



---

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN  
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

---



**Evaluación de microbiota intestinal cultivable  
de lactantes y preescolares y estimación de su  
estado nutricional: Prueba de función prebiótica de  
FOS obtenidos a partir de hojas de agave.**

# **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO  
DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN  
INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA

**FRANCISCO HUMBERTO ORTIZ SALAZAR**

Dra. María de los Ángeles Sánchez Contreras  
Dra. Tania González Flores  
Dra. Marisela González Ávila

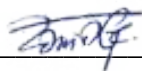
Mérida, Yucatán, abril de 2021

Guadalajara, Jalisco a 19 de abril de 2021

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO  
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO  
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Francisco Humberto Ortiz Salazar**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “EVALUACIÓN DE MICROBIOTA INTESTINAL CULTIVABLE DE LACTANTES Y PREESCOLARES Y ESTIMACIÓN DE SU ESTADO NUTRICIO: PRUEBA DE FUNCIÓN PREBIÓTICA DE FOS OBTENIDOS A PARTIR DE HOJAS DE AGAVE” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 19 del mes de abril del año dos mil veintiuno.



Tania González Flores

*Co-directora*



Marisela González Ávila

*Co-directora*



María de los Ángeles Sánchez Contreras

*Directora*



GOBIERNO DE  
MÉXICO



CONACYT  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 4 de mayo de 2021

CP/377/2021

**FRANCISCO HUMBERTO ORTIZ SALAZAR**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN  
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA  
NÚMERO DE MATRÍCULA 1803MB6428  
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis **“Evaluación de microbiota intestinal cultivable de lactantes y preescolares y estimación de su estado nutricional: prueba de función prebiótica de FOS obtenidos a partir de hojas de agave”** desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. María de los Ángeles Sánchez Contreras. Directora de tesis

Dra. Marisela González Ávila. Co-directora de tesis

Dra. Tania González Flores Co-directora de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz**  
Coordinadora de Posgrados



## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento para realizar los estudios de maestría a través de la beca nacional tradicional 2018-2.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ) por el financiamiento económico complementario durante el desarrollo de los estudios de maestría.

Al proyecto “Digestibilidad en ARIS de un simbiótico a base de fructanos de agave propuesto para combatir la disbiosis de personas con sobrepeso y obesidad” del cual forma parte el presente trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), por las facilidades otorgadas en el uso de las instalaciones y equipos utilizados en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Banco de Germoplasma del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. por la donación de las hojas de dos agaves utilizados para el desarrollo del siguiente trabajo de investigación.

A las directoras de las guarderías particulares de la ciudad de Guadalajara, Jalisco por su apoyo en la logística con los padres de familia en la colecta de las heces fecales y el desarrollo de las mediciones antropométricas.

A Best Ground International S.A. de C.V., por el financiamiento para la certificación en el nivel 1 de La Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría (ISAK).

A la Dra. María de los Ángeles Sánchez Contreras, directora del comité tutorial, que durante el transcurso de los estudios de maestría me orientó más allá de lo académico, por brindarme la oportunidad de capacitarme en nuevas áreas y sobre todo por su amistad y confianza a lo largo de estos cinco años de trabajo.

A la Dra. Marisela González Ávila y Dra. Tania González Flores por compartirme su experiencia como guía durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A Mariela García Aguilar por su apoyo en la obtención de los datos del agave presentados dentro de esta investigación.

A los integrantes del sínodo por sus aportaciones en el enriquecimiento del trabajo escrito.

---

---

## Dedicatoria

El siguiente trabajo es dedicado a todas aquellas personas que han colaborado directa o indirectamente para que día con día siga creciendo el amor a la ciencia, ya sea con una historia, una plática de sus actividades o enseñándome algo nuevo.

De forma muy especial quiero dedicar este trabajo a mi esposa Mariana Delgadillo Diaz, porque en los últimos años la distancia nos ha mantenido más unidos, el deseo de volvernos a encontrar nos ha hecho trabajar por una meta en común, por la paciencia que me ha tenido en mis momentos más difíciles, por estar ahí para levantar la moral cuando ésta ya la daba por perdida, por hacerme ver lo importante que es la paciencia y la perseverancia, pero en especial por compartir el deseo de transmitir el conocimiento y querer descubrir o desarrollar lo no escrito aún.

A mi mamá y papá, Vilma Salazar Vazquez y Francisco Manuel Ortiz Bonilla, que siempre están para apoyarme en las decisiones que he tomado y por su amor que siempre está presente, por enseñarme lo duro de la vida, así como a luchar en las adversidades porque todo ello al final tiene una recompensa.

A mis amigos del laboratorio de CIATEJ, Sandra, Karen, Inés, Tania, Mayra y Rudy, que me enseñaron algo más que solo seguir un protocolo dentro del laboratorio.

A mis compañeros de la ciudad de la ciudad de Querétaro y de la Facultad de Química de la UNAM que conocí dentro del curso de biología molecular, porque sus historias solo engrandecen el deseo de querer más.

*“La derrota es una constante, por eso la victoria sabe tan dulce”*  
-Marion Reimers

---

---

## I. Índice de contenido

1	Resumen .....	1
2	Introducción .....	4
3	Marco teórico .....	6
3.1	Evaluación del estado nutricional en lactantes y preescolares .....	6
3.1.1	Historia clínico-nutricional .....	6
3.1.2	Composición corporal .....	7
3.1.3	Datos antropométricos .....	7
3.2	Establecimiento de la microbiota intestinal en lactantes y preescolares .....	10
3.2.1	Microbiota intestinal .....	10
3.2.1.1	Establecimiento de microbiota intestinal por el canal de nacimiento .....	12
3.2.1.2	Establecimiento de microbiota intestinal por el tipo de alimentación .....	16
3.2.1.2.1	Alimentación con lactancia materna .....	16
3.2.1.2.2	Alimentación con fórmula láctea .....	17
3.2.2	Otros factores que influyen en el establecimiento de la microbiota intestinal .....	18
3.3	Aislamiento e identificación de la microbiota intestinal .....	19
3.3.1	Algunos microorganismos presentes en la microbiota intestinal de lactantes y preescolares .....	21
3.3.1.1	Género Bifidobacterium .....	21
3.3.1.2	Género Lactobacillus .....	22
3.3.1.3	Género Clostridium .....	22
3.3.1.4	Género Salmonella .....	23

---

3.3.2	Técnicas y medios de cultivo para el aislamiento de la microbiota intestinal cultivable.....	24
3.4	Uso de probióticos en fórmulas lácteas para lactantes y preescolares .....	26
3.5	Fructooligosacáridos usados como prebióticos en fórmula lácteas para lactantes y preescolares .....	27
3.6	El agave como fuente de obtención de fructooligosacáridos .....	32
3.6.1	Fructanos.....	34
3.7	Procesos para la obtención artificial de FOS.....	35
3.7.1	Purificación de FOScc .....	35
3.7.1.1	Purificación por técnicas de membrana .....	36
3.8	Métodos para la identificación y cuantificación de FOS .....	37
4	Planteamiento del problema .....	40
5	Justificación .....	42
6	Hipótesis.....	43
7	Objetivos.....	44
7.1	Objetivo general .....	44
7.2	Objetivos específicos .....	44
8	Metodología.....	45
8.1	Primera etapa experimental; colecta de heces fecales .....	45
8.1.1	Sujetos, diseño del estudio y cálculo de la muestra .....	45
8.1.1.1	Aspectos éticos.....	47
8.1.2	Selección de guarderías para la obtención de muestras.....	48
8.1.3	Mediciones antropométricas.....	49
8.1.4	Recolección de la historia clínico-nutricional .....	51
8.1.5	Recolección y preparación de heces fecales.....	51
8.1.5.1	Cultivo y aislamiento microbiológico a partir de heces fecales.....	52



---

8.1.5.1.1	Cultivo de los microorganismos aeróbicos a partir de heces fecales	52
8.1.5.1.2	Cultivo de los microorganismos anaeróbicos .....	53
8.1.5.2	Conteo de microorganismos cultivados.....	54
8.2	Análisis estadístico primera etapa experimental; colecta de heces fecales .	54
8.3	Segunda etapa experimental; colecta de agaves.....	56
8.3.1	Obtención del material biológico.....	56
8.3.2	Medición de color en las hojas .....	56
8.3.3	Caracterización bromatológica y bioquímica de las hojas de agave .....	56
8.3.3.1	Humedad.....	56
8.3.3.2	Cenizas .....	57
8.3.3.3	Proteína cruda.....	57
8.3.3.4	Porcentaje extracto etéreo .....	58
8.3.3.5	Porcentaje de fibra dietética total .....	58
8.3.3.6	Fibra dietética soluble .....	59
8.3.4	Cuantificación de azúcares reductores totales por método DNS.....	59
8.3.5	Elaboración del jugo de agave .....	60
8.3.6	Cuantificación de glucosa y sacarosa .....	60
8.3.7	Identificación de FOS por HPTLC .....	60
8.3.8	Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	61
8.3.8.1	Activación de <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	61
8.3.8.2	Cinética de crecimiento <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	61
8.4	Análisis estadístico segunda etapa experimental; colecta de agaves .....	63
9	Resultados / Discusiones.....	64
9.1	Resultados de la primera etapa experimental; colecta de heces fecales .....	64

---

9.1.1	Mediciones antropométricas.....	64
9.1.2	Historia clínico-nutriológica.....	67
9.1.3	Microbiota cultivable de heces fecales .....	71
9.1.3.1	Población total microbiota intestinal .....	71
9.1.3.2	Microorganismos benéficos y no deseados identificados de la microbiota intestinal.....	75
9.1.4	Correlación múltiple de resultados microbiológicos y antropométricos ...	79
9.2	Resultados de la segunda etapa experimental; colecta de agaves.....	84
9.2.1	Caracterización bromatológica y bioquímica de las hojas de agave .....	84
9.2.2	Cuantificación de azúcares presentes en el jugo de agave.....	86
9.2.3	Identificación de FOS en jugo de agave .....	89
9.2.4	Cinética de crecimiento de probiótico comercial en jugo de agave .....	93
10	Conclusiones .....	96
11	Perspectivas .....	99
12	Referencias .....	101
	Anexo A.....	116
	Anexo B.....	121
	Anexo C.....	122
	Anexo D.....	123
	Anexo E.....	128
	Anexo F.....	131
	Anexo G.....	132
	Anexo H.....	133

---

---

## II. Índice de figuras

Figura 1. Cambios en la densidad poblacional de la microbiota a lo largo del SGI ...	11
Figura 2. Efecto de la alimentación en el establecimiento de la microbiota intestinal durante los primeros tres años de vida.....	12
Figura 3. Mapa de distribución de diversos Agaves de carácter fermentativo en la República Mexicana (López-Romero et al., 2018). .....	32
Figura 4. Diferentes estructuras químicas de FOS: a) 1-questosa [inulina lineal], b) 6-questosa [Levano], c) Neoquestosa [inulina neoserie] y d) Bifructosa [Levano neoserie] (Apolinário et al., 2014).....	34
Figura 5. Ejemplo de distribución de microgotas en caja Petri con medio LIA o MRS. ....	53
Figura 6. Preparación de microplaca para cinética de crecimiento de <i>S. boulardii</i> en extracto crudo y tres fracciones de corte molecular (30, 10 y 3 kDa) obtenidas de las hojas de <i>A. fourcroydes</i> y <i>A. angustifolia</i> .....	62
Figura 7. Población total de la microbiota intestinal cultivable de heces fecales proveniente de lactantes y preescolares, según su vía de parto y tipo de alimentación, n= 34. ....	76
Figura 8. Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño experimental $2^2 \times 3$ . ....	88
Figura 9. Cromatografía en capa fina de alta resolución con revelado para azúcares, grupo cetónico y aldehído, de los fraccionamientos por peso molecular de 3 y 10 kDa en las hojas de agave.....	89
Figura 10. Reporte de cromatografía en capa fina de alta resolución con revelado de cromatografía para el <i>Agave fourcroydes</i> .....	91
Figura 11. Reporte de cromatografía en capa fina de alta resolución con revelado de cromatografía para el <i>Agave angustifolia</i> . ....	91
Figura 12. Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces boulardii</i> en función de la densidad óptica (DO 630 nm) y tiempo (horas) en dos fracciones por peso molecular (3 kDa y 10 kDa) obtenidos de las hojas de agave. ....	94
Figura 13. Registro de masa corporal en preescolar (>24 meses).....	116
Figura 14. Registro de talla en preescolar (>24 meses).....	117
Figura 15. Medición pliegue subescapular. ....	118

Figura 16. Medición pliegue de tríceps.....	118
Figura 17. Medición de perímetro de brazo relajado (circunferencia media de brazo). .....	118
Figura 18. Registro de longitud en lactantes (<24 meses). ....	119
Figura 19. Guía visual de la medición de perímetro cefálico.....	120
Figura 20. Curva de calibración para cuantificar azúcares por método DNS .....	133

---

---

### III. Índice de tablas

Tabla 1. Indicadores antropométricos vigentes en las primeras etapas de la vida para población mexicana.....	8
Tabla 2. Modificación de la microbiota según la vía de parto en menores de 12 meses.....	14
Tabla 3. Algunas condiciones de crecimiento para microorganismos presentes en las heces fecales de lactantes y preescolares.....	20
Tabla 4. Algunas técnicas de cultivo utilizados en el aislamiento de microorganismos esperados en las heces fecales de lactantes y preescolares.....	24
Tabla 5. Algunos medios de cultivo utilizados en el aislamiento de microorganismos esperados en las heces fecales de lactantes y preescolares.....	25
Tabla 6. Fases móviles utilizadas en la identificación de oligosacáridos mediante la cromatografía en capa fina (TLC).....	38
Tabla 7. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de donantes de heces fecales frescas.....	45
Tabla 8. Parámetros e indicadores antropométricos de lactantes y preescolares incluidos en el estudio, n=20. ....	66
Tabla 9. Características clínicas de lactantes y preescolares como participantes en el estudio, n=29.....	69
Tabla 10. Valores medios y proporciones del recuento de la microbiota intestinal en muestras de heces fecales de lactantes y preescolares, n= 34. ....	71
Tabla 11. Proporciones de la población total de la microbiota intestinal cultivable de heces fecales proveniente de lactantes y preescolares, n= 34. ....	74
Tabla 12. Matriz de correlación múltiple de Pearson para las cuentas microbiológicas provenientes de la microbiota intestinal de lactantes y preescolares, las mediciones e indicadores antropométricos de crecimiento. ....	80
Tabla 13. Composición química, color y azúcares reductores de las hojas <i>Agave fourcroydes</i> y <i>Agave angustifolia</i> .....	84
Tabla 14. Resultados del contenido de glucosa y sacarosa extraídas de las hojas de <i>Agave fourcroydes</i> y <i>Agave angustifolia</i> filtrados con diferente tamaño de membrana (3 y 10 kDa).....	87

Tabla 15. Valor del factor de retención de los compuestos presentes en los fraccionamientos por peso molecular de 3 y 10 kDa en las hojas de *Agave fourcroydes* y *Agave angustifolia*..... 90

## IV. Abreviaturas y símbolos

<b>%FDI</b>	Porcentaje de fibra dietética insoluble	<b>GC-MS</b>	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b>%FDS</b>	Porcentaje de fibra dietética soluble	<b>GOS</b>	Galactooligosacáridos
<b>%FDT</b>	Porcentaje de fibra dietética total	<b>h</b>	Matiz
<b>%LE</b>	Porcentaje longitud para la edad	<b>HPAEC-PAD</b>	Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detector de pulsos amperométricos
<b>%PE</b>	Porcentaje de peso para la edad	<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>%PL</b>	Porcentaje peso para la longitud	<b>IMC</b>	Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )
<b>%PT</b>	Porcentaje peso para la talla	<b>IMCE</b>	Índice de masa corporal para la edad
<b>%TE</b>	Porcentaje talla para la edad	<b>ISSSTE</b>	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.
<b>ABr</b>	Área del brazo.	<b>kDa</b>	Kilo dáltones
<b>AGBr</b>	Área grasa del brazo.	<b>L</b>	Luminosidad
<b>AGBr</b>	Porcentaje del área grasa del brazo	<b>L.I.A. agar</b>	Agar hierro-lisina
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta	<b>LFPDPPP</b>	Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares
<b>Alc/Vol.</b>	Volumen de alcohol.	<b>LGPDPPSO</b>	Ley General de Protección de Datos Personales en posesión de Sujetos Obligados
<b>AMBr</b>	Área muscular del brazo	<b>LArf</b>	Lactancia artificial
<b>B.S.M. agar</b>	Agar selectivo de Bifidobacterias	<b>LM</b>	Lactancia materna exclusiva
<b>C</b>	Color	<b>M.R.S. agar</b>	Agar Man, Rogosa y Sharper
<b>CDC</b>	Centro para el control de enfermedades y prevención	<b>MCT</b>	Masa corporal total
<b>CMB</b>	Circunferencia media de brazo	<b>MG</b>	Masa grasa
<b>DP</b>	Grado de polimerización	<b>MLG</b>	Masa libre de grasa
<b>FOS</b>	Fructooligosacáridos	<b>Ms</b>	Masa en kilogramos
<b>FOScc</b>	Fructooligosacáridos de cadena corta	<b>nm</b>	Nanómetros

<b>Ø cf</b>	Perímetro cefálico
<b>OLM</b>	Oligosacáridos de leche materna
<b>PC</b>	Parto por cesárea
<b>PC-LArf</b>	Parto vaginal con lactancia artificial
<b>PC-LM</b>	Parto vaginal con lactancia materna
<b>Pse</b>	Pliegue subescapular
<b>PTr</b>	Pliegue de tríceps
<b>PV</b>	Parto vaginal
<b>PV-LArf</b>	Parto vaginal con lactancia artificial
<b>PV-LM</b>	Parto vaginal con lactancia materna
<b>SGI</b>	Sistema gastrointestinal
<b>T.S.C. agar</b>	Agar triptosa-cicloserina-sulfato
<b>TGI</b>	Tracto gastrointestinal
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>TII</b>	Talla en centímetros
<b>TPY</b>	Extracto de levadura tripticasa-fitona
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colina
<b>UFC g<sup>-1</sup></b>	Unidad formadora de colonia por gramo de heces fecales



---

---

## V. Glosario

- **Acromiale:** Punto en borde superior de la parte más lateral del acromion.
- **Acromiale-radiale medio:** Punto equidistante entre las marcas acromiale y radiale.
- **Angiogénesis:** Formación de nuevos vasos sanguíneos.
- **Apófisis mastoides:** Es una proyección redondeada de la porción mastoides del hueso temporal posterior e inferior para el meato auditivo exterior que sirve como punto de fijación para muchos músculos del cuello (Tortora, Gerard y Nielsen, 2017).
- **Brazo relajado:** Perímetro del brazo a nivel del punto acromiale-radiale medio, perpendicular al eje longitudinal del brazo.
- **Fórmula infantil o fórmula láctea:** Alimento para lactantes adecuado que sustituye de forma parcial o total a la leche humana y que satisface las necesidades nutritivas normales del lactante (Gómez-Álvarez Salinas, 2002).
- **Fungemia:** La presencia de hongos en la sangre, principalmente por miembros del género *Candida* spp. (Guna-Serrano et al., 2019).
- **IMC:** Fraccionamiento de la masa en kilogramos de una persona por su talla en metros cuadrados, muestra la masa en función de la estatura y estratifica diferentes grados de desnutrición  $IMC=(\text{masa en kg})/[\text{talla en m}]^2$ .
- **Masa corporal:** Cantidad de materia en el cuerpo. Se calcula mediante el peso, es la fuerza que ejerce la materia en un campo gravitacional estándar.
- **Oligosacáridos:** Molécula que contiene pequeños números de residuos de monosacáridos de 3 – 10 aproximadamente, unidas mediante enlaces glucosídicos (BeMiller, 2019; Cunha y Fernandes, 2020).
- **Orbitale:** Punto situado en el margen inferior óseo de la cuenca del ojo.
- **Perímetro cefálico:** Indicador de posibles discapacidades neurológicas o del desarrollo en niños, vigila la respuesta a las intervenciones de nutrición.
- **Peso para la edad:** Indicador utilizado en la evolución de los niños lactantes y preescolares, mediante el uso de una curva de crecimiento, comparando el peso del niño con el de un grupo de referencia (Heller-Rouassant y Pegueros-Fernández, 2013; Montesinos-Correa, 2014).

- **Peso para la talla:** Indicador que evalúa el estado nutricional en el corto plazo, cuando los valores que están por debajo de lo normal indican alteraciones agudas del estado nutricional ya sea consunción o atrofia, así como para identificar sobrepeso y/o obesidad. Cuantifica el peso del niño en relación con su propia talla (Heller-Rouassant y Pegueros-Fernández, 2013; Montesinos-Correa, 2014).
- **Plano de Frankfort:** Posición de la cabeza cuando la línea que une los puntos orbitales y tragión se encuentran paralela al plano del suelo.
- **Pliegue de tríceps:** Medición del pliegue tomada en paralelo al eje longitudinal del brazo en el punto del pliegue del tríceps.
- **Pliegue subescapular:** Medición del pliegue tomada oblicuamente 45° hacia abajo y hacia afuera en el punto del pliegue del subescapular (Esparza-Ros et al., 2019).
- **Puntuación Z:** Valor antropométrico como en número de desviaciones estándares o puntuaciones Z por debajo o por encima de la media de referencia.  $Z = \frac{\text{Valor observado} - \text{valor promedio}}{\text{desviación estándar}}$  del valor promedio.
- **Punto del pliegue del tríceps:** Punto en la cara posterior del brazo, en la línea media, a nivel de la marca del acromioclavicular medio.
- **Punto del pliegue subescapular:** Punto localizado a dos centímetros a lo largo de una línea que lleva una dirección hacia abajo, lateral y oblicua en un ángulo de 45° desde la marca subescapular.
- **Radiale:** Punto en el borde proximal y lateral de la cabeza del radio.
- **Subescapular:** Punto más abajo del ángulo inferior de la escápula.
- **Talla para la edad:** Indicador de desnutrición crónica con retraso en la talla, compara la estatura del niño con la estatura esperada en niños de la misma edad. Como consecuencia una desnutrición crónica en el crecimiento lineal o la presencia de una enfermedad crónica (Heller-Rouassant y Pegueros-Fernández, 2013; Montesinos-Correa, 2014).
- **Talla, estatura o altura:** Distancia perpendicular entre los planos transversales del punto del vértex y el inferior de los pies.

- **Tragión:** Punto situado en la muesca superior del trago de la oreja.
- **Vértex:** Punto más superior del cráneo cuando la cabeza está situada en el plano de Frankfort.

---

---

## 1 Resumen

Las secciones del intestino delgado y colon pertenecientes al sistema gastrointestinal humano, son el hábitat natural de una amplia variedad de microorganismos, a los que se le ha denominado microbiota intestinal. Se ha establecido una relación de simbiosis, que está dada por el trabajo en conjunto de la microbiota intestinal con el hospedero, lo que resulta en beneficio para este último, gracias a todos los mecanismos metabólicos de la microbiota intestinal, son sintetizados ácidos grasos de cadena corta y vitaminas, así como favorecer la absorción de minerales. Además, de los beneficios antes mencionados, se sabe que el desarrollo de una microbiota intestinal adecuada en el hospedero, limitará el desarrollo de microorganismos patógenos y permitirá la estimulación y fortalecimiento del sistema inmune.

Muchos problemas de salud son originados posiblemente desde la composición y el desarrollo de la microbiota intestinal al nacer y durante los primeros años de vida. La vía de parto y el tipo de alimentación son factores importantes que contribuyen en la composición de la microbiota intestinal en lactantes y preescolares. Se sabe que la lactancia materna contribuye a la mejora en la composición y desarrollo de la microbiota intestinal, debido a su alto contenido de oligosacáridos. Por ello, el presente trabajo está enfocado en el estudio de la microbiota intestinal cultivables de lactantes y preescolares, con la finalidad de estimar su estado nutricional, generado como propuesta de inclusión prebiótica a los fructooligosacáridos (FOS) obtenidos de las hojas de agave, desde la primera infancia.

La evaluación del estado nutricional permite la identificación de problemas que afectan al individuo sano, para ello se realizó en una primera etapa experimental, la verificación del estado nutricional, que consistió en seleccionar de acuerdo con el establecimiento de criterios de inclusión, exclusión y eliminación a 34 participantes menores de edad pertenecientes a guarderías previamente seleccionadas en Guadalajara, Jalisco. Se realizó una evaluación antropométrica usando técnicas avaladas por la Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría (ISAK, por sus siglas en inglés). Paralelamente, se recolectó la historia clínico-nutricional de cada participante mediante entrevistas que incluyeron datos

generales de historia médica, sociocultural y dietética. Finalmente, de los donantes seleccionados se recolectaron heces fecales frescas y posteriormente se utilizaron técnicas microbiológicas para la determinación de la cantidad de microorganismos perteneciente a los géneros: *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. y *Salmonella* spp.

