *Helianthus tuberosus* sobre cultivos *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium animalis lactis*. Además, evaluar el efecto sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

## **1.1 Maguey**

Algunos botánicos y arqueólogos coinciden en afirmar que el centro de origen y dispersión del género *Agave* (Agavácea) es Mesoamérica (Batanero, *et al.*, 1988), ya que existen en esta región en estado silvestre, de formas menos evolucionadas (primitivos) y ahí se encuentra el mayor número de variedades. En general, los magueyes presentan rizomas subterráneos, tallos cortos o grandes, casi siempre arborescentes; hojas generalmente angostas, gruesas y carnosas, surgiendo del tallo y terminan en una espina fuerte y oscura. Sus inflorescencias son paniculadas, con flores hermafroditas y sus frutos son cápsulas o bayas que contienen numerosas semillas comprimidas, se consideran rosetas perennes monocárpicas (Batanero, *et al.*, 1988). Se distribuyen desde la parte Suroeste de los Estados Unidos (40° latitud norte) hasta Venezuela (6° de la misma latitud), siendo su mayor diversidad y riqueza en el territorio mexicano. Este género comprende alrededor de 200 especies de las cuales el 75% se distribuye en México. Los magueyes son abundantes en matorrales xerófilos, chaparrales, bosques estacionalmente secos de *Pinus-Quercus* y bosques tropicales deciduos, pero hay especies en casi cualquier bioma (García-Mendoza, 2002).

### **1.1.1 Importancia del maguey**

El maguey es una de las plantas más importantes en México desde los puntos de vista cultural y de aprovechamiento. Existen registros arqueológicos que documentan su uso como fuente de alimento y fibra desde hace 10,000 años. Hernán Cortés, en la segunda de sus cartas al emperador Carlos V, relatando lo que vio en el mercado de Tlatelolco, dice: “Venden miel de abeja y cera y miel de cañas de maíz, que son tan melosas y dulces como las de azúcar; y miel de unas plantas que llaman en las otras y éstas, maguey, que es mucho mejor que arrope; y de estas hacen azúcar y vino, que asimismo venden.” (Segura, 1901)

La importancia que los pueblos indígenas le otorgaban al maguey antes de la conquista, se debía a los diferentes productos y sus aplicaciones, como en el caso del aguamiel que además de tener aportes nutricionales, posee propiedades

medicinales en la regulación del nivel de glucosa en la sangre. El pulque o vino nacional (en náhuatl; *octli*), al igual que al aguamiel, se le atribuyen propiedades terapéuticas como excelente diurético y eficaz contra ciertas enfermedades intestinales. Las hojas se usaban para fabricar papel, así como un tejido impenetrable para la confección de vestidos ordinarios y ayates. De sus fibras rígidas se saca un hilo con el que se hacen sogas muy tupidas. La planta en su totalidad se sigue usando como valla o cerco vivo en los campos, con el tronco o escapo floral para reforzar las vigas de los techos de las casas y con las hojas cubren el techo de las mismas como tejas. Las espinas de la punta de la penca eran usadas como agujas y alfileres (Goncalves, 1978). Hoy en día, los magueyes siguen siendo un recurso importante en muchas áreas rurales de México como material de construcción, combustible, medicina tradicional, fibras, ornato, forraje, alimento (gusano blanco y rojo, jarabe) y bebidas fermentadas como el pulque y destiladas como los mezcales, incluyendo el tequila (Figura 1) (García-Mendoza 1998). Varias especies de este género son la base de la importante industria nacional del tequila, tanto para el consumo interno como para exportación.



Figura 1. Usos relevantes del maguey: a) aguamiel, b) gusanos, c) mezcal, d) dulce, quiote para golosina, e) construcción, tejas, f) pulque, g) ornato, h) confección de telas y ayates (García-Mendoza, 1998)

Por último, los plantíos de maguey, sirven para formar terrazas en las laderas de los montes y así protegerlos de la erosión y la desertización (Batanero *et al.*, 1988).

### 1.1.2 Metabolismo Ácido de las Crasuláceas

A medida que nos desplazamos hacia regiones más secas, podemos observar que las plantas poseen adaptaciones para enfrentar la escasez de agua. Las plantas de las zonas áridas o semiáridas, almacenan la mayor parte de sus productos resultantes de la fotosíntesis en las raíces, por lo que requieren de un sistema radicular extenso, tanto para alcanzar agua como para absorber la máxima cantidad del vital líquido cuando llueve. El ángulo de inclinación de las hojas respecto al sol influye en la absorción de calor por parte de la planta, cuando el agua es escasa, las especies vegetales orientan la superficie de sus hojas en forma paralela a los rayos del sol. Con esta disposición, la temperatura foliar y la tasa de transpiración se reducen. La manera de subsistir de plantas del desierto a elementos del clima extremo, es usando la vía de la fotosíntesis Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (MAC) o CAM (por sus siglas en inglés *Crassulacean Acid Metabolism*), en la cual, la captación de energía luminosa y la transformación de bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en azúcares simples se producen en las células mesófilas. El ciclo se divide en dos fases: nocturna y diurna. Durante la nocturna, los estomas se abren para llevar a cabo el intercambio gaseoso de  $\text{CO}_2$ , oxígeno ( $\text{O}_2$ ) y vapor de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), el  $\text{CO}_2$  del ambiente es difundido hacia el interior de las células mesófilas, donde con ayuda de la enzima carboxilasa del fosfoenolpiruvato (PEP) el piruvato se carboxila y se transforma en el ácido de cuatro carbonos oxalacetato, para posteriormente reducirse a otro ácido de cuatro carbonos; malato (Lehninger, 1982). En la fase diurna los estomas se cierran, el malato es transportado a la célula de empalizada donde es descarboxilado por la malato-deshidrogenasa  $\text{NADP}^+$  y forma  $\text{NADPH}$ , piruvato y  $\text{CO}_2$ , este último, por medio de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP o rubisco) y con ayuda de un intermediario enediol se carboxilan y se hidratan para después fragmentarse y tener como resultado dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PG) donde cada molécula se fosforila por el adenosin trifosfato (ATP) mediante una reacción catalizada por la fosfoglicerato quinasa, produciendo así 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-DPG) el cual se reduce a la triosa gliceraldehido-3-fosfato (G3P). Así, una molécula de G3P puede isomerizarse a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a través



de la triosa fosfato isomerasa, una vez formada puede combinarse con G3P mediante la acción de la enzima fructosa bisfosfato aldosa, para formar fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) el cual se desfosforila originando fructosa-6-fosfato (F6P) este se isomeriza en glucosa-6-fosfato (G6P) para dar como resultado final glucosa-1-fosfato (G1P) que es el precursor de la formación de oligosacáridos y polisacáridos (Lehninger, 1982; Smith y Smith, 2001; Mathews *et al.*, 2002).

## 1.2 Carbohidratos

Los carbohidratos desempeñan una gran variedad de funciones en los organismos vivos, son el principal combustible en algunos tejidos y órganos animales como el cerebro, en la plantas forma parte estructural de hojas, tallos, raíces, flores y semillas, en éstas últimas también se almacenan como sustancias de reserva para la reproducción de nuevos individuos. De hecho, el principal ciclo energético de la biosfera depende en gran parte del metabolismo de los carbohidratos (Smith y Smith 2001; Mathews *et al.*, 2002).

Los carbohidratos reciben este nombre porque se representan con la fórmula estequiométrica  $(CH_2O)_n$ , esta denominación se les asignó porque se consideraban “carbonos hidratados”. Sin embargo, esta fórmula es demasiado simple, ya que muchos carbohidratos están modificados y algunos contienen grupos amino, sulfato o fosfato. Los más sencillos son moléculas monoméricas pequeñas denominados **monosacáridos**, que comprenden los azúcares simples que contienen de tres a ocho átomos de carbono como la glucosa, fructosa, entre otros. Cuando se unen de dos hasta 10 monosacáridos, se denominan **oligosacáridos** como la lactosa, sacarosa, maltosa y oligofructosacáridos. Los polímeros más grandes que contienen cadenas lineales o ramificaciones de monosacáridos se denominan **polisacáridos**, se almacenan en las plantas en forma de almidón, celulosa o fructanos (Mathews *et al.*, 2002).

### 1.2.1 Polisacáridos

La mayoría de los glúcidos encontrados en los seres vivos, se encuentran como polisacáridos de elevado peso molecular. Formados por unidades de monosacáridos de D-glucosa en la mayoría de los casos, pero también existen polisacáridos constituidos de D-manosa, D-fructosa, D- y L-galactosa, D-xilosa y D-arabinosa. Difieren los unos de los otros en la naturaleza de sus unidades de monosacáridos repetidas, en la longitud de la cadena y en el grado de ramificación (Lehninger, 1982).

Sus funciones principales en los organismos vivos son como fuente energética en plantas (almidón y fructanos) y en animales (glucógeno); además de constituir las paredes celulares vegetales (celulosa y hemicelulosa), en bacterias, insectos y animales (quitina) (Mathews *et al.*, 2002).

### 1.2.2 Carbohidratos de reserva

Los principales son la **amilosa** y la **amilopectina**, juntos constituyen el almidón en las plantas y el **glucógeno** en células animales. El almidón se encuentra en casi todos los tipos de células vegetales, y de manera abundante en semillas de cereales, los tubérculos y las frutas no maduras. El glucógeno se deposita en el hígado, que actúa como órgano central de almacenamiento de energía de los animales. También se encuentra en el tejido muscular, en el que está disponible de manera inmediata para la generación de energía.

La amilosa, la amilopectina y el glucógeno son polímeros de  $\alpha$ -D-glucopiranososa. Son homopolisacáridos de la clase denominada **glucanos**, polímeros de glucosa. Solo se diferencian por la posición de los enlaces entre los residuos de glucosa y el grado de polimerización. La amilosa es un polímero lineal que tiene enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  entre los residuos de glucosa adyacentes. La amilopectina y el glucógeno son ambos polímeros ramificados, puesto que contienen además de los enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  algunos enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$ . En el glucógeno, las ramificaciones son más frecuentes y más cortas que las que se

encuentran en la amilopectina, pero ambos son muy semejantes (Mathews *et al.*, 2002).

Además de estos, se encuentran los mananos, homopolisacáridos constituidos por monómeros de manosa encontrados en bacterias, mohos, levaduras y plantas superiores, los xilanos y los arabinanos también son homopolisacáridos presentes en los tejidos vegetales (Lehninger, 1982).

Otro tipo de carbohidratos de reserva son los fructanos constituidos por unidades de fructosa y una glucosa terminal o intermedia, pueden ser lineales o ramificados, con diferente grado de polimerización (GP) de por lo menos 3 monómeros (Fleming *et al.*, 1979).

#### **1.2.2.1 Fructanos**

Son fibras dietéticas, formadas por unidades fructosil unidos a través de enlaces  $\beta(2\rightarrow1)$  y/o  $\beta(2\rightarrow6)$ , generalmente presentan en su estructura una fracción de glucosa interna o terminal unida a una fructosa (Suzuki and Chatterton, 1996; Delaquis y Mazza, 1998). Su estructura puede ser lineal o ramificada según la complejidad (Wang *et al.*, 1999). Se almacenan en grandes cantidades como sustancias de reserva en las raíces tuberizadas de algunas plantas fanerógamas y en menor cantidad en hojas, tallos y semillas (Chatterton *et al.*, 1993), preferiblemente en las vacuolas, donde es posible que posean otras funciones para la planta cuando se encuentra en estado de estrés causado por frío y sequías (Utah State University, 2003).

En promedio, 36 000 especies vegetales contienen como carbohidratos de reserva diversos tipos de fructanos, en algunas plantas el contenido puede llegar a constituir hasta un 24% de la masa cruda (Utah State University, 2003). Las principales familias vegetales que sintetizan fructanos como carbohidratos de reserva son la Liliaceae, Amaryllidaceae, Graminae, Poaceae, Solanaceae, Asteraceae y Agavaceae (Cuadro 1) (Marquina y Santos, 2003; Kaur & Gupta, 2002; Van Loo *et al.*, 1995).

Cuadro 1. Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales

Fuente	Parte vegetal	Contenido sólidos base seca %	Contenido de inulina %
Cebolla	Bulbo	6 – 12	2 – 6
Achicoria de Jerusalén	Tubérculo	19 – 25	14 – 19
Achicoria	Raíz	20 – 25	15 – 20
Puerro	Bulbo	15 – 20*	3 – 10
Ajo	Bulbo	40 – 45*	9 – 16
Alcachofa	Corazón de las hojas	14 – 16	3 – 10
Plátano	Fruta	24 – 26	0.3 – 0.7
Centeno	Cereal	88 – 90	0.5 – 1*
Cebada	Cereal	ND	0.5 – 1.5
Diente de león	Hojas	50 – 55*	12 – 15*
Bardana	Raíz	21 – 25	3.5 – 4
Camas	Bulbo	31 – 50	12 – 22
Murnong	Raíz	25 – 28	8 – 13
Yacon	Raíz	13 – 31	3 – 19
Barba de cabra	Raíz	4 – 11	4 – 11

(Van Loo *et al.*, 1995)

La primera referencia de la presencia de fructanos en maguey fue hecha por Sánchez Marroquín y Hope (1953), en la que realizaron un análisis de jugos de maguey provenientes de secciones de tallos de algunas especies. Aunque los autores solo refieren los nombres comunes, detectaron la presencia de fructanos a los cuales llamaron inulina, ya que no se contaba con una descripción estructural de los tipos de fructanos que actualmente se conocen (Cuadro 2).

Cuadro 2. Contenido de inulina en diferentes especies de maguey, Resultados expresados en porcentaje

### Composición del tallo de *Agave* spp.

Nombre común	H <sub>2</sub> O	Fibra cruda	Inulina	Total azúcares reductores	Nitrógeno proteico	Cenizas	pH
Carpintero	70	11	15.4	1.03	0.021	3.9	5.5
Pata de mula	63	12	19.8	1.00	0.019	2.9	5.0
Bermejo	65	12.5	18.1	1.06	0.022	2.5	5.0
Azul	62	11.8	20.1	1.03	0.024	2.5	5.5
Zopilochino	70	12	14.3	1.03	0.023	2.7	4.5
Shuin	65	12.5	17.5	1.09	0.021	2.5	4.5
Chato	68	12.5	15.6	1.23	0.020	2.4	5.0
Azul 2	60	11	24.1	1.50	0.020	2.7	4.5

(Sánchez Marroquín, 1953) traducido del inglés.

Las principales fuentes comerciales de estas fibras dietéticas son la achicoria (*Cichorium intybus*) y alcachofa de jerusalem (*Helianthus tuberosus*), ambas utilizadas en nivel industrial (De Bruyn *et al.*, 1992). Mancilla-Margalli y López (2006), demostraron la presencia de fructanos en especies de los géneros *Agave* y *Dasyilirion* (15 – 22%), y en plátano (*Musa* sp) que (0.3 – 0.7%).

Otras fuentes productoras de fructanos aunque menos importantes para la industria alimentaria son las de origen microbiano, como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, y *Actinomyces* (Hendry y Wallace, 1993). Se cree que producen polisacáridos extracelulares que por lo general, son levanos con pesos moleculares que oscilan entre  $10^7$  y  $5 \times 10^7$  Daltones (Da) y con GP mayores en dos o tres grados de magnitud en comparación con los fructanos de origen vegetal (Fuchs, 1987; Cairns, 2002). Por otra parte, fructanos de origen fúngico presentan bajos GP que van de dos a cuatro unidades de monómeros, los principales microorganismos responsables de la síntesis de fructanos son: *Aureobasidium* sp, *Candida* sp, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Aspergillus niger* y ciertos bacilos que contengan la enzima levanosucrasa y  $\beta$ -fructofuranosidasa (Utah State University, 2003).

#### **1.2.2.2.1 Extracción de fructanos**

La producción industrial de fructanos como la inulina y sus derivados se obtiene exclusivamente de la raíz de la achicoria y patata (Franck, 2006). En la Figura 2, se muestra un esquema de su producción y de algunos de sus derivados. Alternativamente, la oligofructosa se puede sintetizar a partir de la sacarosa, la cual es sometida a transfructosilación por acción de la enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa (Niness, 1991). Existen productos comerciales que son mezclas entre inulina y oligofructosa, por ejemplo, Synergy 1® es una combinación de oligofructosa e inulina en una proporción de 30:70 en peso, que le confiere características funcionales específicas (Roberfroid, 2005).

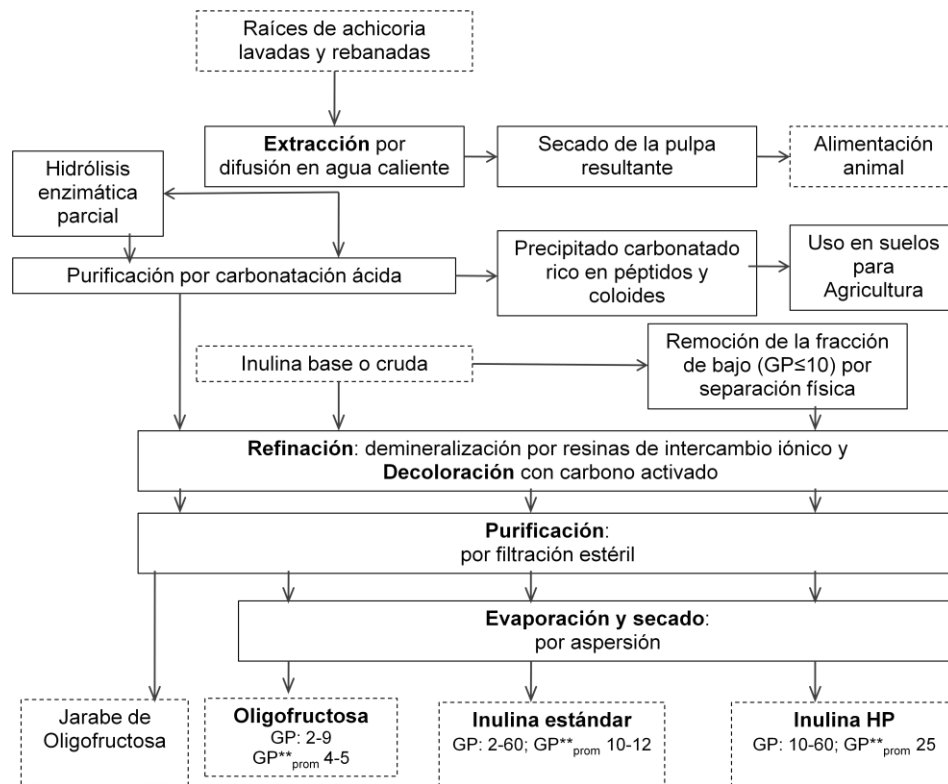


Figura 2. Diagrama de extracción industrial de fructanos (Madriral y Sangronis, 2007)

También se han realizado estudios a menor escala para la extracción de fructanos (Fructooligosacaridos GP = 3.0 – 4.0) a partir de jugos de *Agave atrovirens* Karw (Martínez y Morales, 2007), los jugos se clarifican antes de la deshidratación adicionándoles 0.7 g/L de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , esta sal alcalina tiene dos funciones importantes: 1) formar complejos con las sustancias albuminoideas y gomosas para removerlas por decantación y 2) elevar el pH a 7 para evitar la hidrólisis de los fructanos y evitar reacciones de oscurecimiento después del proceso de deshidratación. El secado se realiza por aspersion (SPAGA9601) con velocidad de flujo de 1.2 L/h y flujo volumétrico del aire de 0.02 m<sup>3</sup>/s, las condiciones ambientales del secado donde se obtiene la mayor concentración de fructanos es 80° C, ya que se reduce la actividad enzimática de inulina, debido a la desnaturalización de la proteína de la cual está formada la enzima, el pH de la solución se mantiene por arriba de 5 para evitar la hidrólisis de los fructanos.

### 1.2.2.3 Biosíntesis

La biosíntesis se rige por mecanismos muy particulares y complejos según sea la fuente: vegetal, microbiana o fúngica, en este caso, analizaremos la síntesis vegetal (Utah State University, 2003). Como ya se mencionó anteriormente, cuando ocurre el proceso de fotosíntesis se producen algunos azúcares como la sacarosa. Considerada como precursora de la síntesis de fructanos, este disacárido se almacena en las vacuolas hasta que las concentraciones han cubierto los requerimientos de la planta, cuando quedan excedentes de sacarosa, intervienen algunas enzimas denominadas  $\beta$ -D-fructofuranosidasas o fructosiltransferasas que transfieren la fructosa de la sacarosa a la elongación de las cadenas poliméricas de fructanos (Longland, 2003; Yun, 2003; Vergauwem *et al.*, 2003). La síntesis de fructanos está regulada por la luz y por la cantidad de almidón en la célula (Figura 3). Por otro lado, algunas plantas como la achicoria (*C. intubus*) y la alcachofa (*Cynara scolymus*) contienen diversas enzimas complejas, necesarias para la síntesis de fructanos. Su actividad depende de la concentración del sustrato y de las enzimas: 1-fructosiltransferasa (1-SST),  $\beta$ -fructan-1-fructosiltransferasa (1-FFT), 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT) y 6-fructosiltransferasa (6-SFT) (Vijn y Smeekens, 1999). En un principio, la 1-SST hidroliza la sacarosa en glucosa y con la fructosa forma un oligofructósido, al cual lo polimeriza hasta el tercer monómero denominado trisacárido 1-cestosa, inmediatamente después interviene la 1-FFT tomando de las demás moléculas de sacarosa un residuo fructosil y lo transfiere al trisacárido para formar polímeros de mayor peso molecular, y va liberando las moléculas de glucosa. Vijn y Smeekens (1999), describieron que a partir de 1-cestosa y sacarosa, la enzima 6G-FFT puede producir neocestosa y la enzima 6-SFT puede producir bifurcosa, productos que pueden ser polimerizados por la 1-FFT de la manera antes mencionada para generar fructanos de estructura ramificada. Por último, si el único sustrato disponible es la sacarosa la enzima 6-SFT puede generar levanos a partir de ella.

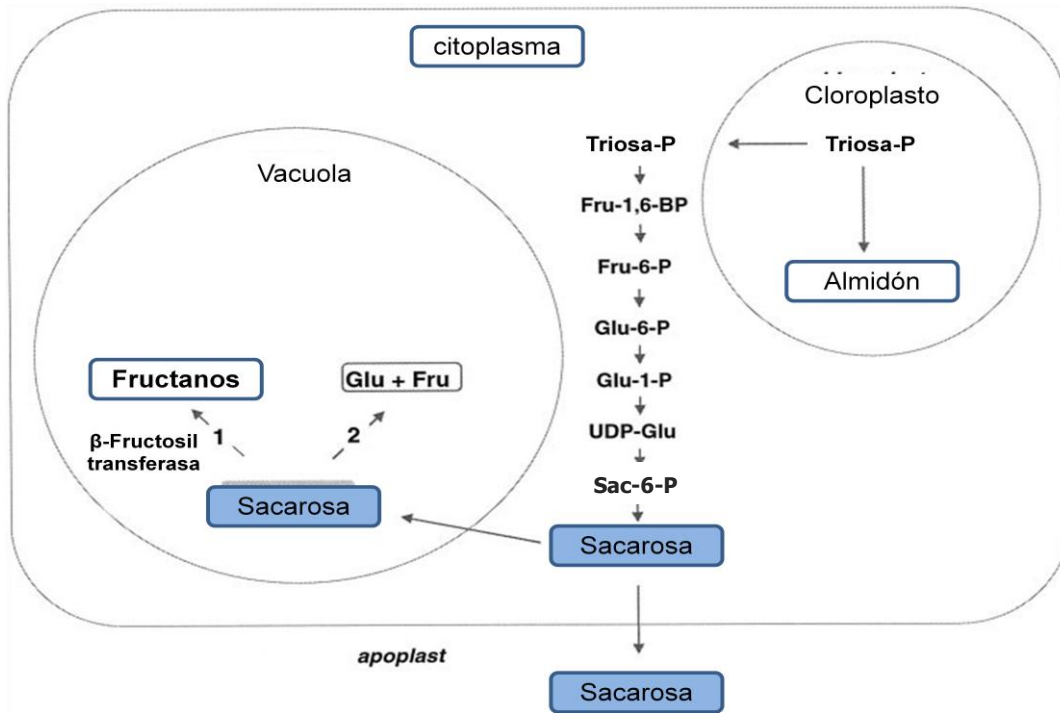


Figura 3. Biosíntesis de fructanos en las vacuolas (Vign y Smeekens, 1999) traducido del inglés

#### 1.2.2.4 Clasificación

Depende en gran medida de los enlaces fructofuranosil y de la longitud de la cadena, el cual varía desde tres hasta 70 unidades de fructosa y de la posición de la glucosa (Ritsema y Smeekens, 2003). En bacterias la estructura puede ser de hasta de  $10^6$  unidades de fructosa (Schulbach y Sinh, 1941). Se han identificado seis tipos diferentes de fructanos de acuerdo a las unidades estructurales que conforman su molécula (Figura 4).