Los resultados obtenidos de esta evaluación antropométrica e historia clínico-nutriológica aportan en conjunto el conocimiento de las características clínicas, dietéticas y socioculturales que rodean a los lactantes y preescolares y que combinada con la identificación de la microbiota intestinal cultivable se puede establecer una relación entre la microbiota intestinal cultivable de lactantes y preescolares con la evaluación antropométrica. En la microbiota intestinal cultivable, los filos bacteriano predominante fue el de las Actinobacterias y Firmicutes, representados por el género *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., respectivamente, esto se observó en los lactantes y preescolares nacidos por parto vaginal y alimentados con lactancia materna.

La dificultad en la realización de este tipo de reportes radica en la baja participación de voluntarios, el desconocimiento de temas como la microbiota y la desconfianza para realizar tanto donaciones de muestras biológicas, en este caso de heces fecales, así como el llenado adecuado de una historia clínico-nutriológica. Por otro lado, se debe establecer el uso combinado de técnicas de microbiología clásica y de biología molecular para identificar las cepas, su establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal en el sistema gastrointestinal de lactantes y preescolares.

La segunda etapa experimental de esta investigación consistió en la obtención y caracterización físico-química de extractos obtenidos de las hojas de dos tipos de agave (*Agave fourcroydes* y del *Agave angustifolia*), a los cuales se realizó vía enzimática la cuantificación de glucosa y sacarosa, para ello se empleo un analizador bioquímico (YSI 2900), los FOS se cuantificaron por cromatografía en capa fina de alta resolución (CAMAG®). Finalmente, se evaluó la actividad prebiótica de diferentes fracciones de hidratos de carbono obtenidos mediante el método de

ultrafiltración por membrana. Lo cual permitió obtener una mayor concentración de hidratos de carbono y FOS para la evaluación del efecto prebiótico utilizando una cepa comercial *Saccharomyces boulardii*. Las cinéticas de crecimiento de este probiótico se realizaron en presencia de FOS obtenidos de las hojas de agaves, se midió la duplicación celular por densidad óptica ( $DO_{630\text{ nm}}$ ) durante 22 h en un equipo automatizado de lector de placas con incubación y agitación (ELx808).

La caracterización físico-química, el color y el contenido de azúcares reductores fue similar en ambas hojas de agave. Los compuestos identificados como FOS presentes en los extractos de agave fueron questosa y nistosa. Mientras que los principales hidratos de carbono encontrados fueron glucosa, sacarosa y fructosa, siendo más abundantes en el *A. fourcroydes*. El enriquecimiento de los extractos de agave se logró con el proceso de ultrafiltración por membrana, estos extractos ricos en FOS produjeron un aumento en el crecimiento *in vitro* de *Saccharomyces boulardii*.

Considerando los resultados obtenidos en ambas etapas de esta investigación se concluye que los preescolares y los lactantes nacidos por parto vaginal y alimentados con lactancia materna tuvieron una composición de la microbiota intestinal diferente a los participantes nacidos por cesárea y alimentados con fórmula láctea (lactancia artificial). Se espera poder profundizar en la caracterización y obtención de los FOS de *Agave fourcroydes* ya que puede ofrecer una alternativa de su inclusión, así como ser evaluados como ingredientes para fórmulas lácteas, que ayuden a mejorar la composición de la microbiota intestinal de preescolares y lactantes.

---

## 2 Introducción

La estabilidad de la microbiota intestinal humana es cada vez más importante en la salud, ya que depende de su composición y su desarrollo durante los primeros años de vida tendrá un impacto en la salud de un adulto. El establecimiento de la microbiota intestinal es crucial para prevenir diferentes afecciones como las enfermedades gastrointestinales, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, diarrea por antibióticos, obesidad infantil, diabetes tipo 1 y tipo 2, entre otras. La vía de parto por cesárea o vaginal y el tipo de alimentación, fórmula láctea o lactancia materna se consideran factores que influyen esencialmente en la composición y el desarrollo de la microbiota intestinal. La alimentación con fórmula láctea adicionada con fructooligosacáridos (FOS) se ha asociado con efectos benéficos sobre la composición y el desarrollo de la microbiota intestinal en la vida temprana.

Actualmente, existen estudios que generan información sobre las tendencias a nivel mundial, por un interés de adquirir alimentos de mejor calidad y que al mismo tiempo, brinden beneficios en la prevención de enfermedades en lactantes y preescolares. Por ejemplo, la agencia MINTEL (2017) reportó que, durante diciembre de 2013 a noviembre de 2016, la región Asia-Pacífico se convirtió en una zona con mayor desarrollo de fórmulas lácteas, con el 54% en la producción de estos alimentos para la nutrición infantil. Destacan por mayor demanda a las fórmulas de crecimiento (33%), las fórmulas para bebés de 0 a 6 meses (22%), las fórmulas para bebés de 6 a 12 meses (16%). Por su parte 360 Market Updates en 2019 reportan que los principales países en cuando al consumo y desarrollo de alimentos con características funcionales son los países de Europa, China, E.E. U.U. y Japón. Siendo este último quien reportó 24.72% por ventas de FOS.

Asimismo, MINTEL reporta que los ingredientes con función prebiótica más usados en el desarrollo de estas fórmulas lácteas son los fructooligosacáridos (FOS= 33%), los galactooligosacáridos (GOS= 27%) y las inulinas (12%). En América Latina, los FOS son los principales ingredientes en las fórmulas lácteas.

En fusión de esta creciente tendencia en el aumento de consumo de fórmulas lácteas destinadas a la alimentación en lactantes y preescolares adicionadas con FOS, es importante investigar el efecto de las fuentes alternativas de obtención de FOS sobre la composición y el desarrollo de la microbiota intestinal durante los primeros años de vida. A su vez, también es relevante establecer como la composición de la microbiota intestinal se asocia con la evaluación antropométrica de los lactantes y los preescolares, para así poder establecer una relación entre la estimulación de esta microbiota benéfica y el consumo de FOS y como esto impacta en el desarrollo antropométrico.

En este marco el presente trabajo experimental se centró, primeramente, en evaluar antropométricamente y recolectar la historia clínico-nutricional de los lactantes y los preescolares, así como determinar la composición de la microbiota intestinal. En segundo lugar, se obtuvieron y caracterización los FOS a partir de las hojas del *Agave fourcroydes* y del *Agave angustifolia*, para evaluar su actividad prebiótica, como posible nutriente para estimular el crecimiento *in vitro* del probiótico *Saccharomyces boulardii*. Todo lo anterior, es con la finalidad de usar los FOS obtenidos de hojas de agaves como ingredientes en las fórmulas lácteas, que ayuden a desarrollar una microbiota intestinal más estable en la vida temprana y contribuir en disminuir la susceptibilidad de diferentes enfermedades en los lactantes y los preescolares.



---

### **3 Marco teórico**

#### ***3.1 Evaluación del estado nutricional en lactantes y preescolares***

La evaluación del estado nutricional tiene como objetivo identificar problemas que afectan o afectarán al individuo sano en su estado de nutrición. Por lo tanto, es necesario recabar información sobre sus datos antropométricos, bioquímicos, clínicos, dietéticos y composición corporal y registrarla en la historia clínico-nutricional (Villegas-Sepúlveda, 2010).

##### *3.1.1 Historia clínico-nutricional*

La historia clínico-nutricional permite monitorear de forma periódica el desarrollo a lo largo de cada etapa de la vida (Heller-Rouassant y Pegueros-Fernández, 2013). En México no se encuentra un lineamiento claramente definido para la elaboración de una historia clínico-nutricional. Sin embargo, existen una Norma Oficial Mexicana que especifican los requisitos para la recolección de información en la atención médica y otra Norma Oficial Mexicana sobre la propiedad y resguardo de los datos recabados que corresponden a la NOM-174-SSA1 (1998) y la NOM-004-SSA3 (2012) respectivamente.

De este modo, la recolección de información en lactantes y preescolares es a través de un modelo adaptativo de la historia clínico-nutricional. Los componentes base son: datos generales, historia médica, historia sociocultural, historia dietética, exploración física, evaluación antropométrica y evaluación bioquímica (Villegas-Sepúlveda, 2010). En el caso de menores de 12 meses es necesario saber si se ha recibido lactancia materna exclusiva y si esta ha sido a libre demanda, conociendo el número de tetadas a lo largo de 24 horas. De lo contrario, se requiere saber si se ha alimentado con algún sucedáneo de leche materna, también conocido como fórmula láctea, el número onzas de fórmula láctea consumidas por toma, así como la cantidad de biberones consumidos al día y los horas de la distribución de estos (Heller-Rouassant y Pegueros-Fernández, 2013).

### 3.1.2 Composición corporal

La composición corporal proporciona la composición química específica de un tejido, órgano o de todo el cuerpo humano, es decir, es una perspectiva de la función fisiológica e inclusive de la estructuración anatómica. De forma general se puede representar mediante un modelo simple de dos componentes a partir de la Masa Corporal Total (MCT):

$$MCT = MG + MLG$$

Donde MG: Masa grasa, MLG= Masa libre de grasa obtenida de la suma de todos los tejidos restantes (Ellis, 2006; Suverza-Fernández, 2010).

### 3.1.3 Datos antropométricos

La antropometría se usa dentro de la evaluación del estado nutricional, ya que genera una visión más objetiva frente a las condiciones físicas y la composición corporal del individuo lactantes y preescolares con o sin patología aparente y en cualquier entorno (Heller-Rouassant y Pegueros-Fernández, 2013; Suverza-Fernández, 2010). Es necesario realizar esta toma de medidas junto con la composición corporal para entender el crecimiento general de la población de estudio. La valoración antropométrica se basa en la relación que existe entre la talla mediante una única medición de peso, usualmente es el peso o talla para la edad. Esto identifica las variaciones en las diferentes etapas de la vida y distintos grados de nutrición. En la tabla 1 se muestran algunos indicadores antropométricos relacionados con la edad (Ellis, 2006; Montesinos-Correa, 2014; Olsen y Wright, 2012).

Existen indicadores antropométricos apropiados para que la valoración antropométrica sea considerada adecuada, por ejemplo, peso para la edad, talla para la edad, peso para la longitud o peso para talla e IMC para la talla. Así mismo, algunos datos necesarios en el registro antropométrico son: edad, peso, longitud o talla, perímetro cefálico, circunferencia de cintura. La obtención de los datos antropométricos debe compararse con tablas y gráficas de referencia de la población de estudio. Estas tablas y gráficas de referencia se han ido modificando y

perfeccionando a lo largo de las últimas décadas, consolidándose tanto a nivel nacional como internacional (Heller-Rouassant y Pegueros-Fernández, 2013).

Tabla 1. Indicadores antropométricos vigentes en las primeras etapas de la vida para población mexicana.

Grupo etario	Indicador antropométrico	Componente que evalúa	Tejido de mayor interés
<i>Recién nacido</i>	Masa Longitud	Masa corporal Cráneo, columna vertebral, pelvis y pierna	Grasa, músculo, hueso y agua. Óseo
	Perímetro cefálico	Masa encefálica	Neuronal
<i>Lactante</i>	Masa Estatura o longitud	Masa corporal Cráneo, columna vertebral, pelvis y piernas	Grasa, músculo, hueso y agua Ósea
	Perímetro cefálico	Masa encefálica	Neuronal
	Perímetro del brazo	Masa corporal	Muscular y graso
<i>Preescolar, escolar y adolescente</i>	Masa Estatura o talla	Masa corporal Cráneo, columna vertebral, pelvis y pierna	Grasa, músculo, hueso y agua Ósea
	Perímetro del brazo	Masa corporal	Muscular y graso
	Panículos adiposos	Grasa subcutánea	Graso

Montesinos-Correa (2014); Indicadores antropométricos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA2 (1993), Control de la nutrición, crecimiento y desarrollo del niño y adolescente. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.

En la actualidad existen pocas investigaciones en población mexicana que reportan la asociación entre el estado nutricional de lactantes y preescolares con relación a los microorganismos presentes en su microbiota intestinal.

A la fecha, los estudios relacionados con la evaluación del estado nutricional antropométrico y su relación con la microbiota intestinal en lactantes y preescolares se han realizado de forma descriptiva u observacional, siendo pocos los estudios que han logrado ser de tipo longitudinal, prospectivo o de cortes, recabando información tanto antropométrica como de cultivos microbiológicos o mediante extracciones de DNA proveniente de heces fecales.

Una de las hipótesis por las cuales no se cuentan con muchos reportes experimentales que identifiquen la relación que tiene el desarrollo nutricional antropométrico con el establecimiento de la microbiota intestinal en lactantes y preescolares, es debido a la combinación de diversos factores, tal como son las técnicas antropométricas. Esta al ser de un costo relativamente bajo y de fácil aplicación a diversos grupos etarios, tiene la desventaja del error sistémico y aleatorio sino se cuenta con los equipos adecuados y calibrados, así como la capacitación y estandarización de la técnica para realizar las mediciones antropométricas

Por otro lado, se tiene estrictos criterios por parte de los comités de ética para el desarrollo y aplicación de protocolos de trabajo con seres humanos y la toma o colecta de muestras biológicas. También, se debe considerar el establecimiento de diversas redes de trabajo con la finalidad de obtener una muestra representativa de la población total de una ciudad, los costos en logística para la colecta, transporte y procesamiento de las muestras, establecer el personal, equipos y material necesarios, así como los grandes intervalos de tiempo que deben esperarse para vislumbrar el establecimiento y/o modificación de la microbiota intestinal.

Coluccini et al. (2020) realizaron en Argentina un estudio mediante revisión bibliográfica para identificar y asociar los factores que influyen en el desarrollo de la microbiota intestinal y el estado nutricional antropométrico en menores de seis años. Identificaron los datos antropométricos de pesos y talla, porcentaje de peso para la edad, porcentaje de talla para la edad e índice de masa corporal, así como una historia clínico-nutricional. Estos autores no encontraron una asociación entre los factores evaluados y la microbiota intestinal.

Por su parte, Osborne et al. (2020) registraron los datos antropométricos de circunferencia media de brazo, circunferencia media de muslo, circunferencia de cintura y circunferencia de cadera, así como la relación cintura-cadera e IMC. Reportaron que el desarrollo de la microbiota intestinal puede ser interrumpido por modificaciones del peso corporal, así como por el almacenamiento y distribución de

la grasa. Finalmente, concluyeron que puede existir una baja diversidad de microorganismos en la microbiota intestinal debido al incremento en las mediciones antropométricas, que indican la presencia de desnutrición por la circunferencia media de brazo, presencia de grasa visceral por la circunferencia de cintura y grasa intraabdominal por la relación cintura cadera.

### **3.2 Establecimiento de la microbiota intestinal en lactantes y preescolares**

Es importante reconocer que la microbiota intestinal representa un papel fundamental como promotor de la salud o en la prevención de enfermedades durante los primeros tres años de vida (Eidelman y Schanler, 2012). El desarrollo y maduración de la microbiota intestinal en lactantes y preescolares tiene un proceso altamente dinámico, influenciado principalmente por las condiciones perinatales. Como lo son el canal de nacimiento, el tipo de alimentación, el uso de antibióticos, el estilo de vida y factores geográficos (Derrien et al., 2019).

#### *3.2.1 Microbiota intestinal*

La microbiota es un conjunto de microorganismos vivos residentes, compuesta por bacterias, arqueas y hongos así como también pueden ser considerados algunos virus y fagos. Es variable entre sitios de ambiente y nichos en el hospedero durante la salud, se asocia como factor protector frente a lesiones epiteliales, control de la adiposidad y estimulación de la angiogénesis intestinal (Cho y Blaser, 2012; Derrien et al., 2019). En los últimos años el concepto de “flora intestinal”, ha sido modificado por “microbiota intestinal”, que corresponde a aquellos microorganismos residentes en el sistema gastrointestinal (SGI) (Eckburg et al., 2005; Sebastián Domingo y Sánchez Sánchez, 2017).

La microbiota intestinal, va evolucionando con el hospedero, la programación metabólica y la neurológica en función del SGI (figura 1), ya que este tiene una

superficie de 250-400 m<sup>2</sup>, de una capacidad máxima de 0.4 kg (0.4L) y una carga de microorganismos cerca de 10<sup>12</sup> – 10<sup>14</sup> UFC (Derrien et al., 2019; Sebastián Domingo y Sánchez Sánchez, 2017).

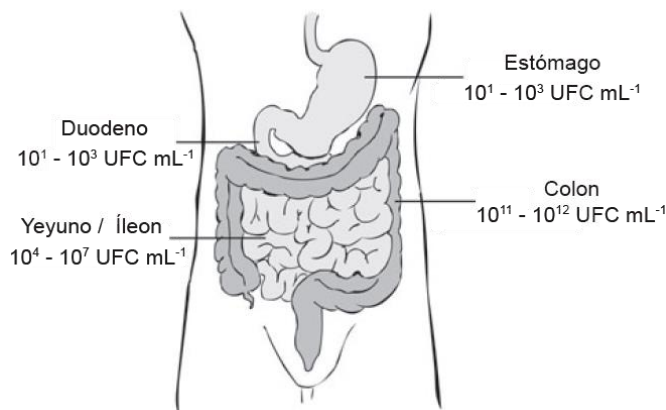


Figura 1. Cambios en la densidad poblacional de la microbiota a lo largo del SGI (Penders et al., 2007).

Se tiene un registro de alrededor de 1,000 especies bacterianas diferentes en la microbiota intestinal, principalmente por bacterias de tipo anaerobias, que a su vez se pueden dividir en cuatro filotipos: Actinobacterias, Firmicutes, Proteobacterias, Bacteroidetes (Castañeda-Guillot, 2018; Cho y Blaser, 2012; Jost et al., 2013; Martínez-Suárez, 2015). En la figura 2 se ejemplifican el efecto que tiene el tipo de alimentación durante los primeros seis meses de vida y así como el consumo de alimentos diferentes a la leche materna o las fórmulas lácteas (Derrien et al., 2019).

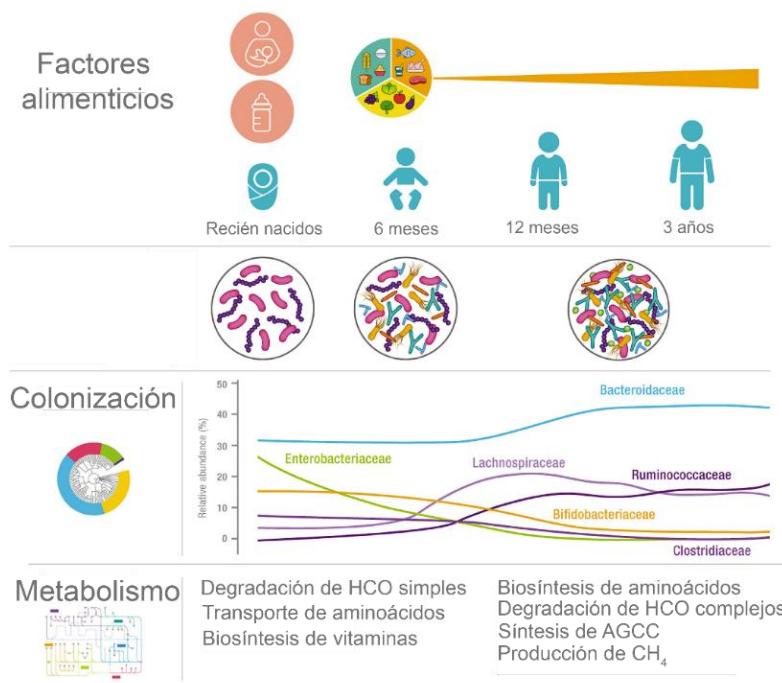


Figura 2. Efecto de la alimentación en el establecimiento de la microbiota intestinal durante los primeros tres años de vida.

**HCO**: hidratos de carbono, **AGCC**: ácidos grasos de cadena corta, **CH<sub>4</sub>**: metano. Modificado de Derrien et al. (2019).

### 3.2.1.1 Establecimiento de microbiota intestinal por el canal de nacimiento

El canal de nacimiento ha sido reconocido como uno de los principales factores para el establecimiento de la microbiota en los humanos. Al finalizar el proceso de parto, el neonato es colonizado por diferentes microorganismos en función del tipo de canal de nacimiento, y estableciéndose durante los primeros años de vida (tabla 2). Por ello, se han realizado estudios, a nivel de filos y géneros bacterianos, para identificar cuáles son los microorganismos que llegan primero al SGI de los recién nacidos según la vía de nacimiento como se menciona a continuación (Díaz y Garrido, 2020; Icaza-Chávez, 2013; Zhuang et al., 2019).

- *Canal vaginal*: Los neonatos tienen contacto con la microbiota de la vagina así como la microbiota fecal. Teniendo como microorganismos dominantes a *Prevotella* spp. y *Lactobacillus*.

- *Cesárea*: No tienen contacto con la microbiota vaginal pero sí con la microbiota de la piel materna, el ambiente intrahospitalario y personal médico. Los microorganismos dominantes son *Corynebacterium*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium* spp.

Yang et al. (2016) realizaron mediante análisis específicos de secuenciación de DNA los factores que afectan la estructura de la microbiota intestinal en los primeros 1,000 días de vida. Mencionan que *Lactobacillus* spp., *Prevotella* o *Sneathia* spp. dominan el intestino de los lactantes nacidos por vía vaginal, después hay una mayor distribución de *Bifidobacterium* spp. y *Bacteroides*. Mientras que los lactantes nacidos por cesárea tienen una microbiota intestinal dominada por *Staphylococcus*, *Corynebacteria* y *Propionibacterium* spp. y menores proporciones de *Bifidobacterium* spp. y *Bacteroides* spp.



Tabla 2. Modificación de la microbiota según la vía de parto en menores de 12 meses.

Tipo de parto	Filo bacteriano	Género bacteriano	Rangos de colonización (%/días)					Referencia
			0 a 7	8 a 30	31 a 90	91 a 180	181 a 360	
Vía vaginal	Actinobacterias	<i>Bifidobacterium</i>	41	53	-	-	-	Mitsou et al., 2008
		<i>Bifidobacterium</i> OTU1	28	-	-	-	-	Dogra et al., 2015
		<i>Bifidobacterium</i>	85	98	-	-	-	Gronlund et al., 1999
	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	-	-	-	-	-	Kabeerdoss et al., 2013
		Enterobacteriaceae no clasificada	-	-	-	-	-	Hesla et al., 2014
		<i>Haemophilus</i>	-	-	-	-	-	Hesla et al., 2014
	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	73		73		93	Jakobsson et al., 2014
		<i>Bacteroides fragilis</i>	68	63	78	76	-	Gronlund et al., 1999
	Firmicutes	<i>Lactobacili</i>	59	-	-	-	-	Mitsou et al., 2008
		<i>Clostridium perfringens</i>	-	17	-	-	-	Gronlund et al., 1999
Vía cesárea	Actinobacterias	<i>Bifidobacterium</i>	4	-	0	-	-	Mitsou et al., 2008
		<i>Bifidobacterium</i> OTU1	6	-	-	33	40	Dogra et al., 2015
		<i>Bifidobacterium</i>	36	-	58	-	-	Gronlund et al., 1999
	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	-	-	-	-	-	Kabeerdoss et al., 2013
		Enterobacteriaceae no clasificada	-	-	-	-	-	Hesla et al., 2014
		<i>Haemophilus</i>	-	-	-	-	-	Hesla et al., 2014
	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	11	-	11		44	Jakobsson et al., 2014
		<i>Bacteroides fragilis</i>	3	0	14	36	-	Gronlund et al., 1999
	Firmicutes	<i>Lactobacili</i>	4	-	-	-	-	Mitsou et al., 2008
		<i>Clostridium perfringens</i>	-	57	-	-	-	Gronlund et al., 1999

Modificado de Rutayisire et al. (2016).

Rutayisire et al. (2016) identificaron un cambio en la microbiota intestinal según el canal de nacimiento, mediante la revisión de literatura científica de aislados microbiológicos a nivel de filo encontrados en heces fecales de menores de un año. El filo de Actinobacterias está en menor presencia durante los primeros siete días de vida para los nacidos por vía cesárea en comparación a los nacidos por vía vaginal. La abundancia del filo de las Proteobacterias, específicamente la familia *Enterobacteriaceae*, no es definido claramente, ya que reportan estudios en donde los nacidos por vía cesárea presentan menor abundancia de estas bacterias, mientras que en otros estudios reportan una abundancia mayor. En el caso del filo de Bacteroidetes es bajo el contenido para los nacidos por vía cesárea, especialmente el género *Bacteroides* en comparación con los nacidos por vía vaginal. Observaron que después de los primeros 365 días de vida los filos Bacteroidetes y Firmicutes tienen una baja presencia en nacidos por vía cesárea. Mientras que *Bifidobacterium* (género del filo Actinobacterias) no presenta repercusiones durante el desarrollo de su vida independiente a la vía de nacimiento.