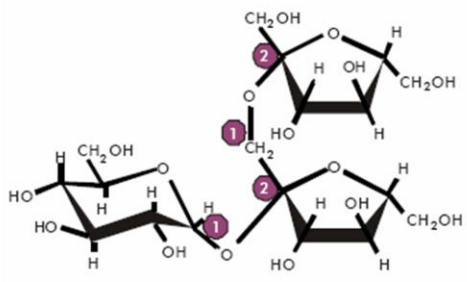
A) Inulina: son oligo/polímeros de D-fructosa unidas por enlaces  $\beta(2 \rightarrow 1)$  con una de D-glucosa en la terminal. Cuando su GP es entre 3 y 10 son referidas como oligofructosa y aquellas que presentan un grado de polimerización entre 10 y 65 son inulina. Se encuentran presentes en plantas de la familia Asteráceas como por ejemplo en *C. intybus* (Kolda & Gibson, 2007). Franck y De Leenheer (2004) describen la inulina como una mezcla de oligómeros y polímeros, su GP puede contener hasta 70 unidades de fructosa más una



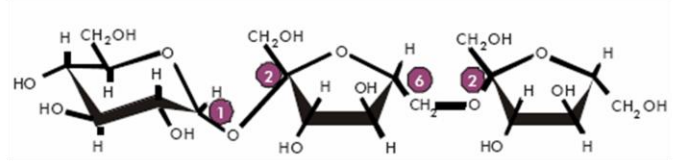
glucosa terminal. Los fructanos son carbohidratos de reserva energética presente en más de 36,000 especies de plantas vasculares (Flickinger *et al.*, 2003). La inulina fue aislada por primera vez en 1804, a partir de *Inula helenium*, por un científico alemán de apellido Rose. En 1818, Thomson, científico británico, le dio el nombre actual (Franck, 2006). La inulina extraída de plantas por lo general contiene hasta un 10% de mono y disacáridos (principalmente fructosa y sacarosa) además de una serie de oligosacáridos en donde se incluyen los FOS los cuales constituyen hasta un 30% del total (Niness, 1999).

- B) Levanos: son producidos por monocotiledóneas, su estructura es lineal, presentan uniones de glucosa y fructosa  $\beta(2\rightarrow6)$  o incluso  $\beta(2\rightarrow1)$ , el término levano se le otorgó debido a la rotación "levo". Estos fructanos generalmente son de cadenas relativamente cortas. Se encuentran en algunos pastos como *Dactylis glomerata* (Suzuki and Chatterton, 1996).
- C) Graminanos: presentan enlaces tanto  $\beta(2\rightarrow1)$  como  $\beta(2\rightarrow6)$  fructofuranosil y una molécula de glucosa terminal, sintetizados por algunas gramíneas como *Hordeum vulgare* y *Triticum aestivum*.
- D) Inulina neoserie: son cadenas lineales de fructosa unidas mediante enlaces  $\beta(2\rightarrow1)$  en los carbonos 1 y 6 de la glucosa de una molécula de sacarosa; encontradas principalmente *Allium cepa* (Aliáceas) y *Asparagus officinalis* (Liliaceae) (Suzuki y Chatterton, 1996; Mancilla-Margali y López, 2006).
- E) Tipo levano neoserie: son polímeros con enlaces tipo  $\beta(2\rightarrow6)$  unidos a una glucosa de una molécula sacarosa, aislados de *Avena sativa*.
- F) Agavinas: presentan enlaces tanto  $\beta(2\rightarrow1)$  como  $\beta(2\rightarrow6)$  fructofuranosil y una molécula de glucosa interna, sintetizados por varias especies de *Agave* (Vijn y Smeekens, 1999; Van Laere y Van den Ende, 2002; López *et al.*, 2003).

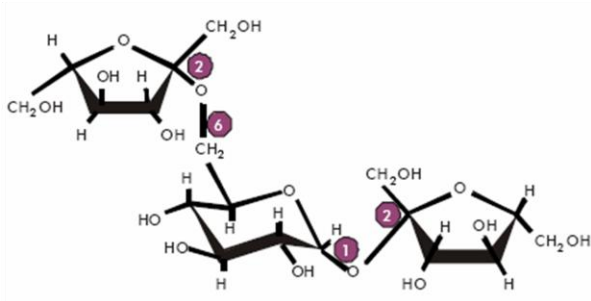
a) Fructano tipo inulina



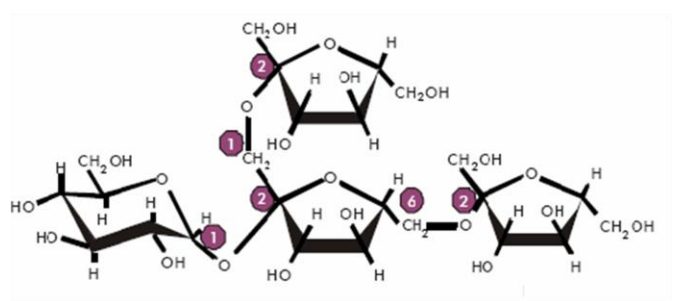
b) Fructano tipo neoserie



c) Fructano tipo levano



d) Fructano tipo graminano



e) Fructano tipo agavina

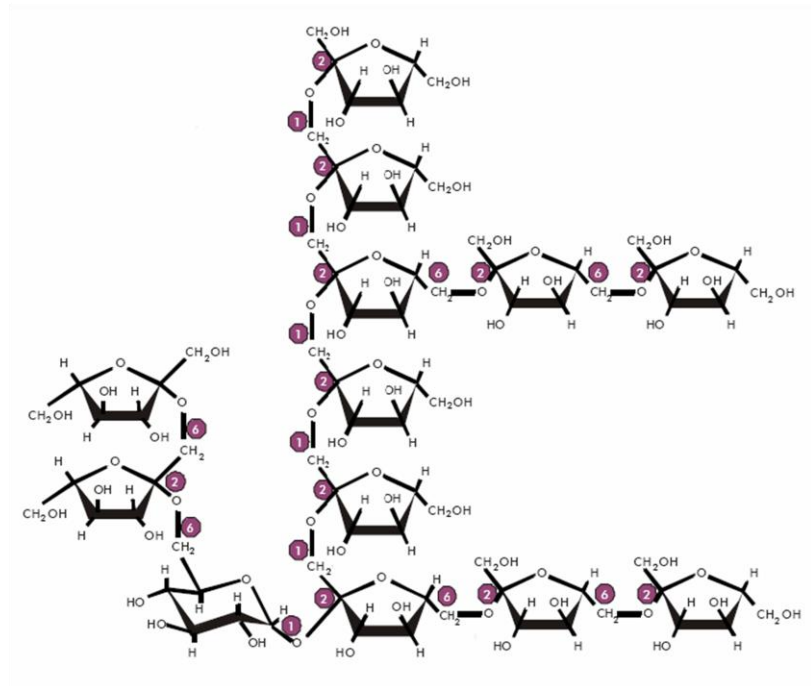


Figura 4. Estructuras de los fructanos (Mancilla-Margali y López, 2006).

## 2.0 Literatura citada

- Aguirre R., J. R., Charcas, H. y Flores, J. L. 2001. El maguey mezcalero potosino; Universidad Autónoma de San Luís Potosí y Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología: San Luís Potosí S. L. P., México. 22 p.
- Batanero, L., B. Suárez, J. Zavaleta, L. Díaz, C. García, M. Ortiz, P. Marrero y M. Arellano. 1988. El maguey, "árbol de las maravillas". Gob. del Edo de Hidalgo. Culturas Populares. SEP.
- Caims, A. 2002. Fructan biosynthesis in transgenic plants. *Journal of experimental botany* 54 (382): 549-567.
- Chatterton N. J., Harrison P. A. and Thornley W. R. 1993. Structure of fructan oligomers in cheatgrass (*Bromus tectorum* L). *New Phytol* 124, 389-396
- De Bruyn A., Álvarez A. P., Patrick S. and Deleenheer L. 1992. Isolation and identification of o-beta-d-fructofuranosyl-(2-]1)-o-beta-d-fructofuranosyl-(2-]1)-d-fructose, a product of the enzymatic-hydrolysis of the inulin from *Cichorium-intybus*. *Journal carbohydrate research*. Vol. 235: 303-308
- Delaquis, P. and Mazza, G. 1998. Functional Vegetable Products. *In: Mazza, G. ed. Functional Foods: biochemical and processing aspects*. Technomic Publishing Co. Pennsylvania, EE.UU. 460.
- Delzenne N. M., Cani P. D., Daubioul C. and Neyrinck M. 2005. Impact of inulin and oligofructos and gastrointestinal peptides. *British Journal of Nutr.* 93, 1:S157-S161
- Fleming S. E. and GrootWassink J. W. D. 1979. Preparation of high fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke (*Heliantus tuberosus* L.). *CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 12: 1-28
- Flickinger E., Van Loo J. and Fahey G. 2003. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diet of domesticated animals: A review. *Crit. Rev Food Sci Nutr*; 43: 19-60.
- Franck A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British J Nutr*; 87: 287-291
- Franck A. and De Leenheer, L. 2004. Inulin. *In: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukayotes*, S. De Baets, E. Vandamme and A. Steinbüchel, Ed., Weinheim, Wiley-VHC.
- Franck A. 2006. Inulin. *En: Food Polysaccharides and Their Applications*. Stephen A. (Editor). Segunda Edición. Nueva York, USA: Marcel Dekker; 733 pp.
- Fuchs A. 1987. Potenciales for nonn food utilization of fructose and inulin. *Starke* 10:335-343

- García-Mendoza, A. 1998. Con sabor a maguey. Guía de la colección nacional de agavaceas y nolináceas del jardín botánico del Instituto de Biología de la UNAM. ISBN 968-7365-07-2. Edit. Sistemas de información geográfica. S. A. de C. V.-UNAM.
- García-Mendoza, A. 2002. Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico en cactus and succulent Journal (US) No. 74: 177-187.
- Gibson, G. R., Probert H., Van Loo J., Rastall R. and Roberfroid M. B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17:259-275.
- Goncalves de L. O. 1978. El maguey y el pulque en los códigos mexicanos 2a. edición. Fondo para la cultura económica, México. 14- 32.
- Hendry G. A. F. and Wallace R. K. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. *In* M Suzuki, NJ Chatterton, Eds, Science and Technology of Fructans. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 119–139
- Kaur, N., and Gupta, A. K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition *J. Biosci.*, 27: 703 p.
- Kolida, S., G. and Gibson R. 2007. Prebiotic capacity of inulin – type fructans<sup>1-3</sup>. Inulin and oligofructose: Health benefits and claims – a critical review. *J. of nutrition.* 137: 2503S-2505S.
- Lenhinger A.L. 1982. Principios de Bioquímica. Worth Publisher. New York.
- Longland, A. C. 2003. Laminitis (en línea). Consultado 13 de marzo de 2008. Disponible en: <http://membersaol.com/wdds1/horsetalk/dh-sci1lam.htm>.
- López M. G., Mancilla-Margalli N. A. y Mendoza-Díaz G. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J Agric Food Chem* 51, 7835-7840.
- Madrigal L. y Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* Venezuela. Vol 57 No. 4:387-396
- Mancilla-Margalli N.A. y López M.G. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *J Agric Food Chem* 54, 7832-7839.
- Marquina, D y Santos, A. 2003. Probióticos, prebióticos y salud. *Revista Actualidad* 32: 24-27.
- Martínez T. R. y Morales D. U. R. 2007. Estudio de la deshidratación del maguey (*Agave atrovirens* Karw) para la obtención de un producto seco con alto contenido de Fructooligosacáridos. Alfa editores técnicos. Bebidas mexicanas. 11-19

- Mathews C. K., Van Holde K. E. and Ahern K.G. 2002. Bioquímica. 3a. edición. Ed. Pearson Educación S.A. 1368 pp
- Niness K. 1991. Inulin and oligofructose: what are they?. *J Nutr*; 129: 1402-1406.
- Niness, K. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World* 44 (2): 79-81.
- Ritsema T. and Smeekens S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol* 6, 223-230.
- Roberfroid M. 2005. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. Boca Raton, USA: CRC Press. 370 pp.
- Sánchez-Marroquin A. and Hope P. H. 1953. Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species. *Agricultural and food chemistry*. Vol. 1, No. 3, 246-249
- Schlubach H.H. and Sinh O.K. 1941. Untersuchungen uber fructoseanhydride. XXIII. Uber des Phlein. Die Ringstruktur der polifruktosane *Ann. Chem.*, 544, 101
- Segura J. C. 1901. El maguey: Memoria sobre el cultivo y beneficio de sus productos. Imprenta particular de la S Agrícola Mexicana. 4ta Edición. México. 391 pp
- Smith R. L. and Smith T. M. 2001. Ecología. PEARSON Addison Wesley. 4a. edición. USA. p 27, 90.
- Suzuki, M. and Chatterton, N. J. 1996. Science and technology of fructans, CRC Press USA.
- Utah State University. 2003. Talks USA. Utha State University Disponible en: <http://usu.edu/~forage/frucabs.htm> consultado: 22 de enero 2008.
- Van den Ende, W., Michiels A., De Roover J., and Van Laere A. 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes Throughout Chicory Development. *The Scientific World Journal*. Vol. 2: 1281-1295
- Van Laere A and Van den Ende W. 2002. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant Cell Envirom* 25, 803-813.
- Van Loo J., Coussement P., De Lenheer L., Hoebregs H. and Smits G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35, 525-552.

- Vergauwem R., Laere A. and Ende W. 2003. Properties of fructan: fructan 1 fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant Physiology*. 133 (1): 391 – 401.
- Vijn I. and Smeekens S. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120, 351-360.
- Yun, J. W. 1996. Fructooligosaccharides– Occurrence, preparation and application. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 19, 107–117.

## **Fructanos de maguey: efecto prebiótico**

Juan Antonio Rendón-Huerta<sup>1</sup>, Bertha Irene Juárez-Flores<sup>2</sup>, Rosa Elena Delgado-Portales<sup>3</sup>, Miguel Ángel Ruiz-Cabrera<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Estudiante de maestría del Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales, UASLP.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación de Zonas Desérticas UASLP.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas UASLP.

## RESUMEN

Se evaluó el efecto prebiótico de los fructanos de *Cichorium intybus*, *Helianthus tuberosus* y *Agave angustifolia* var. *tequilana* en concentraciones de 0.0, 7.0, 14.0 ó 21.0 g/L (n = 5, tres réplicas) sobre el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium lactis* en medio MRS sin glucosa bajo condiciones de esterilidad. Los parámetros analizados fueron cambio del pH, aumento de la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) y biomasa. Una vez inoculados los caldos de fermentación, se incubaron a 35° C durante 48 h, posteriormente se retiraron las muestras de la incubadora y se realizaron las mediciones de los parámetros mencionados. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial. El microorganismo que presentó mayor crecimiento fue *L. casei* con las tres fuentes de carbono en la concentración de 21.0 gL<sup>-1</sup>, donde el mayor descenso de pH fue de 3.67, incremento de la  $DO_{600}$  de 0.963 y de biomasa de 0.0358 g. Por último, los tratamientos que mayor efecto tuvieron sobre el crecimiento de *B. lactis*, fueron los pertenecientes a *A. angustifolia* var. *tequilana* y *H. tuberosus*, con resultados de pH de 5.41 y 4.91 respectivamente,  $DO_{600}$  de 0.75 con fructanos de *A. tequilana* y biomasa de 0.0087 g con el tratamiento de *H. tuberosus*.



## 1.0 Introducción

La flora microbiana intestinal de los humanos es un ecosistema rico en microorganismos metabólicamente activos, que juegan un papel importante en la salud de su hospedero. De los cientos de especies de bacterias que colonizan el intestino, los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son considerados como benéficos para la salud. Por consiguiente, se ha hecho una búsqueda de diversas fuentes de carbono para promover su crecimiento en el intestino (Rycroft *et al.*, 2001; Blaut, 2002). Una estrategia, ha sido el empleo de sustratos selectivos como carbohidratos no digeribles en el tracto gastrointestinal, también conocidos como prebióticos o ingredientes alimenticios no digeribles que al ser fermentados, estimulan de manera benéfica al hospedero, promueven el crecimiento selectivo y/o actividad de un número limitado de bacterias en el colon (Gibson y Roberfroid, 1995). Dentro de la industria de los prebióticos, destacan los fructanos, azúcares no reductores que contienen en su estructura unidades de fructosa más una glucosa terminal o intermedia. Los más utilizados son los fructanos tipo inulina (inulina de bajo grado de polimerización GP,  $\leq 10$  y de alto GP  $\leq 70$ ), transgalactooligosacáridos (TGO), lactulosa, entre otros como xilooligosacáridos (XOS), galactooligosacáridos (GOS) e isomaltooligosacáridos (Van Loo *et al.*, 1999). Son ampliamente usados en la agroindustria por su aplicación como sustituto de grasas y carbohidratos (Delaquis y Mazza, 1998).

Es importante mencionar que las bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son los únicos que producen la enzima  $\beta$ -Fructofuranosidasa, responsable de la fermentación de fructanos generando ácidos grasos de cadena corta (SCFA por sus siglas en inglés, *Short Chains Fatty Acids*) como lactato, butirato, acetato, propionato y gases producto del metabolismo anaerobio (MacDonal *et al.*, 1978; Ehrmann *et al.* 2003). En estudios *in vitro*, se ha demostrado que los fructanos de *C. intybus* y *H. tuberosus* estimulan el crecimiento bacteriano y la producción de SCFA (Topping y Clifton, 2001). A mediados del siglo pasado Sánchez-Marroquín y Hope (1953) encontraron la presencia de polisacáridos denominados entonces como inulina en distintas

especies de maguey. Recientemente, Mancilla-Margalli y López, (2006) demostraron la presencia de fructanos en *A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. cantala*, *A. fourcroydes*. Así, el objetivo de este trabajo fue comparar el efecto prebiótico *in vitro* de fructanos obtenidos de *A. angustifolia* var. *tequilana*, *C. intybus* y *H. tuberosus* sobre cultivos de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium lactis*. Tomando como parámetros de referencia el cambio del pH, la densidad óptica a 600 nm y la biomasa.

## 2.0 Antecedentes

### 2.1 Prebióticos

Los prebióticos son considerados ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente a un hospedero y además estimulan el crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias presentes en el colon (Gibson *et al.*, 2004).

El concepto de prebiótico surgió porque se observó que inulina y fructooligosacáridos (FOS) estimulan el crecimiento selectivo de *Bifidobacterium*, que es considerado como benéfico para la salud humana (Gibson & Roberfroid, 1995; Gibson *et al.*, 1995; Kruse *et al.*, 1999).

Para que un ingrediente pueda ser considerado como prebiótico, debe cumplir con tres criterios propuestos por Gibson y Roberfroid (1995):

- 1) Ser capaz de resistir la acidez gástrica, la hidrólisis de las enzimas digestivas y la absorción gastrointestinal,
- 2) Ser fermentado por la flora intestinal especialmente por especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.
- 3) Estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales asociadas con la salud del hospedero.

Con base en lo criterios antes mencionados, existen tres tipos de carbohidratos considerados como prebióticos: los fructanos tipo inulina (inulina de bajo grado de polimerización,  $\leq 10$  y de alto grado de polimerización  $\leq 70$ ), transgalactooligosacáridos (TGO) y lactulosa (Gibson *et al.*, 2004).

Aunque los trabajos se han realizado principalmente con inulina y FOS, a otros oligosacáridos no digeribles (OND) también se les ha comprobado este efecto, incluyen a: xilooligosacáridos, galactooligosacáridos e isomaltooligosacáridos (Van Loo *et al.*, 1999).

### **2.1.1 Efecto prebiótico de fructanos**

Una vez que los fructanos atraviesan el tracto gastrointestinal de los mamíferos, son fermentados por la microflora colonica especialmente por las especies de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* estimulando el crecimiento de sus poblaciones, así mismo, se originan ácidos grasos de cadena corta (AGCC) productos de la fermentación, como propionato, acetato, butirato, además aumenta la absorción de minerales como el calcio (Coudray *et al.*, 1997; 2006), mejora el sistema inmunológico, reduce el riesgo de aterosclerosis, al mismo tiempo, regula el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Delzenne, 1999; Roberfroid, 2001)

El valor calórico de la inulina oscila entre 1.6 a 2.71 kcal/g (Coussement, 1999) específicamente durante el metabolismo de los AGCC en su paso a través del colon (Lendorio, 2003). Además, se estima que el índice glucémico de la inulina es nulo (Deis, 2001)

### **2.1.2 Importancia de los prebióticos en alimentos**

Los fructanos y sus derivados ofrecen múltiples usos como ingredientes en la formulación de productos (Cuadro 3). La inulina tiene propiedades similares a las del almidón, mientras que la oligofruktosa presenta propiedades más parecidas a la sacarosa (Roberfroid, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006). La inulina mejora la aceptabilidad de yogures elaborados con leche descremada, impartándole una mayor cremosidad, también actúa como espesante, retiene el agua y estabiliza geles (Kip *et al.*, 2005). Los geles se pueden formar por efecto mecánico o térmico y el obtenido por el método térmico presenta mejor textura y firmeza (Kim *et al.*, 2001). La capacidad de formar gel es determinante en su uso como sustituto de grasas en productos lácteos, untables, aderezos, salsas y otros productos en los que las propiedades funcionales que otorgan las grasas son indispensables para lograr los efectos sensoriales deseados por los consumidores (Franck, 2002). En este sentido, los fructanos de bajo GP se utilizan en nivel industrial como sustitutos de azúcares debido a que son altamente solubles y tienen un sabor

dulce. En cambio, los fructanos de alto GP son menos solubles y comúnmente se emplean como sustitutos de grasas o para dar una mayor estabilidad a las emulsiones y espumas (Frank 2002, Ritsema y Smeekens, 2003).

**Cuadro 3. Propiedades funcionales de la inulina**

<b>Propiedades funcionales de la inulina y derivados</b>	
<b>Aplicación</b>	<b>Funcionalidad</b>
<b>Productos lácteos</b>	Cuerpo y palatabilidad, capacidad de formar gel, emulsificantes, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
<b>Postres congelados</b>	Textura, depresión en el punto de congelación, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
<b>Productos untables</b>	Estabilidad de emulsión, textura y capacidad de ser untado, sustituto de grasas.
<b>Productos horneados</b>	Disminución de actividad del agua, sustituto de azúcares
<b>Cereales de desayuno</b>	Crujencia, capacidad de expansión
<b>Preparación con frutas (no ácidas)</b>	Cuerpo y palatabilidad, capacidad de formar gel, estabilidad de emulsión, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes
<b>Aderezos de ensaladas</b>	Cuerpo y palatabilidad, sustituto de grasas
<b>Productos cárnicos</b>	Textura, estabilidad de emulsión, sustituto de grasas.
<b>Chocolate</b>	Sustituto de azúcares, humectante.

(Franck, 2002)

## **2.2 Probióticos**

El término probiótico se deriva del griego y significa “pro vida”. Ha sido redefinido por años través del conocimiento científico como la relación entre la salud intestinal y sentirse bien (Kun, 2009).

Parker (1974), sugiere en su definición que existe una interacción entre el microorganismo y el hospedero: “Organismos y sustancias con efectos benéficos para animales, que tienen influencia sobre la microflora intestinal”.

Fuller (1989), los define como “Un suplemento alimenticio con microorganismos vivos que afectan benéficamente al hospedero animal mejorando el balance de la flora intestinal.

Havenaar & Huis (1992), mencionan que los probióticos son “Mono-cultivo o una mezcla de microorganismos vivos que administrados a animales o al hombre, afectan de manera benéfica al hospedero, mejorando las propiedades de la flora normal”.

Probióticos son microorganismos viables que en cantidad suficiente enriquecen el intestino y lo mantienen en un estado activo, además, ejercer un efecto positivo en la salud (Anónimo, 2000). El término fue creado por Kollath (1953), no debe confundirse con el concepto de alimento probiótico.

Los alimentos probióticos pueden ser definidos como “Alimentos con un contenido de microorganismos vivos que activamente mejoran la salud por el balance de la microflora en el intestino” (Fuller, 1989; 1992).

Diplock *et al.* (1999), mencionan que “Un alimento probiótico es funcional si ha sido demostrado satisfactoriamente su efecto benéfico en uno o más funciones del cuerpo, más allá del efecto nutricional, en el sentido de mejorar el estado de salud y el bienestar, así como, la reducción de riesgo de enfermedades”.

### **2.2.1 Rol de los probióticos (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*)**

El género *Bifidobacterium* constituye el 25 % de la microflora intestinal animal, compite con otras especies por nutrientes y se acopla en distintos sitios del intestino (Scardovi, 1986; Vaughan *et al.*, 2000). Como muchas bacterias intestinales, las especies de este género son sacarolíticas, es decir, obtienen carbón y energía a través de la fermentación de mono y oligosacáridos (Scardovi, 1986; Cremonini *et al.*, 2002), produciendo ácido láctico y acético, que acidifican todo el intestino, lo que restringe la putrefacción así como el crecimiento de bacterias patógenas potenciales, además, tienen efecto anticancerígeno, producen vitaminas y reducen la conversión primaria de sales biliares en sales

biliares secundarias (Servin, 2004; Hirayama and Rafter, 2000; MacDonal *et al.*, 1978).

En el mismo sentido, las especies del género *Lactobacillus*, son microorganismos que habitan de manera natural la flora intestinal de mamíferos, al formar parte de ese hábitat, propician un ambiente hostil para muchos microorganismos patógenos a través de un mecanismo de fermentación de fructanos, produciendo lactato y otros ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno y bactericidas o antibióticos (Rasic y Kurmann, 1978). El peróxido de hidrógeno inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens* (Gilliland y Speck 1977).

### **3.0 Justificación**

Se ha demostrado que los fructanos de *C.intybus* y *H. tuberosus* tienen efecto prebiótico sobre las bacterias benéficas del intestino, por lo que es importante verificar si los fructanos obtenidos *Agave angustifolia* var. *tequilana* provocan ese mismo efecto en un modelo *in vitro*.

## 4.0 Materiales y Métodos

### Microorganismos y condiciones de cultivo

Los fructanos de *C. intybus* fueron proporcionados por América alimentos S.A. de C.V. (Jalisco, México), los de *A. tequilana* se adquirieron en Industrializadora Integral del Agave (IIDEA) S.A. de C.V. (Jalisco, México) mientras que los fructanos de *H. tuberosus* fueron suministrados por BNP (Qingdao, China).

Los microorganismos utilizados fueron *Lactobacillus acidophilus* SACCO LA3, *L. casei* SACCO BGP93 y *Bifidobacterium lactis* SACCO BLC1 adquiridos en RAFF S.A. de C.V. Jalisco, México. Se conservaron a -4° C. Posteriormente las cepas se activaron en caldo Man–Rogosa–Sharpe (MRS) Difco, durante 24 h a 35° C en una jarra anaerobia con una atmosfera de CO<sub>2</sub> + N<sub>2</sub>.

Las cepas de *Lactobacillus* y de *Bifidobacterium* de 24 h del cultivo en caldo MRS, se sembraron placas con Agar MRS y se incubaron durante 48 h a 35° C, posteriormente se suspendieron en una solución de peptona de caseína (Merck) al 0.1%, hasta obtener una concentración de 0.5 en la escala de McFarland que equivale a  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Inmediatamente después, se inoculó (2.0% v/v) de ésta solución de peptona de caseína en relación a 25 mL de medio MRS sin glucosa, el cual contenía los siguientes ingredientes (en gramos por litro): peptona de proteasa (Difco), 10; extracto de carne, 10; extracto de levadura, 5; tween 80, 1; citrato de amonio, 2; acetato de sodio (Analytica), 5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05; L-cisteína (Analytica) 0.5 (con un pH inicial de 6.5 y esterilizado en autoclave a 121° C durante 15 min), adicionado con 0, 7, 14 ó 21 gL<sup>-1</sup> de fructanos de *C. intybus*, *A. angustifolia* var. *tequilana* y *H. tuberosus* (n = 5). Los cultivos se incubaron en condiciones anaerobias a 35° C durante 48 h. Las condiciones anaerobias se mantuvieron en jarras de anaerobiosis adicionadas con un sobre Generador EZ anaerobio (GasPak BBL 260678).



## **Variables respuesta**

Para verificar el efecto prebiótico de los diferentes tipos y dosis de fructanos se tomó como referencia el cambio en el pH del medio, esta medición se realizó mediante un Potenciómetro (Orion 3 star, Thermo scientific). También se realizó la medición del incremento en la DO<sub>600 nm</sub>, ya que se espera que al haber un mayor desarrollo de los microorganismos, aumente la turbidez del caldo de fermentación, la medición se llevó a cabo por espectrofotometría (Sequoia-Turner 340). Además se cuantificó la biomasa en peso seco, para lo cual, las colonias de bacterias contenidas en 10 mL de caldo se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm, se lavaron con agua destilada y se secaron a 105° C durante 24 h y por último se pesaron.

## **Diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial 3 x 4, 12 tratamientos (3 fructanos y 4 dosis).

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

**Donde;**  $Y_{ijk}$  es la variable respuesta en la repetición  $k$ , nivel  $j$  de  $B$ , nivel  $i$  de  $A$ ,  $\mu$  es la Media general,  $A_i$  es el efecto del factor  $A$  al nivel  $i$ ,  $B_j$  es el efecto del factor  $B$  al nivel  $j$  y  $E_{ijk}$  es el error aleatorio.

Con los resultados se hicieron pruebas de normalidad y se sometieron a un análisis de varianza ( $p < 0.05$ ) de los factores principales y sus interacciones, se realizó una comparación múltiple de medias de los tratamientos mediante una prueba de Tukey, con el paquete estadístico SAS 6.0, (1999).

## 5.0 Resultados y discusión

El crecimiento de cultivos puros de *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* en medio MRS suplementado con los tres tipos de fructanos fue analizado mediante el descenso de pH (Figura 5), el incremento de la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) (Figura 6), así como por el aumento de la biomasa en peso seco (Figura 7) después de 48 h de incubación anaerobia. En el cuadro 4 se presentan los cuadrados medios y los resultados de la prueba de F correspondiente.

Cuadro 4. Cuadrados medios y resultados de la prueba de F del descenso de pH, DO<sub>600nm</sub> y biomasa de caldo de fermentación MRS sin glucosa suplementado con fructanos de *C. intybus*, *A. angustifolia* y *H. tuberosus*.

pH				
	G. L.	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>B. lactis</i>
Fuente	2	4.266***	0.491***	3.788***
Dosis	3	16.748***	24.163***	3.752***
Fuente x dosis	4	0.410***	0.100*	0.017
Error	140	0.043	0.037	0.026
C. V.		4.270	4.279	2.904
DO <sub>600</sub>				
Fuente	2	0.403***	0.379***	0.091*
Dosis	3	1.779***	0.905***	1.809***
Fuente x dosis	4	0.052*	0.001*	0.199***
Error	140	0.016	0.0004	0.021
C. V.		21.17	2.580	34.708
Biomasa				
Fuente	2	0.0003***	0.0004*	0.00003***
Dosis	3	0.0007***	0.0030***	0.00024***
Fuente x dosis	4	0.00002***	0.00016	0.000008***
Error	140	0.000002	0.0001	0.0000009
C. V.		20.485	47.566	19.897

\*\*\*Significativo en los niveles de probabilidad de 0.0001

\* Significativo en los niveles de probabilidad de 0.01

G.L. = Grados de libertad

C.V. = Coeficiente de variación

Al medir el pH del caldo de fermentación al término de la incubación, se observó una relación directa entre el crecimiento de la población y el descenso del pH, esto se debe principalmente a que las bacterias utilizan como fuente de carbono a los fructanos, que al oxidarse producen ácidos grasos de cadena corta

(AGCC). De acuerdo con Makras (2005), cuando especies del género *Lactobacillus* fermentan fructanos, producen en el orden, ácido láctico>ácido acético>ácido fórmico>etanol, para el caso de *Bifidobacterium*, la degradación de fructanos tipo inulina produce ácido acético> ácido fórmico>etanol.

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (Cuadro 4), el efecto de las distintas fuentes de fructanos en las diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de *L. acidophilus* fue estadísticamente diferente, pero dependió significativamente de la fuente y dosis de fructanos. Siendo el mejor tratamiento los provenientes de *C.intybus* y *H. tuberosus* en la concentración de 21.0 gL<sup>-1</sup>, con descenso de pH de 4.03 y 4.26 respectivamente (p<0.0001). Con respecto a la DO<sub>600</sub>, los fructanos de *C. intybus* en la dosis de 14.0 y 21.0 gL<sup>-1</sup>, provocaron el mayor efecto (0.764, 0.838 respectivamente), seguidos por los fructanos de *H.tuberosus* en la dosis de 21.0 g/L<sup>-1</sup> con una absorbancia de 0.748. Este aumento observado en la DO concuerda con la biomasa en peso seco, ya que el mayor aumento se presenta con los fructanos de *H. tuberosus* y *C. intybus* en la concentración más alta (0.017 y 0.012 g respectivamente). La interacción fuente x dosis también fue altamente significativa, en los tratamientos donde no se añadieron fructanos (0.0 gL<sup>-1</sup>), no disminuyó el pH, tampoco se presentó incremento de la DO<sub>600</sub>, y biomasa, lo que indica que el efecto en el crecimiento de las poblaciones de bacterias se debe a la fuente de carbono (fructanos) y a la dosis en el caldo de fermentación. Se observó un efecto dosis-reacción en los tres parámetros estudiados.

En lo que respecta a *L. casei* la fuente de fructanos y la dosis fueron altamente significativos (p<0.0001), así mismo, se observó diferencia significativa en la interacción fuente x dosis. Los fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia* en la concentración de 21.0 gL<sup>-1</sup>, tuvieron el mayor efecto sobre la disminución del pH (3.67, 3.78 y 3.86 g, respectivamente) (p<0.0001). Por otra parte, en la DO<sub>600</sub> se observó un efecto altamente significativo con los tratamientos de *C.intybus* y de *A. tequilana* en las tres concentraciones (absorbancia promedio

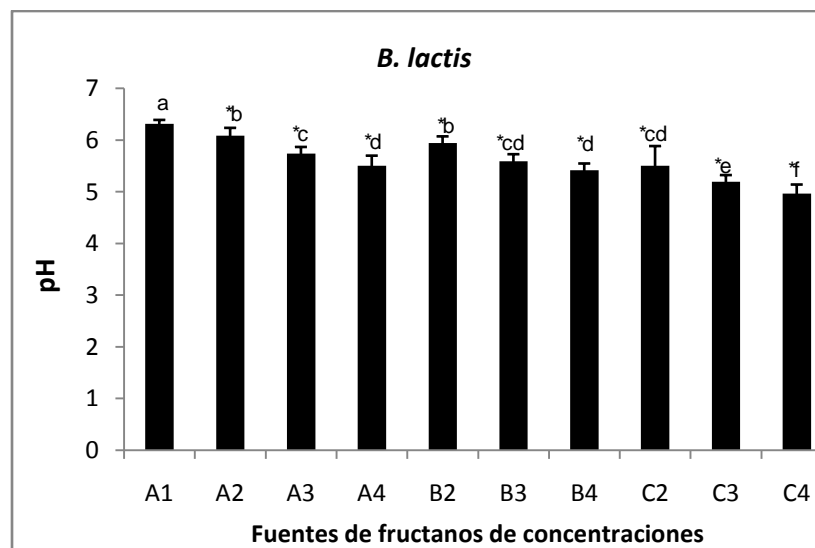
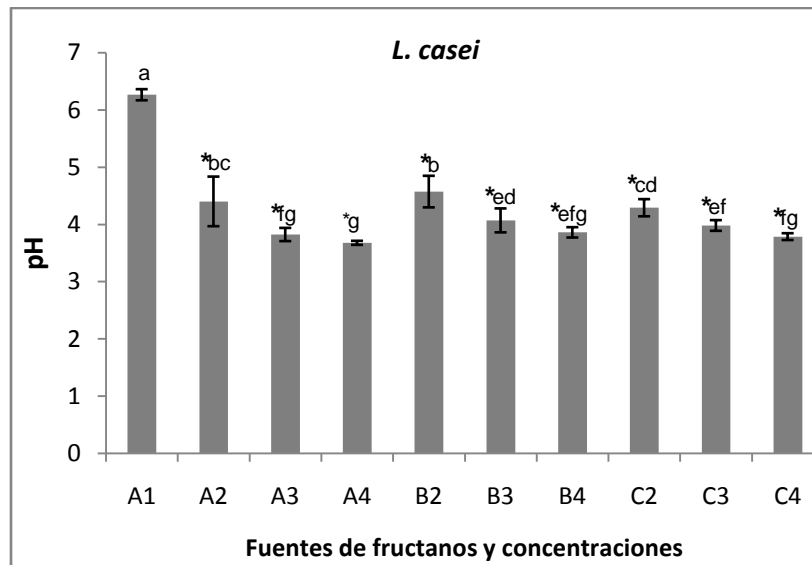
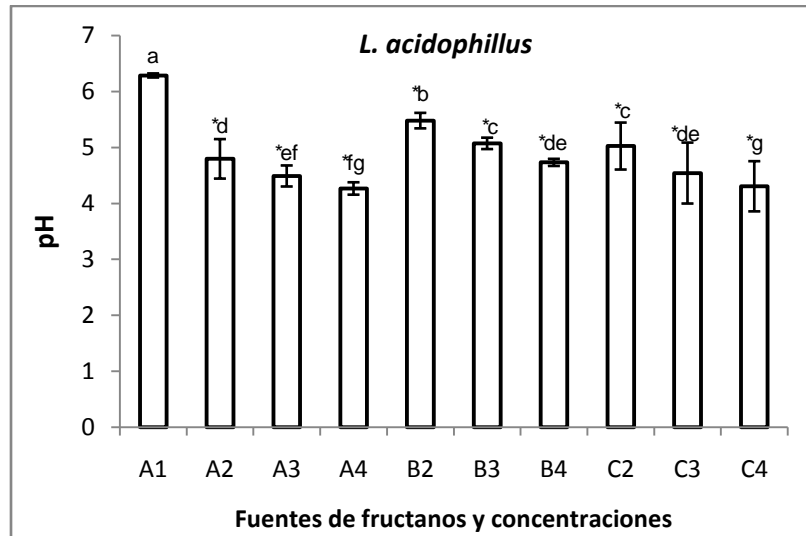
de 0.953), no se presentaron diferencias significativas, posiblemente se debió, a un alta aceptación del microorganismo en consumir los fructanos como fuente de carbono, la cual, se reflejó en un rápido crecimiento de la población con un alto enturbiamiento del caldo de fermentación. La biomasa incrementó con los fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia* en la concentración más elevada (0.038, 0.030 y 0.028 g respectivamente) ( $p < 0.0001$ ).

Para contrastar el crecimiento de lactobacilos con diferentes fuentes de carbono, Makras *et al.* (2005), compararon el efecto prebiótico de glucosa (Glu), fructosa (Fru), galactosa (Gal), lactulosa (Lact), transgalactooligosacaridos (TOS), oligofructosa (Raftilose P95), oligofructosa-Inulina (Ogf-Inu; Raftilose synergy, inulina de cadena larga (Raftilose HP) en concentraciones de 10 y 20 gL<sup>-1</sup> inoculados con 10 especies de lactobacilos. Observaron que todos los microorganismos crecieron con Glu, Fru y Gal, Además, la mayoría degradaron TOS y Lact a excepción de *L. rhamnosus*, la única bacteria que pudo crecer en todas las fuentes de carbono fue *L. paracasei* subespecie *paracasei* 8700:2.

En lo que concierne a la medición de pH en caldos inoculados con *B. lactis*, la fuente y la dosis fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ), siendo el mejor tratamiento los suplementados con fructanos de *H. tuberosus* en la dosis de 14 y 21.0 gL<sup>-1</sup>, con descenso de pH de 5.17 y 4.91 respectivamente y con *A. tequilana* en la concentración más alta (pH 5.41). En cuanto a la medición de la DO<sub>600</sub>, la dosis y la interacción fuente x dosis fueron significativas. Los tratamientos que presentaron mayor efecto fueron *C. intybus* y *A. tequilana* en la dosis de 21.0 gL<sup>-1</sup> (absorbancia 0.750 y 0.736 respectivamente). Por último, en la biomasa, tanto la fuente como la dosis y la interacción fuente x dosis, son estadísticamente significativas. Donde los fructanos que provocan un mayor incremento de la biomasa fueron los obtenidos de *C. intybus*, y *H. tuberosus* en la concentración de 21.0 gL<sup>-1</sup>, los pesos observados fueron de 0.0087, 0.0082 ( $p < 0.0001$ ).

Wang y Gibson (1993), demostraron el crecimiento de ciertas bacterias del género *Bifidobacterium* en caldos de fermentación con glucosa, inulina (*C.*

*intybus*) u oligofruetosa (*C. intybus*) en concentración de 7.0 gL<sup>-1</sup>. De manera general, observaron una mayor fermentación con la oligofruetosa, después con inulina y el menor desarrollo se presentó con glucosa. Estos resultados no concuerdan con lo observado por Rabiú *et al.* (2001), Van der Meulen *et al.* (2003) y Rossi *et al.*, (2005) en los que se observó que las bifidobacterias si pueden metabolizar carbohidratos como las inulinas y sus derivados, pero que prefieren FOS con GP de tres o cuatro monómeros debido a que presentan transportadores específicos de oligosacáridos de bajo peso molecular, por lo cual suponemos que el desarrollo de *B. lactis* en nuestro estudio, no fue tan importante como el que se observó en las bacterias lácticas, posiblemente porque los fructanos analizados son de alto grado de polimerización.



**Fuente de fructanos**

**A** = *C. intybus*

**B** = *A. angustifolia*

**C** = *H. tuberosus*

**Concentraciones**

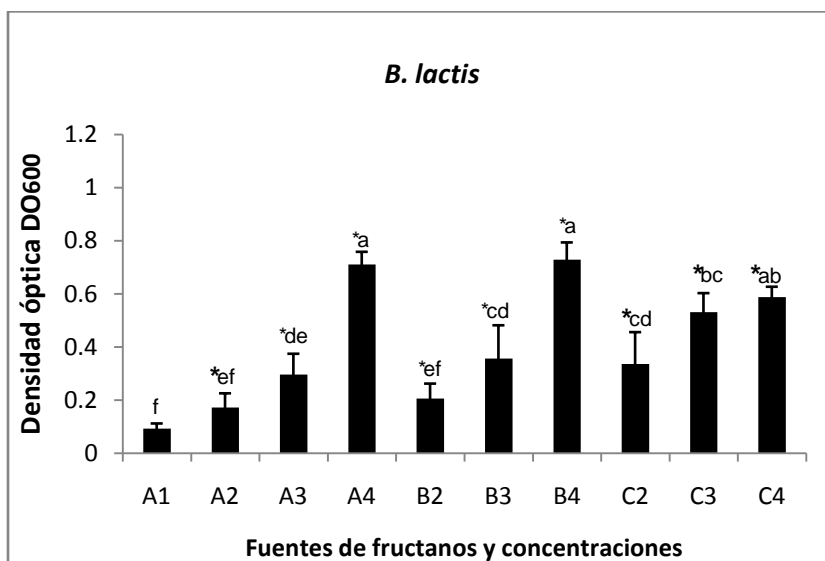
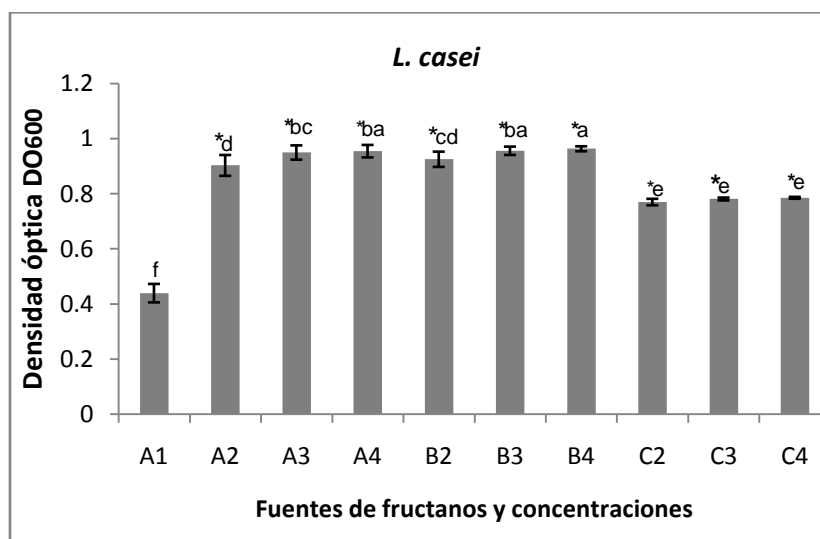
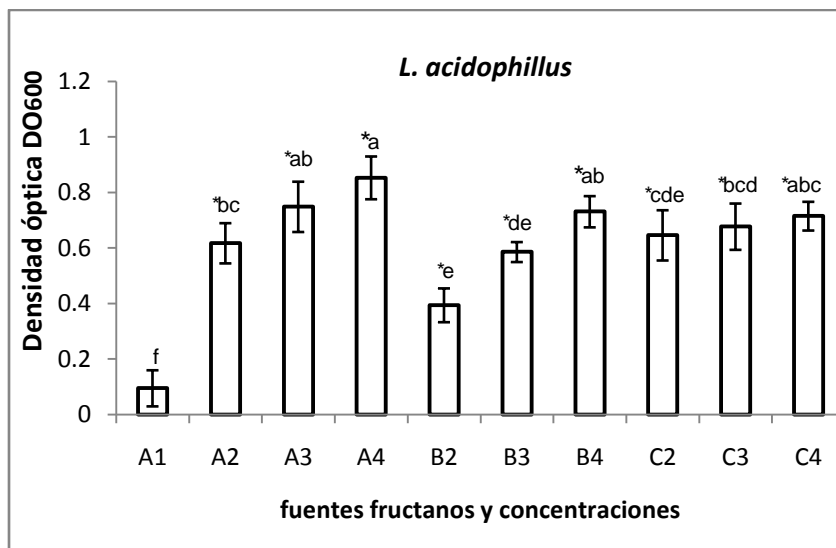
**1** = 0 g/L

**2** = 7 g/L

**3** = 14 g/L

**4** = 21 g/L

Figura 5. Descenso de pH por los microorganismos de *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis*. Los tratamientos con diferente literal minúscula, son estadísticamente diferentes



**Fuente de fructanos**

A = *C. intybus*

B = *A. angustifolia*

C = *H. tuberosus*

**Concentraciones**

1 = 0 g/L

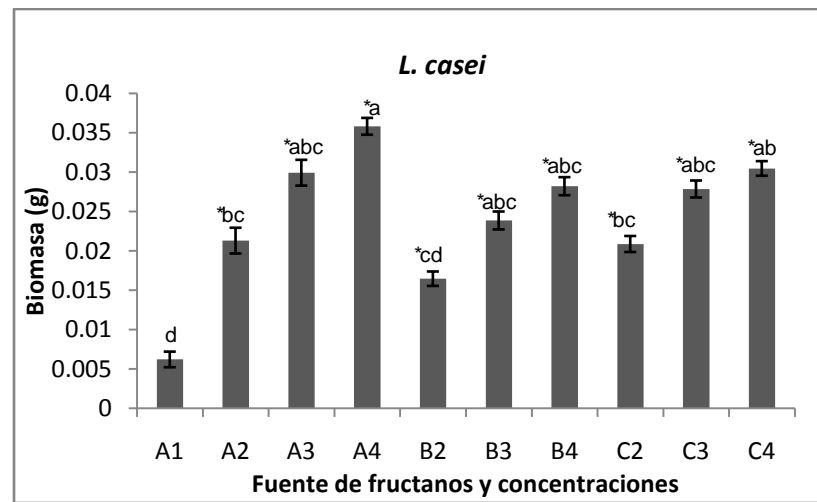
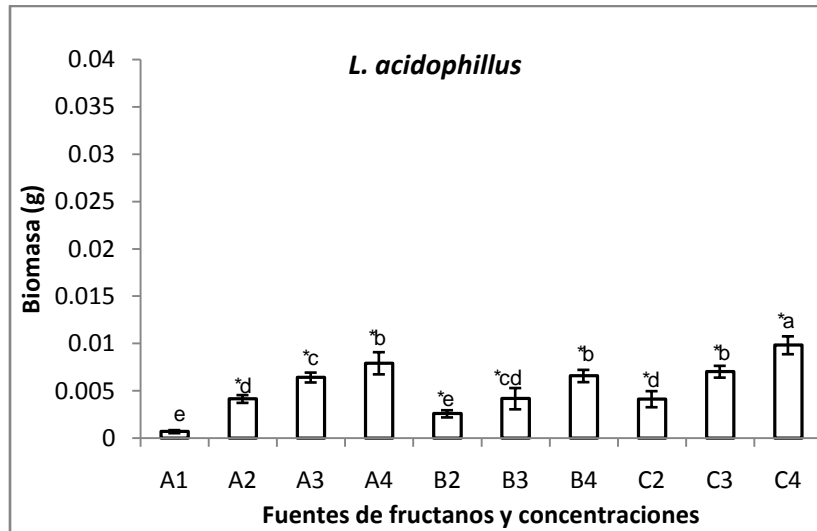
2 = 7 g/L