Moreno Villares (2008) reportó que en las heces fecales de los recién nacidos por parto vaginal hubo mayor presencia de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp, esto fue sustituido durante los primeros cinco días de nacido por microorganismos del género *Bifidobacterium*. Mientras que, los nacidos por vía cesárea mostraron una colonización de los microorganismos presentes en el ambiente hospitalario. Por su parte, van den Elsen et al. (2019) observaron una mayor presencia de microorganismos del género *Bifidobacterium* en la leche materna a partir del canal de nacimiento vaginal en comparación con el nacimiento por cesárea.

Según Qin et al. (2010) y Turnbaugh et al. (2009) la baja diversidad de microorganismos en lactantes nacidos por cesárea, se ha relacionado con una variedad de enfermedades humanas, incluidas la enfermedad inflamatoria intestinal y la obesidad.

### 3.2.1.2 Establecimiento de microbiota intestinal por el tipo de alimentación

En la última década se ha reconocido el efecto que tiene la alimentación sobre la microbiota intestinal de lactantes y preescolares. Los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* provenientes de la leche materna son los primeros colonizadores del intestino en recién nacidos. La alimentación con leche materna puede reducir la incidencia y la gravedad en enfermedades metabólicas y del sistema inmune, en comparación con la alimentación a partir de fórmula láctea (Jost et al., 2013).

#### 3.2.1.2.1 Alimentación con lactancia materna

La lactancia materna es producida directamente del seno materno, está compuesta por una microbiota de *Proteobacterias* y *Firmicutes*. Además, es rica en grandes concentraciones de lactosa, lípidos, proteínas, péptidos como lactoferrina, caseína e inmunoglobulinas y oligosacáridos, estos últimos actúan como prebióticos naturales. El consumo de oligosacáridos de la leche materna (OLM) estimula el desarrollo específico de microorganismos del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en la microbiota intestinal del lactante, ya que son preferidos como sustrato para la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y lactato (Díaz y Garrido, 2020; Guaraldi y Salvatori, 2012; Icaza-Chávez, 2013; Serrano-Cervantes y Sermeño-Chicas, 2012; Serrano-Honeyman et al., 2016; van den Elsen et al., 2019; Zhuang et al., 2019).

En el estudio de Yang et al. (2016), mencionan que la alimentación con leche materna promueve la presencia principalmente de microorganismos del género *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. y algunos anaerobios estrictos y otros anaerobios facultativos.

Guaraldi y Salvatori (2012) reportaron que los efectos de la alimentación a partir de leche materna se reflejan en las heces fecales de los lactantes y las madres, ya que en su microbiota reportaron la presencia de *L. rhamnosus*, *Staphylococci* y *Staphylococcus epidermidis*.

Lewis et al. (2015), observaron un mejor establecimiento de *Bifidobacterium* en lactantes alimentados con leche materna, en comparación a los lactantes alimentados con fórmula láctea. Específicamente la presencia *Bifidobacterium breve* presentó una correlación positiva con otros miembros de *Bifidobacterium*, mientras que la correlación de *Bifidobacterium logum* fue negativa en lactantes no alimentados con leche materna. Los niveles de bifidobacterias presentes en las heces fecales fueron evaluados mediante la secuenciación del RNA ribosomal 16S logrando encontrar miembros del género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* (mayormente *Streptococcus*), *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* y *Clostridium*.

#### 3.2.1.2.2 Alimentación con fórmula láctea

El uso de fórmulas lácteas también ha demostrado ser un factor que influye en la modificación de la microbiota intestinal. Puede haber variaciones desde la forma de obtener el alimento en polvo seco, el equipo utilizado para la preparación de la fórmula láctea o el agua empleada para suspender la fórmula láctea seca. El resultado de la modificación de la microbiota intestinal con la alimentación por fórmula láctea es visto por el incremento del género *Clostridium* como *C. paraputrificum*, *C. perfringens*, *C. clostridiiforme*, *C. difficile* y *C. tertium*; el género *Streptococcus* como *S. bovis*, *S. faecalis* y *S. faecium*. Así como *Bacillus subtilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Veillonella paravula*, *Lactobacillus acidophilus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Atopobium*. Específicamente, *Bifidobacterium fragilis* es quien tiene mayor presencia en la microbiota intestinal de estos lactantes (Guaraldi y Salvatori, 2012).

En un estudio realizado por Cooke et al. (2005) en donde analizaron la composición de la microbiota intestinal en recién nacidos de 0 a 6 semanas en lactantes alimentados con leche materna y fórmula láctea, mediante técnicas de microbiología clásica, lograron encontrar los géneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. *Enterobacteriaceae* spp y *Escherichia coli*. Reportaron un cambio en la composición de la microbiota intestinal, de acuerdo con la alimentación a lo largo de 6 semanas.

En los primeros cinco días de vida, las diferencias más notables fueron la presencia de *Staphylococcus* spp. y *Bifidobacterium* spp., ya que estos son más abundantes en los alimentados con leche materna en comparación con fórmula láctea. Al cumplirse el tiempo de estudio, reportaron un aumento de las bacterias estrictamente anaerobias como *Bacteroides* spp. en ambos grupos. Mientras que para los géneros *Lactobacillus* spp. y *Clostridium* spp. mostraron un aumento gradual a lo largo del tiempo.

Penders et al. (2007) reportaron que la microbiota intestinal de los lactantes alimentados con fórmula láctea tiene mayor presencia de *Clostridium difficile*, lo cual repercute en la salud de los lactantes. Esto se refleja al desarrollar eccema, sibilancias recurrentes, sensibilización alérgica, así como un diagnóstico de dermatitis atópica.

### 3.2.2 Otros factores que influyen en el establecimiento de la microbiota intestinal

El uso de medicamentos es un factor externo que modifica la microbiota intestinal de los lactantes y preescolares (Díaz y Garrido, 2020). Los antibióticos consumidos por recién nacidos son muy frecuentes, pueden alterar el número y la diversidad de los microorganismos de la microbiota intestinal, esto es conocido como disbiosis. Los nichos vacíos que provoca la disbiosis son llenados por microorganismos patógenos y la recuperación de la microbiota intestinal es lenta o parcial (Beltrán de Heredia, 2017; Derrien et al., 2019; Serrano-Honeyman et al., 2016).

Bokulich et al. (2016) estudiaron el desarrollo de la microbiota en menores de 2 años que consumían antibióticos, y observaron una disminución de *Bifidobacterium* frente a una gran presencia de *Enterococcus*.

Otro factor intrínseco es la secreción del propio sistema digestivo y los factores genéticos, ya que tienen una fuerte influencia en el predominio de una cepa de microorganismos sobre otras. Por consiguiente, la microbiota intestinal no solo

cambia en abundancia sino que evoluciona junto con la programación metabólica y neurológica del hospedero. Por tal motivo, el dinamismo que se asocia a la microbiota intestinal desde el nacimiento hasta la adultez tardía, puede ayudar esclarecer los efectos en la variación de las comunidades microbianas y sobre todo en la asociación para el desarrollo de futuras enfermedades (Beltrán de Heredia, 2017; Derrien et al., 2019; Díaz y Garrido, 2020; Serrano-Honeyman et al., 2016; Zamudio-Vázquez et al., 2017).

Entre los factores extrínsecos que tienen influencia en el establecimiento de la microbiota intestinal, están aquellos relacionados con la llamada “teoría de la higiene”. En donde se focaliza a los niños viviendo en ambientes limpios o que se tiene una excesiva limpieza, esta se convierte en un factor negativo para el desarrollo de la microbiota debido a que se encuentran menos expuestos a los agentes infecciosos (2016).

### ***3.3 Aislamiento e identificación de la microbiota intestinal***

El aislamiento de los microorganismos presentes en el SGI se puede realizar a partir de heces fecales, con una recuperación de  $<10^9$  UFC g<sup>-1</sup>. Moore y Holdemann (1974) y Tannock (1995) reportaron que el contenido de microorganismos en las heces humanas es mayor a  $10^{11}$  UFC g<sup>-1</sup>, lo que llega a representar hasta un 55% de los sólidos dentro del colon. Puede llegar a haber 400 especies en un solo sujeto, predominando los microorganismos anaerobios facultativos (Hammes y Hertel, 2006). Es necesario considerar algunos aspectos que pueden afectar el crecimiento de los microorganismos como pH, anaerobiosis, temperatura óptima y osmolaridad (tabla 3) (Hammes y Hertel, 2006).

Tabla 3. Algunas condiciones de crecimiento para microorganismos presentes en las heces fecales de lactantes y preescolares.

Microorganismo	Características de crecimiento	Referencia
Anaeróbicos	Se desarrollan en ausencia de oxígeno; predominantes en las mucosas de la boca, los intestinos, las heces y la vagina. Por lo que comúnmente son enterobacterias, pseudomonas o cocos Gram positivos. las muestras de heces fecales deben ser tratadas con especial cuidado. La colecta y el transporte de la muestra deben ser en recipientes especial que genere un ambiente anaeróbico.	(Torres, 1996).
Aeróbicos	Gram negativos no formadores de esporas, son de rápido crecimiento en condiciones aeróbicas o anaeróbicas facultativas en un medio selectivo o no selectivo. El requerimiento de nutrientes es simple, son fermentadores de glucosa y reductores de nitrato. Los principales miembros son las Enterobacteriaceae, <i>Salmonella</i> serotipo Typhi, <i>Shigella</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> .	(Murry et al., 2020a)
Mesófilos	La temperatura de crecimiento es de 24 – 40°C, óptima de 37°C. Algunos miembros pertenecientes son <i>Bacillus</i> , <i>Aneurinibacillus</i> , <i>Clorstridacea</i> , <i>Acetonema</i> , <i>Pectinatus</i> , <i>Aminomonas</i> o <i>Moorella</i>	(De Vos et al., 2009).
Coliformes	Son aeróbicos o anaeróbicos facultativos, de tinción Gram negativos, no son formadores de esporas, de forma bacilar que pueden fermentar lactosa y liberan gas. su crecimiento es a partir de 48 horas a una temperatura de 35 – 37°C. Las especies más representativos <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Hafbia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i> y <i>Yersinia</i> .	(Horan, 2003; Madigan et al., 2015; Tortora et al., 2019).

La identificación preliminar de los microorganismos presentes en las heces fecales se realiza a partir de la técnica de coprocultivo, en la cual se usan muestras de heces frescas o a partir de un hisopo rectal. Es uso del coprocultivo es para demostrar la presencia de bacterias enteropatógenas, que son las causantes de afecciones como la diarrea, el dolor abdominal, la fiebre e inclusive pueden provocar la muerte. Estas bacterias llegan a representar el 1% de la microbiota intestinal (Torres, 1996).

Moreno et al. (2015) realizaron un estudio preliminar a niños de tres a 13 años con trastorno del espectro autista. A partir de técnicas de microbiología clásica evaluaron la microbiota aeróbica del tracto gastrointestinal mediante la colecta de heces fecales. Identificaron en la microbiota intestinal benéfica la presencia de *Escherichia coli* en 87.2% de los participantes. En el 30% de los participantes observaron una disminución o ausencia de *Enterococcus faecalis*. La microbiota intestinal patógena presentó microorganismos de los géneros *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Streptococcus* spp. y *Campylobacter coli*, los cuales fueron responsable de dolor abdominal, diarrea y estreñimiento. La microbiota intestinal patógena fue atribuida como la responsable de los trastornos de la conducta de los niños es decir, presencia de aleteos, autoagresión, berrinches e insomnio.

### 3.3.1 Algunos microorganismos presentes en la microbiota intestinal de lactantes y preescolares

Los microorganismos que componen la microbiota intestinal de los lactantes y preescolares son variables, las cantidades de bacterias que contiene son sorprendentes. Algunas de las bacterias presentes en la microbiota intestinal corresponden a los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Salmonella*.

#### 3.3.1.1 Género *Bifidobacterium*

Las especies de *Bifidobacterium* se han descrito desde los años 20 hasta lo más reciente en el año 2000. El género *Bifidobacterium* spp. es fácilmente encontrando en la cavidad bucal, el intestino grueso y la vagina, por lo que puede ser aislada con facilidad de las heces fecales de infantes. *Bifidobacterium* representa un bajo riesgo para la salud de los humanos (Biavati y Mattarelli, 2006; Murry et al., 2020b). Mantiene un control del número y la presencia de diferentes especies a lo largo del SGI, gracias a la capacidad de coexistir con diferentes microorganismos, especialmente con anaerobios estrictos (Biavati y Mattarelli, 2006).

*B. bifidum* y *B. logum* se han convertido en los principales exponentes en el TGI de infantes. Mientras que *B. adolescentes*, *B. bifidum*, *B. logum* y *B. breve* son especies



típicas de la vagina. *Bifidobacterium* logra estar presente en ciertas condiciones patológicas, como lo son las caries dentales, principalmente por *B. denticolens*, *B. inopinatum* y *B. dentium*. (Biavati y Mattarelli, 2006; Murry et al., 2020b).

### 3.3.1.2 Género *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* pertenecen a las bacterias ácido-lácticas, no son considerados como un grupo patógeno. Los miembros del género *Lactobacillus* son fermentadores estrictos, capaces de desarrollarse en una gran variedad de hábitats como la cavidad oral, la vagina o el SGI, siempre y cuando exista grandes cantidades de hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas y bajos niveles de oxígeno contenidos en la atmosfera, considerándose así, como bacterias anaerobias oxígeno-tolerantes. El ácido láctico que producen estas bacterias, las hace más tolerantes a ellas mismas, lo que permite una modificación en el pH del sustrato coadyuvando en la limitación e inclusive la inhibición de microorganismos con características patógenas (Dart, 1996; Hammes y Hertel, 2006; Zotta et al., 2017).

Al ser el SGI un ecosistema en contacto con el ambiente, los *Lactobacillus* aislados de las heces fecales brindan una idea de su origen o tránsito a lo largo de este sistema. Representan una parte minoritaria de toda la microbiota contenida en las heces fecales. Los parámetros de crecimiento a considerar son el pH, la anaerobiosis, la temperatura y la osmolaridad (Hammes y Hertel, 2006; Maresca et al., 2018).

### 3.3.1.3 Género *Clostridium*

El género *Clostridium* es cultivable en condiciones anaeróbicas en una temperatura de 37°C, descompone proteínas, produce toxinas o realiza ambas acciones, son Gram positivos, es un generador de esporas y son sensibles a la penicilina G. *Clostridium* puede ser encontrarlo en el suelo, en sedimentos marinos, en aguas residuales, así como en el TGI de humanos y animales. La presencia de *Clostridium perfringens* es relevante en lactantes y preescolares. Es de forma rectangular y convexa, de apariencia suave y rodeada por una zona hemolítica, es Gram positivo,

raramente presenta esporas y es productor de toxinas (toxinas alfa, beta, épsilon y iota). Su característica principal es su amplio y rápido crecimiento, especialmente en medios de cultivo que contienen  $\beta$ -hemolíticos (Kayser, 2005; Murry et al., 2020c; Riedel et al., 2019).

Las afecciones clínicas causadas por *C. perfringens* están asociadas al SGI mediante la intoxicación de alimentos en un tiempo de incubación de 8 a 12 horas. Otra afección es la enteritis necrosante atribuida a las toxinas beta de *C. perfringens* tipo C (Murry et al., 2020c). Una enterotoxina de gran importancia producida por *C. perfringens* es la CPE de 35 kDa, su acción radica en la hipersecreción en el yeyuno e íleon que provoca una pérdida de líquidos y electrolitos en forma de diarrea (Riedel et al., 2019).

#### 3.3.1.4 Género *Salmonella*

El género *Salmonella* alberga a más de 2500 serotipos formando parte de los microorganismos entéricos con capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos entéricos. Es anaerobio facultativo, no forma esporas, Gram negativo de forma bacilar, crece a en un rango de temperatura de 7 – 48°C, a un pH neutro, 6.5 – 7.5, adaptable a rangos de pH de 4.05 – 9.5. *Salmonella* es capaz de utilizar citrato como fuente de carbono, y lisina como fuente de nitrógeno, no fermenta lactosa o sacarosa, es oxidasa negativa, forma ácidos y algunas veces produce gases, generalmente H<sub>2</sub>S. Los medios de cultivo usados en el aislamiento del género *Salmonella* a partir de heces fecales, permiten tener un cultivo de cerca del 70% de los microorganismos presente en las heces fecales (Dart, 1996; Elliermeier y Slauch, 2006; Riedel et al., 2019).

Los serotipos como *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, están adaptados a los humanos y no son causantes de enfermedades en animales. Sin embargo, *Salmonella choleraesuis* está muy bien adaptada a animales y cuando logra entrar al cuerpo humano, se convierte en el causante de enfermedades severas. Por lo que la forma más común de infección en niños por *Salmonella* es mediante la transmisión

fecal-oral. Lo que provoca gastroenteritis con síntomas de náuseas, vómito, fiebre, dolor abdominal, mialgias y dolor de cabeza (Murry et al., 2020a).

### 3.3.2 Técnicas y medios de cultivo para el aislamiento de la microbiota intestinal cultivable

Las técnicas de cultivo usadas para el aislamiento de microorganismos tienen la capacidad de amplificar el número de microorganismos presentes, detectar niveles muy bajos de contaminación, así como diferenciar células viables de células no viables (Dart, 1996). En la tabla 4 se describen algunas técnicas de cultivo utilizadas en el aislamiento de la microbiota intestinal presente en heces fecales de lactantes y preescolares.

Tabla 4. Algunas técnicas de cultivo utilizados en el aislamiento de microorganismos esperados en las heces fecales de lactantes y preescolares.

Técnica de cultivo	Principio	Referencia
Dilución de muestra	Se toma 1 mL de muestra y se adiciona a 9 mL de un diluyente estéril obteniendo así, una dilución uno en diez [1:10 o $10^{-1}$ ], repitiendo el proceso anterior se obtiene la dilución 1:100 o $10^{-2}$ . La dilución adecuada para el conteo de microorganismos se encuentra en un rango de 30 – 300 por placa Petri.	(Dart, 1996)
vertido en caja o vertido en placa	Se coloca una cantidad de muestra conocida, diluida o no, en una placa Petri y adicionar ~10 mL de agar fundido y se realizan movimientos circulares, con la finalidad de homogenizar el agar con la muestra.	(Dart, 1996)
Técnica de gota en placa (Miles y Misra)	Se coloca una gota de volumen conocido en la superficie del agar solidificado. El conteo de dichos microorganismos se realiza a partir del factor de dilución y del volumen de la gota	(Dart, 1996; Herigstad et al., 2001).

En el desarrollo de las técnicas de cultivo de microorganismos se usan medios de cultivo, por ejemplo, existen medios de cultivo con características selectivas o no selectivas (tabla 5). Los medios de cultivo selectivos incluyen antibióticos u otros

factores que limitan el crecimiento de microorganismos no deseados, tales como la adición de cloruro de litio, propionato de sodio, ácido propiónico o ácido iodoacético. Junto a los antibióticos también es necesaria la incorporación de elementos que favorezcan el crecimiento de los microorganismos deseados. Los medios de cultivo no selectivos arrojan información preliminar, es decir, los primeros resultados de microorganismos a partir de las muestras analizadas (Biavati y Mattarelli, 2006).

Tabla 5. Algunos medios de cultivo utilizados en el aislamiento de microorganismos esperados en las heces fecales de lactantes y preescolares.

Microorganismo	Medios de cultivo	Referencia
	<i>No selectivos</i>	
	de Man, Rogosa y Sharpe (MRS)	de Man et al., 1960
	Agar clostridial reforzado (RCA)	Willis et al., 1973
	Hígado Briggs (BL)	Mitsuoka, 1984
	Extracto de levadura triptona-fitona (TPY)	Scardovi, 1986
	<i>Selectivos</i>	
<i>Bifidobacterium</i>	Agar transgalacto-oligosacáridos (agar TOS)	Sonoike et al., 1986
	RCA con azul de Prusia (RCPB)	Ghoddusi and Robinson, 1996
	Agar sangre-glucosa-hígado con oxgall y gentamicina	Lim et al., 1995
	MRS con azul oxgall, cisteína y dicloxacilina (MRS-BCD)	Ingham, 1999
	Agar Sharpe	(Hall y Copsey, 2015)
<i>Lactobacillus</i>	Jugo de tomate	de Man et al., 1960
	de Man, Rogosa y Sharpe (MRS)	de Man et al., 1960
	Agar APT	(Hammes y Hertel, 2006)
	Medio Homohiochii modificado	
	Medio selectivo SL	
<i>Salmonella</i>	Agar de sulfato bismuto	(Dart, 1996).
	Agar Salmonella/shigella (SS)	(Riedel et al., 2019)
	Agar desoxicolato de xilosa-lisina (XLD)	(Riedel et al., 2019)
	Agar citrato Simmons	(Dart, 1996)
<i>Clostridium</i>	Yema de huevo con emulsión de yema de huevo	
	Duncan-Strong Sporulation Medium, Modificado	(Atlas, 2010)
	Medio hierro leche	

Microorganismo	Medios de cultivo		Referencia
	Duncan-Strong modificado	Sporulation	medio
	Medio lactosa gelatina		

### 3.4 Uso de probióticos en fórmulas lácteas para lactantes y preescolares

*Saccharomyces boulardii* es importante por su acción probiótica, fue aislada por primera vez en el año de 1923 por el científico francés Henri Boulard, a partir del fruto Lichi. *S. boulardii* es una levadura que tiene presencia de <0.1 % en la microbiota intestinal, en comparación con la principal levadura aislada del SGI, *Candida albicans*. Es termo tolerante a una temperatura de 37°C y es resistente a los antibióticos como la amoxicilina, tiene la capacidad de duplicar su número al momento de ser consumida en conjunto con ciertos medicamentos. También es utilizada como coadyuvante en el tratamiento de diarrea infecciosa o la diarrea por antibiótico, es parte de la terapia en infecciones por *Helicobacter pylori*, por lo que se ha sugerido su incorporación en fórmulas lácteas para prematuros. El consumo de *S. boulardii* es muy seguro en personas sanas, aunque su advertencia de uso está relacionada con pacientes de fungemia, principalmente en aquellos con catéter venoso central (Buck y Pharm, 2009; Vandenplas et al., 2009).

La actividad que tiene *S. boulardii* al ser ingerida de forma oral, está dada en el mantenimiento o restauración de la microbiota gastrointestinal, por ejemplo, de *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. y *Streptococcus* spp. *S. baulardii* es capaz de secretar proteasas que degradan a las toxinas de *Clostridium difficile*, así como fosfatasas que logran inactivar las endotoxinas producidas por *Escherichia coli*. Muestra un efecto al mejorar las uniones entre los enterocitos, lo que promueve la maduración de las células del borde en cepillo y glicoproteínas, así como también la producción de disacaridasas como lactasa, sacarasa, maltasa y N-aminopeptidasas. También promueve una reducción en la inflamación en el SGI por la regulación de las células T e inhibe la

actividad de la proteína quinasa activada por mitógenos (MPAK), así como la disminución en la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Buck y Pharm, 2009).

### **3.5 Fructooligosacáridos usados como prebióticos en fórmula lácteas para lactantes y preescolares**

Los prebióticos de tipo oligosacáridos son compuestos predominantes en la leche materna, el cual es un alimento esencial en los lactantes. La leche materna contiene más de 130 oligosacáridos complejos de 12 a 13 g L<sup>-1</sup>, siendo los oligosacáridos una combinación de cinco monosacáridos (glucosa, galactosa, ácido siálico, fructosa y N-acetil-glucosamina) (Moreno-Villares, 2008).

En los últimos años, se han estudiado los oligosacáridos del tipo fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) e inulinas debido a los nuevos hábitos de lactancia por parte de las madres (Martínez-Suárez, 2015). Es decir, las fórmulas lácteas con oligosacáridos son una alternativa para sustituir la leche materna en casos necesarios. Esto ha alentado a las casas productoras de fórmulas lácteas para adicionar con FOS, GOS, e inulinas en la formulación. Los oligosacáridos adicionados a las fórmulas lácteas ayudan a mejorar la salud del SGI en lactantes y preescolares. El objetivo de esta adición está dado en asemejar la composición de la fórmula láctea a la composición de los oligosacáridos de la leche materna, repercutiendo no solo en el ámbito microbiológico a nivel del colon, sino mejorar la actividad metabólica, la frecuencia y la consistencia de las defecaciones (Kumar et al., 2018; Moreno-Villares, 2010; Wainwright, 2006).

Otros beneficios de la adición de oligosacáridos a las fórmulas lácteas es la modificación del pH de las heces fecales, lo que da como resultado un pH intestinal bajo que favorece el desarrollo de microorganismos benéficos y disminuye la proliferación de microorganismos no deseados. También favorece a una mayor síntesis de ácido acético y/o ácido butírico, esto hace referencia a una adecuada

modulación de la microbiota intestinal, evaluada a partir del contenido de los AGCC, repercutiendo en una modificación favorable para el sistema inmune a nivel del tejido linfático. Esto como una respuesta por parte del desarrollo de una microbiota intestinal benéfica (Oliveros-Leal y Moreno-Villares, 2006). La alta solubilidad en agua y fácil esterilización de los FOS en fórmulas lácteas, permiten recomendar dosis eficaces de 4 a 20 g/día. Autores como Oliveros leal y Moreno Villares (2006) clasifican las diferentes fórmulas lácteas en función de la incorporación de ingrediente como lo son los FOS, GOS, probióticos o de sus combinaciones:

- *Fórmulas con FOS y GOS*: Crecimiento de bifidobacterias propias de cada niño, su fermentación es en la parte superior e inferior del colon, se incluye tanto en fórmulas de inicio, continuación y crecimiento.
- *Fórmulas con FOS*: Se fermentan exclusivamente en la parte inferior del colon, efectos no globales.
- *Fórmulas con GOS*: Se fermentan exclusivamente en la parte superior del colon, con un efecto parcial.
- *Fórmulas con FOS + probióticos*: Preferentemente en fórmulas de continuación, actúan en la parte inferior del colon, únicamente.
- *Formulas con GOS + probióticos*: Preferentemente en fórmulas de continuación, actúan en la parte superior del colon, únicamente.
- *Fórmulas con probióticos*: Incorpora un número limitado de cepas microbianas adaptadas a las condiciones físico-químicas del tracto digestivo, así como una disminución o pérdida del número de colonias efectivas durante los procesos de fabricación de las fórmulas lácteas.

El Comité científico en alimentos de la Unión Europea y las directivas de la Unión Europea (Comisión directiva 2006/141/EC) ha aprobado la incorporación de mezclas de oligosacáridos, en especial las que contienen GOS/FOS (90/10%) en concentraciones de 0.8 g dL<sup>-1</sup> (Moreno-Villares, 2010; Vandenplas et al., 2014). En México, la NOM-131-SSA1 (2012) es la encargada de regular aspectos de las

diferentes fórmulas lácteas y los criterios microbiológicos. En este sentido la NOM establece que la base de las fórmulas debe ser de leche de vaca, de otros animales o una mezcla de ellos. Así como los ingredientes utilizados deben ser adecuados en la alimentación para las diferentes edades a las que están dirigidos. Se entiende que la incorporación de los FOS es “opcional”, siempre y cuando se tenga una evidencia científica y esté disponible en cualquier momento que sea solicitada.

Actualmente, el crecimiento del mercado de alimentos funcionales está dado principalmente por el desarrollo de alimentos que optan por la adición de ingredientes como los fructooligosacáridos de cadena corta (FOScc) en alimentos y bebidas. Por lo que, la utilización de los oligosacáridos ha generado una relevancia económica importante en la industria de los endulzantes como remplazo de azúcares convencionales. A partir de 1995 ha ido en aumento el uso de FOScc, de forma anual incrementa ~15%. Hoy en día, los FOScc representan un 10% de los edulcorantes del mercado con una retribución económica esperada para el año 2024 de 3.52 mil millones de dólares (Kumar y Dubey, 2019; Sánchez-Martínez et al., 2020).

Una forma de conocer las tendencias de consumo de productos y la utilización de ingredientes para la elaboración de alimentos es mediante la vigilancia tecnológica que analiza las tendencias de uso de ingredientes en el desarrollo de nuevos productos alimentarios. MINTEL ha generado estudios de mercado para conocer la tendencia a nivel global sobre el interés de los padres de lactantes y preescolares en adquirir alimentos de mejor calidad y que al mismo tiempo brinden beneficios para la prevención de enfermedades. Durante los meses del estudio que fueron de diciembre 2013 a noviembre 2016, la región Asia-Pacífico se convirtió en una zona con mayor desarrollo de fórmulas lácteas, correspondientes al 54% de la producción de alimentos para la nutrición infantil. Al mismo tiempo, las subcategorías de productos con mayor lanzamiento son fórmulas de crecimiento (33%), fórmulas para bebés de 0 a 6 meses (22%), fórmulas para bebés de 6 a 12 meses (16%), cereales para bebés (11%) y sustitutos de comida y otras bebidas (4%). Los ingredientes



prebióticos más utilizados en el desarrollo y lanzamiento de fórmulas lácteas en edades de 0 a 6 meses y de 6 a 12 meses, fueron los galactooligosacáridos (44%), los fructooligosacáridos (30%), los fructanos (4%), la povidexrosa (3%) y las inulinas (2%). A nivel mundial los FOS destacan con un 33% como los ingredientes más usados en fórmulas lácteas que contienen prebióticos y probióticos, seguidos de los GOS (27%) y las inulinas con un 12%. En América Latina, los FOS son el principal ingrediente en dichas fórmulas (MINTEL, 2017).

Otra empresa consultora, 360 Market Updates, reporta que dos estados de comercialización de los FOS, ya sea en estado sólido o en forma de jarabes este último representando un 73.75% de las ventas totales.

La gran demanda de los FOS esta principalmente dada en países de Europa, China, y E.E. U.U.; así como Japón que se ha convertido en uno de los principales mercados para los FOS, tanto que en 2017 Japón registro ventas por 24.72% a nivel mundial teniendo como principales empresas manufactureras de FOS a Quantum Hi-Tec, Bowling Bio y Meiji Japan. Mientras que, en Europa, las principales empresas son Beneo, Sensus y Japan's Meiji en conjunto con BMI.

Esta industria en las últimas décadas ha logrado valuar el mercado de \$380 millones de dólares en 2018 hasta proyectar cerca de \$400 millones de dólares para el año 2025, con un crecimiento de 3.6% durante el periodo de 2019-2025 ("Global Fructooligosaccharides (FOS) Market Insights, Forecast to 2025", 2019).

Por su parte, autores como Kumar y Dubey (2019) señalan que los principales países en el consumo y desarrollo de alimentos para su autoconsumo con ingredientes tales como los FOS, son E.E. U.U., Japón, Canadá, China, Brasil y los países europeos, promoviendo un desarrollo del mercado de alimentos funcionales en un 7.2%, valuado para el año 2000 en \$33 mil millones de dólares y que en el año 2010 alcanzó los \$168 mil millones de dólares, obteniendo una proyección económica para el año 2024 de \$255 mil millones de dólares.

La comprobación de la actividad prebiótica de los FOS adicionados a fórmulas lácteas ha sido posible gracias a la realización de estudios *in vitro* o *in vivo* en diferentes partes del mundo. Por ejemplo, Paineu et al. (2014) realizaron un estudio *in vivo* para evaluar el efecto de una fórmula suplementada con FOScc (4g L<sup>-1</sup>), midieron la concentración fecal de microorganismos del género de *Bifidobacterium* en 61 niños sanos. Reportaron cambios en la microbiota intestinal, específicamente el aumento del género *Bifidobacterium* y de la inmunoglobulina A (IgA), después de dos meses de consumir la fórmula suplementada con FOScc.

En otro estudio realizado por Ripoll et al.(2015), para conocer los efectos benéficos de adicionar FOScc a una fórmula láctea consumida por lactantes sanos mayores de cuatro meses de edad, no identificaron un cambio significativo entre el grupo alimentado con la fórmula láctea adicionada con 5 g L<sup>-1</sup> de FOScc y el grupo control. Después de tres meses del consumo de la fórmula láctea, observaron un incremento significativo de bifidobacterias.

En México se han realizado diferentes estudios para conocer la microbiota intestinal de escolares. Por ejemplo, Ruiz-Álvarez et al. (2014) obtuvo conglomerados de microorganismos provenientes de heces fecales de escolares de 5 a 11 años. Realizaron adaptaciones a biorreactores y usaron condiciones fisiológicas de la población estudiada. Dichos biorreactores fueron alimentados con un suplemento alimenticio funcional simbiótico enriquecido con FOS de agave. Reportaron un aumento de *Bifidobacterium* spp. al mismo tiempo que se mantuvo el crecimiento del género *Salmonella*.

Logrando observar que la microbiota de los sujetos estudio presentaron un aumento cantidades de *Bifidobacterium* spp., al mismo tiempo que se mantuvo el crecimiento del género *Salmonella*. Concluyendo que la administración del suplemento funcional mantuvo un equilibrio en la microbiota intestinal sin sobrepasar el nivel de los probióticos.

### 3.6 El agave como fuente de obtención de fructooligosacáridos

El género *Agave* es ampliamente distribuido, desde las regiones tropicales de EE. UU. hasta el sur del continente americano y consta de aproximadamente 200 especies. En México se concentra el 75% de estas especies y es considerado como un centro de diversidad de *Agaves*.

El *Agave* tiene diversos usos siendo las fermentaciones y la producción de fibras las dos actividades económicas más importantes a lo largo de la historia. En la figura 3 se muestra la distribución de las principales especies de agave de carácter fermentativo (López-Romero et al., 2018).

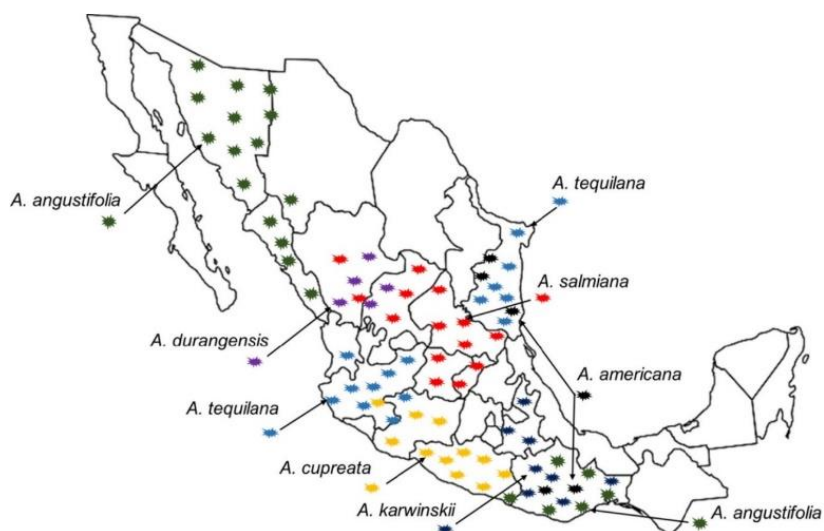


Figura 3. Mapa de distribución de diversos *Agaves* de carácter fermentativo en la República Mexicana (López-Romero et al., 2018).

Los *Agaves* han forjado un nicho económico a nivel internacional principalmente en la industria de las bebidas alcohólicas destiladas, convirtiendo al Tequila en una bebida emblemática para de la región de Jalisco y de todo el país que proviene del *Agave tequilana* Weber variedad azul. Otra de las bebidas alcohólicas destiladas que comienza a ganar un renombre es el mezcal que se obtiene de *A. angustifolia* Haw., *A. asperima* Jacobi, *A. weberi* Cela, *A. salmiana* Otto y *A. potatorum* Zucc. (López-Romero et al., 2018). Una industria que poco a poco ha quedado olvidada es la

relacionada con las fibras de gran calidad, donde el principal exponente ha sido el *Agave fourcroydes* Lem. o henequén, como es conocido comúnmente, el cual fue albergado en las haciendas henequeneras de la Península de Yucatán (Colunga-García Marín, 1998; Cruz-Ramos et al., 1985).

Los agaves, al igual que las demás plantas deben cumplir con su ciclo biológico de alimentación y almacenamiento de energía, ellos desarrollan una molécula de almacenamiento energético llamada inulina. La inulina como medio de almacenamiento de hidratos de carbono es observada en más de 30,000 productos de origen vegetal. Dado que ésta puede tener aplicaciones farmacéuticas, se han realizado numerosos estudios sobre ella. En el siglo XIX demostraron que la inulina es una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos, principalmente unidades de fructosa de configuración  $\beta$  en el anomérico C<sub>2</sub> convirtiéndola en fructanos de tipo inulina resistentes a los procesos digestivos a lo largo del SGI, por lo cual se ha catalogado como fibra soluble (Apolinário et al., 2014).

Por otro lado, la producción de las bebidas alcohólicas destiladas genera un gran número de residuos. Por ejemplo, al producir un litro de tequila con un 55% Alc./Vol., se reporta una producción de 10 litros de residuos líquidos llamados vinanza y ~1.4 kg residuos sólidos con una humedad del 60%. Por lo que la producción de grandes cantidades de bebidas alcohólicas representa una gran cantidad de plantas de agave, de las cuales el 50% no son utilizadas en el proceso de producción, lo que ocasiona el mismo volumen de producto residual como el utilizado en la producción (López-Romero et al., 2018). El aprovechamiento de las pencas no es únicamente en la obtención de fibras solubles o insolubles, sino que también se han realizado estudios para obtener saponinas, FOS y/o azúcares fermentables útiles en el desarrollo y mantenimiento de la industria de los combustibles renovables (López-Romero et al., 2018; Nieto-sotelo, 2017).

### 3.6.1 Fructanos

Los fructanos son substratos selectivos para microorganismos probióticos que estimulan el desarrollo de dichos microorganismos, retribuyen beneficios al hospedero mediante diversos mecanismos como la inmunomodulación e inclusive pueden actuar como sustractores de especies reactivas de oxígeno, catalogándolos también como una fuente antioxidante (Franco-Robles y López, 2015).

Los fructanos tienen una base fructosa soluble en agua que es el resultado del metabolismo extendido de la sacarosa, se encuentran como una mezcla heterogénea con diferentes grados de polimerización (DP) en las hojas y otros órganos de las plantas, como las *Agavaceae*. El *A. tequilana* Weber variedad *azul* tiene una gran concentración de inulinas, así identificándolo como la única especie apta para la producción de tequila. Dentro de los fructanos con actividad prebiótica y más estudiados son los FOS (figura 4), debido a sus efectos benéficos que tienen como alimento exógeno, esto se puede prolongar mediante el consumo continuo y al mismo tiempo se puede usar en el tracto gastrointestinal (TGI) (Apolinário et al., 2014; Franco-Robles y López, 2015; Mancilla-Margalli y Lopez, 2006; Swanson et al., 2002).

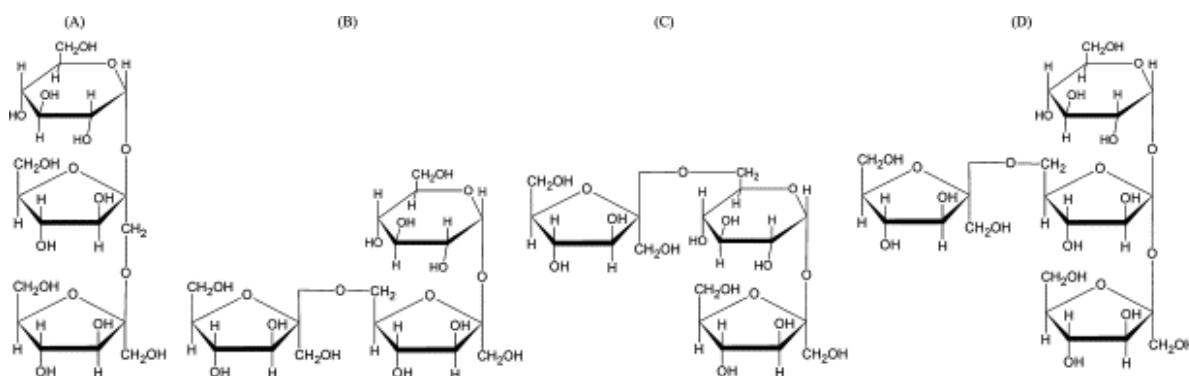


Figura 4. Diferentes estructuras químicas de FOS: a) 1-questosa [inulina lineal], b) 6-questosa [Levano], c) Neoquestosa [inulina neoserie] y d) Bifruktosa [Levano neoserie] (Apolinário et al., 2014).

### **3.7 Procesos para la obtención artificial de FOS**

Entre las técnicas utilizadas para la obtención artificial de FOS se encuentra la técnica de producción enzimática, que tiene como principio el aislamiento y purificación de las enzimas FTasa, proveniente de *Aureobasidium pullulans* y *Aspergillus niger*, y FFasa proveniente de fuentes microbiológicas cultivadas en fermentaciones sumergidas y fermentaciones en estado sólido. Otra técnica utilizada para la obtención artificial de FOS es a partir de células competentes. Este tipo de síntesis se realiza mediante el desarrollo de microorganismos en medios de cultivo, se optimizan para facilitar la síntesis de los FOS (Kumar y Dubey, 2019; Sánchez-Martínez et al., 2020).

Los principales métodos de recuperación para las enzimas producidas durante la fermentación sumergida son la filtración, la centrifugación y la ultra sonicación. En la filtración se pueden recuperar FOS utilizando papel filtro con una apertura de poro de 8  $\mu\text{m}$ . También existe la filtración por esterilización, en la cual se usan filtros de membrana con poros uniformes de tamaños que varían entre 0.11 a 0.22  $\mu\text{m}$ . La centrifugación tiene un uso muy limitado, ya que después del tiempo síntesis intra o extracelular, ya que se dificulta la precipitación del micelio formado en el pellet centrifugado. Por otro lado, la ultrasonicación tiene la función de romper la pared celular mediante la cavitación y se forman microtúbulos en diferentes partes del medio líquido. Es un método de bajo costo por lo que se vuelve una opción ideal a escala industrial. La longitud de frecuencia utilizada es de 15 – 20 kHz, la ultrasonicación debe ser complementada con la centrifugación (Sánchez-Martínez et al., 2020; Sánchez et al., 2010).

#### **3.7.1 Purificación de FOScc**

El valor en el mercado que tienen los FOScc está directamente relacionado con la pureza de estos, por ello, se han aplicado y desarrollado técnicas como son el intercambio iónico, los sistemas de carbón activado y el uso de proceso con membranas. Al ser un método de bajo costo en la purificación de FOScc, las

principales técnicas de purificación por membranas son la microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y las membranas de ósmosis inversa (Sánchez-Martínez et al., 2020).

#### *3.7.1.1 Purificación por técnicas de membrana*

El empleo de las técnicas de membrana en la purificación de FOScc como parte de la separación selectiva del resto de hidratos de carbono complejos ha generado gran expectativa a escala industrial por su bajo costo frente a la purificación por cromatografía (Alles et al., 2015). El principio de estas técnicas radica en emplear gradientes, ya sea mediante la presión o por electrostática, para forzar el paso de determinados componentes de una disolución entre los poros de una membrana para conseguir una separación, que puede ser por su tamaño o carga molecular. Siendo clave el uso de la presión en relación el tamaño de poro, por lo tanto, se necesitará una mayor presión en función del decrecimiento en el tamaño del poro (Gómez-Álvarez, 2015).

Las membranas utilizadas en estas técnicas poseen diferentes tamaños de poro, así como la distribución de estos, de igual forma los materiales de las membranas varían siendo los más utilizados el acetato de celulosa, polímeros orgánicos como polisulfonas, teflón, propilenos, polisulfuros, polipropilenos o compuestos inorgánicos como cerámicas, y sus configuraciones pueden ser plana, cartuchos tubulares de paredes filtrantes o espirales. Este conjunto de características repercute directamente hacia los rendimientos de la purificación (Gómez-Álvarez, 2015; Sánchez-Martínez et al., 2020).

Las ventajas de utiliza las técnicas de membrana se encuentran, además de la ya antes mencionada bajo costo, en la sencillez de aplicación, la eficiencia energética, en el cuidado del medio ambiente al no utilizar solventes orgánicos dañinos y la practicidad para modificar variables consideradas como críticas, tales como la presión, temperatura, agitación, flujo de almacenamiento o caudal de alimentación pero principalmente su fácil escalamiento (Alles et al., 2015; Gómez-Álvarez, 2015).

La ultrafiltración por membranas fue estudiada por Gouals et al., quienes compararon el método de ultrafiltración y nanofiltración por membranas en el fraccionamiento comercial de mezclas de oligosacáridos. Logrando demostrar que es posible obtener resultados similares tanto en la nanofiltración como en la ultrafiltración (Sánchez-Martínez et al., 2020).

### **3.8 Métodos para la identificación y cuantificación de FOS**

Para la identificación y caracterización de hidratos de carbono con propiedades prebióticas, existen diferentes métodos analíticos directos. La aplicación de estos métodos puede hacerse de forma simultánea con las técnicas de Cromatografía en capa fina (TLC) y Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Park et al., 2001), cromatografía de gases, espectrometría de masas (GC-MS) (Hayashi et al., 2000). La cromatografía líquida de alta resolución con índice de refracción junto con la utilización de columnas con puentes polares y base de resina, se vuelve esencial al momento de separar FOS de diversos DP (Prapulla et al., 2000). Asimismo, son importantes para su separación e identificación el empleo de técnicas analíticas combinadas como la cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) (Antošová et al., 1999; Campbell et al., 1997; Shiomi et al., 1991), la cromatografía en papel, la resonancia nuclear magnética de  $C^{13}$ , el bombardeo rápido de átomos como técnica de ionización de espectrometría de masas (Prapulla et al., 2000) o las metodologías aplicadas en normas oficiales como las de la AOAC 997.08 y 999.03 (AOAC International, 2016).

La utilización de las técnicas cromatográficas comenzó alrededor de los años 50's, con la aparición de los primeros polímeros de fructanos y FOS. Wagner y Wiemken en 1987, logrando separar FOS y fructanos mediante hojas de TLC junto con un sistema que permitía la separación de FOS de cadena corta y otros fructanos



mediante su masa molecular. Observaron que los fructanos con un DP mayor a 10 no lograban realizar la migración en las hojas de TLC.

Shiomi en 1992 utilizó un papel y TLC logrando separar los FOS en 1-questosa, neoquestosa y nistosa. Debido a la forma estructural de los oligosacáridos, se relaciona su forma de migrar en la fase estacionaria con su afinidad al agua y su masa molecular. Por lo tanto, con un mayor número de grupos hidroxilo se tendrá una mejor afinidad a la capa sílice, separándose al inicio de la fase estacionaria. Esto se puede corregir aplicando un pretratamiento a la fase estacionaria con una solución buffer (Reiffová, 2014). Para lograr la separación de los oligosacáridos es conveniente usar agua, solventes polares o alguna mezcla de solventes como se muestra los reportes condensados en la tabla 6.

Tabla 6. Fases móviles utilizadas en la identificación de oligosacáridos mediante la cromatografía en capa fina (TLC).

Fase móvil	Fase estacionaria	Oligosacárido identificado	Referencia
Cloroformo-ácido acético-agua (1:6:3, v/v); (6:7:1, v/v)	TLC gel de sílice G	FOS de inulinas proveniente de kombucha	Malbaša (2002)
Acetato de etilo-2-propanol-agua (40:30:10, v/v)	TLC gel de sílice 60 F <sub>254</sub>	Glucosa, disacáridos y oligómeros	Hassan (2007)
1-Butanol-ácido acético-agua (3:2:2, v/v); (2:1:1, v/v); (5:4:1, v/v)	TLC gel de sílice 60	Sacarosa, questosa, nistosa y fructosilnistosa	Perrin et al. (2001)
		Oligosacáridos e inulinas en fórmulas lácteas	Coppa et al. (2002)
1-Butanol-etanol-agua (5:3:2, v/v)	TLC gel de sílice pretratado con acetato de sodio	FOS y maltodextrinas en el contenido intestinal	Reiffová y Nemcová (2006)
	HPTLC gel de sílice pretratado con acetato de sodio	Fructanos de agave (mono, di, oligo y polisacáridos)	Espinosa-Andrews y Urias-Silva (2012)
Ácido acético-cloroformo-agua (7:5:1, v/v)	TLC sílice gel 60	FOS provenientes de <i>L. paracasei</i>	Goh et al. (2007)

Fase móvil	Fase estacionaria	Oligosacárido identificado	Referencia
Ácido fórmico-butanona-terbutanol-agua (15:25:35:25, v/v)	Capa fina de celulosa	Oligosacáridos con DP 2-10	Damonte et al. (1971)
Alcohol isopropílico-acetato de etilo- agua (3:1:1, v/v); (2:1:1, v/v)	TLC gel de sílice K5F con pretratamiento de una hora a 110°C	FOS	Park et al. (2001)
Acetona-agua-metanol (17:3:0.25, v/v) con 0.05% de ácido difenilbórico de éster 2-aminoetílico	HPTLC gel de sílice 60	Glucosa, fructosa y sacarosa	Vovk et al. (2003)
<i>N</i> -propanol-acetona-agua (50:40:25, v/v); (50:40:10, v/v)			
Modificado de Reiffová (2014).			