3 = 14 g/L

4 = 21 g/L

Figura 6. Incremento de la Densidad Óptica 600 nm por los microorganismos de *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis*

Los tratamientos con diferente literal minúscula, son estadísticamente diferentes



**Fuente de fructanos**

A = *C. intybus*

B = *A. angustifolia*

C = *H. tuberosus*

**Concentraciones**

1 = 0 g/L

2 = 7 g/L

3 = 14 g/L

4 = 21 g/L

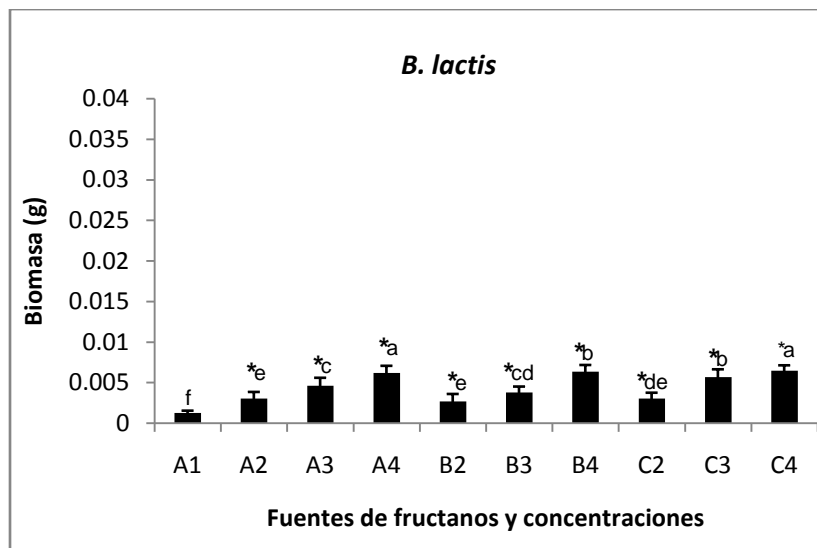


Figura 7. Incremento de la biomasa en peso seco realizada por los microorganismos de *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis*

Los tratamientos con diferente literal minúscula, son estadísticamente diferentes



## 6.0 CONCLUSIONES

- 1) Se comprobó el efecto prebiótico de los fructanos obtenidos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y de *A. angustifolia* var. *tequilana*.
- 2) Los fructanos de *A. angustifolia* tienen un efecto prebiótico estadísticamente igual ( $p < 0.0001$ ) a los de *C. intybus* sobre cepas de *L. casei* y *L. acidophilus*.
- 3) El mayor efecto prebiótico con los tres tipos de fructanos se observó en *L. casei* posiblemente porque la degradación de los fructanos por la enzima  $\beta$ -Fructofuranosidasa es más eficiente.
- 4) El menor efecto se observó con *B. lactis* debido a que degrada con mayor dificultad polisacáridos.
- 5) El efecto prebiótico se debió principalmente a las distintas fuentes de carbono, hubo un efecto dosis reacción y la capacidad de degradación de los fructanos depende del metabolismo de cada microorganismo.
- 6) Podemos afirmar que existe un gran potencial en el maguey como fuente de prebióticos, ya que la síntesis de fructanos en estas plantas puede superar de forma importante a la de otras especies comerciales.

## 7.0 LITERATURA CITADA

- American Association of Cereal Chemists. 2001. The definition of dietary fiber. *Cereals Food World* 46 (3): 112-129.
- Anónimo. 2000. Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln. Abschlussbericht der Arbeitsgruppe "Probiotische Mikroorganismen in Lebensmitteln" am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin. In: *Ernährungs-Umschau* 47:191–195
- Blaut M. 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur. J. Nutr.* 41, 1-16.
- Bustamante P. C. and R. Mayorga. 2006. Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica, *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* 37, 5-10,
- Coudray, C., Bellanger, J., Castiglia-Delavaud, C., Remesy, C., Vermorel, M. and Rayssiguier, Y. 1997. Effects of soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51:375.
- Coudray, C., Feillet-Coudray, C., Gueux, E., Mazur, A., and Rayssiguier, Y. 2006. *J. Nutr.*, 136:117.
- Coussement P. A. 1999. Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. *Journal of Nutrition*. 129:1412S-1417S
- Cremonini, F., S. Di Caro, M. Covino, A. Armuzzi, M. Gabrielli, L. Santarelli, E. C. Nista, G. Cammarota, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini. 2002. Effect of different probiotic preparations on an anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *A. J. gastroenterol.* 97: 2744-2749.
- De Bruyn A., Álvarez A.P., Sandra P. and De Leenheer L. 1992. Isolation and identification of O-beta-D-fructofuranosyl-(2-->1)-O-beta-D-fructofuranosyl-(2-->1)-D-fructose, a product of the enzymic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*. *Carbohydr Res* 235, 303-308.
- Deis R. 2001. Dietary fiber: a new beginning? (en línea). Consultado 25 de junio 2008. Disponible en: <http://www.foodproductdesing.com/achieve/2001/1201ap.html>
- Delaquis, P. and Mazza, G. 1998. Functional Vegetable Products. In: Mazza, G. ed. *Functional Foods: biochemical and processing aspects*. Technomic Publishing Co. Pennsylvania, EE.UU. 460.
- Delzenne, N.M. 1999. The hypolipidaemic effect of inulin: when animal studies help to approach the human problem. *Brit. J. Nutr.*, 82:3.
- Delzenne N.M., Daubioul C., Neyrinck A., Lasa M. and Taper H. S. 2002. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animal: review of biochemical events and future prospects. *British Journal of Nutrition*, 87, 2, S255-S259

- Diplock A.T., Aggett P., Ashwell M., Bornet F., Fern E. and Roberfroid M. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *Br. J. Nutr.* 81 (suppl. 1): S1-S27.
- Ehrmann, M. A., Müller, M. R. A. and Vogel, R. F. 2003. Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 7–13.
- Franck, A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British J Nutr*; 87: 287-291
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals: a review. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378
- Fuller, R. 1992. Probiotics – The scientific basis. Chapman and Hall, London.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *J. Nutr* 125: 1401-1412.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. and Cummings, J.H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterol* 108: 975 – 982.
- Gibson, G. R., Probert H., Van Loo J., Rastall R. and Roberfroid M. B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17:259-275.
- Gilliland S.E. and M.L. Speck. 1977. Antagonistic action of *L. acidophilus* towards intestinal and food borne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.* 40: 820-823.
- Havvenar R. and Huis Int Veld JHJ. 1992. Probiotics: A general view. In: wood BJB, editor. *The Lactic Acid Bacteria*, vol. 1: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Applied Science, London, 151-170.
- Hirayama, K., and J. Rafter. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* 2:681-686.
- Kim Y., Faqih M. and Wang S. 2001. Factor affecting gel formation of inulin. *Carb Polym*, 46: 135-145.
- Kip P., Meyer D. and Jellema R. 2005. Inulin improve sensoric and textural properties of low fat yogurts. *Int Dairy J.*, 16: 1098- 1103
- Kollath, .1953. The increase of the diseases of civilization and their prevention. *Münch Med Wochenschr* 95:1260–1262
- Kruse, H. P., Kleessen, B. and Blaut, M. 1999. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *Brit J Nutr* 82: 375 – 382.

- Kun L. Y. 2009. Probiotic microorganisms. In: Handbook of probiotics and prebiotics, 2nd Edition. Edited by Yuan Kun Lee & Seppo Salminen, 3
- Lendorio R. 2003. Oligosacaridos como ingredientes funcionales (en línea). Consultado el 24 de junio de 2008. Disponible en: <http://www.icofma.es/vocalíasalimentacion/oligosacaridos1.htm>
- MacDonal, I. A., G. Singh, D. E. Mahony, and C. E. Meyer. 1978. Effect of pH on bile salt degradation by mixed fecal culture. *Steroids* 32: 245-256.
- Makras L., G. Van Acker, and L. De Vuyst. 2005. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 Degrades Inulin-Type Fructans Exhibiting Different Degrees of Polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, No. 11: 6531-6537.
- Mancilla-Margalli N.A. y López M.G. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *J Agric Food Chem* 54, 7832-7839.
- Parker R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*; 29: 4-8.
- Rasic, J. L., and J. A. Kurmann. 1978. Yoghurt. Scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Publ. ed. Tech. Dairy Publ. House, Copenhagen, Denmark. 117
- Rabiu B.A., Jay A. J., Gibson G. R. and Rastral R.A. 2001. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidase from bifidobacterium species. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 2526-2530
- Ritsema T. and Smeekens S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol* 6, 223-230.
- Roberfroid M. 2001. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73:406
- Roberfroid M. 2002. Functional foods: concepts and applications to inulin and oligofructose. *Brit J Nutr.*; 87: 139-143
- Rodríguez R., Jiménez A., Fernández J., Guillén R. and Heredia A. 2006. Dietary fiber from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends Food Sci Technol*; 17: 3-15.
- Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanoni S. and Matteuzzi D. 2005. Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71. No. 10: 6150-6158.
- Rycroft C.E., Jones M.R., Gibson G.R. and R.A. Rastall. 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 878-887.

- SAS Institute. 1999. SAS Users Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, N.C. 1028p
- Sánchez-Marroquin A. and P. H. Hope. 1953. Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species. *Agricultural and food chemistry*. Vol. 1, No. 3, 246-249
- Servin, A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 405-440.
- Scardovi, V. 1986. Genus *Bifidobacterium*, In H. Sneath, N. Mair, M. Sharpe, and J. Holt (cd), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2, 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md. p. 1418-1434.
- Topping D. I. and P. M. Clifton. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol rev.* 81: 1031. 1064.
- Van der Meulen R., Avonts L. and De Vuyst L. 2003. Short fructans of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-170010. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 1923-1930.
- Van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebregs, H. and Smits, G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 525–552.
- Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Frank, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., Van Vliet T. and Van den Heuvel E. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1905). *Br J Nutr* 81: 121-132
- Vaughan E. E., F. Scahut H. G. Heilig E. G. Zoetendal W. M. de Vos, and A. D. Akkenmans 2000. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1: 1-12.
- Wang X. and Gibson G.R. 1993. Effect of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 373-380.

## **Fructanos de maguey: efecto metabólico**

Juan Antonio Rendón-Huerta<sup>1</sup>, Bertha Irene Juárez-Flores<sup>2</sup>, Rosa Elena Delgado-Portales<sup>3</sup>, Miguel Ángel Ruiz-Cabrera<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Estudiante de maestría del Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales, UASLP.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación de Zonas Desérticas UASLP.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas UASLP.

## RESUMEN

Se comparó el efecto de los fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia* var. *tequilana*, sobre el metabolismo energético de ratas obesas y diabéticas. Se registró el peso corporal durante cinco semanas, en las cuales, se tomó una muestra sanguínea cada semana para medir las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL), se hizo un análisis de la flora bacteriana benéfica y patógena al inicio y al final del experimento, al término del experimento se sacrificaron los animales y se evaluó la presencia de esteatosis hepática. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial. No hubo diferencia significativa en la ganancia o pérdida de peso en los tratamientos obesos (sanos y diabéticos). Los animales no obesos (sanos y diabéticos) suplementados con fructanos de *C. intybus* y de *A. angustifolia* fueron los que presentaron menor ganancia de peso. El consumo de fructanos de *A. angustifolia* en ratas sin diabetes disminuyó los niveles de glucosa, colesterol y aumentó el HDL, mientras que, en ratas diabéticas, se disminuyeron las concentraciones de glucosa y triglicéridos. Los tratamientos con fructanos favorecen el crecimiento de especies de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y reducen de manera significativa las poblaciones de *Clostridium* y *Escherichia*. La evaluación histoquímica del hígado de las ratas obesas indicó que el consumo de fructanos protege a los animales de la esteatosis en comparación con el tratamiento sin fructanos.

## 1.0 Introducción

Debido a los cambios en los hábitos alimentarios con altos contenidos de grasas saturadas y trans, así como el consumo de sodio, tabaco, alcohol y el sedentarismo, más de 50% de la población de adultos y casi un tercio de los niños y niñas en México tienen sobrepeso y obesidad, lo que convierte a este país en el segundo más obeso del mundo (12.1 millones de personas); en efecto, la frecuencia de pacientes con sobrepeso aumenta considerablemente sobre todo en países en desarrollo (IMSS, 2008; Sánchez *et al.*, 2004). El sobrepeso y la obesidad incrementa el riesgo de sufrir diabetes, algunos tipos de cáncer, enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares, no sólo en la población adulta sino también en los adolescentes y en los niños. Una alternativa para reducir algunas enfermedades asociadas a la obesidad ha sido el consumo de fibras dietéticas no digeribles, las cuales, tienen efecto sobre la absorción de grasas, además, son degradadas por la flora normal de los mamíferos, produciéndose así un efecto sobre el metabolismo de grasas y carbohidratos (Niness 1999; Roberfroid 2000). La flora microbiana intestinal de los humanos representa un ecosistema rico en microorganismos metabólicamente activos que juegan un importante papel en la salud de su hospedero. Por consiguiente, se han buscado estrategias para promover el crecimiento de Bifidobacterias y Lactobacilos en el intestino, empleando sustratos selectivos como carbohidratos no digestibles como los fructanos, en el tracto gastrointestinal, estos polisacáridos obtenidos principalmente de *Cichorium intybus* y *Helianthus tuberosus*, al ser fermentados, generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el colon, siendo los principales acetato, butirato, lactato y gases como producto del metabolismo anaerobio. Los AGCC han demostrado tener efecto en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, elevar la concentración de glucagon similar al péptido-1 (GLP-1), estimular la saciedad, mejorar el perfil lipídico en sangre, incrementar la concentración de insulina, así como, la neogénesis de células  $\beta$  en el páncreas (Delzenne *et al.*, 2002). Recientemente, Mancilla-Margali y López. (2006), han demostrado la presencia de fructanos en varias especies del género *Agave*, por lo que, el objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de los fructanos obtenidos



de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia* var. *tequilana* sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos de ratas obesas y diabéticas, así como el crecimiento de bacterias benéficas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) y patógenas (*Clostridium*, *Escherichia*). Además, evaluar la acumulación de lípidos en hígado (esteatosis).

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 Obesidad

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasas que pueden ser perjudiciales para la salud, y al sobrepeso como una acumulación excesiva de energía; en ambos casos hacen referencia al Índice de Masa Corporal (IMC), que es la relación entre peso y talla expresado en  $\text{kg}/\text{m}^2$ , en el sobrepeso es igual o superior a  $25 \text{ kg}/\text{m}^2$  y en la obesidad es igual o mayor de  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ , cabe mencionar que el riesgo de padecer enfermedades crónicas aumenta a partir de un IMC mayor de 21 (OMS, 2006).

Por otro lado, Kaufer-Horwitz *et al.* (2001), definen la obesidad como una enfermedad crónica de etiología multifactorial, que se desarrolla a partir de la interacción de la influencia de factores sociales, conductuales, psicológicos, metabólicos, celulares y moleculares. De alguna manera menos drástica, una persona obesa enfrenta otro tipo de enfermedades debido a las presiones psicológicas por marginación social como la discriminación (Stambler, 1991).

En 1993 se hizo una Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas a adultos entre 20 y 69 años de edad, que residían en zonas urbanas de México, se encontró que la prevalencia de obesidad era de 28.5% en los varones y de 41.4% en mujeres con un IMC igual o mayor de  $27.8 \text{ kg}/\text{m}^2$  para los hombres y de  $27.3 \text{ kg}/\text{m}^2$  para las mujeres y que aumentaba según la edad (Vargas y Ávila, 1997). Normalmente, cuando hay obesidad, la frecuencia de padecer diabetes mellitus tipo II (DM II), es dos veces mayor en individuos ligeramente obesos, cinco veces en moderadamente obesos y 10 veces mayor en excesivamente obesos, por lo que se ha estimado que el 80% de las personas con DM II son obesos (Herrera-Pombo, 2001). Algunos estudios han demostrado que los hombres obesos y fumadores, tienen mayor riesgo de presentar cáncer de colon, recto y próstata, mientras que las mujeres obesas son más propensas a sufrir cáncer de vesícula, de mama, de útero y de ovarios. También se le asocia a enfermedades de la vesícula biliar. La presencia de cálculos renales es de tres a cuatro veces más

frecuente en individuos obesos, por otro lado, afecta la función respiratoria lo cual puede ocasionar falta o suspensión del sueño. Aunado a esto, la relación de la distribución de grasa que se acumula en mayor cantidad en el tejido adiposo en la región abdominal, implica mayores riesgos de enfermedades cardiovasculares e hipertensivas lo que incrementa la probabilidad de morir.

Según la topografía del tejido adiposo se conocen cuatro tipos de obesidad:

Tipo I, El exceso de grasa se encuentra indistintamente en todo el cuerpo

Tipo II, El exceso de grasa subcutánea en el tronco y en el abdomen (androide)

Tipo III, Exceso de grasa abdominal o visceral

Tipo IV, El exceso de grasa se encuentra en la región glútea y femoral (ginecoide) (Kaufer-Horwits *et al.*, 2001).

### **2.1.1 factores etiológicos**

Entre los diversos factores que contribuyen a la acumulación de grasa se encuentran los genéticos, ambientales, nutricionales y falta de actividad física, entre otros. En un estudio realizado en la década de los cincuenta, se encontró que la descendencia de una pareja con peso adecuado tenía solo entre el 7 y el 14% de probabilidad de padecer obesidad, mientras que en parejas donde uno o ambos progenitores eran obesos, el riesgo de que el sucesor fuera obeso aumentó entre un 40 y 80% respectivamente. Algunos factores genéticos evidencian el desarrollo de la obesidad gracias al descubrimiento del gen *ob* que humanos codifica la proteína leptina, la cual actúa en el hipotálamo e influye en el apetito y en el balance energético. Se ha demostrado que una deficiencia genética de esta proteína altera la sensación de saciedad, lo que trae como consecuencia un hambre constante que conduce al consumo excesivo de alimentos (Villaseñor, 2002). Otra posible causa de padecer obesidad, es una anomalía metabólica que puede incrementar el almacenamiento energético en tejido adiposo por distintas maneras: 1) la desviación preferente de los sustratos energéticos hacia la síntesis y el almacenamiento de los triglicéridos; 2) un aumento en la eficiencia

para degradar hidratos de carbono, ácidos grasos y aminoácidos y almacenar energía adicional en forma de triglicéridos en el tejido adiposo; 3) una mayor eficiencia para llevar a cabo trabajo fisiológico donde se da una situación en la que se requiere menos energía y el exceso se convierte en triglicéridos que se almacenan en el tejido graso. Otro factor importante, es el estilo de vida de los individuos, en el cual, los cambios en sus hábitos alimenticios se caracterizan por un consumo de alimentos muy energéticos, que en muchas ocasiones son de mala calidad o la que comúnmente se denomina comida chatarra, así como una reducción de la actividad física (Kaufer-Horwitz *et al.*, 2001).

## **2.2 Diabetes**

La diabetes es una enfermedad crónica debida a que el páncreas no produce insulina suficiente o a que el organismo no la puede utilizar eficazmente, la palabra proviene del latín *diabetes mellitus*, que significa “orina dulce como la miel” (Mathews *et al.*, 2002). La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre (glucemia). La hiperglucemia es un efecto frecuente de la diabetes no controlada, que con el tiempo provoca importantes lesiones en muchos sistemas orgánicos, en particular en los nervios y los vasos sanguíneos. En 1985, la OMS estableció algunos criterios basados en la glucemia en ayunas y la tolerancia alterada a la glucosa (TAG). En 1997, la American Diabetes Association (ADA) estableció nuevos criterios basados en la glucemia en ayunas sin la realización de un test de tolerancia oral a la glucosa, en los que se indica, que la glucosa en ayunas está alterada cuando la glucemia oscila entre 110-125 mg/dL y que se presenta DM cuando la glucemia está por arriba de 126 mg/dL. Actualmente se conocen ocho tipos de DM, entre las que destacan la DM tipo I (DM I) y la DM tipo II (DM II), gestacional, tipo 3A, tipo 3B, tipo 3C, tipo 3D y tipo 3E, siendo las más importantes la DM I y DM II (Anónimo, 2008).

**La tipo I**, antes conocida como diabetes insulino dependiente o de inicio en la infancia, se caracteriza por una ausencia en la producción de insulina. Sin la

administración diaria de insulina exógena, este tipo de diabetes lleva rápidamente a la muerte.

**La tipo II**, conocida como diabetes no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta, se debe a que el organismo no utiliza eficazmente la insulina. El 90% de los diabéticos del mundo padecen este tipo de diabetes y se debe en gran parte a la inactividad física y al peso corporal excesivo (OMS, 2008).

### **2.2.1 factores etiológicos**

La DM II se ha asociado a múltiples condiciones, intervienen procesos como el envejecimiento, la genética, el ambiente y la cultura, que en conjunto interactúan dando como resultado un incremento importante de casos de la enfermedad en grupos sociales que han cambiado su estilo de vida a un estilo moderno. De igual manera, la obesidad, el sedentarismo, el estrés y el consumo de alimentos ricos en grasas y carbohidratos favorecen la presencia de DM II (Vázquez y Panduro, 2001).

Es de llamar la atención como los hispanos que viven en los Estados Unidos de Norteamérica presentan una alta prevalencia a este padecimiento. Durante la primera mitad del siglo XX, México se caracterizaba por un bajo nivel de vida, insalubre y de alta pobreza, acompañado de una alimentación escasa y una actividad física de moderada a intensa en la mayor parte de la población, factores que reducen el riesgo de contraer enfermedades crónicas degenerativas como la DM II. La morbilidad y la mortalidad debido a esta enfermedad han ido en aumento sobre todo a partir de 1950, cuando la tasa de mortalidad era de 4.8 por cada 100,000 habitantes y en 1998 se registró un aumento de 43.3 por cada 100,000 habitantes. La Encuesta Nacional Enfermedades Crónicas de 1993 mostró que el riesgo de padecer DM se incrementa a partir de los 40 años (Anónimo, 1993). Entre las patologías asociadas a esta enfermedad, sobresalen la cirrosis hepática y enfermedades coronarias (Pérez *et al.*, 2000)

### 2.3 Metabolismo de los lípidos (biosíntesis de los ácidos grasos)

La biosíntesis de los lípidos constituye un importante proceso metabólico en la mayoría de los organismos. Debido a la limitada capacidad de los animales superiores para almacenar polisacáridos, una vez cubierta la demanda energética, el exceso de glucosa se convierte mediante la vía de la glucólisis a piruvato que al descarboxilarse en la mitocondria de las células del hígado se produce acetil-CoA, así como en los tejidos adiposos y en las glándulas mamarias, éste acetil-CoA es la fuente de carbono esencial para la síntesis de grasas. Otras rutas de producción de acetil-CoA son la degradación oxidativa de algunos aminoácidos y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga. Una vez que se formó el acetil-CoA y dado que no puede atravesar la membrana mitocondrial, entra al ciclo de Krebs en donde, al unirse al oxalacetato genera citrato, que es trasladado de la mitocondria al citosol a través del sistema transportador de tricarboxilatos. Posteriormente, el citrato en presencia de ATP-citrato-liasa regenera el acetil-CoA. En la siguiente reacción el acetil-CoA mediante la acción de la enzima acetil-CoA carboxilasa en presencia de ATP forma el malonil-CoA. Una vez formado el malonil-CoA, las reacciones siguientes de la síntesis de ácidos grasos se realizan por una secuencia de seis etapas sucesivas, catalizadas por seis enzimas del sistema de la ácido graso sintetasa. La séptima proteína de este sistema es la portadora del acilo (ACP), cuando reacciona con malonil-CoA y en presencia de la enzima malonil-CoA-ACP-transacilasa forman el malonil-ACP, de la misma manera reacciona con acetil-CoA y con acetil-CoA-ACP-trasnsacilasa y se produce Acetil-ACP. Entonces un mol de malonil-ACP y un mol de acetil-ACP unidos producen cuatro reacciones (condensación, reducción, deshidratación y reducción) para la generación de butiril-ACP que es el primer ciclo de síntesis, para iniciar el segundo ciclo, el butiril-ACP reacciona con otra molécula de malonil-ACP y produce hexanoil-ACP, del ciclo tres al siete se forma palmitoil-ACP que al hidrolizarse produce ácido palmítico y ACP libre (Mathews *et al.*, 2002). Estos a su vez, se convierten en triacilglicéridos, que poseen un contenido energético muy por arriba al de los polisacáridos y además pueden almacenarse en tejido adiposo (Figura 1).

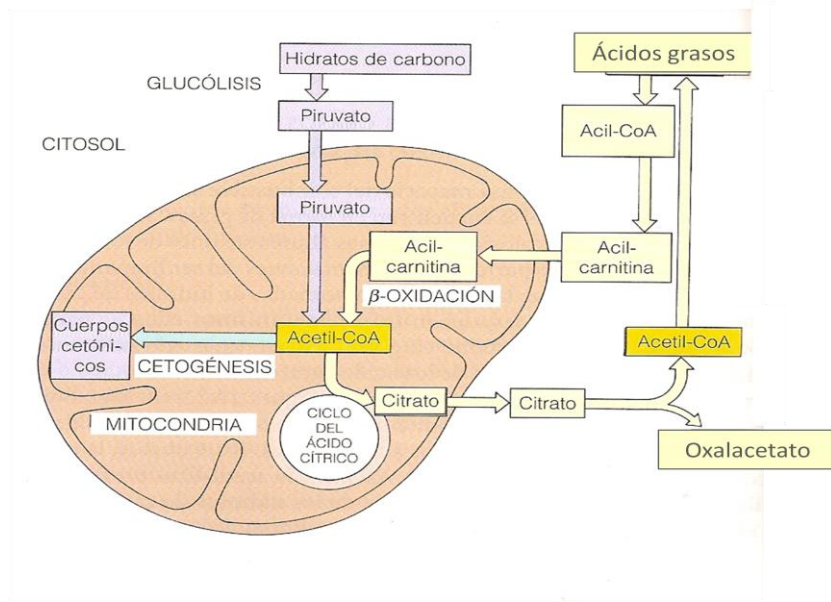


Figura 1. Síntesis de ácidos grasos (Mathews *et al.*, 2002)

## 2.4 Metabolismo de los carbohidratos (Gluconeogénesis)

La mayoría de los órganos animales pueden metabolizar distintas fuentes de carbono para producir energía, entre las más utilizadas encontramos azúcares, triglicéridos, piruvato y aminoácidos. Sin embargo, el sistema nervioso central utiliza glucosa como fuente de carbono única. Las células animales son capaces de sintetizar glucosa a partir de otros precursores de tres o cuatro carbonos como el lactato, aminoácidos, propionato y glicerol, a este proceso se le denomina gluconeogénesis. Esta ruta se lleva a cabo en el citosol de las células del hígado. Una vez que el lactato, precursor más importante que proviene de la glucólisis en el músculo esquelético, entra a la matriz mitocondrial de las células del hígado, se reoxida y se convierte en piruvato, que al unirse a la enzima piruvato carboxilasa y en presencia de ATP y biotina forma oxalacetato. El oxalacetato debe salir de la mitocondria al citosol, pero dado que la mitocondria no contiene el transportador para el oxalacetato, se reduce mediante la malato deshidrogenasa mitocondrial a malato, que es transportado al citosol donde se reoxida por la malato deshidrogenasa citosólica a oxalacetato, que posteriormente es carboxilado por el fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, produciéndose así fosfoenolpiruvato, después

este se isomeriza en fructosa-1,6-bisfosfato a través de la enzima fosfofructoquinasa. Posteriormente, en presencia de agua reacciona y se desfosforila formando fructosa-6-fosfato, que es isomerizada a glucosa-6-fosfato a través de la fosfoglucoisomerasa, la glucosa-6-fosfato no puede convertirse en glucosa por la acción inversa de la hexoquinasa o de la glucoquinasa, por lo que entra en su lugar la glucosa-6-fosfatasa y da origen a glucosa-6-fosfato que al unirse con agua forma glucosa y un fosfato (Mathews *et al.*, 2002).

Muchos aminoácidos pueden convertirse con facilidad en glucosa a través de rutas de degradación que generan intermediarios del ciclo del ácido cítrico, que pueden convertirse en oxalacetato. Durante el ayuno, cuando la cantidad de hidratos de carbono ingerida es insuficiente, el catabolismo de las proteínas musculares funge como principal fuente de mantenimiento de las concentraciones de glucosa en sangre.

Durante el catabolismo de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol, los ácidos grasos se convierten en acetil-CoA a través de la  $\beta$ -oxidación. En los animales el acetil-CoA no puede convertirse en piruvato ni en ningún otro precursor, por lo que los lípidos son malos precursores gluconeogénicos. El único producto de la degradación de las grasas que puede entrar en la gluconeogénesis es el glicerol, que se fosforila para formar glicerol-3-fosfato (G3P) seguida de una deshidrogenación para producir dihidroxiacetona fosfato y por último genera fructosa-1,6-bisfosfato

## **2.5 Composición de la microflora intestinal**

La flora microbiana intestinal de los humanos representa un ecosistema con un amplio número de microorganismos metabólicamente activos, que juegan un papel importante sobre la salud del hospedero (Mitsuoka, 1990).

Diversas investigaciones han demostrado que el tracto gastrointestinal del humano está poblado por aproximadamente 100 trillones de bacterias divididas en



15 diferentes géneros que incluyen de 70 a 80 especies, incluso algunos pueden presentar hasta 100 especies (Mitsuoka, 1996), incluyendo tanto aerobias como anaerobias. El contenido intestinal de un recién nacido es eliminado dentro de los dos primeros días después del parto, comienza a colonizarse progresivamente por enterobacterias como *Escherichia coli*, *Streptococos* y *Clostridium*. En el tercer día, aparecen especies de los *Bacteroides* y *Bifidobacterium* procedentes de la leche materna. En el cuarto día las bifidobacterias se vuelven predominantes con cifras de  $10^{10}$  y  $10^{11}$  unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) de excremento, esto hace que microorganismos como *Clostridium*, bacteroides, enterobacterias y estafilococos disminuyan (Mitsuoka, 1975).

Durante el destete del infante, cuando comienza a consumir una ración normal para adulto, la flora bacteriana cambia, las bifidobacterias disminuyen a  $10^9$  UFC/g, y el número de bacteriodes, eubacterias y frecuentemente *Clostridium* aumentan (Torres, 2002).

En personas adultas, las bifidobacterias disminuyen y otras como *C. perfringens* aumentan significativamente de  $10^3$  hasta  $10^6$  UFC/g, así como también las del género *Streptococcus* se incrementan de  $10^6$  a  $10^9$  UFC/g, este fenómeno se debe al resultado del envejecimiento, pero además puede acelerar la senectud (Torres, 2002).

Aun cuando la composición de la flora intestinal es estable en individuos sanos, se puede alterar por varios factores endógenos y exógenos, como los desórdenes peristálticos, cáncer, operaciones del estómago o intestino delgado, enfermedades del hígado o riñón, anemia perniciosa, terapia por radiaciones, estrés emocional, administración de antibióticos y envejecimiento (Mitsuoka, 1992; Mitsuoka, 1996).

Factores como la ración alimenticia influyen de manera significativa sobre el equilibrio de la flora intestinal, el consumo de cantidades excesivas de grasa promueve la secreción de ácido biliar y colesterol en el intestino, esto, a su vez

concentra ciertos ácidos secundarios secretados por las bacterias patógenas que están relacionados con efectos carcinógenos (Mitsuoka, 1983).

Existen evidencias de la relación entre el balance de la flora intestinal con la salud del hospedero y las enfermedades. El incremento de bacterias patógenas en el intestino promueve desórdenes como enfermedades del hígado, riñón, arterosclerosis, hipertensión, cáncer y envejecimiento (Mitsuoka, 1983).

Como muchas bacterias que habitan en el intestino de mamíferos, las bifidobacterias y lactobacilos son sacarolíticos, es decir, obtienen energía a través de la fermentación de carbohidratos no digeribles y compiten por alimento con otras bacterias potencialmente patógenas (Scardovi, 1986; Servin, 2004).

Estudios *in vitro* realizados por Pompei *et al.* (2008), analizaron el efecto prebiótico de fructanos tipo inulina altamente soluble y de un fructooligosacárido en muestras fecales humanas. Ellos observaron un incremento significativo de las poblaciones de *Bifidobacterium* y de *Lactobacillus* con ambas fuentes de carbono, en comparación con el tratamiento al que no se le adicionó algún tipo de fructano.

### **2.5.1 Fermentación de fructanos**

La fermentación de fibras dietéticas no digeribles (fructanos) en el colon, es el resultado de una actividad metabólica compleja que parece depender de la estructura del carbohidrato, del grado de polimerización y de las bacterias prebióticas presentes en el colon (Van der Meulen *et al.*, 2004 y 2006; Falony *et al.*, 2006). Este proceso es fundamental para el mantenimiento y el desarrollo de la flora bacteriana, así como de las células epiteliales. Como resultado de esta fermentación bacteriana, se produce hidrógeno, dióxido de carbono, metano y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el ácido acético, propiónico y butírico, en una proporción molar casi constante 60:25:20, (Figura 2) (Titgemeyer *et al.*, 1991; Miller and Wolin, 1979; Fernández-Bañares y Gassul, 1992). La caída de pH en el colon, causada por la fermentación de fructanos, se debe a la acumulación de AGCC, lo que disminuye la solubilidad de ácidos biliares libres,

que además, puede disminuir la concentración de ácidos biliares secundarios, produciéndose un efecto positivo, ya que éstos últimos están involucrados en la aparición de carcinogénesis en el colon (Pool-Zobel *et al.*, 2002; Grubben *et al.*, 2005). Diversos estudios han demostrado que el orden de utilización de los AGCC por el colonocito es butirato > acetato > propionato (Roediger, 1982).

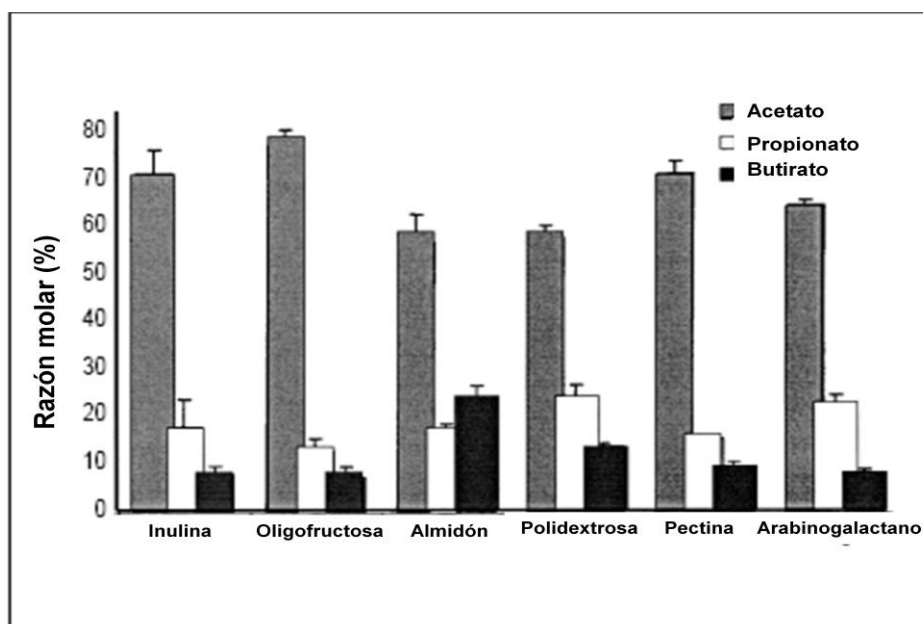


Figura 2. Producción de ácidos grasos de cadena corta con distintas fuentes de carbono (Wang and Gibson, 1993).

### 2.5.1.1 Importancia del ácido propiónico

El propionato es el inhibidor competitivo de la proteína encargada de la entrada de acetato a la célula hepática, fenómeno que contribuye a la disminución de la lipogénesis y colesterogénesis (Macfarlane y Macfarlane, 2003). Durante el proceso de fermentación de los prebióticos, la producción del cociente acetato-propionato es un marcador que puede ser usado como predictor de las propiedades hipolipemiantes (Marti del Moral *et al.*, 2003).

### **2.5.1.2 Importancia del ácido butírico**

El butirato y los otros AGCC contribuyen en un 80% a los requerimientos energéticos de los colonocitos (células epiteliales del intestino). Aproximadamente el 90% del butirato y entre el 10 y el 50% del propionato son metabolizados por la mucosa del colon. El remanente del propionato y el acetato consiguen llegar hasta el hígado (García *et al.*, 2002). Además, el ácido butírico puede ejercer una actividad antiproliferativa en muchos tipos de células. Algunos estudios en animales y en líneas celulares, han demostrado el efecto preventivo del butirato sobre cáncer de colon y desarrollo de adenoma (Bornet *et al.*, 2002).

### **2.5.1.3 Importancia del ácido acético**

El ácido acético es el principal ácido graso de cadena corta en el colon, una vez producido, es rápidamente absorbido y transportado al hígado, donde cumple varias funciones. La presencia de acetil-coenzima A sintetasa citosólica en los hepatocitos permite la incorporación del acetato en los procesos de colesterogénesis y lipogénesis. En humanos, el acetato es usado para monitorizar eventos del colon debido a que es el ácido graso más abundante en la sangre. También es precursor de la síntesis de colesterol, este hecho se ha propuesto como la base del efecto hipercolesterolemiante de algunos carbohidratos no digeribles (Jenkins *et al.*, 1991). Actualmente, las técnicas moleculares han permitido aislar bacterias del intestino humano, entre los microorganismos más importantes se encuentran *Roseburia intestinalis* y *Anaerostipes caccae*, capaces de transformar el acetato en butirato en el colon (Duncan *et al.*, 2002; Falony *et al.*, 2006).

### **3.0 Justificación**

Debido a que se ha demostrado que los fructanos de *C. intybus* y *H. tuberosus* tienen un efecto prebiótico sobre las bacterias benéficas del intestino, se pretende verificar si los fructanos de maguey tienen el mismo efecto, en dos modelos animales (obesos y diabéticos) sin causar efectos indeseables en el metabolismo de grasas y carbohidratos.

## **4.0 Materiales y métodos**

### **Modelo animal y ración de alimento**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 140 y 160 g, adquiridas en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Cada animal constituyó una unidad experimental, se mantuvieron en cajas de acrílico individuales en una habitación con condiciones de temperatura y humedad controladas y con un ciclo de luz oscuridad invertido de 12/12. Los animales se mantuvieron en un periodo adaptación de 5 días antes de comenzar el experimento, fueron alimentados con una ración estándar para roedores (Rodent Laboratory Chow 5001, Agribands Purina, México) y agua *ad libitum*. Y se mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones éticas de la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### **Inducción de la obesidad**

Los animales se mantuvieron durante una semana como período de adaptación, se les proporcionó una ración de alimento estándar (Rodent Laboratory Chow 5001, Agribands Purina, México) suplementada con 10% aceite de coco (Alquimia mexicana S.A. de C.V.), 15% fructosa y agua *ad libitum*, cuando los animales alcanzaron un peso superior a 400 g se consideraron obesos.

### **Inducción experimental de la diabetes**

El estado hiperglucémico de las ratas se indujo con el fármaco Estreptozotocina (STZ) (Sigma SO130, St. Louis, MO, USA) disuelta en solución amortiguadora de citrato de sodio 0.01 M a un pH de 4.5. La STZ es un antibiótico usado en animales de experimentación (Áreas, 2003); induce la expresión de citocinas en los islotes pancreáticos provocando la muerte de las células  $\beta$  por apoptosis a través de la formación de radicales libres y óxido nítrico (Turk *et al.*,

1993). Para llevar a cabo la inducción a la diabetes, se dejaron a los animales en ayuno por 12 h, se administró una dosis única de 40 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal, al tercer día de haber administrado el antibiótico, se tomaron muestras de sangre de la vena caudal, para evaluar el estado de salud con un glucómetro portátil (Ascencia Elite, Bayer, Francia). Se consideraron los individuos diabéticos si las concentraciones de glucosa sanguínea después de 12 h de ayuno eran superiores a 250 mg/dL. Para mantener la concentración de glucosa sanguínea entre 250 y 350 mg/dL y simular así el estado metabólico de un enfermo de DM II sin control terapéutico, se administraron dos dosis diarias (mañana y tarde) de insulina de acción intermedia (Eli Lilly HI-310 NPH, México). Las dosis administradas fueron de una a tres unidades por vía subcutánea, durante el periodo que duró el experimento (cinco semanas).

Se tuvieron 16 tratamientos divididos en dos condiciones corporales (obesos y no obesos) y dos estados de salud (diabéticos y no diabéticos), suplementados con a) *C. intybus*, b) *H. tuberosus*, c) *A. tequilana* y d) sin fructanos, 6 individuos por tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos distribuidos según la condición corporal y el estado de salud

Tratamientos		
Estado de salud	Alimentación	Fructanos 15 %
<b>Obesos sin/ con diabetes</b> <b>Peso ≥ 400 g</b>	Ración estándar para roedores Rodent Laboratory Chow 5001 + 10% aceite de coco + 15% fructosa Contenido calórico = 140.2 Kcal = 586.85 KJ	Sin fructanos
		<i>C. intybus</i>
		<i>A.angustifolia</i>
		<i>H. tuberosus</i>
<b>No obesos sin/con diabetes. Peso ≥ 300</b>	Ración estándar para roedores Rodent Laboratory Chow 5001 Contenido calórico = 93.5 Kcal = 391.34 KJ	Sin fructanos
		<i>C. intybus</i>
		<i>A.angustifolia</i>
		<i>H. tuberosus</i>

### Elección de la dosis

Con el propósito de elegir la dosis óptima de suplemento de fructanos de *A. angustifolia*, *C. intybus* y *H. tuberosus*, en términos de la relación biológica de animales sanos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos, se

realizó un ensayo exploratorio en base en la variación del peso corporal, que consistió en utilizar 16 ratas con peso  $\geq 400$  g divididas en cuatro tratamientos, suplementadas con fructanos de *C. intybus* (0.0, 5.0, 10.0 y 15.0 %) mezclados en el alimento. Se escogió este fructano por que es el más documentado, ha sido evaluado en ratas Wistar en dosis entre 9 y 10% y se ha observado a estas dosis, la capacidad de los fructanos de regular el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Delzenne *et al.*,2002, 2007; Reimer y Russell, 2008). Posteriormente, se registró el consumo diario de alimento, así como, el peso corporal de los animales cada semana, durante un periodo de 4 semanas y se analizó la variación del peso.

$$\text{Porcentaje de variación de PC} = \frac{(\text{PCf} - \text{PCo})}{\text{PCo}} * 100$$

Donde:

PC es el peso corporal promedio.

PCf es el peso corporal promedio final.

PCo es el peso corporal promedio inicial.

$$\text{Porcentaje de disminución de CA} = \frac{(\text{CAf} - \text{CAo})}{\text{CAo}} * 100$$

Donde:

CA es el consumo alimentario promedio.

CAf es el consumo alimentario promedio final.

CAo es el consumo alimentario promedio inicial.



## **Parámetros bioquímicos**

### **Muestras sanguíneas**

Las muestras de sangre fueron tomadas una vez por semana de la vena caudal de las ratas, y se recolectaron en tubos microtainer con separador de gel 600 – 800  $\mu$ L(BD), se dejaron reposar por 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, se separó el suero y se congeló a  $-20^{\circ}$  C. Posteriormente se midió glucosa, colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), usando kits de reacción enzimática (Elitech, Bruselas, Bélgica) empleando un espectrofotómetro (RA50, BAYER).

### **Glucosa**

Para realizar la prueba de glucosa sérica se siguió el método de la glucosa oxidasa, el cual consiste en que por medio de la enzima glucosa oxidasa, la glucosa se convierte en un ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de peroxidasa oxida el cromógeno (4-aminoantipirina/fenol), formando un compuesto de color rojo lo que permite su medición espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm (Trinder, 1969; Burrin y Price, 1985).

### **Colesterol total**

La medición de colesterol total se basó en el método de colesterol éster hidrolasa; los ésteres de colesterol se hidrolizan por acción la enzima colesterol éster hidrolasa para liberar colesterol y ácidos grasos. El colesterol libre existente junto con el producido por esta reacción se oxida por la acción de colesterol oxidasa en  $\Delta$ 4-colestenona y peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida al cromógeno (4-aminoantipirina/fenol), formando un compuesto de color rojo, con el que se analiza la concentración de colesterol a

través de espectrofotometría a una longitud de onda de 500 nm (Allain *et al.*, 1974).

### **Triglicéridos**

En la reacción, los triglicéridos son primeramente hidrolizados mediante la enzima lipasa para generar glicerol y ácidos grasos. El glicerol es oxidado por la glicerol fosfato oxidasa, produciéndose dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa cataliza el acoplamiento del peróxido de hidrógeno con 4 – aminoantipirina y sodio N-etil-N-3 sulfopropil m-anisidina para producir una quinoneimina. El color rosa producido por la quinoneimina se lee a 500 nm, el incremento del color es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra.

### **Lipoproteínas de alta densidad HDL**

Para llevar a cabo esta prueba se usó el método de inmunoinhibición directo, donde el anticuerpo anti $\beta$ -lipoproteína humana se une a las lipoproteínas (LDL, VLDL y quilomicrones) distintas de las HDL. Al añadir el reactivo enzimático (colesterol esterasa y colesterol oxidasa), los complejos antígeno-anticuerpo bloquean las reacciones enzimáticas con colesterol HDL y dan como resultado un complejo de color azul debido a la condensación oxidativa de F-DAOS [(N-etil-N-(2-hidroxi-3—sulfopropilo)-3,5-dimetoxi-4-fruroanilina], sal de sodio y 4-animoantipirina (4-AA) en presencia de peroxidasa. La absorción del complejo de color azul se mide a una longitud de onda de 620 nm (Burtis y Ashwood, 1994; Gordon *et al.*, 1977; Grundy, 1993; Rifai y Warnick, 1994).

## **Diseño experimental**

El diseño experimental para el análisis de la variación del peso corporal, fue con asignación de tratamientos completamente al azar, con una comparación de medias de Tukey. Para los resultados del análisis bioquímico, el diseño experimental fue con asignación de tratamientos completamente al azar y una comparación de mínimos cuadrados con el procedimiento LSMEANS, además, se hicieron pruebas de normalidad con el paquete estadístico SAS (1999).

El periodo del experimento fue de cinco semanas durante las cuales los suplementos se suministraron por vía oral en mezcla con el alimento, una vez iniciado el experimento, semanalmente se extrajo una muestra de sangre de la vena caudal. Dichas muestras se procesaron para realizar la evaluación del efecto de los tratamientos sobre parámetros bioquímicos que se alteran normalmente durante un estado de diabetes como de hiperglucemia e hiperlipidemia.

## **Análisis de presencia y abundancia de los géneros *Clostridium*, *Escherichia*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en heces fecales de ratas**

### **Preparación de los medios**

Para la detección de los géneros patógenos se usaron medios selectivos: para *Clostridium* se utilizó el agar Reinforced Clostridial medium (RCM, Difco) y para *Escherichia* Eosina y Azul de Metileno (EMB, Bioxon).

Para la identificación de los géneros benéficos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se siguió la técnica propuesta por Su *et al.*, (2007). Para analizar el crecimiento de *Lactobacillus* se utilizó agar Man–Rogosa–Sharpe (MRS, Difco) con un pH de 5.0 y adicionando de 2% (p/v) de verde de bromocresol (Sigma Aldrich, UK), para asegurar únicamente el crecimiento de esta bacteria se adicionó una solución de clindamicina al 1.0% p/v disuelta en agua destilada esterilizada. Para *Bifidobacterium* se usó agar RCM adicionado con azul de anilina (Sigma,

Aldrich) a una concentración de  $0.09 \text{ gL}^{-1}$ , posteriormente se le agregó ácido propiónico (Analytica) 3% v/v y el pH fue ajustado a 5.0.