Arrizon et al. (2010) realizaron estudios sobre el efecto de la edad en los fructanos en *Agave tequilana*, utilizaron las técnicas de HPLC para separar azúcares polimerizados y no polimerizados y de HPAEC-PAD para determinar los fructanos con un DP de 3 a 6. Usaron la técnica de matriz asistida por láser desorción/ionización de tiempo de vuelo con espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) para la detección y diferenciación de los oligosacáridos inducidos por la edad del agave. Finalmente emplearon la cromatografía de gases (CG) en la elaboración de un perfil para los enlaces.

Otra técnica es la electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforos, la cual fue introducida por Jackson (1990), quien utilizó geles de poliácridamida y una cámara eléctrica con la finalidad de lograr una detección y cuantificación. Chen y Tian en el año 2003 y mediante la electroforesis capilar lograron elucidar fructanos provenientes de *Cyathula officinalis* (Apolinário et al., 2014; Benkeblia, 2013).

---

#### 4 Planteamiento del problema

Los avances en las técnicas de biología molecular favorecen su utilización en los estudios de nueva generación sobre la microbiota intestinal. La aplicación de estas técnicas ayuda a realizar un cambio de concepto acerca de la esterilidad del feto durante su etapa de desarrollo en la placenta de la madre. Al mismo tiempo los costos elevados en materiales y equipos para PCR en tiempo real o metasecuenciación, favorecen el uso de técnicas más económicas y descriptivas como lo son las de microbiología clásica.

Junto con los nuevos descubrimientos de no esterilidad, los factores externos como la alimentación de la madre antes y durante el embarazo, el IMC de la madre, el consumo de alcohol o tabaco, así como el uso de medicamentos antibióticos durante el embarazo se convierten en factores determinantes sobre la microbiota del feto.

Una vez se cumplida la etapa del parto, el recién nacido estará influenciado por más factores externos en la colonización del SGI, como lo son la vía de parto, mediante la vagina o por cesárea. Por otro lado, si durante el desarrollo de la infancia se proporciona una alimentación a base de una fórmula láctea en lugar de la leche materna, los avances en el desarrollo de alimentos similar en componentes nutricionales han logrado desarrollar fórmulas lácteas que asemejan el efecto de los oligosacáridos de leche materna. Para ello se ha propuesto y comprobado la utilización de hidratos de carbono complejos de tipo galactooligosacáridos y fructooligosacáridos en una relación 9:1. Beneficiando al filo de las Actinobacterias, especialmente al género *Bifidobacterium*, así como a los filos Firmicutes, proteobacteria y Bacteroidetes.

Las fuentes de obtención de estos hidratos de carbono complejos pueden ser de forma artificial con el uso de microorganismos o a través de plantas, como se ha demostrado en las hojas del género *Agave*. Dando como resultado una completa utilización de la planta, así como de algunos residuos agroindustriales, lo que abre una puerta hacia una fuente de negocio distinta a la producción de bebidas alcohólicas principalmente para los Estados de Yucatán o Oaxaca.

Los beneficios de procurar el desarrollo de una microbiota intestinal adecuada, pueden verse relacionados con la evaluación del estado nutricional y la microbiota intestinal cultivable proveniente de heces fecales, al mismo tiempo que se mantiene presente la síntesis de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta que previenen el riesgo a desarrollar alergias, enfermedades gastrointestinales, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, diarrea por antibióticos, obesidad infantil, diabetes tipo 1 y tipo 2 e inclusive cáncer de colon.

---

## 5 Justificación

El desarrollo de la microbiota intestinal es esencial durante los primeros años de vida, ya que promueve la salud o previene diferentes enfermedades gastrointestinales, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, diarrea por antibióticos, obesidad infantil, diabetes tipo 1 y tipo 2. Existen varios factores que influyen en el desarrollo de esta microbiota intestinal, se pueden mencionar principalmente, la vía de parto por cesárea o vaginal y el tipo de alimentación, fórmula láctea o lactancia materna. Comúnmente los lactantes y preescolares alimentados con fórmula láctea presentan mayores alteraciones en su salud, debido a la diversidad de microorganismos que componen su microbiota intestinal, mientras que la lactancia materna ayuda al crecimiento de microorganismos benéficos como lo son *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. Por ello, es importante conocer la composición de los microorganismos presentes en la microbiota intestinal como método de prevención para la salud humana.

Para disminuir estas alteraciones y obtener similitud con la microbiota intestinal generada por la lactancia materna, es necesario adicionar ingredientes a las fórmulas lácteas que permitan mejorar el desarrollo de la microbiota intestinal en los lactantes y preescolares. Es bien sabido que los FOS tienen actividades prebióticas, es decir, son los nutrientes que necesitan los microorganismos de la microbiota intestinal para aumentar el desarrollo de *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. Por lo tanto, se deben buscar fuentes alternativas para la obtención de FOS con actividades prebióticas. Las hojas de agave pueden considerarse como una fuente para la obtención de FOS, ya que son poco aprovechadas y no tienen un uso primario, esto se debe a que la explotación del agave es a partir de la piña, que se usa principalmente para producir bebidas alcohólicas.

---

## 6 Hipótesis

Los fructooligosacáridos obtenidos del fraccionamiento por diferentes pesos moleculares, 3 kDa y 10 kDa, de las hojas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*, podrían demostrar una función prebiótica frente al crecimiento de un microorganismo probiótico modelo (*Saccharomyces boulardii*), para proponer su posterior uso como ingrediente funcional en las fórmulas lácteas en función de conocer la variabilidad de la microbiota intestinal presente en las heces de los lactantes y preescolares y su posible asociación con su estado nutricional.

---

## 7 Objetivos

### 7.1 *Objetivo general*

Evaluar la microbiota intestinal cultivable y su estimación del estado nutricional de lactantes y preescolares en guarderías privadas de Guadalajara, Jalisco, y probar la función prebiótica de los FOS obtenidos de las hojas de *Agave fourcroydes* y *Agave angustifolia* sobre el crecimiento de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*.

### 7.2 *Objetivos específicos*

- 1) Generar redes de colaboración y trabajo con guarderías privadas en la ciudad de Guadalajara, Jalisco para seleccionar a los participantes lactantes y preescolares que cumplan con los criterios de selección.
- 2) Evaluar el estado nutricional de los participantes mediante mediciones e indicadores antropométricos y condiciones clínicas registradas en la historia clínico-nutricional.
- 3) Determinar la población de la microbiota intestinal presente en los participantes a partir de la identificación de microorganismos benéficos y no deseados mediante técnicas de microbiología tradicional.
- 4) Establecer una correlación múltiple de Pearson entre la evaluación del estado antropométrico nutricional y la composición de la microbiota intestinal.
- 5) Determinar las características bromatológicas y bioquímicas de las hojas *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* propuestas como fuente de obtención de FOScc
- 6) Identificar los FOS contenidos en dos fraccionamientos por peso molecular (3 kDa y 10 kDa) de las hojas de agave mediante técnicas cromatográficas en capa fina de alta resolución.
- 7) Determinar el efecto prebiótico de los FOS contenidos en dos fracciones de peso molecular (3 kDa y 10 kDa) de las hojas de agave frente a la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*.

---

## 8 Metodología

### 8.1 Primera etapa experimental; colecta de heces fecales

#### 8.1.1 Sujetos, diseño del estudio y cálculo de la muestra

Se realizó un estudio de nivel exploratorio explicativo cuasiexperimental sustentado en la recolección de información, a partir de las historias clínico-nutriológicas, mediciones antropométricas y obtención de heces fecales frescas de lactantes y preescolares. La colecta de las heces fecales se realizó entre las fechas del 29 de octubre al 26 de noviembre 2019. Los sujetos participantes se reclutaron en guarderías privadas de la ciudad de Guadalajara, Jalisco, México en un rango de edad de >12 a <24 meses y preescolares de  $\geq 24$  a <48 meses. Para ello se establecieron criterios de inclusión, exclusión y eliminación descritos para en la tabla 7.

Tabla 7. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de donantes de heces fecales frescas.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sexo: indistinto</li><li>• Canal de nacimiento: indistinto.</li><li>• Edad gestacional: término o pretérmino.</li><li>• Masa y longitud de nacimiento: indistinto.</li><li>• Edad biológica: Un año, cero meses y cero días hasta tres años, 11 meses y 29 días</li><li>• Historia clínica: Saludable (sin patologías previas, diarreas, vómitos, tratamientos médicos prolongados, consumo de medicamentos o antibióticos y sin alergias)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Estar por debajo del límite inferior o por encima del límite superior del rango de edad biológica.</li><li>• Edad gestacional prematuro.</li><li>• Cursar por un cuadro clínico de vómito o diarrea.</li><li>• Consumo de medicamentos asociado a patologías de cualquier índole (leves o agudas, ya sea virales o bacterianas).</li><li>• Alergias (animales, alimenticias o ambientales) en los últimos cuatro meses.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Desarrollo o curso de enfermedad tratada con fármacos (virales o bacterianos).</li><li>• Utilización de tratamientos médicos.</li><li>• Desarrollo de alergias alimenticias, ambientales o por animales (últimos cuatro meses).</li><li>• Presentar cuadro clínico de diarrea o vómito.</li><li>• No cumplir con el rango de edad establecido</li></ul>



Se eligieron los participantes que cumplieron con todos los criterios de inclusión. Cada uno recibió una plática informativa para instruirlos en el protocolo de colecta, almacenamiento y entrega de las heces fecales para el estudio.

El cálculo de la muestra se realizó mediante dos softwares de acceso gratuito:

**EPIDAT versión 4.2** – Desarrollado por los Servicios de Epidemiología de la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad (Junta de Galicia), utilizando la ruta *Módulos > cálculo de la muestra > contraste de hipótesis > comparación de medias > grupos independientes*.

Introduciendo la siguiente información.

- *Varianzas*: Iguales.
- *Diferencia de medias*: 3.55 (según lo propuesto por Aguilar-Barojas (2005)).
- *Desviación estándar común*: 3.55 (según lo propuesto por Aguilar-Barojas (2005)).
- *Razón entre tamaños muestrales*: 1.0.
- *Nivel de confianza*: 95% (error  $\alpha$ : 0.05%).
- *Potencia*: 80% (error  $\beta$ : 0.2%).

**Epi info™ versión 7.2.3.1** – Software desarrollado por el CDC, utilizando la ruta *Statcalc > Population survey* e introduciendo los datos solicitados:

- *Población estimada*: 26,754 nacimientos en Guadalajara, Jalisco durante el año 2016 (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2017).
- *Frecuencia esperada*: 50% (Aguilar-Barojas, 2005).
- *Margen de error aceptable*: 5% [error  $\alpha$ ] (Aguilar-Barojas, 2005; Castro, 2019)
- *Efecto del diseño*: 0.05 (Aguilar-Barojas, 2005; Castro, 2019).
- *Grupos*: 2 (lactancia exclusiva de seis meses y alimentación con sucedáneo de leche materna).

Se obtuvo un total de 34 participantes, de los cuales 17 fueron lactancia materna y 17 lactancia artificial de sexo indistinto. Debido a los estrictos criterios de inclusión, 5 participantes fueron excluidos del estudio antes de la recolección de la historia clínica-nutricional y otros 9 participantes fueron excluidos antes de las mediciones antropométricas, principalmente por tratamiento con antibióticos o inasistencia a la guardería.

En número final de participantes se divide de la siguiente manera:

- *29 historias clínico-nutricionales:*
  - 13 lactancia materna
  - 16 lactancia artificial
- *20 mediciones antropométricas:*
  - 6 lactancia materna
  - 14 lactancia artificial

#### *8.1.1.1 Aspectos éticos*

De conformidad con la Declaración de Helsinki, la NOM-004-SSA3 (2012), la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares [LFPDPPP] (2010), la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados [LGPDPSSO] (2017) y la Ley General de Salud (2020), se garantizó la confidencialidad de la información proporcionada para evitar la identificación clínica de los sujetos participantes, y la información generada para elaborar una base de datos con la finalidad de mantener comunicación entre el responsable del experimento y el responsable del sujeto participante. Esto garantiza prevenir la exposición de vulnerabilidad o compartición de información con terceros, lo cual fue expresado y firmado mediante un consentimiento informado (anexo E).

### 8.1.2 Selección de guarderías para la obtención de muestras

La selección de las guarderías para la obtención de las heces fecales frescas se realizó a partir del enlace logrado con diferentes guarderías particulares en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

Primero se procedió a realizar una investigación en el directorio telefónico, enseguida se usó el servicio de aplicación de mapas en web (Google maps) para localizar las guarderías particulares más cercanas a los laboratorios de CIATEJ Guadalajara. Posteriormente, se realizó el primer contacto mediante llamadas telefónicas o entrevistas personales con responsables, directores o dueños de las guarderías, prueba de ello se visualiza en el anexo G. De esta forma, las personas contactadas conocieron el objetivo del registro de las mediciones antropométricas, la recolección de la historia clínico-nutricional y la recolección de las heces fecales frescas. Después del primer contacto, se presentó la información a los padres de familia mediante una reunión informativa, en la cual se expuso un tema relacionado a la antropometría, historia clínico-nutricional y heces fecales en lactantes y preescolares. Enseguida se explicó detalladamente la solicitud de los lactantes y los preescolares como voluntarios para donar heces fecales frescas, según los criterios de inclusión establecidos. Después de la presentación se realizó una base de datos con el nombre del niño, el nombre del papá y el teléfono, asimismo se registró si estaba interesado en participar en el experimento como voluntario en la donación de heces fecales frescas. Los papás interesados fueron contactados de forma individual para proporcionarles el protocolo de la colecta de muestras descrito en un tríptico (anexo C), asimismo recibieron el kit de materiales para tomar las heces fecales frescas, estas muestras recolectadas por los participantes las entregaron en la fecha y la hora establecidas.

Finalmente, las muestras recepcionadas fueron transportadas lo más rápido posible a los laboratorios de "Digestión *ex vivo*" en CIATEJ Guadalajara, en un contenedor tipo hielera previamente rotulado, como "*Peligro muestra biológica*" junto con una

flecha ↑ (hacia arriba) indicado su orientación. En el interior del contenedor se colocó un gel refrigerante para mantener las condiciones de frío.

### 8.1.3 Mediciones antropométricas

Previamente al registro de las mediciones antropométricas, se obtuvo la capacitación y certificación en las técnicas ISAK nivel 1, anexo B, que validan la estandarización en la toma de las mediciones antropométricas.

El registro de las mediciones fue durante una visita a las guarderías en donde previamente se le notificó al responsable o director de la guardería el procedimiento que se realizaría con los lactantes y los preescolares. Dichos procesos siempre se realizaron en presencia, así como bajo la autorización y supervisión del personal que labora en las guarderías para garantizar la integridad de los participantes.

*Masa corporal:* Se realizó colocando al participante de tal forma que permaneciera sobre la báscula con capacidad de 150 kg (UM081, TANITA, Japón) en menor o nulo movimiento, sin apoyo y con una distribución equilibrada en ambos pies. En el caso de los voluntarios de mínimo un año y máximo dos años fue registrada su masa por diferencia de peso entre la masa de una profesora de la guardería y la masa de la profesora con la del participante.

*Longitud y talla:* De acuerdo con la edad biológica de cada participante, se utilizó un procedimiento distinto:

- *Longitud:* Se colocó la cabeza del participante sobre la parte rígida del infantómetro de 20 a 99 cm con precisión de 5 mm (ZAUDE, China), y se extendió el cuerpo sobre una superficie plana e inmóvil junto con una ligera presión sobre las rodillas, se acercó la parte móvil logrando que la planta de los pies no tuviera separación entre dicha parte móvil.
- *Talla o estatura:* Mediante una tracción de la cabeza colocada en el plano de Frankfort, se solicitó al participante que realizara una inspiración profunda y se aplicó una tracción moderada hacia arriba con procesos mastoideos usando el

estadiómetro de 220 cm con precisión de 1 mm (204, ZAUDE, China), se colocó la escuadra sobre el vértex comprimiendo el cabello tanto como fuera posible.

*Perímetro cefálico:* Se extendió la cinta de 3 a 59 cm con precisión de 1 mm (212, SECA, Alemania) de tal forma que el diámetro estuviera más grande que la cabeza del participante, y se colocó el extremo con la marca de medición entre las cejas y el nacimiento del cabello (hueso frontal) de la parte anterior del cráneo y la protuberancia occipital posterior del cráneo, ajustando el extremo libre de la cinta sin apretar.

*Circunferencia media de brazo (CMB) o perímetro de brazo relajado:* Se colocó la cinta antropométrica de 200 cm (W606PMMX, Lufkin, México) de tal forma que el punto acromiale-radiale medio quedara centrado entre las dos partes de la cinta.

Se registraron los pliegues adiposos como el pliegue de tricipital y pliegue subescapular (mm) con un plicómetro de 80 mm con precisión de 1 mm (Slim Guide, EE. UU.).

Para más información sobre las mediciones antropométricas revisar anexo A.

La evaluación del estado nutricional antropométrico se realizó mediante los indicadores de porcentaje de peso de acuerdo con la edad (%PE), porcentaje de longitud o talla de acuerdo con la edad (%LE o %TE), porcentaje de peso de acuerdo con la longitud o la talla (%PL o %PT), índice de masa corporal de acuerdo con la edad (IMCE, kg/m<sup>2</sup>), área muscular del brazo (AMBr, cm<sup>2</sup>), área del brazo (ABr, cm<sup>2</sup>), área grasa del brazo (AGBr, cm<sup>2</sup>), porcentaje del área grasa del brazo (%AGBr). Los valores se clasificaron de acuerdo con los criterios descritos en el Manual de fórmulas y tablas para la intervención nutricional de la población mexicana (Palafox López y Ledesma Solano, 2015).

#### 8.1.4 *Recolección de las historia clínico-nutriológica*

La historia clínico-nutriológica (HCN-DMB-19/20) se elaboró en un formulario web perteneciente a Google, el cual sigue presente en los servidores de Google, la evidencia de su existencia se puede visualizar en el anexo D, en donde se presentan las preguntas formuladas. El formulario estuvo conformado de cuatro secciones: 1) Datos generales, 2) Historia médica, 3) Historia sociocultural, 4) Historia dietética. Dentro de estas secciones, se solicitaron datos demográficos, método de parto, tipo de alimentación, tiempo de inicio de la alimentación mixta o lactancia artificial, motivo de suspensión de la lactancia materna exclusiva, base proteica de la fórmula láctea utilizada, marcas de la fórmula láctea utilizada, promedio de evacuaciones y anomalías en las heces, antecedentes heredo-familiares, tratamientos médicos y medicamentos utilizados. Esta información se recabo con la finalidad de conocer los factores externos que se relacionan con los participantes y su microbiota intestinal cultivable, en este caso, una proyección de sus hábitos alimenticios, la relación que puede tener la recurrencia de las enfermedades y el consumo de medicamentos.

Los papás de los participantes recibieron a través de una aplicación de mensajería instantánea la liga de acceso a la HCN-DMB-19/20. El formulario contenía las instrucciones para contestar las preguntas, las cuales se diseñaron con respuestas específicas de números, opción múltiple o una sola respuesta y respuestas cortas. Después de completar el formulario por parte de los papás, se procedieron a descargar las respuestas de los servidores Google en una hoja de cálculo de Excel para su posterior interpretación.

#### 8.1.5 *Recolección y preparación de heces fecales*

Las heces fecales frescas se recolectaron a partir de la evacuación más reciente antes de la colecta, enseguida se colocaron en un vaso estéril con tapa rosca para coprocultivo (Kook et al., 2018). Se preparó un medio de cultivo estéril (extracto de levadura, caseína, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) con algunas modificaciones (Macfarlane et al., 1998) para recrear las condiciones

aeróbicas de la fuente original. El medio de cultivo estéril se conservó en refrigeración (0 a 4°C) hasta su uso. En un primer tubo se añadieron 9 mL del medio de cultivo preparado y se mezclaron con ~1 g de las heces fecales recolectadas. En un segundo tubo con 9 mL del medio de cultivo preparado se mezcló ~1g de heces fecales, el cual se confinó en un recipiente con sales generadoras de dióxido de carbono (CaCO<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) para recrear las condiciones anaeróbicas de la fuente original. El material que conformó el kit para tomar las heces fecales frescas se preparó previamente a la colecta de muestras.

Después de transportadas las muestras en condiciones de frío al laboratorio, se procesaron durante las siguientes ocho horas después de la evacuación. Se inició colocando los tubos que contenían el medio de cultivo y las heces fecales en una centrífuga de mesa (1248R, Labogene), durante 10 minutos a 532.6 rad/s con temperatura controlada de 4°C. Enseguida, los tubos se trasladaron a la campana de flujo laminar para mezclar sus sobrenadantes, tanto de condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Estos sobrenadantes fueron usados para el cultivo y aislamiento microbiológico.

#### *8.1.5.1 Cultivo y aislamiento microbiológico a partir de heces fecales*

La cuantificación de poblaciones bacterianas viables en las heces fecales frescas recolectadas se realizó usando la técnica de goteo en placa (Herigstad et al., 2001) y la técnica de vaciado en placa (Clark, 1967) a partir de seis diluciones seriadas (1:10 a 1:1 000 000) preparadas con agua peptonada (peptona de caseína, NaCl).

##### *8.1.5.1.1 Cultivo de los microorganismos aeróbicos a partir de heces fecales*

Para las condiciones aeróbicas se utilizaron los medios de cultivo diferenciales M.R.S. (BD Difco™ – BD 288210) para el género *Lactobacillus* spp. y otros mesófilos lácticos. El medio de cultivo L.I.A. (BD Bioxon® – 211719) se usó para microorganismos entéricos Gram negativos en especial *Salmonella* fermentadora de lactosa. De acuerdo con el fabricante de cada medio de cultivo, estos fueron rehidratados y esterilizados en autoclave (Felisa – FE399), a una temperatura de

121°C por 15 minutos a una presión de 14 libras de fuerza por pulgada cuadrada (psi). Después, dentro de una campana de flujo laminar se vertió el agar en cajas Petri de 90x15 mm hasta su solidificación. En cada medio de cultivo se realizó la siembra de goteo en placa; colocando 10 µl de cada dilución seriada, se cuidó mantener la tensión superficial de la gota, como se muestra en la figura 5. Dejando el tiempo suficiente para que el agua de la gota se evaporada en esterilidad, las cajas se incubaron en una estufa (Thermo Heratherm™ IGS100 o VWR Symphony™ – 414004) a 37°C durante 24 h.

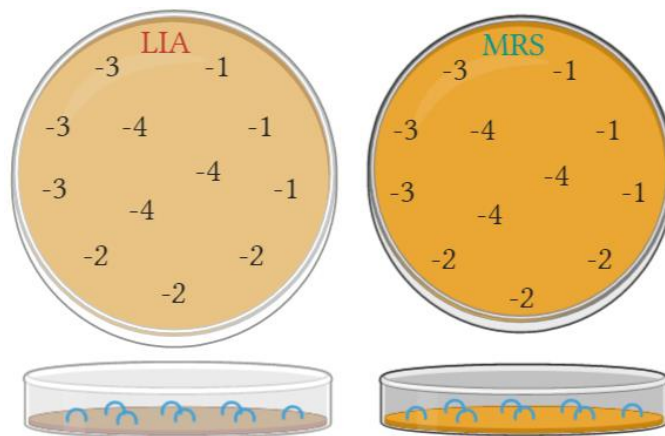


Figura 5. Ejemplo de distribución de microgotas en caja Petri con medio LIA o MRS.