Una vez preparados todos los medios, éstos se vertieron en placas de tres divisiones y se dejaron a prueba de esterilidad por 24 h a  $35^{\circ}\text{C}$ .

### Preparación de las diluciones

Se siguió la técnica de Miles y Misra (1938), que consiste en tomar un gramo de heces fecales antes de iniciar la administración de los tratamientos y al final del experimento. La muestra se disuelve en 9.0 mL de solución de peptona de caseína (Merck) al 0.1% y se hacen diluciones de  $10^1$  hasta  $10^9$ , en cada una las divisiones de la placa se asignó una dilución (tres placas por medio), se tomaron muestras de  $20 \mu\text{L}$  y se inoculó en la división correspondiente (Figura 3). De cada dilución se hicieron tres replicas.

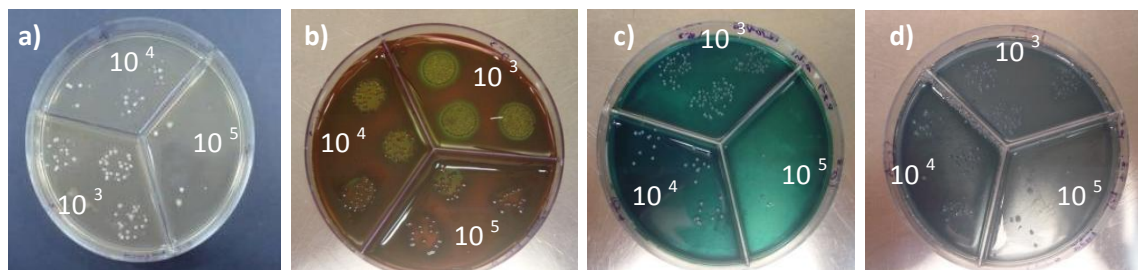


Figura 3. Inoculación de los medios a) RCM, b) EMB, c) MRS+verde, d) RCM+azul

Una vez inoculados, los medios RCM sin colorante, MRS+verde de bromocresol y RCM+azul de anilina, se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones de anaerobiosis durante 72 h. El agar EMB se incubó por 24 h a  $35^{\circ}\text{C}$  en condición de aerobiosis. Al término del periodo de incubación, se contaron las colonias de cada género en su respectivo medio, en la división de la placa que mejor posibilidad de lectura mostraba.

## **Histología de hígado**

Al final del experimento, se sacrificaron los animales administrando por vía intraperitoneal una sobredosis de pentobarbital sódico, posteriormente las ratas fueron perfundidas vía intracardiaca con 50 mL de solución fisiológica y 50 mL de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (Sigma, Aldrich), luego se extrajo una sección de hígado, que después se procesó con la técnica habitual para microscopía óptica, se incluyó en parafina y se hicieron cortes de 5.0  $\mu\text{m}$  de espesor. Se tiñeron con hematoxilina-eosina se observaron en un microscopio óptico (Olympus Cx31 Model CX31RTSF), para observar el efecto de los fructanos, sobre la acumulación de lípidos en hígados de ratas (figura 4). Para la interpretación de los resultados se siguieron los siguientes criterios:

**Esteatosis grado I (zona 1)**, ligera con menos de 33% de los lobulillos afectados, Inflamación portal: ausente o ligero

**Esteatosis grado II (zona 2)**, menos del 66% de los lobulillos se ven afectados) en donde se presenta una inflamación de los lobulillos, puede haber ligera inflamación crónica e inflamación portal: ligera o moderada. Donde hay un exceso de la captación de triglicéridos y las entradas son mayores que las salidas.

**Esteatosis grado III (zona 3)**, severa, más del 66% de los lobulillos están afectados con inflamación aguda y crónica, generalmente es de tipo mixto (macro y microvesicular); fibrosis, Inflamación portal: ligera o moderada (Cohen *et al.*,1997).

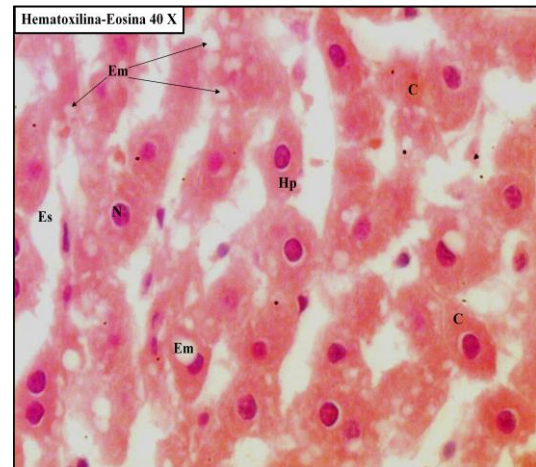
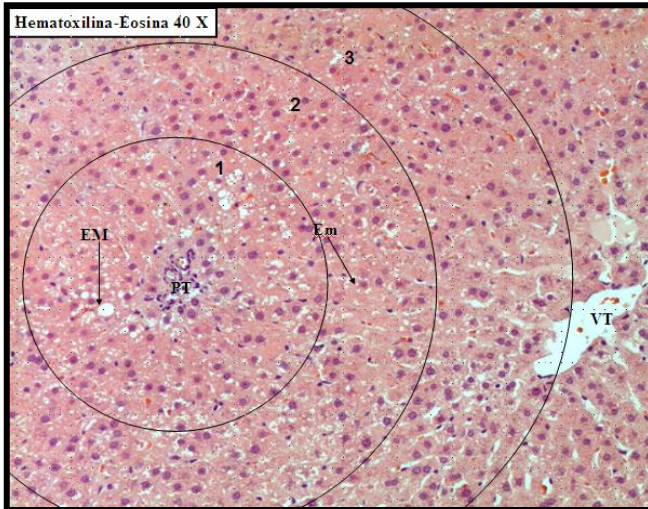


Figura 4. Fotografía del corte histológico de hígado: **EM** = esteatosis macrovesicular, **Em** = esteatosis microvesicular, **PT** = triada portal, **VT** = Vena porta, **1,2 y 3** = Zonas, **Hp** = Hepatocito, **N** = núcleo, **Es** = Espacio sinusoidal. (Foto, Dra. María Guadalupe Cruz Rubio, 2009)

## 5.0 Resultados y discusión

### Elección de la dosis

En lo que corresponde a la primera fase de este experimento, sobre la dosis de fructanos a utilizar con respecto a la variación de peso en ratas obesas, no hubo efecto de los tratamientos sobre la variación del peso corporal de los animales. Se eligió la dosis de 15.0% debido a que fue donde se observó una tendencia en la disminución del peso (Figura 5).

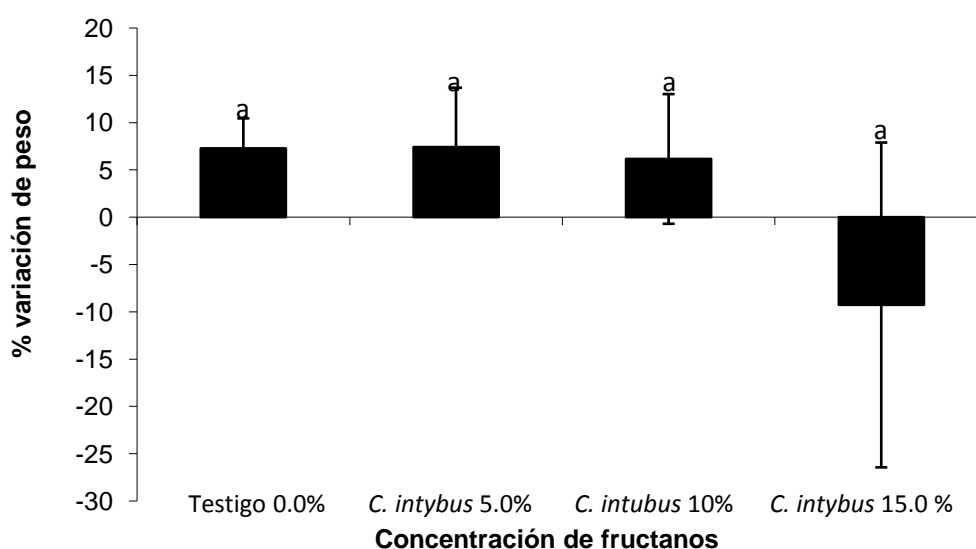


Figura 5. Ensayo de elección de la dosis con respecto a la variación del peso corporal

En lo que respecta a la segunda fase experimental, se comparó el efecto de los fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia* sobre la ganancia de peso, las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL (n=6). Las mediciones se realizaron semanalmente, pero para propósito de esta tesis solo se presentaron los datos iniciales y finales del período que duró el experimento (cinco semanas). Además, se evaluó el efecto sobre la flora bacteriana benéfica (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) y patógena (*Clostridium* y

*Escherichia*) en individuos obesos sanos, obesos diabéticos, no obesos sanos y no obesos diabéticos. Y por último se realizó un estudio de esteatosis hepática.

### **Variación del peso corporal**

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (Cuadro 2), en los tratamientos obesos sanos y diabéticos, no se observó diferencia significativa en la ganancia de peso (Figura 6), posiblemente porque la ración con que se alimentó a los animales era hipercalórica (140.2 Kcal). Kun-Han *et al.* (2000), evaluaron el efecto de una ración rica en grasas, suplementada con fructanos tipo inulina en las concentraciones de 0.0, 0.5 y 1.0% sobre el metabolismo energético de ratones hembra adultas de la cepa ICR, y ratas adultas de la cepa Wistar, y al igual que en este estudio, tampoco observaron diferencias en la variación del peso corporal, en todas las ratas se presentó un incremento de peso. En lo que respecta a los animales no obesos, la variación del peso corporal fue estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ), pero dependió básicamente de la fuente de fructanos, observándose el menor incremento de peso corporal en los animales suplementados con fructanos de *C. intybus* y *A. angustifolia*, con ganancia de peso de 27.0 y 29.0 g respectivamente (Figura 7). La interacción fuente de fructanos por estado de salud fue altamente significativa ( $p < 0.0005$ ), pero en dependencia de la fuente de fructanos. En los animales no obesos diabéticos, no se presentó efecto de los tratamientos sobre la disminución del peso, los resultados concuerdan con los obtenidos por Cani *et al.*, (2004), que al estudiar el efecto de fructanos tipo inulina al 10.0%, sobre la regulación del apetito y cambio de peso corporal de ratas jóvenes de la cepa Wistar, con un período experimental de 4 semanas, observaron que en todos los animales se incrementó el peso en la misma proporción, esto probablemente debido a la edad de las ratas que continuaron creciendo hasta la etapa adulta. La condición corporal en individuos no obesos diabéticos se mantiene en equilibrio, lo que es positivo, ya que normalmente en individuos diabéticos se presenta una tendencia a disminuir de



peso corporal debido a que se ven afectadas las reservas de proteínas (Mathews *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo publicado por Reimer y Russell (2008), donde ensayaron el efecto cuatro raciones: 1) sin fructanos, 2) alta en fibra “inulina 9.0%”, 3) alta en proteína, 4) combinación de 2) y 3), sobre ratas obesas y no obesas, el experimento duró tres semanas. Observaron que todos los tratamientos provocaban un aumento de peso.

**Cuadro 2.** Cuadrados medio y resultados de la prueba de F de la variación de peso, para los animales obesos (sanos y diabéticos) y no obesos (sanos y diabéticos), suplementados con fructanos.

<b>Fuente variación</b>	<b>G.L.</b>	<b>Obesos</b>	<b>No obesos</b>
Fuente de fructanos	3	288.50	1119.23**
Estado salud	1	26.80	431.54
Fuente de fructanos x estado de salud	3	543.55	1724.62***
Error	31	369.72	224.60
C.V. %		169.27	33.39

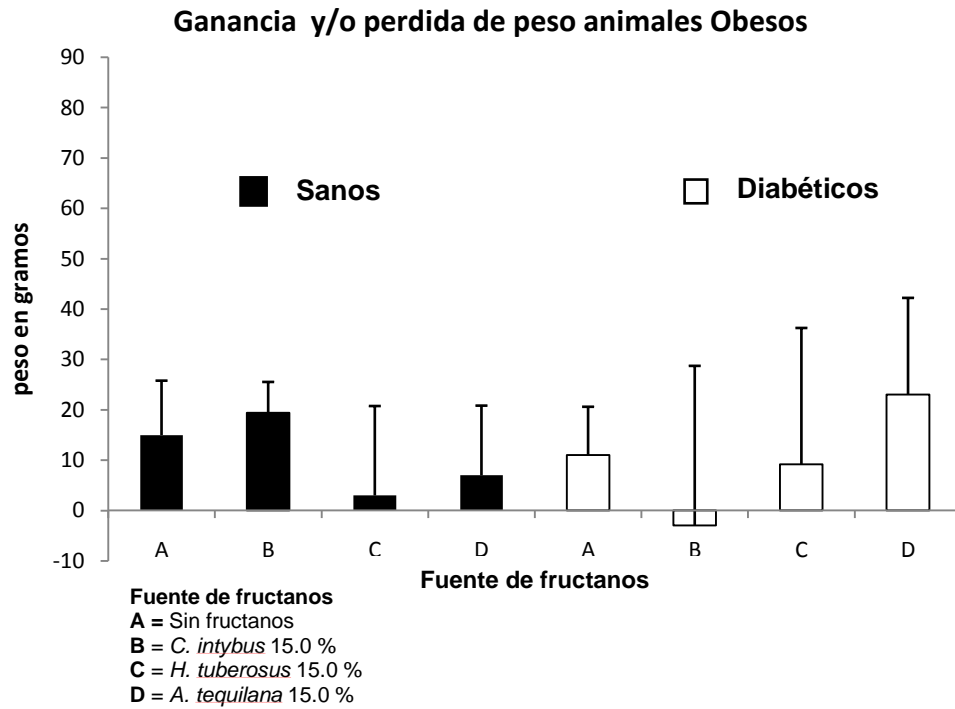


Figura 6. Variación del peso corporal en los tratamientos obesos (sanos y diabéticos)

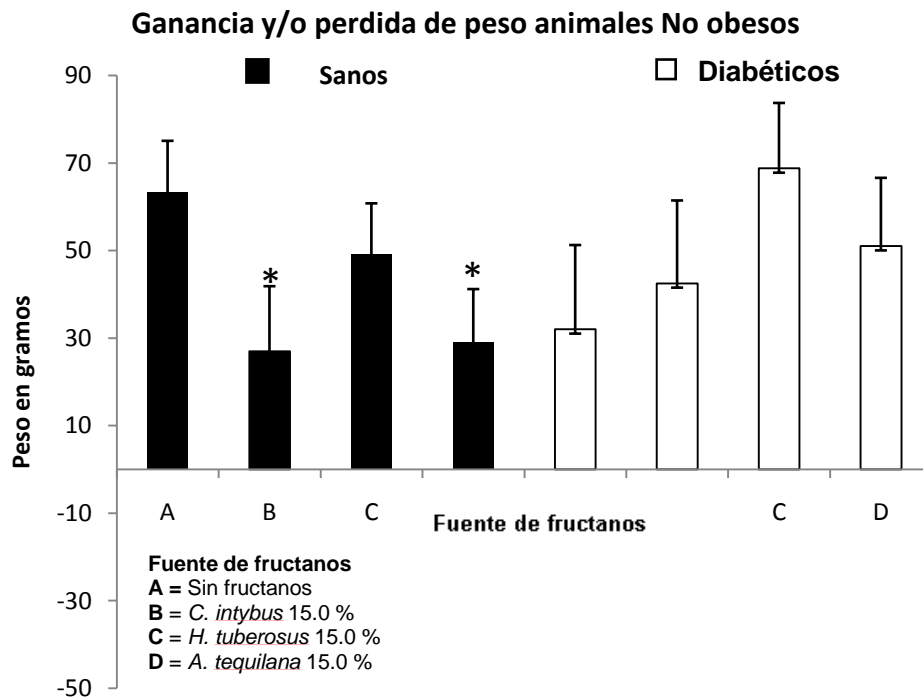


Figura 7. Variación del peso corporal en los tratamientos no obesos (sanos y diabéticos)

## Parámetros bioquímicos

### Glucosa y perfil lipídico

Debido a que las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL, se alteran durante el desarrollo de DM, y que ello permite en breve conocer el estado metabólico del paciente, solo para estos parámetros se practicaron los análisis de variación. En el Cuadro 3 se muestran los cuadrados medios y los resultados de la prueba de F correspondiente.

Cuadro 3. Cuadrados medios y resultados de la prueba de F para la concentración (mg/mL) de compuestos en sangre de ratas obesas sanas y diabéticas) y ratas no obesas (sanas y diabéticas) suplementados con fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia*.

<b>Ratas obesas</b>						
<b>Fuente de variación</b>	<b>G.L.</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Colesterol</b>	<b>Triglicéridos</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>
Fuente de fructanos	3	579.71	76.97	19.71	42.50	108.00*
Tiempo	1	1518.78*	4408.33***	215.04	3710.08***	56.33
Error	35	356.39	180.65	350.47	106.64	34.82
C.V.		17.53	16.57	18.71	18.83	22.46
<b>Ratas obesas diabéticas</b>						
Fuente de fructanos	3	11307.33	136.92	514.61	283.60	652.79*
Tiempo	1	367.43	4680.75***	462.04	816.60*	2507.15**
Error	35	5325.96	166.88	344.61	278.12	196.56
C.V.		22.26	15.93	19.33	29.08	36.26
<b>Ratas no obesas</b>						
Fuente de fructanos	3	242.46	20.37	987.77*	70.55	117.89
Tiempo	1	94.21	5238.80***	1944.99*	1525.89	1110.90***
Error	35	297.20	146.48	320.58	92.64	58.80
C.V.		16.28	15.4	18.52	19.03	27.28
<b>Ratas no obesas diabéticas</b>						
Fuente de fructanos	3	8356.34	309.50	4158.43*	67.24	162.70
Tiempo	1	137147.97***	1399.54**	2315.68*	189.39*	578.76*
Error	35	7541.66	145.71	1105.72	48.00	103.56
C.V.		38.35	14.12	27.73	19.77	20.13

## Glucosa

Los resultados obtenidos revelan que el consumo de fructanos, reduce de manera significativa ( $p < 0.01$ ) la concentración de glucosa en ratas obesas (Figura 8), donde los tratamientos suplementados con fructanos de *C. intybus* y *A. angustifolia* presentaron el mayor efecto, logrando reducir la glucosa sanguínea de 101.8 y 124.71 mg/dL hasta 95.67 y 89.28 mg/dL (6.0 y 28.4%) respectivamente, lo que reduce el riesgo de padecer DM. De acuerdo con Delzenne *et al.* (2002), posiblemente este fenómeno se debió a que se produjo una mayor cantidad de insulina, provocando un mejor uso de la glucosa. Nuestros resultados concuerdan con los de Huazano y López (2009), donde analizaron el efecto de fructanos tipo inulina (Raftiline) y de *A. angustifolia* al 10%, sobre el metabolismo de carbohidratos de ratones adultos, observaron que los niveles de glucosa disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) con respecto al testigo en un 11.0 y 12.0 % respectivamente.

En lo que respecta a los individuos obesos diabéticos, la concentración de glucosa no disminuyó, probablemente debido al desorden metabólico que comúnmente se presenta en pacientes diabéticos que consumen alimentos ricos en energía. En los animales no obesos tampoco hubo efecto del tratamiento, lo que era de esperarse, ya que estos, desde el inicio presentaron concentraciones de glucosa normales por debajo de 100 mg/dL, además de que la ración que recibieron no era hipercalórica, esto parece no ser importante, sin embargo, se ve que en individuos sanos con una ración normal, suplementada con fructanos no se altera este parámetro. Por último, en los animales no obesos diabéticos, se presentaron diferencias altamente significativas con respecto al tiempo ( $p < 0.0001$ ), los animales suplementados con fructanos de *A. angustifolia* y *H. tuberosus*, que inicialmente tenían concentraciones de glucosa de más de 300mg/dL se redujeron hasta 145.66 y 166.50 mg/dL respectivamente. El alimento que se suministró a los animales era el normal, por lo que la disminución de los niveles de glucosa pueden atribuirse a los fructanos.

## **Colesterol**

Las concentraciones de colesterol en individuos obesos, al inicio y al final del experimento fueron diferentes ( $p < 0.0001$ ), se observó un incremento en todos los tratamientos (Figura 9), cabe mencionar, que los valores estaban dentro de los deseables ( $< 200$  mg/dL), lo que indica, que a pesar de la obesidad, el consumo de fructanos disminuye el riesgo de presentar una enfermedad cardiovascular como la arterosclerosis.

En lo que respecta a individuos obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos y el tiempo, pero al igual, los niveles de colesterol están dentro de la amplitud de colesterol deseable, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Han *et al.* (2000), donde evaluaron el efecto de fructanos tipo inulina 0.5 y 1.0%, extraídos de *Platycodi radix* sobre el perfil lipídico de ratones adultos, de igual manera, no observaron efecto del tratamiento sobre las concentraciones de colesterol y triglicéridos. Nuevamente, cotejando los resultados de este trabajo con los de Huazano y López (2009), donde describen que los fructanos de raftiline y de *A. angustifolia*, sí disminuyen los niveles de colesterol de ratones jóvenes en un 39.33 y 43.11 % respectivamente, siendo estos iguales estadísticamente, pero diferentes al tratamiento sin fructanos, pero no concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación. Cabe mencionar, que en ese trabajo, los animales no se colocaron en jaulas individuales, por lo que el consumo de alimento no fue cuantificado por individuo, además de que les colocaron algunos juguetes para disminuir la agresividad de algunos individuos.

## **Triglicéridos**

En lo que respecta a los triglicéridos (Figura 10), en los individuos obesos no hubo efecto de los fructanos y el tiempo, la concentración promedio fue de 100 mg/dL, que de manera positiva está dentro de los valores deseables ( $< 150$  mg/dL), en cuanto a individuos no obesos, tampoco hubo diferencias significativas

de los tratamientos con respecto al tiempo. En el caso de las ratas obesas diabéticas, se observó una disminución significativa con respecto al tiempo ( $p < 0.05$ ), ya que al inicio del experimento la concentración de triglicéridos era mayor a 200 mg/dL, y al término del experimento, en los animales suplementados con fructanos de *A. angustifolia* el nivel de triglicéridos disminuyó a 168.2 mg/dL. En lo que respecta a animales no obesos no hubo efecto de los tratamientos sobre la concentración de triglicéridos, haciendo una comparación de los resultados obtenidos en este trabajo, con los de Huazano y López (2009), ellos mencionan que los fructanos de raftiline y de *A. angustifolia* presentaron un decremento de triglicéridos de 27.0 y 23.0% respectivamente, lo que no concuerda con los observados en este trabajo y posiblemente se deba al metabolismo de los animales que usaron en su modelo.

Por último, los fructanos de *H. tuberosus*, *A. angustifolia* y *C. intybus*, también redujeron la concentración de triglicéridos en animales no obesos diabéticos de 109.4, 125.83 y 181.83 hasta 94.00, 100.83 y 110.66 mg/dL respectivamente, sin posibles riesgos de enfermedades coronarias. En contraste con el estudio de Han *et al.* (2000), ellos evaluaron el efecto de fructanos tipo inulina 0.5 y 1.0%, extraídos de *Platycodi radix* sobre el perfil lipídico de ratones adultos y no encontraron diferencias significativas en las concentraciones de colesterol y triglicéridos, y solo concuerdan sus resultados con los obtenidos en este experimento con el parámetro de colesterol, posiblemente no observaron un efecto de los fructanos sobre el metabolismo de lípidos, por la baja concentración que utilizaron de fructanos tipo inulina.

## **HDL**

En lo que se refiere a HDL (Figura 11), en individuos obesos, se observó un incremento en el tiempo ( $p \geq 0.001$ ), los fructanos de *C. intybus* y *A. angustifolia*, mostraron el mayor incremento de HDL (64.16 y 71.00 mg/dL respectivamente), este incremento es importante, ya que la función del colesterol HDL es arrastrar el

exceso de colesterol de los tejidos y devolverlo al hígado para posteriormente metabolizarlo o excretarlo, evitando así que se formen placas ateroscleróticas (Mathews *et al.*, 2002). En animales obesos diabéticos, las concentraciones de HDL disminuyeron, lo cual se le puede atribuir al desorden metabólico normal en esta enfermedad. En las ratas no obesas, no hubo efecto del tratamiento, aunque se observa una tendencia a disminuir con el consumo de fructanos de *H. tuberosus*, *C. intybus* y *A. angustifolia* (41.0, 42.0 y 46.0 mg/dL respectivamente), cabe mencionar, que estos valores se encuentran dentro de la amplitud normal que oscila entre 40.0 – 59.0 mg/dL. Por último, en los animales no obesos diabéticos se observó diferencia significativa en dependencia del tiempo, con disminución de los niveles de HDL, los cuales ya estaban disminuidos (abajo de 40.0 mg/dL) antes de iniciar el experimento. También atribuible al desorden metabólico ocasionado por la diabetes, lo que, puede incrementar el riesgo de contraer una enfermedad cardíaca.