#### 8.1.5.1.2 Cultivo de los microorganismos anaeróbicos

Para las condiciones anaeróbicas se utilizaron los medios de cultivo diferenciales TSC (Fulka® – 93745) para *Clostridium perfringens*, así como el medio de cultivo selectivo agar BSM (SIGMA-ALDRICH – 88517) para *Bifidobacterium logum* y *B. infantis*. De acuerdo con el fabricante de cada medio de cultivo, estos fueron rehidratados y esterilizados en autoclave (Felisa – FE399), a una temperatura de 121°C por 15 minutos a una presión de 14 libras de fuerza por pulgada cuadrada (psi). Después, dentro de una campana de flujo laminar se procedió a realizar una siembra por vaciado en placa, se colocaron 100 µl de cada una de las diluciones seriadas en cada caja Petri de 60x15 mm. Se mantuvo la temperatura de cada agar hasta tolerar el calor con la palma de la mano, se procedió a verter el agar sobre la



gota de la dilución y se homogenizó la caja Petri con movimientos circulares con sentido a las manecillas del reloj, realizando movimientos en sentido opuesto, hacia arriba, hacia abajo y en diagonal. El agar de las cajas se dejó solidificar dentro de la campana de flujo laminar, después se transfirieron a un contenedor de plástico con sellos a presión junto con una vela y 2 g de sales efervescentes ( $\text{CaCO}_3$  y  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) en una proporción 1:1 para lograr condiciones de anaerobiosis. Finalmente los contenedores con las cajas de Petri se incubaron en una estufa (Thermo Heratherm™ IGS100 o VWR Symphony™ – 414004) a una temperatura de 37°C durante un tiempo entre 24 a 48 h.

#### *8.1.5.2 Conteo de microorganismos cultivados*

Transcurridos los tiempos de incubación de cada uno de los medios de cultivo, se procedió a realizar el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Para ello se tomaron en cuenta las colonias bien definidas en cada medio de cultivo. Se realizaron los cálculos necesarios para reportar los resultados en UFC g<sup>-1</sup> de acuerdo con los lineamientos de las Normas Oficiales Mexicanas:

- NOM-092-SSA1 (1994). Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-113-SSA1 (1994). Métodos para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

## **8.2 *Análisis estadístico primera etapa experimental; colecta de heces fecales***

Los resultados obtenidos fueron analizados empleando diferentes pruebas estadísticas:

- En los resultados de las variables cuantitativas continuas de la antropometría se estratificaron de acuerdo con el inicio y fin de cada etapa de la vida. Se obtuvieron dos grupos, el primero conformado por los lactantes,  $\geq 12$  a  $< 24$  meses y el segundo grupo de preescolares,  $\geq 24$  meses a  $< 48$  meses, para

minimizar el error en la captura de la información antropométrica se realizó el sistema de doble digitalización.

- El análisis de las mediciones antropométricas se realizó con un análisis de varianza de una vía y prueba de rangos múltiples con el método de Tukey usando el software estadístico Statgraphics Centurion XVI (versión 16.01.0011, StatPoint Technologies, Inc., Virginia, E.E. U.U.).
- Para las respuestas categóricas de la historia clínico-nutricional se utilizó el software informático Microsoft 365 Excel (versión 16.0.13328, Microsoft Corporation, Washington, E.E. U.U.), para expresar los resultados como media  $\pm$  desviación estándar de todos los participantes.
- La comprobación de la fiabilidad en la historia clínico-nutricional se realizó mediante el cálculo del alfa de Cronbach utilizando el software estadístico IBM SPSS (versión 25.0.0.0, IBM corp., E.E. U.U.).
- Para los resultados de las variables semicuantitativas discretas obtenidos del conteo de unidades formadoras de colonia, se calcularon los recuentos en base logarítmica 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) y se presentaron en gráficas del valor medio con el error estadístico de la media. Además, se obtuvieron las cantidades relativas de la microbiota intestinal de lactantes y preescolares.
- Para compensar estadísticamente la pérdida de participantes, tanto para los recuentos de unidades formadoras de colonia como de las mediciones antropométricas, se realizó una ponderación de casos utilizando el software estadístico IBM SPSS (versión 25.0.0.0, IBM corp., E.E. U.U.).
- Los resultados de las UFC  $\text{g}^{-1}$  fueron analizados con la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos utilizando el software estadístico Prism 7 (Versión 7.03, Graphpad software, California, E.E.U.U.).
- Para medir la relación entre las variables cuantitativas antropométricas y las variables semicuantitativas de la microbiota intestinal cultivable se realizó un análisis de correlación múltiple de Pearson, utilizando el software estadístico IBM SPSS (versión 25.0.0.0, IBM corp., E.E.U.U.)

---

### **8.3 Segunda etapa experimental; colecta de agaves**

#### *8.3.1 Obtención del material biológico*

La colecta de las hojas del *Agave fourcroydes* Lem. y *Agave angustifolia* Haw. fueron proporcionadas por parte del banco de germoplasma del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Las hojas provienen de agaves con una edad promedio de 90 meses, fueron seleccionadas de forma aleatoria y se cortaron en la zona más próxima a la piña. Las hojas fueron lavadas y preparadas para realizar los análisis posteriores en los laboratorios de CIATEJ subsección sureste

#### *8.3.2 Medición de color en las hojas*

La medición de color de las hojas se realizó mediante un medidor de colorimetría MiniScan (EZ 4500, HUNTERLAB,). Se obtuvieron los valores para el espacio de color CIE L\*a\*b, con los cuales se calculó el espacio de color CIE L\*C\*h a partir de las siguientes ecuaciones:

$$C = (a^2 + b^2)^{0.5}$$
$$h = \text{Tan}^{-1} \left( \frac{b}{a} \right)$$

#### *8.3.3 Caracterización bromatológica y bioquímica de las hojas de agave*

##### *8.3.3.1 Humedad*

La humedad fue determinada mediante la desecación por el método 925.10 de la AOAC. Se fraccionaron las hojas en cuadrados de 10 cm<sup>2</sup> y se colocaron en un horno (Fe-291, Felisa) a una temperatura de 60°C durante 24 h. El cálculo del porcentaje de humedad se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = (P_f - P_c / P)(100)$$

En donde:

P: Peso inicial de la muestra (g)

P<sub>c</sub>: Peso constante charola de secado (g)

P<sub>f</sub>: Peso de la muestra después del secado (g)

### 8.3.3.2 Cenizas

La determinación de cenizas se realizó siguiendo el método 923.03 de la AOAC dividiéndolo en dos fases. La primera fase fue la eliminación de la humedad, antes mencionada. La segunda fase fue la incineración de las hojas secas dentro de una mufla (FE-340, Felisa) a 550°C el tiempo necesario hasta eliminar toda la materia orgánica. Al finalizar el tiempo de incineración, se calculó el porcentaje de cenizas mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = (P_f - P_c/P)(100)$$

En donde:

P: Peso inicial de la muestra

P<sub>c</sub>: Peso constante del crisol

P<sub>f</sub>: Peso de la muestra después del secado

### 8.3.3.3 Proteína cruda

La determinación del porcentaje de proteína cruda se realizó mediante el método 981.10 de la AOAC en un equipo automático Kjeldahl (Unidad digestora automática DKL-12 y Unidad destiladora semiautomática UDK-139, VELP científica). *Digestión:* Se colocaron ~0.5g de la muestra en 10 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) junto con dos tabletas catalizadoras (contenido: K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> y selenio) y se programó el equipo a una temperatura de 425°C durante 60 minutos. *Destilación:* Se adicionaron 50 mL de NaOH al 40% y 30 mL de ácido bórico al 2% para recuperar el amoniaco en un matraz Erlenmeyer. *Titulación:* Se adicionó indicador de Tashiro a cada matraz y se tituló con HCl al 0.325 N, se registró el volumen del gasto del ácido al observar el cambio de color. El porcentaje de nitrógeno y porcentaje de proteína fueron calculados mediante las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ nitrógeno} = \left( \frac{[G_a - G_o](N)(0.0014)}{m} \right) (100)$$

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ nitrógeno}(6.25)$$

En donde:

$G_a$ : Gasto de la muestra en mililitros.

$G_0$ : Gasto del blanco en mililitros.

$N$ : Normalidad el ácido requerido.

$m$ : Masa de la muestra en gramos.

#### 8.3.3.4 *Porcentaje extracto etéreo*

La cuantificación del extracto etéreo se realizó a partir de 100g de muestra obtenida de la determinación de humedad. Se envolvieron en papel filtro y se colocaron en un cartucho de celulosa a peso constante. Después, el cartucho se introdujo en el tubo de recirculación del sistema Soxhlet y se dejaron completar varios ciclos de recirculación a lo largo de cuatro horas. El cálculo del porcentaje de extracto etéreo se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ extracto etéreo} = \left( \frac{P_a - P_0}{m} \right) (100)$$

En donde:

$P_a$ : Masa constante del matraz con grasa en gramos.

$P_0$ : Masa constante de matraz sin grasa en gramos.

$m$ : Masa de la muestra en gramos.

#### 8.3.3.5 *Porcentaje de fibra dietética total*

El procedimiento para la determinación de la fibra dietética total se realizó mediante el procedimiento 985.29 de la AOAC. Se colocó la muestra proveniente del extracto etéreo y se realizó la primera digestión enzimática, se usó el kit para fibra dietética total (TDF 100A, SIGMA-ALDRICH), con  $\alpha$ -amilasa termoestable (A3306) en pH 6 a una temperatura de 95°C durante 15 minutos, finalizado el tiempo se ajustó el pH a  $7.5 \pm 0.2$  con solución de NaOH al 0.01N. Posteriormente se realizó la segunda digestión enzimática, se usó proteasa (P3910) a una temperatura de 60°C durante 30 minutos en agitación constante. Finalizado el tiempo se ajustó nuevamente el pH 4 – 4.6 con HCl 0.01N, estas fueron las condiciones para inocular la tercera enzima de amiloglucosidasa (A9913) a 60°C.

La determinación de la fibra dietética insoluble se llevó a cabo, posterior a las tres digestiones enzimáticas realizadas. El producto obtenido de las digestiones enzimáticas se filtró en crisoles con zeolita a peso constante con 15 mL de agua desionizada, 20 mL etanol 96% y 20 mL de acetona. Finalmente se realizó el secado de la fibra obtenida en un horno a 105°C (FE-291, Felisa) durante cinco horas.

#### 8.3.3.6 Fibra dietética soluble

En cuanto a la determinación de fibra dietética soluble. Se adicionó a la fracción acuosa proveniente de la determinación de fibra dietética insoluble, 50 mL de agua destilada junto con 450 mL etanol al 96% y se mantuvo a una temperatura de 60°C por una hora. Posteriormente se realizó un filtrado y lavado con 20 mL de etanol al 78% y 20 mL de etanol al 96% junto con 20 mL de acetona. Después se secó la fibra en un horno a 105°C (FE-291, Felisa). Los cálculos necesarios para el porcentaje de fibra dietética soluble, insoluble y total se realizaron mediante las siguientes ecuaciones:

$$\% FDI = (P_r - P_p - P_c)(P_m)(100)$$

$$\% FDS = \frac{P_r - P_p - P_c/100}{P_m}(100)$$

$$FDT = FDI + FDS$$

En donde

- P<sub>r</sub>: Promedio masa residuo de la muestra en mg
- P<sub>p</sub>: Promedio masa proteína de la muestra en mg
- P<sub>c</sub>: Promedio masa ceniza de la muestra en mg
- P<sub>m</sub>: Promedio masa muestra en mg.

#### 8.3.4 Cuantificación de azúcares reductores totales por método DNS

La cuantificación de azúcares reductores se realizó por medio del método Miller o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a una longitud de onda de 550 nm. Se colocaron 500 µL de la muestra junto con el reactivo 3,5-dinitrosalicílico en un tubo de vidrio con tapa rosca, se homogenizó la mezcla y se llevó a punto de ebullición durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se aplicó un choque térmico, se añadieron 8 mL de agua destilada, se homogenizó la mezcla, nueva e inmediatamente se registró la

absorbancia en una longitud de onda de 550 nm. La muestra testigo se realizó con agua destilada y la curva patrón se realizó con glucosa en una concentración de 1 g L<sup>-1</sup>, anexo H. Los cálculos para determinar la cuantificación se realizaron mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Azúcares reductores} = \frac{\text{Abs} + 0.0642}{0.978}$$

En donde

Abs: Absorbancia de la muestra.

#### 8.3.5 *Elaboración del jugo de agave*

Las hojas de los agaves fueron seccionadas para obtener la mayor cantidad de compuestos posibles en los extractos acuosos 1:6. La mezcla de agave con agua se sometió a una temperatura de 60°C por 30 minutos. Posteriormente, se molió el extracto acuoso y mediante una filtración se eliminaron las fibras. El jugo de cada agave fue fraccionado mediante la técnica de ultrafiltración para conseguir diferentes pesos moleculares, 10, 000 Da o 10 kDa, 3, 000 Da o 3 kDa y filtrado (<3 kDa), esto mediante centrifugación a 10,646 g durante 20 minutos. Una parte de los jugos obtenidos con diferentes pesos moleculares fueron liofilizados para su conservación.

#### 8.3.6 *Cuantificación de glucosa y sacarosa*

En los jugos de agave obtenidos de cada especie se cuantificó el contenido de glucosa y sacarosa en gramos por litro, mediante el uso de un analizador bioquímico YSI 2900 [YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, E.E. U.U.]. Para ello, se colocaron 200 µL del jugo de agave correspondiente a la especie y a las fracciones de peso molecular (3 y 10 kDa) en una placa de pozos múltiple por triplicado.

#### 8.3.7 *Identificación de FOS por HPTLC*

Para realizar la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución, se procedió a realizar un pretratamiento a la placa de sílice asperjando una solución de acetona

de sodio al 0.2 M, posteriormente la placa se secó a 60°C durante 60 minutos. La identificación se realizó de forma automática (CAMAG®) [Muttentz, Suiza], en una placa fue colocado 1 mL del jugo de agave de cada especie y del fraccionado por peso molecular (3 y 10 kDa), así como 1 mL de los estándares necesarios (nistosa, questosa, glucosa, sacarosa y fructosa) en concentraciones de 1 mg mL<sup>-1</sup>. El volumen de aplicación programado para los estándares fue de 5 µL, mientras que para las muestras fue de 7 µL. El sistema de elución utilizado fue butanol-etanol-agua 10 mL (5:3:2, v/v/v) durante 20 minutos, la activación se realizó con MgCl<sub>2</sub> (33% RH) por 10 minutos y un secado por cinco minutos. Seguidamente se asperjó la placa con una solución reveladora de azúcares con grupo cetónico y aldehído, anilina 4%, difenilamina 4% y ácido fosfórico (5:5:1, v/v/v) junto con un tiempo de secado de un minuto a 120°C. El valor del factor de refracción fue calculado mediante el software del equipo.

### 8.3.8 Cinética de crecimiento de *Saccharomyces boulardii*

#### 8.3.8.1 Activación de *Saccharomyces boulardii*

La levadura con carácter probiótico, *Saccharomyces boulardii* fue adquirida de forma comercial bajo la marca Floratil® en presentación de cápsulas. Se activó el contenido de una cápsula (~250 mg) en 250 mL del medio líquido *RPMI-1640* (R6504, SIGMA-ALDRICH). El medio líquido con la levadura fue introducido a una incubadora con agitación orbital a una temperatura de 37°C durante 18 h. A partir de este medio de cultivo madre se realizaron diluciones seriadas en base 10 para determinar el contenido de UFC mL<sup>-1</sup> mediante siembras microbiológicas en un medio de cultivo sólido. Asimismo, se realizaron cuentas directas en cámara Neubauer hasta obtener el número de crecimiento de microorganismos de 6.5x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 8.3.8.2 Cinética de crecimiento *Saccharomyces boulardii*

La cinética de crecimiento comenzó con el desarrollo de un diseño experimental factorial 4x2. En donde uno de los factores tiene cuatro niveles que corresponde al



corte molecular del jugo de agave (30, 10, 3 kDa y extracto crudo), el segundo factor es de dos niveles que es el tipo de agave evaluado (*A. fourcroydes* y *A. angustifolia*).

El monitoreo del crecimiento de *S. boulardii* se realizó mediante el uso de un lector de microplacas de 96 pozos (BioTek ELx808, Winooski, E.E. U.U.). Se programó el lector de microplacas para realizar una agitación antes de cada lectura de densidad óptica (DO) con una longitud de onda de 630 nm, cada 30 minutos a una temperatura de 37°C por 36 h. Las lecturas se detuvieron a las 22 h. Los pozos fueron llenados con un volumen final de 250 µL de la siguiente manera y como se representa en la figura 6:

- Volumen del jugo de agave: 0, 5, 10 15 y 20 µL
- Volumen del inóculo crecido: 30 µL de inóculo con número de crecimiento de *S. boulardii*  $6.5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.
- Volumen del medio de cultivo RPMI-1640: Diferencia de volumen en µL ajustado a 250 µL de volumen final.

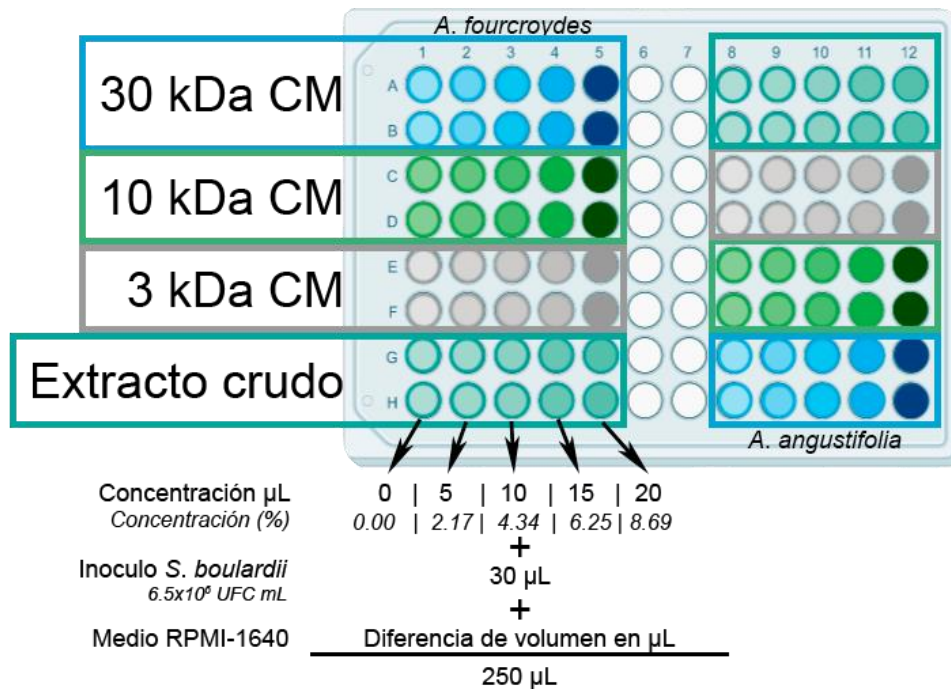


Figura 6. Preparación de microplaca para cinética de crecimiento de *S. boulardii* en extracto crudo y tres fracciones de corte molecular (30, 10 y 3 kDa) obtenidas de las hojas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*.

**CM:** corte molecular, **kDa:** kilo dalton.

#### **8.4 Análisis estadístico segunda etapa experimental; colecta de agaves**

Los resultados obtenidos fueron sometidos a diferentes pruebas estadísticas:

- Para los resultados obtenidos de la composición química y color de las hojas de *Agave fourcroydes* y *Agave angustifolia* se realizó un análisis de varianza de una vía y prueba de rangos múltiples con el método de Tukey para identificar diferencias estadísticas. Se usó el software estadístico Statgraphics Centurion XVI (versión 16.01.0011, StatPoint Technologies, Inc., Virginia, E.E. U.U.).
- Los resultados obtenidos de la cuantificación de azúcares presente en los jugos de agave, se realizó mediante un análisis de varianza factorial multinivel ( $2^2 \times 3$ ) utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion XVI (versión 16.01.0011, StatPoint Technologies, Inc., Virginia, E.E. U.U.).
- El análisis de resultados para la cinética de crecimiento de crecimiento de *Saccharomyces boulardii* se realizó mediante el el software estadístico Statgraphics Centurion XVI (versión 16.01.0011, StatPoint Technologies, Inc., Virginia, E.E. U.U.).

---

## 9 Resultados / Discusiones

### 9.1 Resultados de la primera etapa experimental; colecta de heces fecales

A continuación, se presentan los resultados de las características de los lactantes y preescolares seleccionados como participantes para evaluar el consumo de una fórmula láctea incorporada con FOS de las hojas de agave.

#### 9.1.1 Mediciones antropométricas

Los resultados de las mediciones antropométricas y la evaluación del estado nutricional antropométrico de los sujetos participantes se muestran en la tabla 8. Se clasificaron de acuerdo con la edad biológica a la que pertenecen, lo que permitió identificarlos como lactantes (>12 – <24 meses) que representan el 20% de la población estudio y como preescolares ( $\geq$ 24 – <48 meses), que pertenecen al 80% de la población. Las mediciones antropométricas realizadas mostraron una diferencia significativa en la masa, la circunferencia media de brazo (CMB) y el pliegue tricípital entre ambos grupos.

En el caso de la evaluación antropométrica, los indicadores que mostraron diferencia significativa entre los lactantes y preescolares fueron porcentaje de longitud para la edad (%LE) y porcentaje de talla para edad (%TE), área del brazo (ABr), área grasa del brazo (AGBr) y porcentaje del área grasa del brazo (%AGBr). De acuerdo con Palafox López y Ledesma Solano (2015) esto quiere decir, que tanto los lactantes como los preescolares tienen una masa adecuada, no presentan desnutrición y tampoco tiene grasa en exceso.

La presencia de emaciación leve en lactantes estuvo presente en el 17% de los participantes, es decir presentan baja masa muscular. En el caso de preescolares, el 7% de la población presenta retraso leve en el crecimiento a retraso moderado en el crecimiento. De la misma forma, los preescolares presentaron una musculatura abajo del promedio según el indicador área muscular del brazo (AMBr). Los resultados del índice de masa corporal para la edad (IMCE) indicaron que el 83% de lactantes y el

85% de preescolares son clasificados como normales para su edad, mientras que el resto de los grupos presentan un posible riesgo nutricional.

En el estudio realizado por Marín Flores et al. (1993), usaron la cinta de colores CIMDER (verde de 16.5 – 19.5, amarillo de 15.1 – 16.5 y rojo de 7 – 15.1 cm), para la detección de riesgo de desnutrición en preescolares de la alcaldía Tláhuac de la CDMX. Los resultados que reportaron muestran que el 45.9% esta normal, el 37.9% está en riesgo de desnutrición y 16.2% necesita atención inmediata. Estos datos son diferentes a los resultados de los indicadores obtenidos en los participantes del presente trabajo experimental. Pero el comportamiento es similar a los resultados reportados por Zavala Olivas (2009) en una población de 12 – 23 meses y de 24 – 35 meses de Ciudad Juárez, Chihuahua.

La importancia de las mediciones antropométricas radica en conocer el estado nutricional de la población, ya que física y visualmente los lactantes y preescolares pueden apreciarse sanos sin estarlo totalmente. La antropometría realizada con la técnica ISAK es adecuada y brinda resultados confiables a bajo costo. Los resultados antropométricos obtenidos en el presente trabajo experimental permitieron descartar la alteración del metabolismo de los participantes, lo cual podría modificar los resultados de la composición y el desarrollo de su microbiota intestinal.

Tabla 8. Parámetros e indicadores antropométricos de lactantes y preescolares incluidos en el estudio, n=20.

<b>Mediciones antropométricas</b>							
<b>Antropometría</b>	<b>Lactante (20%) 12- ≤24 meses (n= 6)</b>			<b>Preescolar (80%) &gt;24 - &lt;48 meses (n= 14)</b>			<b>P&lt; 0.05</b>
Masa (kg)	11.40 (±0.00)			14.34 (±0.00)			0.0000*
Longitud (cm)	85.36 (±0.18)			No aplica			
Talla (cm)	No aplica			95.28 (±0.21)			
Perímetro cefálico (cm)	47.47 (±0.12)			No aplica			1.0000
CMB (cm)	14.52 (±0.05)			15.70 (±0.06)			0.0205*
Pliegue tricipital (mm)	5.92 (±0.35)			7.32 (±0.25)			0.0141*
Pliegue subescapular (mm)	4.58 (±0.35)			4.75 (±0.25)			0.7279
<b>Evaluación antropométrica</b>							
<b>Indicador</b>	<b>Lactante (20%) 12- ≤24 meses (n= 6)</b>			<b>Preescolar (80%) &gt;24 - &lt;48 meses (n= 14)</b>			<b>P&lt; 0.05</b>
	<i>Promedio</i>	<i>Referencia<sup>a</sup></i>	<i>Interpretación</i>	<i>Promedio</i>	<i>Referencia<sup>a</sup></i>	<i>Interpretación</i>	
%PE	105.96 (±12.55)	>90 %	Normal	100 (±11.38)	>90 %	Normal	0.1879
%LE	103.60 (±4.15)	>95 %	Normal		No aplica		0.0040*
%TE		No aplica		99.33 (±4.00)	>95 %	Normal	
%PL	99.16 (±9.13)	>90 %	Normal		No aplica		0.6240
%PT		No aplica		100.32 (±5.62)	>90 %	Normal	
IMCE (kg/m <sup>2</sup> )	15.45 (±1.32)	+1 a -2 Z	Normal	15.97 (±1.32)	+1 a -2 Z	Normal	0.2608
AMBr (cm <sup>2</sup> )	12.79 (±1.55)	15.1 a 85.0	Mp	14.42 (±2.71)	15.1 a 85.0	Mp	0.0604
ABr (cm <sup>2</sup> )	16.82 (±1.95)	> -2	Sin desnutrición	19.82 (±4.07)	> -2	Sin desnutrición	0.0204*
AGBr (cm <sup>2</sup> )	4.03 (±0.84)	0.0 a 5.0	Magro	5.40 (±1.70)	5.1 a 15.0	Gab	0.0116*
%AGBr	23.91 (±3.62)	0.0 a 5.0	Magro	26.92 (±4.26)	5.1 a 15.0	Gab	0.0395*

\*P< 0.05: diferencia estadística significativa; **Mp**: musculatura promedio, **Gab**: grasa abajo del promedio; %PE: porcentaje peso-edad, %LE: porcentaje longitud-edad, %TE: porcentaje talla-edad, %PL: porcentaje peso-longitud, %PT: porcentaje peso-talla, **IMCE**: índice de masa corporal para la edad, **AMBr**: área muscular del brazo, **ABr**: área del brazo, **AGBr**: área grasa del brazo, %AGBr: porcentaje área grasa del brazo. <sup>a</sup>=(Palafox López y Ledesma Solano, 2015).

### 9.1.2 *Historia clínico-nutricional*

La elaboración del cuestionario que comprende la historia clínico-nutricional fue evaluada mediante la fiabilidad el alfa de Cronbach, dando como resultado un  $\alpha = 0.616$ , lo cual indica que tiene una escala de fiabilidad baja, tomando como referencia que los valores cercanos a 1, serán los que tendrán mayor fiabilidad.

En la tabla 9 se muestra el resultado de las características clínicas y demográficas de los sujetos participantes en el presente trabajo experimental. La población de participantes se conformó por el 52% de hombres y el 48% de mujeres, con una edad promedio de 27 meses de edad. La vía de parto más referida fue por cesárea con un 72% mientras que 28% fue por parto vaginal. En el caso del tipo de alimentación, la lactancia materna exclusiva más de seis meses de vida correspondió al 45% de los participantes. Del 55% de los participantes que fueron alimentados con lactancia artificial (fórmula láctea), el 38% recibieron este alimento a partir de los 30 días después de nacido, mientras que 1 participante comenzó entre los 90 y 120 días después de nacido. El principal motivo de alimentación con fórmula láctea fue por la incorporación de la madre a la actividad laboral seguido de una baja producción de leche materna (31 y 25%, respectivamente). El principal tipo de fórmula láctea usada por los participantes fue a base de proteína animal (45%), mientras que el 7% de participantes consumieron fórmula láctea hipoalérgica. Las heces fecales de los participantes fueron reportadas de acuerdo con la escala de Bristol, el 76% fueron de tipo 3 o 4 que corresponden a heces fecales normales.

Otros datos informativos importantes son la presencia de hermanos de cada participante, 55% de ellos si tienen hermanos. Asimismo, el 72% convive con mascotas, siendo el perro la principal mascota. En el caso de los medicamentos utilizados por los participantes, los antibióticos son los compuestos de mayor suministro (20%), seguidos por los antivirales (14%) y antihistamínicos (14%). La información de los antecedentes heredo-familiares indica que, la hipertensión es la enfermedad más recurrente (30%), seguida de la diabetes 2 (17%) y después diabetes mellitus 1 (13%).

Villegas Sepúlveda (2010) menciona que la elaboración de una historia clínico-nutricional permite valorar al paciente e identificar si existen problemas que lo afecten o que repercutan en su estado de nutrición, siendo estas las bases para la elaboración de un diagnóstico nutricional. Por su parte, Derrien et al. (2019) mencionan que para estudiar la composición y el desarrollo de la microbiota intestinal de una población específica, es necesario identificar qué factores externos están relacionados con dicha población, por ejemplo, canal de nacimiento, tipo de alimentación, uso de antibióticos, estilo de vida y factores geográficos. Por lo tanto, fue necesario recolectar la información que compone la historia clínico-nutricional de los lactantes de >12 a <24 meses y preescolares de ≥24 a <48 meses que participaron en el presente trabajo experimental como donadores de heces fecales.

Tabla 9. Características clínicas de lactantes y preescolares como participantes en el estudio, n=29.

<b>Sexo (%)</b>				
<i>Masculino</i>		<i>Femenino</i>		
52 (15/29)		48 (14/29)		
<b>Edad (%)</b>				
<i>12 a ≤24 meses</i>		<i>&gt;24 a &lt;48 meses</i>		
21 (6/29)		79 (23/29)		
<b>Vía de parto (%)</b>				
<i>Vaginal</i>		<i>Cesárea</i>		
28 (8/29)		72 (21/29)		
<b>Lactancia materna (≥6 meses) [%]</b>				
<i>Sí</i>		<i>No</i>		
45 (13/29)		55 (16/29)		
<b>Participantes con hermanos (%)</b>				
<i>Sí</i>		<i>No</i>		
55 (16/26)		45 (13/29)		
<b>Convivencia con mascotas (%)</b>				
<i>Sí</i>		<i>No</i>		
72 (21/29)		28 (8/29)		
<b>Lugar de compra de alimentos</b>				
<i>Supermercado</i>	<i>Mercado local</i>		<i>Tianguis</i>	
41 (12/29)	38 (11/29)		21 (6/29)	
<b>Día de inicio alimentación con fórmula láctea (%)</b>				
<i>&lt; 30</i>	<i>30 – &lt;60</i>	<i>60 – 90</i>	<i>90 – 120</i>	<i>&gt;120</i>
25 (4/16)	25 (4/16)	38 (6/16)	6 (1/16)	6 (1/16)
<b>Motivo de suspensión de lactancia materna (%)</b>				
<i>Trabajo</i>	<i>Baja producción leche</i>	<i>Tratamiento médico</i>	<i>LME insuficiente</i>	<i>Reflujo recién nacido</i>
31 (5/16)	25 (4/16)	13 (2/16)	13 (2/16)	6 (1/16)
	<i>Preferencia de fórmula</i>		<i>Ingreso a guardería</i>	



Resultados / Discusiones (*primera etapa experimental; colecta de heces fecales*)

6 (1/16)		6 (1/16)		
<b>Tipo de fórmula láctea utilizada (%)</b>				
<i>Proteína animal</i>	<i>Deslactosada</i>	<i>Para reflujo</i>	<i>Hipoalergénica</i>	<i>Ninguna</i>
45 (13/29)	31 (9/29)	14 (4/29)	7 (2/29)	3 (1/29)
<b>Promedio de evacuaciones por día</b>		2.14 (± 0.88)		
<b>Heces fecales en escala de Brístol (%)</b>				
<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 3 o 4</i>	<i>Tipo 5</i>	<i>Tipo 6</i>	
10 (3/29)	76 (22/29)	10 (3/29)	4 (1/29)	
<b>Convivencia con mascotas (%)</b>				
<i>Ninguno</i>	<i>Perro</i>	<i>Gato</i>	<i>Aves</i>	<i>Pez</i>
21 (6/29)	62 (18/29)	3 (1/29)	10 (3/29)	3 (1/29)
<b>Medicamentos utilizados (%)</b>				
<i>Analgésicos</i>	<i>Antiasmáticos</i>	<i>Antibióticos</i>	<i>Antieméticos</i>	<i>Antihistamínicos</i>
7 (2/29)	7 (2/29)	20 (6/29)	3 (1/29)	14(4/29)
<i>Antiinflamatorios</i>	<i>Antitusígenos</i>	<i>Antivirales</i>	<i>Glucocorticoides</i>	<i>Mucolíticos</i>
3 (1/29)	7 (2/29)	14(4/29)	3 (1/29)	10 (3/29)
	<i>Medicina alternativa</i>		<i>No respondió</i>	
	3 (1/29)		7 (2/29)	
<b>Antecedentes heredo-familiares (%)</b>				
<i>Diabetes 1</i>	<i>Diabetes 2</i>	<i>Hipertensión</i>	<i>Enfermedades coronarias</i>	<i>Cáncer*</i>
13 (8/60)	17 (10/60)	30 (18/60)	2 (1/60)	12 (7/60)
<i>Alzheimer</i>	<i>Esquizofrenia</i>	<i>Toxoplasmosis</i>	<i>Epilepsia</i>	<i>Ninguna de las anteriores</i>
3 (2/60)	2 (1/60)	2 (1/60)	2 (1/60)	8 (5/60)

\*Cualquier tipo de cáncer.

### 9.1.3 Microbiota cultivable de heces fecales

#### 9.1.3.1 Población total microbiota intestinal

En la tabla 10 se presenta un resumen de la composición de la microbiota intestinal de las 34 muestras de heces fecales correspondientes a los lactantes y los preescolares que participaron en el presente trabajo experimental. En los participantes se detectaron diferentes cantidades del crecimiento de grupos bacterianos.

Tabla 10. Valores medios y proporciones del recuento de la microbiota intestinal en muestras de heces fecales de lactantes y preescolares,  $n= 34$ .

	Media	Proporción	% proporción	EE <sub>p</sub>	Límite inferior	Límite superior
<i>Atmosfera de crecimiento</i>						
<b>Aerobio</b>	2.52x10 <sup>9</sup>	0.58	58%	0.000007	0.580266	0.580295
<b>Anaerobio</b>	1.82 x10 <sup>9</sup>	0.42	42%	0.000007	0.419705	0.419734
<i>Filo bacteriano</i>						
<b>Actinobacterias</b>	9.10 x10 <sup>8</sup>	0.21	21%	0.000006	0.209360	0.209384
<b>Firmicutes</b>	2.64 x10 <sup>9</sup>	0.61	61%	0.000007	0.606536	0.606565
<b>Proteobacterias</b>	8.00 x10 <sup>8</sup>	0.18	18%	0.000006	0.184066	0.184089
<i>Género bacteriano</i>						
<b><i>Bifidobacterium</i> spp.</b>	9.10 x10 <sup>8</sup>	0.21	21%	0.000006	0.209360	0.209384
<b><i>Lactobacillus</i> spp.</b>	1.72 x10 <sup>9</sup>	0.40	40%	0.000007	0.396189	0.396218
<b><i>Clostridium</i> spp.</b>	9.14 x10 <sup>8</sup>	0.21	21%	0.000006	0.210335	0.210360
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	8.00 x10 <sup>8</sup>	0.18	18%	0.000006	0.184066	0.184089

EE<sub>p</sub>: Error estándar de la proporción.

El crecimiento de bacterias en diferentes condiciones de oxígeno, es decir bacterias aerobias y anaerobias, mostró una mayor proporción en presencia de oxígeno en comparación con los microorganismos crecidos sin oxígeno. A nivel del filo, Firmicutes representó la mayor proporción de microorganismos en la microbiota intestinal seguido de Actinobacterias y Proteobacterias. En el caso del género, el grupo de microorganismos presente en mayor proporción fue *Lactobacillus* spp. que corresponde a microorganismos benéficos presentes en la composición de la microbiota intestinal. Mientras que el género de *Salmonella* spp. mostró la proporción

más baja en dicha composición, este grupo corresponde a microorganismos no deseados en la microbiota intestinal. Por lo tanto, se puede decir que los *Lactobacillus* spp., quienes forman parte del grupo bacteriano de Firmicutes son las bacterias más comunes en los lactantes y los preescolares. Estos resultados son sustentados con la información reportada por Yang et al. (2016). Ellos mencionan que las diferencias en las comunidades bacterianas de recién nacidos pueden tener importantes consecuencias para la salud, ya que consideran que los géneros *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. protegen la salud, atribuyéndolos como microorganismos benéficos, mientras que el género *Clostridium* spp. tiene un potencial patógeno, por lo tanto, es considerado como un microorganismo no deseado.

Se esperaba la presencia tanto de bacterias aerobias y anaerobias en la microbiota intestinal. Aunque después del nacimiento, la colonización comienza con anaerobios facultativos y sigue con géneros anaerobios, la composición de la microbiota intestinal es variable durante los primeros años de vida según Cong et al. (2016). También, señalan que los lactantes prematuros tienen cantidades muy bajas de bacterias anaerobias en el tracto gastrointestinal, incluidas Bifidobacterias y Bacteroidetes. En otro estudio, Benno et al. (1984) mencionan que la microbiota intestinal de los bebés alimentados con lactancia materna tiene varias bacterias anaerobias estrictas y anaerobias facultativas. Mientras que los bebés alimentados con biberón tienen una gran variedad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas. Dentro de esta gran variedad de bacterias, Fouhy et al. (2012) reportan que la composición de la microbiota intestinal está dominada por el filo Firmicutes compuesto principalmente por *Lactobacillus* spp. y *Clostridium* spp., cuando el bebé alcanza los dos años de vida. Estos microorganismos con mayor colonización están presentes con la misma relevancia en el presente trabajo experimental.

Recientemente, Niu et al. (2020) identificaron los patrones de edad específicos de la microbiota intestinal, así como la evaluación del impacto de la vía de nacimiento. Observaron que los Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacterias y Actinobacterias son

dominantes a lo largo de los primeros 36 meses. Mientras que la abundancia relativa de Firmicutes se mantiene estable, los Bacteroidetes tienen un aumento progresivo al paso del tiempo. Proteobacterias tienen una disminución progresiva del porcentaje de abundancia desde el nacimiento hasta los 36 meses. En función de la vía de nacimiento, reportaron que la cesárea muestra una mayor existencia de Firmicutes y Proteobacterias, mientras que Bacteroidetes es dominante en el parto vaginal durante los primeros 18 meses de vida.

Por su parte, Rutayisire et al. (2016) investigaron el efecto que tiene el tipo de parto en la colonización de microbiota intestinal, y reportaron que después de los 6 meses no identificaron diferencias entre los bebés nacidos por vía vaginal y cesárea con respecto a la colonización de *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *Lactobacillus*. Sin embargo, indican que la mayor diversidad microbiana total es significativamente mayor en bebés nacidos por vía vaginal en comparación con los nacidos con cesárea.

De acuerdo a la información anterior, se puede decir que la microbiota intestinal de los participantes lactantes y preescolares contiene altas cantidades de microorganismos benéficos, principalmente del género *Lactobacillus* spp. que constituye el filo Firmicutes. Logrando observar una concordancia con lo antes mencionado por Niu et al. (2020), ya que se puede observar en los donantes con ~24 meses una población estable de Firmicutes así como una disminución de Proteobacterias de acuerdo con el porcentaje de proporción. Por el contrario, los recuentos microbiológicos demuestran una menor presencia de Firmicutes y Proteobacterias, como se puede observar en las figuras 7. Asimismo, se puede atribuir que las mayores proporciones de estas bacterias pueden atribuirse a varios factores, por ejemplo, la vía de parto y el tipo de alimentación como se observa en los resultados presentados a continuación en la tabla 11. Es importante recordar que, dichos factores influyen en el desarrollo de la microbiota intestinal durante los primeros años de vida.

Tabla 11. Proporciones de la población total de la microbiota intestinal cultivable de heces fecales proveniente de lactantes y preescolares,  $n= 34$ .

	Media	Proporción	% proporción	EE <sub>p</sub>	Límite inferior	Límite superior
<i>Vía de parto</i>						
<b>Parto vaginal</b>	3.42x10 <sup>9</sup>	0.79	79%	0.000006	0.786946	0.786970
<b>Parto cesárea</b>	9.26x10 <sup>8</sup>	0.21	21%	0.000006	0.213030	0.213054
<i>Tipo de alimentación en los primeros seis meses de vida</i>						
<b>Lactancia materna exclusiva</b>	3.57x10 <sup>9</sup>	0.82	82%	0.000006	0.821926	0.821949
<b>Fórmula láctea</b>	7.74x10 <sup>8</sup>	0.18	18%	0.000006	0.178051	0.178074
<i>Combinación de la vía de parto y del tipo de alimentación</i>						
<b>Parto vaginal y lactancia materna exclusiva</b>	3.35x10 <sup>9</sup>	0.83	83%	0.000006	0.826143	0.826166
<b>Parto cesárea y fórmula láctea</b>	7.05x10 <sup>8</sup>	0.17	17%	0.000006	0.173834	0.173857

EE<sub>p</sub>: Error estándar de la proporción.

En función de la vía de parto se observa una mayor proporción de microorganismos, en los lactantes y los preescolares nacidos por parto vaginal en comparación con el parto por cesárea. En el caso del tipo de alimentación, los participantes que recibieron lactancia materna exclusiva presentaron la mayor proporción de microorganismos cultivados de su microbiota intestinal. Mientras que fue menor la proporción de microorganismos en los participantes alimentados con fórmula láctea. Las diferencias en la vía de parto y el tipo de alimentación pueden deberse a que estos factores importantes determinan la composición y el desarrollo de la microbiota intestinal infantil como lo mencionan Vandenplas et al. (2020). Asimismo, señalan que la leche materna estimula el desarrollo de la microbiota intestinal más equilibrada del lactante, principalmente debido a su alto contenido de oligosacáridos únicos. Por su parte, Rinninella et al. (2019) reportan que después del nacimiento, se desarrolla un ecosistema rico y dinámico a partir de la piel de la madre, la microbiota vaginal y fecal y el contacto con la microbiota ambiental. Reportaron que en lactantes prematuros se tiene una baja colonización de bacterias potencialmente no deseadas

del filo Proteobacterias, y los niveles son muy reducidos de microorganismos anaerobios estrictos como los filos Actinobacterias. Todo lo anterior, explica porque la colonización de bacterias en la microbiota intestinal fue mayor en los participantes nacidos por parto vaginal y alimentados con lactancia materna exclusiva.

Asimismo, en la tabla 11 se observa que todos los participantes que tuvieron una vía de nacimiento vaginal y un tipo de alimentación de lactancia materna exclusiva presentaron una mayor proporción de microorganismos en la población de su microbiota intestinal. Mientras que, la vía de nacimiento por cesárea en combinación con fórmula láctea mostró la proporción más baja de microorganismos presentes en la microbiota intestinal de lactantes y preescolares. Estos resultados amplían la importancia que tiene la relación entre vía de parto con tipo de alimentación. Koren et al. (2012) mencionan que los bebés nacidos por parto vaginal tienen una mayor diversidad microbiana que puede ser más estable a corto y largo plazo, en comparación con los bebés nacidos por cesárea, quienes tienen menos diversidad microbiana porque no están expuestos a microbios maternos vaginales, fecales y epiteliales. Por su parte, LaTuga et al. (2014) indican que los lactantes alimentados directamente del seno materno, pueden obtener una variabilidad adicional en la microbiota a través de la leche materna y del contacto con la piel de la madre.

Por lo tanto, se puede decir que la combinación entre los factores de vía de parto y tipo de alimentación pueden contribuir sobre la composición y el desarrollo de la microbiota intestinal en la vida temprana.

#### 9.1.3.2 *Microorganismos benéficos y no deseados identificados de la microbiota intestinal*

En la figura 7 se presenta la colonización de cada género bacteriano identificado *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. y *Salmonella* spp. de acuerdo con los factores vía de parto y tipo de alimentación, así como la combinación de estos factores. De forma general, se puede decir que *Lactobacillus* spp., fue el género de bacterias con mayor presencia (valor promedio = 7.82 log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup>),

observado en los participantes que nacieron por parto vaginal. Mientras que, la menor cantidad de bacterias presentes fue del género *Salmonella* spp. (valor promedio =  $6.40 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ), y resultó a partir de los participantes que nacieron mediante el parto por cesárea.

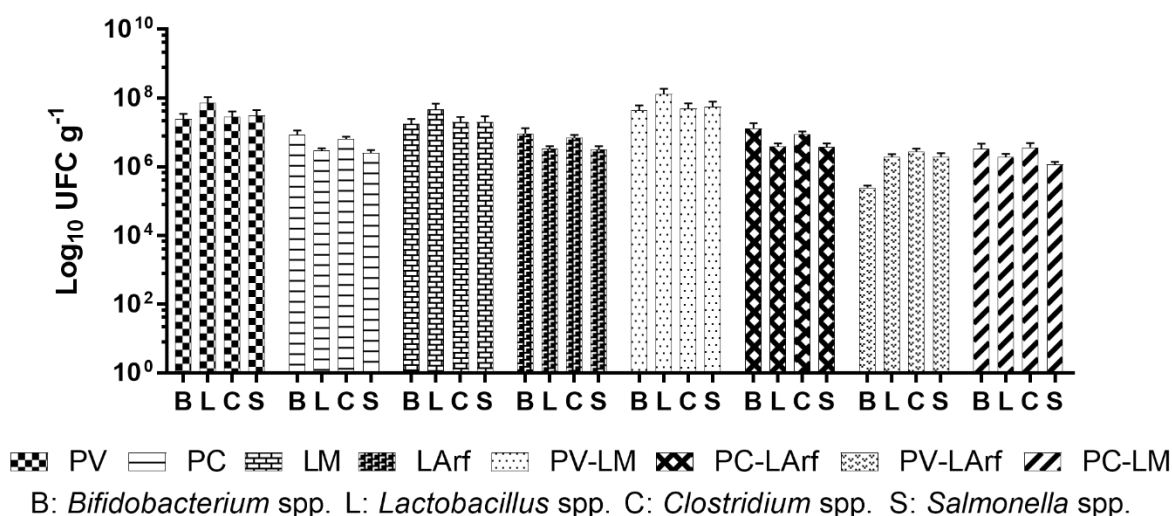


Figura 7. Población total de la microbiota intestinal cultivable de heces fecales proveniente de lactantes y preescolares, según su vía de parto y tipo de alimentación,  $n=34$ .

**PV**: parto vaginal, **PC**: parto cesárea, **LM**: lactancia materna, **LArf**: lactancia artificial, **PV-LM**: parto vaginal con lactancia materna, **PC-LArf**: parto cesárea con lactancia artificial, **PV-LArf**: parto vaginal con lactancia artificial, **PC-LM**: parto cesárea con lactancia materna.

El género *Bifidobacterium* spp. detectado en la microbiota intestinal de los lactantes y los preescolares, predominó en los participantes que nacieron por vía vaginal ( $7.38 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ). Sucedió lo contrario con los participantes que nacieron mediante el parto por cesárea ( $6.96 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ) (figura 7). El mismo comportamiento de prevalencia presentó el género *Lactobacillus* spp. que se encontró en las heces fecales de los participantes por parto vaginal ( $7.82 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ) y por cesárea ( $6.48 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ) (figura 7). En el caso del género *Clostridium* spp. no hubo una variación diferente, ya que el mayor recuento de *Clostridium* spp. se obtuvo a partir del parto vaginal ( $7.41 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ), mientras que el parto por cesárea indicó la

presencia más baja de estos microorganismos ( $6.82 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ) (figura 7). Finalmente, se muestra que el género *Salmonella* spp. se encontró igual que los otros géneros, parto vaginal arrojó la mayor presencia de estos microorganismos ( $7.46 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ) y parto por cesárea la menor cantidad de bacterias ( $6.40 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ).

De acuerdo a los resultados gráficos, la vía de parto resaltó como el factor que tiene mayor influencia en la composición y desarrollo de la microbiota intestinal de los lactantes y preescolares. Los cuatro géneros *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. y *Salmonella* spp. colonizaron en mayor cantidad la microbiota intestinal de los participantes nacidos por parto vaginal. Por otro lado, se puede observar que todos los géneros bacterianos aislados fueron mayores en la microbiota intestinal de los lactantes y los preescolares alimentados con lactancia materna, como se identificó anteriormente.

Específicamente, en la figura 7 se aprecia que el género *Lactobacillus* spp. fue predominante en la microbiota intestinal de los participantes que recibieron lactancia materna ( $7.67 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ), seguido de *Salmonella* spp. ( $7.31 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ), *Clostridium* spp. ( $7.30 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ) y *Bifidobacterium* spp. ( $7.24 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ). Los participantes que se alimentaron con lactancia artificial presentaron mayores cantidades de *Bifidobacterium* spp. ( $6.96 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ), seguido de *Clostridium* spp. ( $6.85 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ), *Lactobacillus* spp. ( $6.51 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ) y con la misma cantidad *Salmonella* spp. ( $6.51 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ).