## **LDL**

En animales obesos, no se presentó efecto de los tratamientos (Figura 12), aunque es importante mencionar que las distintas fuentes de fructanos no favorecen el incremento de la concentración de LDL. Lo mismo ocurrió con los individuos obesos diabéticos, en donde los niveles no sobrepasaron el valor límite óptimo, en este estado de salud se observó que todos los fructanos incrementaron la concentración de LDL, al final del experimento se obtuvieron los siguientes resultados 39.00, 3.66 y 69.75 para *A. angustifolia*, *H. tuberosus* y *C. intybus* respectivamente. Cabe destacar que los fructanos de *A. angustifolia*, provocaron el menor incremento de LDL.

En los individuos no obesos, también se hubo diferencia significativa con respecto al tiempo, los fructanos de *A. angustifolia*, *H. tuberosus* y *C. intybus* provocaron disminución en las concentraciones de LDL (23.5, 24.42 y 24.66 mg/dL

respectivamente), estas lipoproteínas se adhieren a las paredes arteriales produciendo efectos nocivos como padecer una enfermedad coronaria.

En el caso de los individuos no obesos diabéticos, también presentó diferencia significativa en el tiempo ( $p < 0.01$ ), se observó una disminución en los animales que fueron suplementados con todas las fuentes de fructanos.

Reimer *et al.* (2007) estudió el efecto de una ración alta en fibra que contenía fructanos tipo inulina (Orafti Raftiline HP) sobre ratas obesas macho de la cepa JCR:LA-cp y observaron que las concentraciones séricas de triglicéridos, HDL y colesterol total disminuían con respecto a los que no se suplementaron con fructanos ( $p < 0.05$ ), lo que no coincide con los resultados observados en este estudio, posiblemente debido a que en ese estudio no se alimentó a los animales con una ración rica en grasas. Además, utilizaron ratas no obesas de la misma cepa, y mencionan que no hubo diferencia significativa de los tratamientos suplementados con fructanos con respecto al testigo en los mismos parámetros, los resultados en este modelo animal coinciden con los descritos en este trabajo con animales no obesos sin diabetes, donde observamos que la acumulación de grasas en el hígado es mínima.



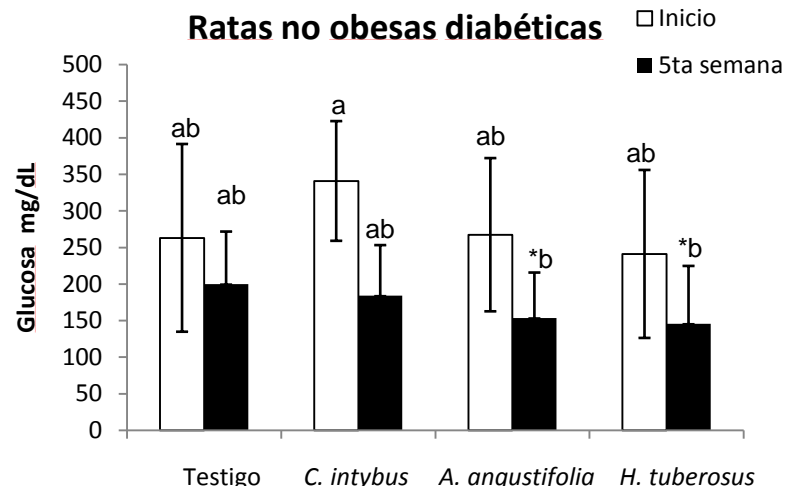
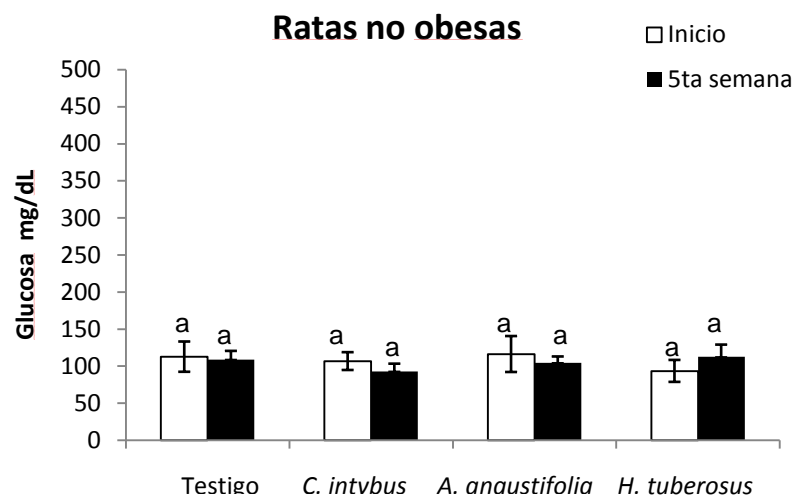
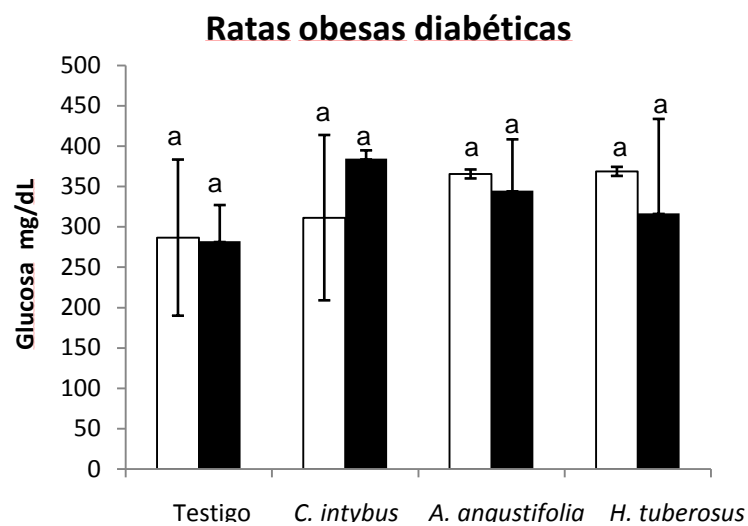
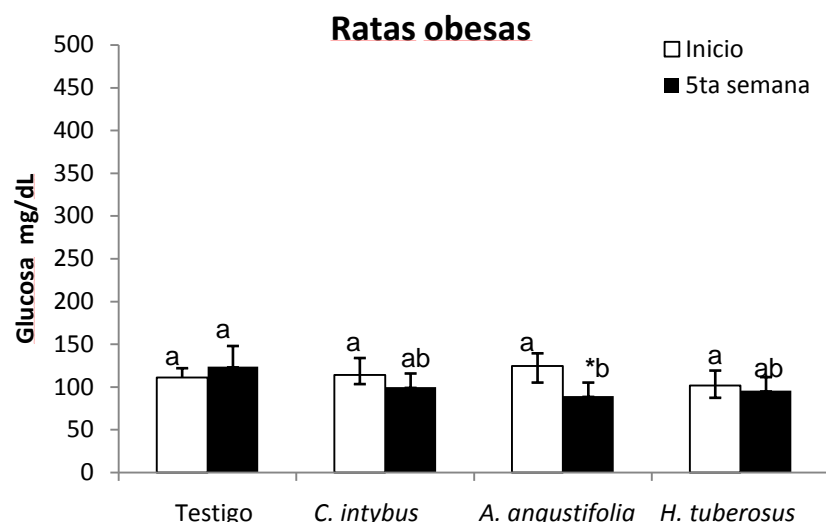


Figura 8. Efecto de los fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia*, sobre la concentración de glucosa sérica en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos

Los tratamientos con diferente literal minúscula, son estadísticamente diferentes

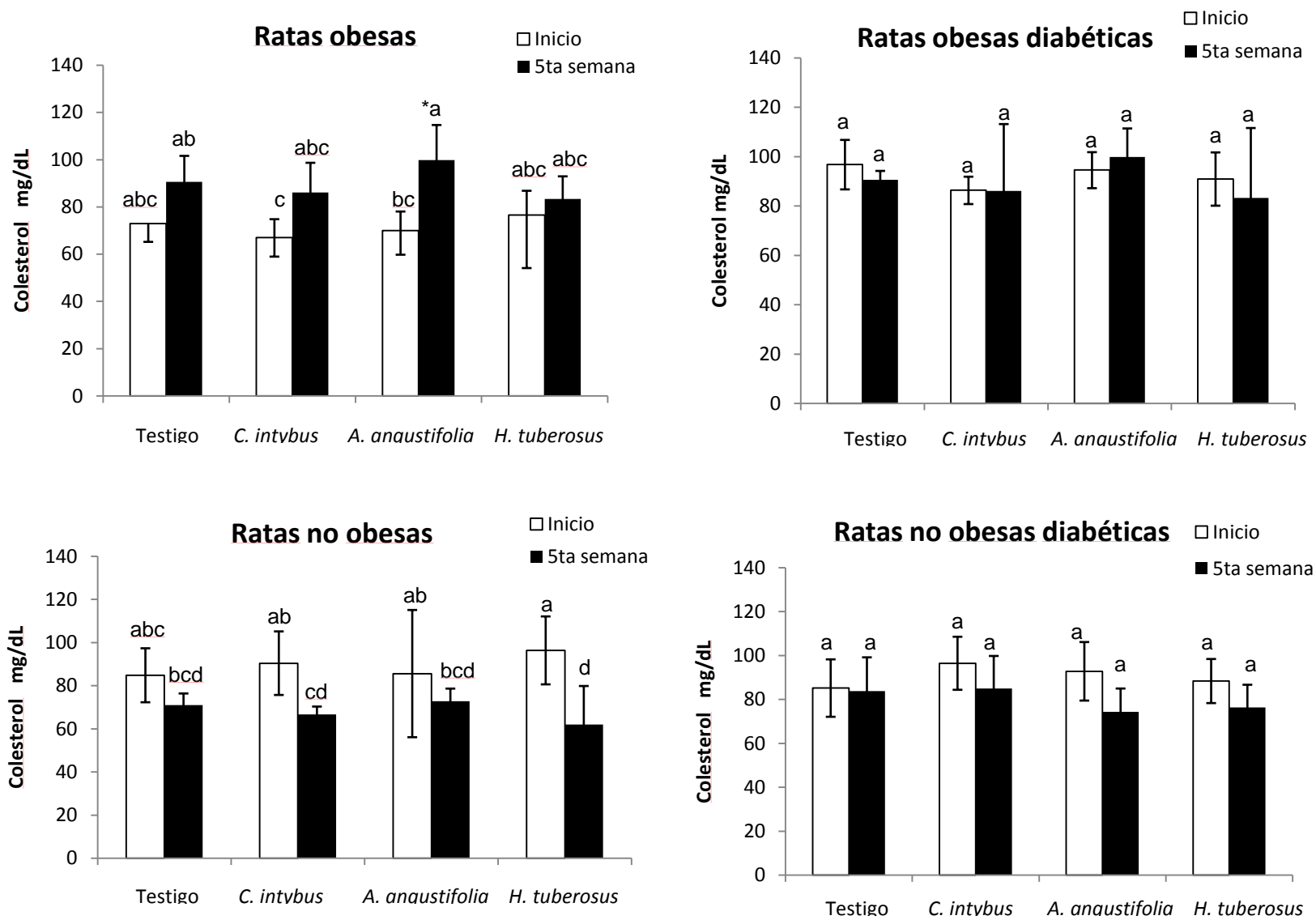


Figura 9. Efecto de los fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia*, sobre la concentración de colesterol sérico en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos

Los tratamientos con diferente literal minúscula, son estadísticamente diferentes

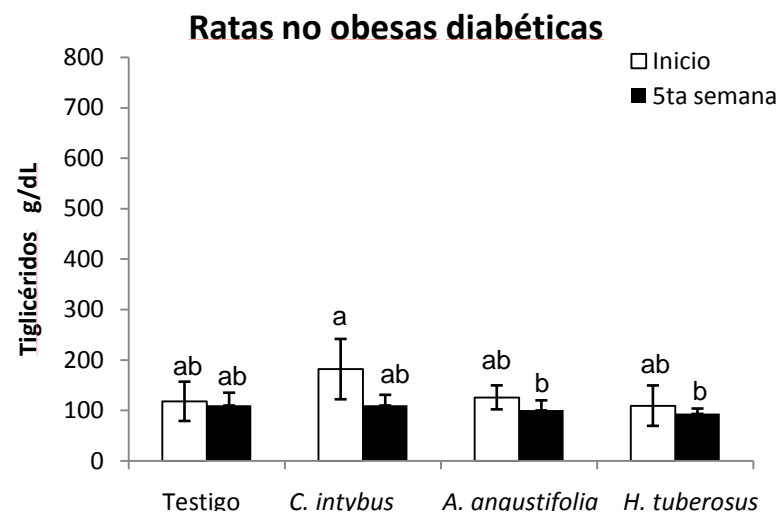
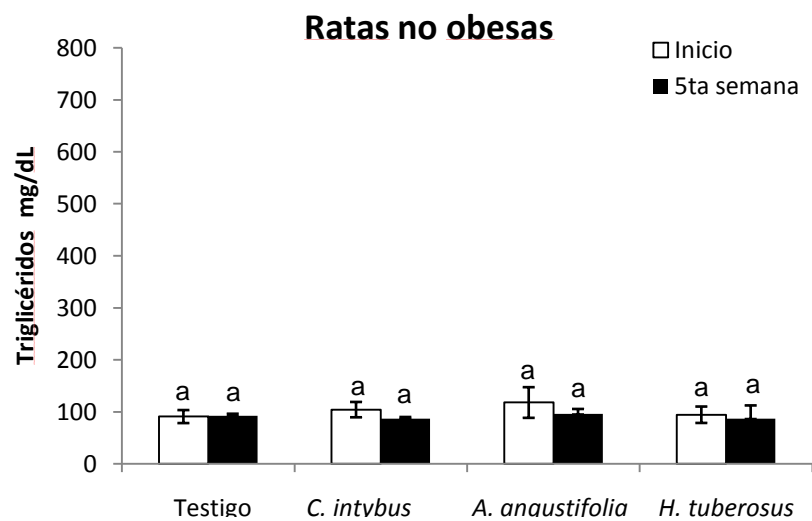
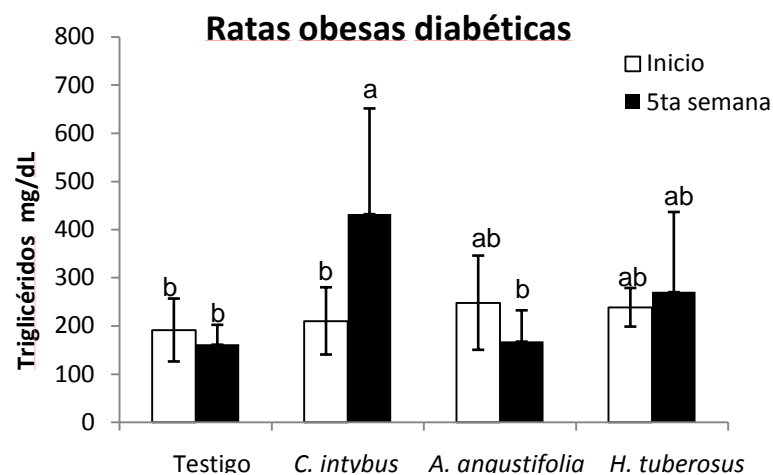
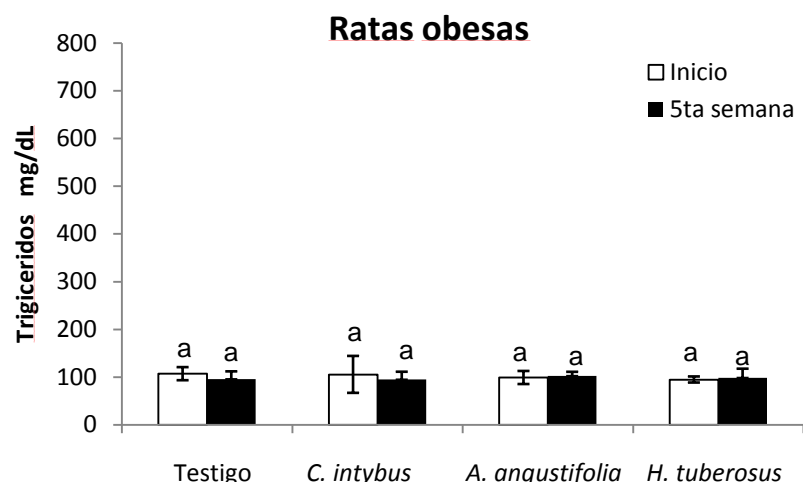


Figura 10. Efecto de los fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia*, sobre la concentración de triglicéridos sérico en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos

Los tratamientos con diferente literal minúscula, son estadísticamente diferentes

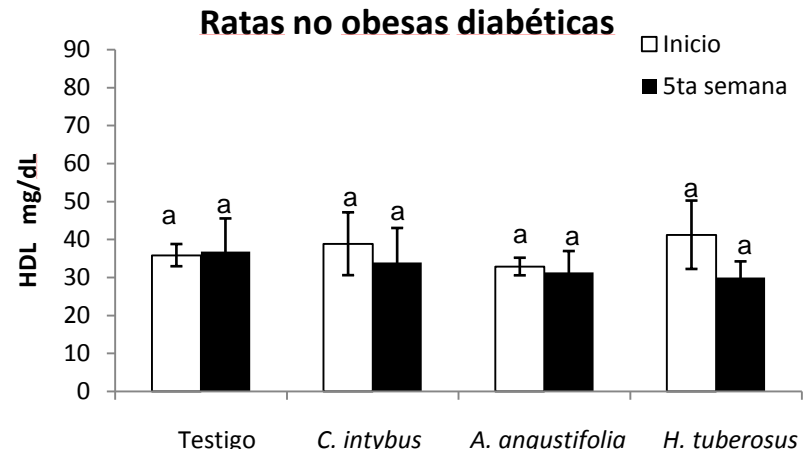
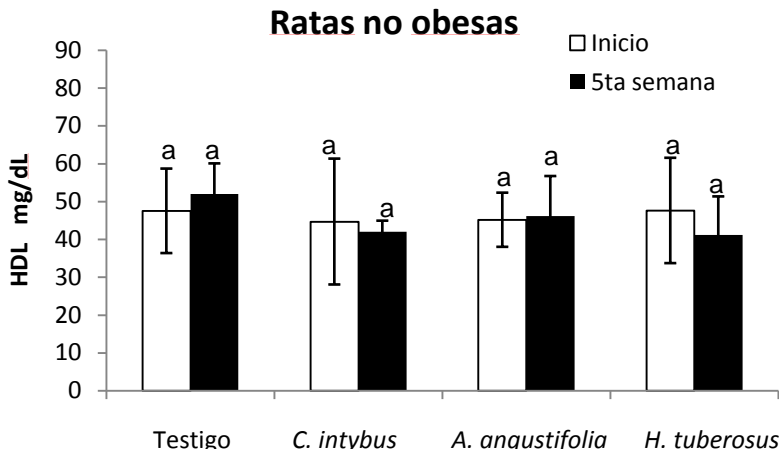
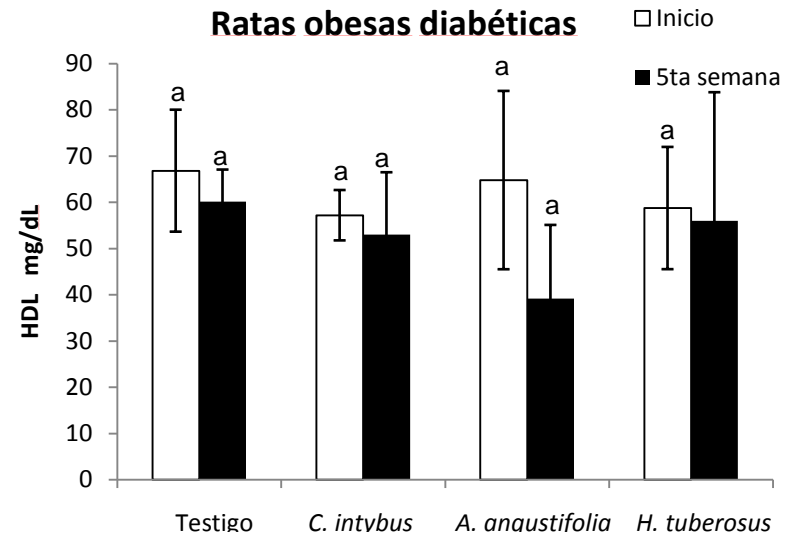
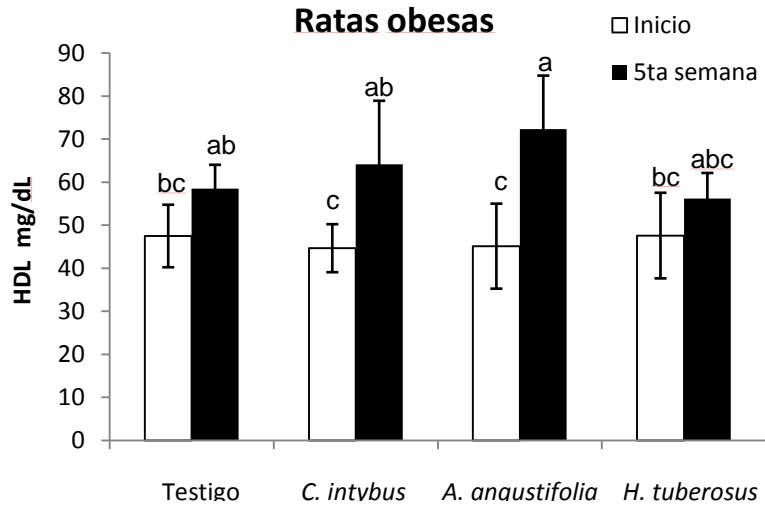


Figura 11. Efecto de los fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia*, sobre la concentración de lipoproteínas de alta densidad HDL sérico en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos

Los tratamientos con diferente literal minúscula, son estadísticamente diferentes

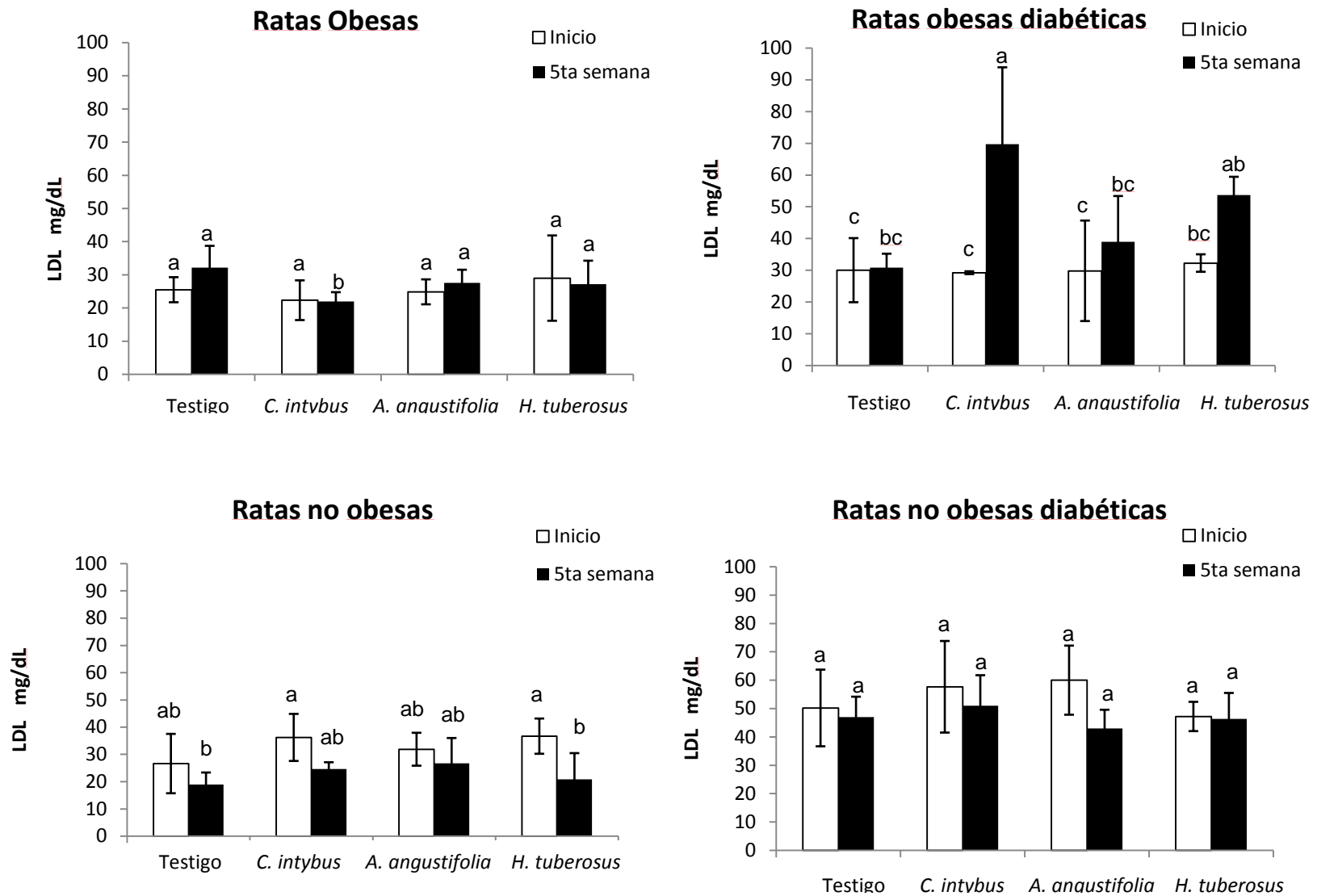


Figura 12. Efecto de los fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia*, sobre la concentración de lipoproteínas de baja densidad LDL sérico en individuos obesos, obesos diabéticos, no obesos y no obesos diabéticos

Los tratamientos con diferente literal minúscula, son estadísticamente diferentes

## **Análisis de la presencia y abundancia de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* y *Clostridium***

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la abundancia de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* y *Clostridium* al inicio y final del experimento (Figura 13). Al inicio, se observó que mayor presencia de *Escherichia* y *Clostridium* en todos los animales, con poblaciones máximas de  $3 \times 10^4$  y  $4.1 \times 10^4$  UFCg<sup>-1</sup> respectivamente, en cuanto a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* corresponde, las poblaciones fueron de  $7 \times 10^1$  y  $3 \times 10^3$  UFC/g respectivamente.

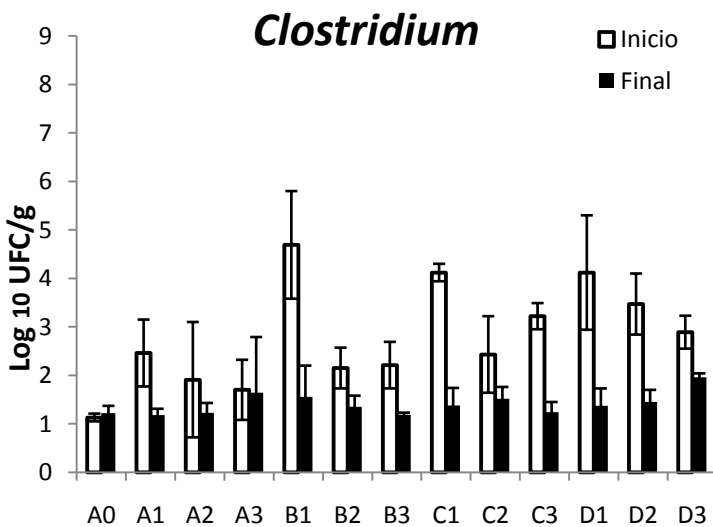
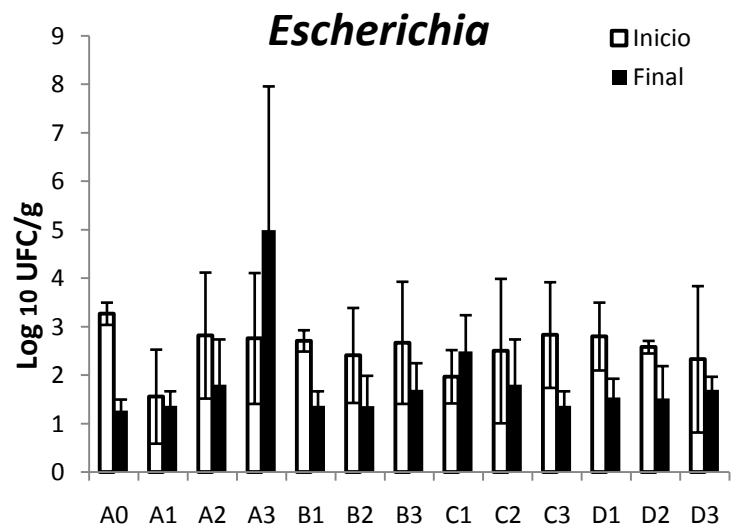
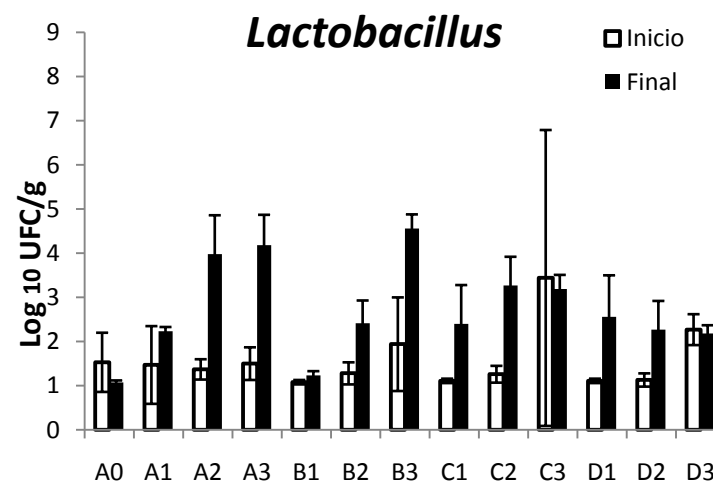
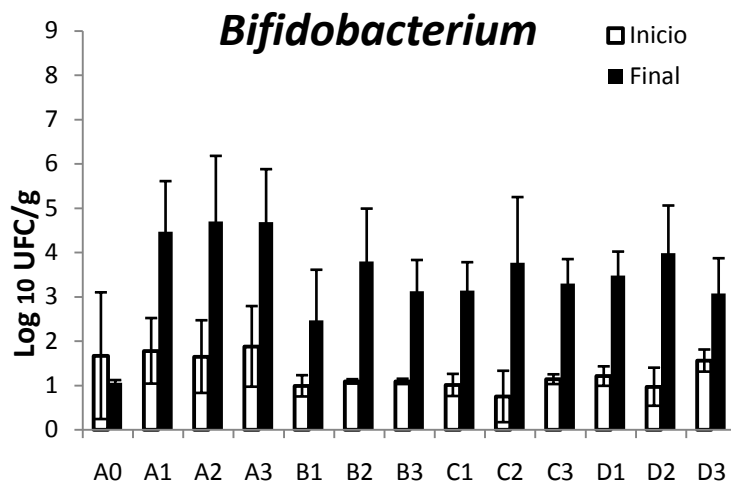
Al término del experimento, en los animales suplementados con fructanos se observó un incremento de las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en individuos obesos el mayor incremento de bífidos se obtuvo con los fructanos de *A. angustifolia* ( $5 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>), en el caso de las bacterias lácticas, el mayor crecimiento lo provocaron los fructanos de *H. tuberosus* ( $15 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>). En lo que respecta a los géneros *Clostridium* y *Escherichia* se observó una reducción de sus poblaciones con los con los tres tipos de fructanos, lo que concuerda con los estudios realizados por Hidaka *et al.*(1991; en Rao, 1999), donde los fructanos tipo inulina suministrados a humanos durante cinco semanas provocaron un aumento en las poblaciones de *Bifidobacterium* de 9.8% a 50.1% , y en lo que respecta a *Clostridium*, provocaron una disminución de las colonias.

Por otro lado, los tratamientos obesos diabéticos, presentaron mayor crecimiento de *Bifidobacterium* con los fructanos de *A. angustifolia* ( $6 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>), *Lactobacillus* obtuvo mayor desarrollo con fructanos de *H. tuberosus* ( $3 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>) y en lo que se refiere a *Escherichia* y *Clostridium* se observó una mayor reducción con los fructanos de *A. tequilana* con poblaciones de  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> respectivamente.

Las ratas no obesas presentaron mayor incremento de las poblaciones de *Bifidobacterium* con fructanos de *A. angustifolia* donde la cuenta fue de  $6 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>, las bacterias lácticas obtuvieron un mayor crecimiento con *H. tuberosus* y *A. angustifolia* 3.19 y 3.27 UFC/g respectivamente, los géneros *Escherichia* y *Clostridium* se vieron

disminuidos con los tratamientos de *H. tuberosus*  $2 \times 10^2$  y  $1 \times 10^2$  UFC/g respectivamente.

Por otra lado, los animales no obesos diabéticos, presentaron mayor abundancia de *Bifidobacterium* con el suplemento de *C. intybus* y *A. angustifolia* con resultados de  $3 \times 10^3$  y  $10^4$  UFC  $g^{-1}$  respectivamente. El mayor efecto observado en las poblaciones de *Lactobacillus* se debió a *C. intybus* y *A. angustifolia* ( $1.8 \times 10^3$  y  $3 \times 10^2$  UFC  $g^{-1}$  respectivamente). Por último, *Escherichia* y *Clostridium*, se vieron afectadas durante la fermentación de los fructanos de *C. intybus* con una disminución de  $3 \times 10^2$  y  $2 \times 10^2$  UFC  $g^{-1}$ , respectivamente.



A = Obesas	0 = Sin fructanos
B = Obesas diabéticas	1 = <i>C. intybus</i>
C = No obesas	2 = <i>A. angustofolia</i>
D = No obesas diabéticas	3 = <i>H. tuberosus</i>

Figura 13. Presencia y abundancia de bacterias en muestras de copros tomados al inicio y al final del experimento, expresados en  $\log_{10}$  UFC/g



## Esteatosis hepática

El estudio histopatológico de los cortes del hígado de los roedores obesos alimentados con una ración hipercalórica adicionada con fructanos de *C. intybus*, *H. tuberosus* y *A. angustifolia*, presentaron una esteatosis microvesicular grado I, mostraron alteraciones morfológicas menos severas que las de los animales cuyo alimento no fue suplementado con fructanos, donde la esteatosis fue grado II (Cuadro 4). De acuerdo con Delzenne (2002), es posible que el efecto protector de los fructanos se deba a que el propionato (AGCC), producido durante la fermentación de los fructanos sea el responsable de inhibir la proteína acetil-CoA sintetasa 2 citosólica encargada de la entrada del acetato a la célula hepática, fenómeno que contribuye a la disminución de la lipogénesis y colesterogénesis.

En individuos obesos diabéticos se presentaron tres casos de esteatosis grado III, cabe mencionar que aunque en la mayoría de los casos, la esteatosis que se presentó es ligera (grado I), con base en Donnelly *et al.* (2005), se podría suponer que los depósitos de triglicéridos son transportados a los tejidos periféricos por lo que en los animales que consumieron fructanos de *C. intybus* presentan altas concentraciones de triglicéridos.

Cuadro 4. Resultados de esteatosis hepática en ratas obesas, obesas diabéticas, no obesas y no obesas diabéticas

Esteatosis microvesicular				
	Obesos	Obesos diabéticos	No obesos	No obesos diabéticos
<b>Testigo</b>	grado 2	grado 1	grado 1	grado 1-2
<b><i>C. intybus</i></b>	grado 1	grado 1-2	grado 1	grado 1
<b><i>A. angustifolia</i></b>	grado 1	grado 1	grado 1	grado 1
<b><i>H. tuberosus</i></b>	grado 1	grado 1	grado 1	grado 1

## 6.0 Conclusiones

- 1.- No hubo efecto de los tratamientos sobre el peso de los animales obesos (sano y diabético).
- 2.- Los fructanos de *A. angustifolia* y de *C. intybus*, reducen la ganancia de peso sobre las ratas no obesas sanas.
- 3.- Los fructanos de *A. angustifolia* disminuyen los niveles de glucosa en individuos obesos y no obesos diabéticos.
- 4.- En individuos no obesos sanos y diabéticos, los fructanos de *A. angustifolia* y *H. tuberosus* reducen los niveles de colesterol total.
- 5.- El mayor incremento de HDL lo provocaron los fructanos de *A. angustifolia* en ratas obesas.
- 6.- Los fructanos de *Agave angustifolia* tiene mayor efecto sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos de individuos obesos y no obesos diabéticos
- 7.- Los fructanos de *A. angustifolia* estimulan el crecimiento de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, reducen las poblaciones de especies de los géneros *Escherchia* y *Clostridium*.
- 8.- Se observó un efecto protector de las tres fuentes de fructanos sobre la acumulación de lípidos en el hígado de las ratas obesas.
- 9.- El consumo de fructanos de *A. angustifolia* en la ración alimenticia mexicana, podrían prevenir el riesgo de padecer enfermedades crónico degenerativas, como la DM, así como, enfermedades cardiovasculares.

## 7.0 Literatura citada

- Anónimo. 1993. Dirección General de Epidemiología e Instituto Nacional de la Nutrición. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. México.
- Allain C. C., Poon L. S., Chan C. S., Richmond W. and Fu P. C. 1974. Enzymatic determination of serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20:470
- American Diabetes Association. 1997. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Diabetes Care*; 20:1183-97
- Áreas M. A., S. R. Gregorio, F. G. R. Reyes. 2003. Evaluación de la inducción de diabetes neonatal con streptozotocina en ratas wistar. *Dialnet.* 347: 45-49
- Bornet F. R., F. Bronus, Y. Tashiro. 2002. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health microflora in rats, *Journal of Nutrition.* 127: 130-136.
- Burrin J. M. and Price C. P. 1985. Measurement of blood glucose. *Ann. Clin. Biochem.* 22: 327
- Burtis C. A., Ashwood E. R. Ed. Tietz. 1994. Textbook of Clinical Chemistry. 2d. Ed. Philadelphia. PA, WB Saunders.
- Cani P.D., C. Dewever, N. M. Delzenne. 2004. Inulin-type fructanos modulate peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *British Journal of Nutrition.* 92: 521-526.
- Cohen H., González M., and Ramírez M. 1997; Etiología y diagnóstico de la esteatosis hepática. *Rev. Med. Uruguay* 13: 37-44
- Delzenne N.M., C. Daubioul, A. Neyrinck, M. Lasa y H. S. Taper. 2002. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animal: review of biochemical events and future prospects. *British Journal of Nutrition*, 87, 2, S255-S259
- Delzenne N.M., C. Daubioul and A. Neyrinck. 2007. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data<sup>1-5</sup>. *The Journal of Nutrition*, 137, 2547S-2551S.
- Donnelly L. K., C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt y E. J. Parks. 2005. *The Journal of Clinical Investigation.* 115: 1343-1351.
- Duncan S. H., G. L. Hold, A. Barcenilla, C. S. Steward, H. J. Flint, 2002. *Roseburia intestinalis* sp. No. a novel saccharolytic, butyrate producing bacterium from human faeces, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 52: 1615-1620

- Falony G., Vlachou A., Verbrugghe K. and De Vuyst L. 2006. Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose, *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 7835-7841.
- Fernández-Bañares F. y Gassull M. A. 1992. Metabolismo colónico de la fibra: efectos fisiológicos y posibles indicaciones terapéuticas de los ácidos grasos de cadena corta. *Gastroenterol Hepatol*, 15(9):536-542
- García P. P., I. Bretón L., C. de la Cuerda C. y M. Cambor A. 2002. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutrición Hospitalaria. Selección de Nutrición Clínica y Dietética*. 17:11-16
- Gordon T. Castelli W. P., Hjortland M. C., Kannel W. B. and Dawber T. R. 1977. High density lipoprotein as a protective factors against coronary heart disease. *Am. J. Med*. 62:70-714
- Grubben M. J., Van der Braak C. and Essemberg M. 2005. Effect of resistant starch on potential biomarkers for colonic cancer risk in patients with colonics adenomas: a controlled trial, *Digestive Diseases Sciencs*. 46: 750-756.
- Grundy S. M. 1993. Summary of the second report of the national cholesterol education program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of Blood and Cholesterol in Adults (Adult treatment panel II) *JAMA*. 269:3015-3023
- Han L. K., Xu B. J., Kimura Y., Zheng Y. and Okuda H. 2000. Platycodi Radix Affects Lipid Metabolism in Mice with High Fat Diet–Induced Obesity. *J. of Nutr*. 130:2760-2764
- Herrera P; J.L. 2001. Diabetes mellitas. Clasificación. Epidemiología. Microangiopatía. pp: 457 – 463. En: A. Jara A. (Ed). *Endocrinología*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Huazano G. A., M. G. López P. 2009. Estudio *in vivo* del efecto prebiótico de los fructanos de *Agave angustifolia* Haw. Tesis de maestría. CINVESTAV Unidad Irapuato, México. p 80
- Instituto Mexicano del Seguro Social. 2008. La obesidad, foco de alerta: IMSS. En Línea: <http://www.presidencia.gob.mx/prensa/salud/?contenido=36246> consultado el 22 de septiembre de 2009
- Jenkins D. J., T. M. Wolever and A. Jenkins, 1991. Specific tipos of colonic fermentation may raise low-density-lipoprotein-cholesterol concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition*. 54: 141-147.
- Kaufer-Horwitz M., Tavano-Colaizzi L.A., Avila-Rosas H. 2001. Obesidad en el adulto. pp 284 – 292. En: Casanueva E; Kaufer H. M., Pérez L. A. B., Arroyo P. 2001. *Nutriología Médica*. Ed. Medica Panamericana 2da. Edición, México D.F.
- Kun-Han L., B. Jun-Xu, Y. Kimura, Y. Zheng, H. Okuda. 2000. Platycodi Radix affects lipid metabolism in mice with hihg fat diet-induced obesity. *Nutrient Metabolism. Journal of Nutrition*.130:2760-2764.

- Macfarlene S. and G.T. Macfarlene. 2003. Regulation of short chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 67-72
- Mancilla-Margalli N.A. y López M.G. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *J Agric Food Chem* 54, 7832-7839.
- Marti del Moral A., J. Moreno A. y J. A. Martínez H., 2003. Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico, *Nutrición Hospitalaria* 28: 181-188.
- Mathews C. K., Van Holde K. E., Ahern K.G. 2002. *Bioquímica*. 3a. edición. Ed. Pearson Educación S.A. 1368 pp
- Miller T.L. and Wolin M.J. 1979. Fermentation by saccharolytic intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr*, 32:164-172
- Miles, A. A. and Misra, S.S. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.* London, 38, 732.
- Mitsuoka T. 1975. The significance of Intestinal Bacterial Flora. *Clinical bacteriology, Japón* 2 (3), 55-97.
- Mitsuoka T. 1983. Intestinal flora and dietary factors, proceeding of IV. RIKEN Symposium on Intestinal Flora. Japón. 1-14.
- Mitsuoka T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *J. Indust. Microbiol.* 6: 263-268.
- Mitsuoka T. 1992. The human gastrointestinal tract. In: Wood ed *The lactic acid bacteria in health disease*. London. Elsevier Applied Science. 69-114
- Mitsuoka T. 1996. Intestinal flora and human health. *Asia Pacific J Clinic Nutr.* 5: 2 -9
- Niness, K.R. 1999. Inulin and oligofructose: What are they? *Journal of Nutrition* 129, 1402S-1406S.
- NOM-015-SSA2-1994. Norma Oficial Mexicana para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. En línea. Secretaría de Salud. Dirección URL: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m015ssa24.html> Consulta: 25 de noviembre de 2008
- NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (En línea). Secretaría de Salud. Dirección URL: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF> Consultado: 11 de octubre del 2008.
- OMS. 1985. Diabetes mellitus: report of a WHO study group. World Health Organization. Technical Report Series 727. Geneve: WHO.

- OMS. 2006. ¿Obesidad y Sobrepeso? En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> (Citado el 06 de noviembre de 2007).
- OMS. 2008. Diabetes. Organización Mundial de la Salud. En Línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/> consultado el 31 de julio de 2009.
- Pérez G.F., Escobedo J., Lara R., Fernandez I.H. 2000. Diabetes mellitus mortality in Mexico using multiple cause-of-death-analysis. Abstract) 17<sup>th</sup> International Diabetes Federation Congress. November 5-10, México.
- Pompei A., Cordisco L., Raimondi S., Amaretti A., Pagnoni U. M., Matteuzzi D. and Rossi M. 2008. *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans Science Direct Elsevier. Volume 14, Issue 5, November 2008, Pages 280-286
- Pool-Zobel B., J. Van Loo, I. Rowland, M. Roberfroid, 2002. Experimental evidences on the potencial of prebiotics fructanos to reduce the risk of cancer, British Journal of nutrition. 87: S273-S281.
- Rao A. V. 1999. Dose-response effect of inulin and oligofructose on intestinal Bifidogenesis effects. J. Nutr. 1442S-1445S.
- Reimer R. A. and J.C Russell. 2008. Glucose Tolerance, Lipids, and GLP-1 secretion in JCR:LA-cp rats fed a high protein fiber diet. Integrative Physiology. Obesity Journal. 16: 40-46
- Rifai N. and Warnick G. R. (Ed). 1994. Laboratory measurement of lipids, lipoproteins and apolipoproteins. Washington, DC. AACC Press.
- Roberfroid, M.B. 2000. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. Nutrition 16, 677-679.
- Roediger W.E. 1982. The effect of bacterial metabolites on nutrition and function of the colonic mucosa. Symbiosis between man and bacteria. Falk Symposium 32. Kaspes H, Goebell H eds. Colon and Nutrition. MTP Press limited, Lancaster: 11- 24.
- Sánchez C. C. P., E. Pichardo O., P. López R. 2004. Epidemiología de la obesidad. Gac Méd México Vol.140, No. 2, S3-S20.
- SAS Institute. 1999.SAS Users Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, N.C. 1028p
- Scardovi V. 1986. Genus *Bifidobacterium*. In H. Sneath, N. Mair, M. Sharpe y J. Holt (ed) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2, 9<sup>th</sup> edition. Williams & Wilkins, Baltimore, Md. 1418-1434
- Servin A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbial Rev. 28: 405-409

- Stambler J. 1991. Epidemiologic findings on body mass and blood pressure in adults. *Annals of Epidemiology*; May; Vol. 1 (4), pp. 347-62; [En línea: EBSCO Medline]; Dirección URL: <http://web.ebscohost.com/creativaplus.uasp.mx:8080/ehost/detail?vid=12&hid=106&sid=d1501604-686c-43c4-813e-f4da632cdc4f%40sessionmgr104> Consulta: 26 de noviembre de 2007
- Su P., A. Henriksson and H. Mitchell. 2007. Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an in vivo murine model. *Journal of Applied Microbiology* 2392-2400
- Titgemeyer E. C., Bourquin L.D., Fahey G. C. and Garleb K.A. 1991. Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria *in vitro*. *Am J Clin Nutr*, 5:1418-1424
- Torres V. M. del R. 2002. Flora intestinal, probióticos y salud. Yakult. Editorial Formas Finas 2ª. Ed. 118
- Trinder P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor *Ann. Clin. Biochem.* 6:24
- Turk J., Corbett J. A., Ramanadham S., Bohrer A., Daniel L. 1993. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 1458-1464.
- Vázquez C. J.L. y A. Panduro C. 2001. Diabetes Mellitus tipo 2: un problema epidemiológico y de emergencia en México. *Investigación en salud*, marzo, vol 3: 18-26.
- Van der Meulen R., L. Avonts and De Vuyst. 2004. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010, *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1923-1930.
- Van der Meulen R., L. Makras, K. Verbrugghe, T. Adriany and L. De Vuyst. 2006. *In vitro* kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bifidobacterium* spp. Indicates different degradation mechanisms, *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 1006-1012.
- Vargas A. L., Ávila R. H. 1997. Obesidad en México. Volumen 1. Consensos Funsalud: Fundación Mexicana para la Salud. pp 99 – 116. México D.F.
- Villaseñor A. 2002. El papel de la leptina en el desarrollo de la obesidad. *Revista de endocrinología y nutrición* Vol. 10, No. 3:135-139.
- Wang X. and Gibson G.R. 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol*, 75:373-380.