En la identificación de cada género bacteriano presente con la combinación de los factores vía de nacimiento y tipo de alimentación, se vuelve a observar que, la colonización de la microbiota intestinal de los participantes nacidos por parto vaginal y alimentados con lactancia materna tuvieron el mayor recuento de microorganismos. El género bacteriano más importante fue *Lactobacillus* spp. ( $7.74 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ), seguido de *Salmonella* spp. ( $7.37 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ), *Clostridium* spp. ( $7.35 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ) y *Bifidobacterium* spp. ( $7.31 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ ). El menor recuento de microorganismos identificado fue en el parto por cesárea combinado con lactancia artificial, se reporta



la presencia en bajas cantidades de *Bifidobacterium* spp. ( $6.91 \log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ ), seguido de *Clostridium* spp. ( $6.83 \log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ ), *Lactobacillus* spp. ( $6.50 \log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ ) y *Salmonella* spp. ( $6.45 \log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ ).

De acuerdo con los resultados obtenidos sobre la proporción de microorganismos presentes de cada género bacteriano, se puede decir que son similares a los reportados en otros estudios. Por ejemplo, la prevalencia de colonización de los géneros bacterianos según la vía de nacimiento es comparable con lo reportado por Yang et al. (2016), quienes reportaron que un factor importante que contribuye a la variación de la microbiota intestinal es la vía de nacimiento. Los bebés que nacen por vía vaginal tienen una microbiota intestinal dominada en los primeros meses por *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp. o *Sneathia* spp. y en los meses siguientes aumenta la distribución de *Bifidobacterium* spp. y *Bacteroides*. Esta colonización ocurre a través de la transferencia vertical de los microbios vaginal-perianal de la madre cuando el bebé pasa por el canal de parto. A partir de esta información, se puede explicar la mayor cantidad de *Lactobacillus* spp. en los lactantes y preescolares que nacieron por parto vaginal.

En otro estudio, también reportaron que la microbiota intestinal de la vida temprana parece verse afectada por la vía de parto. Reyman et al. (2019) trabajaron con 74 bebés nacidos por vía vaginal y 46 por cesárea, mostraron que los bebés nacidos por parto vaginal tuvieron un enriquecimiento de *Bifidobacterium* spp, y menores cantidades de *Enterococcus* spp. y *Klebsiella* spp. En este caso, se puede atribuir que la vía de parto vaginal está asociada directamente a las altas cantidades de *Bifidobacterium* spp. tal como se observó en la microbiota intestinal de los lactantes y preescolares que participaron en el presente trabajo experimental.

Para los géneros bacterianos presentes según el tipo de alimentación, Penders et al. (2005) determinaron la prevalencia bacteriana a partir de la lactancia materna y la alimentación con fórmula láctea en la composición de la microbiota intestinal de 100 bebés. Los resultados reportados, indicaron que todos los bebés estaban

colonizados por *Bifidobacterium* spp. en cantidades comparables (10.24 a 10.56 log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup>). Estos valores son mayores a las cantidades del género *Bifidobacterium* spp. identificadas en los lactantes y preescolares que en el presente trabajo experimental. Asimismo, existen otros factores, por ejemplo, el estrés, las intervenciones farmacológicas, los entornos hospitalarios, las prácticas de alimentación que pudieron influir en la composición y proliferación de la microbiota de los participantes tal como lo menciona Cong et al. (2017). Sin embargo, se puede decir que ambos grupos presentaron este grupo de microorganismos en diferentes cantidades provenientes de la lactancia materna y la lactancia artificial.

#### 9.1.4 Correlación múltiple de resultados microbiológicos y antropométricos

En la tabla 12 se presenta los resultados de la correlación múltiple de Pearson en donde se presentan valores con signo negativo (-) o positivo de  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.05$  (\*). Los valores reportados para la correlación de Pearson van de +1 a -1 pasando por el cero. Un valor de cero, indica que las dos variables no tienen asociación entre sí. Un valor  $>0$  hasta +1, representa una relación positiva, es decir, al aumentar una variable su contraparte lo hará al mismo tiempo y en la misma dirección. Si por el contrario se obtiene un valor de  $<0$  hasta -1, se entenderá como una correlación negativa, en donde al aumentar una variable la otra lo hará en sentido opuesto, es decir, si una aumenta la otra disminuye.

La matriz de correlación se dividió en tres secciones; la primera sección en color verde es la correlación que existe entre los géneros bacterianos cultivados de las heces fecales frescas de los donantes, la segunda sección en color turquesa es la correlación entre los géneros bacterianos y las mediciones e indicadores antropométricos evaluados en los donantes de heces fecales y la tercera sección en color amarillo representa la correlación que existe entre las mediciones e indicadores antropométricos.

Resultados / Discusiones (primera etapa experimental; colecta de heces fecales)

Tabla 12. Matriz de correlación múltiple de Pearson para las cuentas microbiológicas provenientes de la microbiota intestinal de lactantes y preescolares, las mediciones e indicadores antropométricos de crecimiento.

	A	B	C	Ms	TII	Ø cf	CMB	Pse	PTr	IMCE	%PE	%PT	AMBr	ABr	AGBr
A	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	.870**	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	.882**	.984**	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	.865**	.998**	.982**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TII	.114	.237	.155	.932**	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ø cf	.064	.145	.093	.819**	.782**	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMB	.110	.138	.110	.734**	.602**	.767**	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Pse	-.047	-.048	-.059	.405*	.266	.415*	.725**	1	-	-	-	-	-	-	-
PTr	.179	.241	.199	.614**	.527**	.737**	.788**	.649**	1	-	-	-	-	-	-
IMCE	.133	.052	.049	.611**	.413*	.805**	.748**	.479**	.790**	1	-	-	-	-	-
%PE	.152	.131	.140	.538**	.341*	.440**	.336	.114	.193	.530**	1	-	-	-	-
%TE	-.018	.029	.039	.157	.124	.127	-.099	-.177	-.169	.113	.809**	-	-	-	-
%PT	.397*	.257	.285	.589**	.346*	.490**	.513**	.081	.452**	.720**	.693**	1	-	-	-
AMBr	.041	.051	.034	.666**	.531**	.647**	.946**	.665**	.548**	.596**	.339*	.440**	1	-	-
ABr	.095	.127	.099	.725**	.592**	.764**	.999**	.746**	.793**	.747**	.322	.490**	.944**	1	-
AGBr	.150	.207	.168	.671**	.567**	.783**	.888**	.718**	.981**	.816**	.241	.469**	.695**	.894**	1
%AGBr	.200	.266	.219	.454**	.401*	.575**	.542**	.495**	.942**	.661**	.074	.359*	0.245	.549**	.861**

\*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.01$ : diferencia estadística significativa; **A**: *Bifidobacterium* spp., **B**: *Lactobacillus* spp., **C**: *Clostridium* spp., **D**: *Salmonella* spp.; **Ms**: masa; **TII**: talla, **Ø cf**: perímetro cefálico; **CMB**: circunferencia media de brazo; **Pse**: pliegue subescapular; **PTr**: pliegue tríceps; **IMCE**: índice de masa corporal para la edad; **%PE**: porcentaje de peso para la edad; **%TE**: porcentaje de altura para la edad; **%PT**: porcentaje peso para la altura; **AMBr**: área muscular del brazo, **ABr**: área del brazo, **AGBr**: área grasa del brazo, **%AGBr**: porcentaje del área grasa del brazo.

En el color verde engloba la correlación existente entre los géneros bacterianos cultivados de las heces fecales frescas de los donantes, logrando observar una correlación positiva con una significancia estadística de  $P < 0.01$  (\*\*) entre los tres géneros bacterianos, indicando que, si un microorganismo aumenta en cantidad, los otros dos lo harán al también. Por lo tanto, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. y *Salmonella* spp. tiene una estrecha relación en la colonización del SGI de los lactantes y preescolares donantes.

En color turquesa se muestra la correlación entre los géneros bacterianos y las mediciones e indicadores antropométricos evaluados en los donantes de heces fecales, se observa solo una correlación positiva entre el género *Bifidobacterium* spp. y el porcentaje del peso para la talla (%PT) con un nivel de significancia estadística de  $P < 0.05$  (\*) y por su cercanía la cero, 0.397, es considera como una correlación positiva débil.

Finalmente, en color amarillo podemos encontrar diversas correlaciones positivas entre las mediciones e indicadores antropométricos, con diferentes grados de significancia estadística  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.05$  (\*). Esto es confirmatorio con lo reportado en las guías de evaluación del estado nutricio antropométrico y la Norma Oficial Mexicana en donde se ha demostrado la relación e importancia que tiene las mediciones antropométricas de forma individual y de forma combinada como indicador.

Un estudio realizado por Osborne et al. (2020) enfocado en la asociación de la microbiota intestinal y cinco mediciones antropométricas, el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia media de brazo (CMB), la circunferencia de muslo, circunferencia de cintura y cadera, y un indicador antropométrico, relación cintura-cadera, de 8,287 adultos en edades de 18 a 75 años. Reportaron uno de tres géneros bacterianos evaluados perteneciente a Firmicutes presentó una correlación positiva, *Acidaminococcus*, con el IMC, la circunferencia de cintura y cadera. Mientras que *Oscillospira* y la familia *S24-7* y *Ruminococcaceae* mostraron correlaciones negativas. En el estudio realizado, las mediciones antropométricas de circunferencia de cintura y cadera no son reproducibles porque dichas mediciones

son recomendadas para adultos y asociadas al desarrollo de síndrome metabólico, por otro lado, la correlación existente entre el IMC y dos géneros bacterianos pertenecientes a Firmicutes no presentaron ningún tipo de significancia estadística.

Por otro lado, en un estudio realizado a 58 madres y sus recién nacidos, Sato et al. (2019) estudiaron la asociación de la microbiota materna con el crecimiento del recién nacido. Reportaron no tener una asociación entre los filos de la microbiota de la madre con la antropometría realizada al recién nacido. Por el contrario, los géneros como *Eggerthella*, *Collinsella*, *Anaerostipes* y *Streptococcus* demostraron tener una asociación de tipo positiva o negativa frente a la masa.

Para el género femenino se reporta únicamente una correlación negativa entre el género *Streptococcus* frente a la longitud. Para el género masculino, se reporta una correlación predominantemente negativa sobre los géneros *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Parabacteroides*, *Lachnobacterium*, *Bacteroides*, *Eggerthella*, *Dorea* y *Coriobacteriaceae* no clasificada y la circunferencia cefálica.

En otro estudio realizado por Zavala Olivas (2009) en donde se llevó a cabo una correlación de Spearman con indicadores antropométricos e indicadores de composición corporal en niños preescolares de Ciudad Juárez, Chihuahua. En donde se observa que existe una correlación entre el índice de masa corporal con el pliegue de bíceps y el pliegue suprailíaco. Por otro lado, se reportó una correlación entre el pliegue de bíceps y pliegue suprailíaco con las ecuaciones para el cálculo del porcentaje de grasa corporal de Slaughter, Duremberg y Brook. El pliegue de tríceps y subescapular tuvieron una correlación positiva con la ecuación de porcentaje de grasa de Slaughter. Ya que el pliegue subescapular y el pliegue de tríceps muestran una asociación, con mayor o menor fuerza, entre los indicadores antropométricos relacionados con el acúmulo de grasa o desarrollo de músculo en el brazo.

Estos datos reportados por Zavala Olivas (2009) concuerdan con las correlaciones de Pearson para las mediciones e indicadores antropométricos del presente estudio, al igual que pliegue de bíceps, el pliegue de tríceps y subescapular se asocian al acumulo de grasa por lo tanto se obtienen resultados de correlaciones positivas con

significancia estadística de  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.05$  (\*) frente a la masa, el IMC para la edad, la circunferencia media de brazo, el área grasa del brazo (AGBr) y el porcentaje del área grasa del brazo (%AGBr). Al mismo tiempo también existen correlaciones positivas con significancia estadística de  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.05$  (\*) para los pliegues de tríceps y subescapular con el área muscular del brazo (AMBr).

De manera general se puede apreciar que los resultados de este estudio son similares en cuanto a la utilización de los indicadores antropométricos en la evaluación del estado de nutrición. Como ya se ha mencionado, uno de los errores en la evaluación del estado nutricional radica en las tablas de referencia, las ecuaciones de Slaughter, Duremberg y Brook son aceptadas a nivel internacional pero no fueron diseñadas o evaluadas en la población mexicana. Con lo que se puede concluir que su uso debe ser limitado y como un punto de referencia, optando por utilizar ecuaciones validadas en población mexicana.

Ya que solo se obtuvo una correlación positiva entre las mediciones antropométricas y las UFC  $g^{-1}$  del género *Bifidobacterium* spp. Este resultado puede mirarse como un primer acercamiento en la realización de más correlaciones de este tipo, ya que para adultos se han publicado muy pocos reportes y en lactantes y preescolares es nula esta información. Además, se puede pensar que la falta de asociación podría estar limitada por los pocos géneros cultivables o por el tamaño de la muestra estudiada.

La falta de correlaciones con significancia estadística puede deberse a que la microbiota en esa edad está teniendo un cambio para dar lugar a una microbiota transitoria que durará hasta poco antes de la adolescencia, donde es un poco más estable, como han reportado otros autores. De igual forma, ha podido quedar plasmado que el uso de indicadores antropométricos respecto a las cuentas microbiológicas o estudios de extracción, cuantificación y/o secuenciación de ADN son poco estudiadas, por lo que realizar este tipo de análisis de información brinda un primer acercamiento del conocimiento sobre la microbiota de una población mexicana.

---

---

## 9.2 Resultados de la segunda etapa experimental; colecta de agaves

A continuación, se presentan algunas características bromatológicas, bioquímicas y compuestos presentes en las hojas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* como posibles alternativas de prebióticos incorporados en fórmulas lácteas consumidas por lactantes y preescolares.

### 9.2.1 Caracterización bromatológica y bioquímica de las hojas de agave

En la tabla 13 se presentan los resultados de algunas características bromatológicas y bioquímicas de las hojas de agaves como fuentes para la obtención de fructooligosacaridos (FOS). Las hojas del *Agave angustifolia* mostraron el mayor porcentaje de humedad, cenizas y proteína cruda, mientras que el *Agave fourcroydes* mostró el mayor porcentaje de grasa, fibra dietética soluble (FDS), y fibra dietética total (FDT). Los parámetros de color indicaron que el tono ( $h^\circ$ ) de ambas hojas de agave fue de color verde, pero con una baja pureza del color, la cual es representada con los resultados de croma (C). La luminosidad (L) mostró diferencia significativa entre las dos hojas de agave, esto quiere decir que el color verde de las hojas de *A. angustifolia* es más claro o luminoso en comparación con *Agave fourcroydes*.

Colunga-García Marín (1998) realizó un análisis bromatológico a plantas de *A. angustifolia* y *A. fourcroydes* cultivadas de forma silvestre en el estado de Yucatán. Aunque las especies del estudio son las mismas que el presente trabajo de experimental, los resultados bromatológicos fueron mayores en los agaves cultivados en Yucatán.

Tabla 13. Composición química, color y azúcares reductores de las hojas *Agave fourcroydes* y *Agave angustifolia*.

<b>Composición (%)</b>	<b><i>A. fourcroydes</i></b>	<b><i>A. angustifolia</i></b>	<b>Valor P</b>
Humedad	80.11 ± 3.75	82.50 ± 1.16	0.0312*
Cenizas	4.95 ± 0.21	5.45 ± 0.21	0.1425
Proteína cruda	2.24 ± 0.32	3.33 ± 0.44	0.0575
Grasa cruda)	5.11 ± 1.29	0.89 ± 0.68	0.0555
FDI	29.54 ± 14.66	36.35 ± 10.05	0.6423
FDS	18.08 ± 4.30	5.58 ± 0.35	0.0548
FDT	47.62 ± 18.96	41.93 ± 10.40	0.7454
Azúcares reductores	0.54 ± 0.026	0.51 ± 0.057	0.3115

Composición (%)	<i>A. fourcroydes</i>	<i>A. angustifolia</i>	Valor P
<b>Color</b>			
L	49.37 ± 0.65	52.48 ± 1.65	0.0015*
C	13.00 ± 1.71	12.65 ± 1.22	0.6890
h(°)	117.83 ± 2.28	117.00 ± 2.87	0.5970

\* $P < 0.05$ : diferencia estadística significativa; **FDI**: fibra dietética insoluble, **FDS**: fibra dietética soluble, **FDT**: fibra dietética total.

La fibra contenida en los agaves estudiados puede considerarse como un componente importante en dichos agaves, después de la eliminación de la humedad ya que se encuentra entre 41.925 y 47.618 g 100 g<sup>-1</sup> de hoja de agave. Estos valores son mayores a la información reportada en la NOM-051-SCFI/SSA2 (2010), quien establece una IDR de 30g, mientras que el Sistema mexicano de alimentos equivalentes, SMAE recomienda 2.5g/equivalente (equivalente = 250g de alimento o 1 taza) (Pérez-Lizaur et al., 2014). Por lo tanto, *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*, podrían considerarse como una fuente de fibra para la alimentación humana, aunque para poder ser utilizados para consumo humano, es necesario realizar otro tipo de tratamientos para una recuperación y purificación de la fibra soluble. La aplicación de la FDT radica en cantidad de hidratos de carbono complejos, que como se ha mencionado, son fuente de FOS, por lo que en la industria alimentaria representan una buena fuente de obtención.

El contenido de azúcares reductores no presentó diferencia significativa entre las hojas de las dos especies de agave, en promedio tienen 0.5276 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores. En comparación con el estudio presentado por Martínez Torres (2005) quien reportó valores de azúcares reductores en piñas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* (46.60±2.52 y 56.96±2.69 g kg<sup>-1</sup> de piña) durante diferentes edades y tres municipios del estado de Yucatán, se puede decir que la cantidad de azúcares reductores es menor en las hojas en comparación con las piñas del agave. Resultados similares fueron reportados por Cruz García et al. (2013), quien reporta 21.6±3.15 g 100 g<sup>-1</sup> de azúcares reductores en el jugo crudo de las piñas de *A. angustifolia* cultivado en el estado de Oaxaca.



En investigaciones relacionadas con desechos agroindustriales generados de la elaboración de fibras a partir de *A. fourcroydes*, Ávila Lizárraga (2018) reportó valores de azúcares reductores de  $1.30 \pm 0.04$  hasta  $2.42 \pm 0.12$  g L<sup>-1</sup> determinados en los desechos del agave mediante extracción ultrasónica.

Las diferencias de los resultados obtenidos del análisis bromatológico, color y azúcares reductores en comparación con los estudios reportados por otros autores puede ser atribuido a la sección de la planta analizada y las variedades, así como a diferentes factores como el sistema de cultivo, las condiciones climáticas (humedad relativa, temperatura, luz), las etapas de desarrollo, maduración, cosecha y almacenamiento, que pueden afectar su composición química y otros parámetros de calidad como apariencia, color, sabor y olor.

De acuerdo con lo anterior, se puede decir, que las hojas de *A. angustifolia* tienen un mayor contenido de humedad, mientras que en las hojas de *A. fourcroydes* es menor. En cuanto a la fibra soluble, esta es significativamente mayor en *A. fourcroydes* por lo que pueden ser usadas como fuente para la obtención de fibra. Ambas hojas de los agaves contienen cantidades de azúcares reductores similares. Por lo tanto, una alternativa por parte de la industria del agave o a la industria de obtención de FOS se pueden considerar el uso de las hojas de los agaves como una materia prima para su procesamiento y posterior obtención de FOS, dependiendo de la región de cultivo y la parte del agave utilizado.

### 9.2.2 Cuantificación de azúcares presentes en el jugo de agave

El contenido de glucosa y sacarosa presente en los jugos de agave de hojas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* extraídos con dos tamaños de membrana se reportan en la tabla 14. De acuerdo con el diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>\*3 y ANOVA se identificó diferencia significativa entre el tipo de filtrado, es decir, jugo de agave sin filtrar y dos tamaños de membrana usados para filtrar y determinar el contenido de glucosa y sacarosa en los agaves, así como entre los propios valores de los azúcares, glucosa y sacarosa y la interacción entre la especie de agave y los azúcares. Estos resultados se pueden apreciar en la gráfica de Pareto (figura 8 A),

donde se observa que los principales factores relevantes fueron el tipo de filtrado y el azúcar. El azúcar fue el principal factor que interactuó con la especie de agave, el tipo de filtrado y la combinación de especie de agave y tipo de filtrado. Entre los efectos principales, se observa que el factor de mayor relevancia que permite obtener un mayor contenido de azúcares es el tipo de filtrado de 10 kDa (+1) a partir de las hojas de *A. fourcroydes* (-1). Sin embargo, en la figura 8 B se puede identificar que la interacción con mayor influencia en el contenido de azúcares es la interacción AC correspondiente a la especie de agave con el azúcar, el resultado de esta interacción fue  $2.263 \pm 0.061$  g de glucosa en un litro de jugo de agave obtenido de *A. angustifolia*. La interacción con menor influencia en el contenido de azúcares fue la especie del agave con el tipo de filtrado.

Tabla 14. Resultados del contenido de glucosa y sacarosa extraídas de las hojas de *Agave fourcroydes* y *Agave angustifolia* filtrados con diferente tamaño de membrana (3 y 10 kDa).

Tratamiento	Especie de agave	Glucosa (g/L)	Sacarosa (g/L)
Sin filtrar	<i>A. fourcroydes</i>	$0.927 \pm 0.876$	$0.896 \pm 0.877$
	<i>A. angustifolia</i>	$1.299 \pm 0.036$	$0.147 \pm 0.005$
3 kDa	<i>A. fourcroydes</i>	$1.603 \pm 0.036$	$1.548 \pm 0.029$
	<i>A. angustifolia</i>	$2.263 \pm 0.061$	$1.425 \pm 0.021$
10 kDa	<i>A. fourcroydes</i>	$1.718 \pm 0.055$	$1.718 \pm 0.055$
	<i>A. angustifolia</i>	$1.930 \pm 0.425$	$1.325 \pm 0.935$
<b>Interacciones</b>		<b>Valor P</b>	
Agave (A)		0.9863	
Filtración (B)		0.0004*	
Hidrato de carbono (C)		0.0179*	
Interacción AB		0.8249	
Interacción AC		0.0260*	
Interacción BC		0.5170	
Interacción ABC		0.5620	

\* $P < 0.05$ : diferencia estadística significativa.

En un estudio realizado por Montañez Soto et al. (2011) de *A. tequilana* se evaluó la presencia de glucosa con un grado de polimerización como azúcar reductor y de hasta 6.6 grados de polimerización para considerarse como fructooligosacárido

(FOS) en dos secciones de la hoja, punta y base. Los valores reportados fueron 2.98 y 3.09 g de glucosa por cada 100 g de punta y base de la hoja, respectivamente. Mientras que para FOS, reportaron 0.99 g y 2.08 g por cada 100 g de punta y base de la hoja, respectivamente. Estos resultados son similares en cuanto al contenido de glucosa obtenido en el presente trabajo experimental, a partir de *A. fourcroydes* con  $0.927 \pm 0.876$  g de glucosa en un litro de jugo de agave hasta  $2.263 \pm 0.061$  g de glucosa en un litro de jugo de agave de *A. angustifolia*. Curbelo et al. (2009) reportaron valores menores de glucosa y sacarosa contenidas en el área apical de la hoja 0.0085 y 0.0049 g/g de hoja seca, respectivamente.

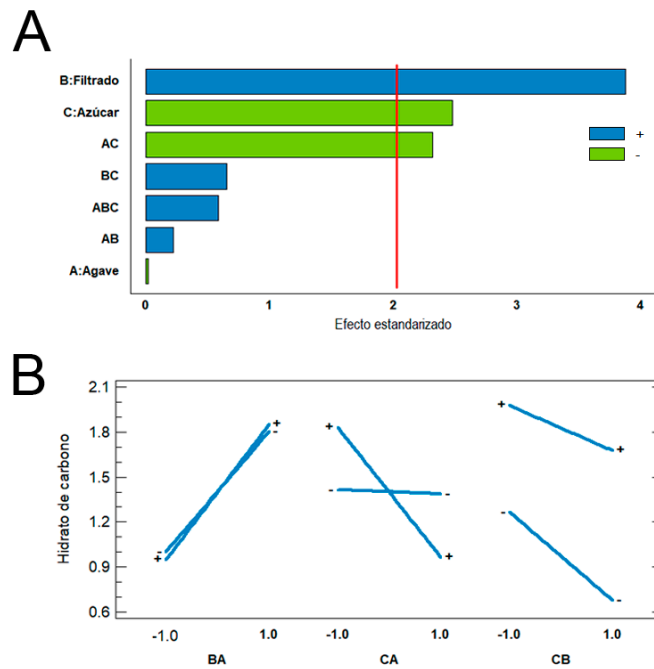


Figura 8. Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño experimental  $2^2 \times 3$ .  
**A:** Diagrama de Pareto; **B:** Gráfico de interacción.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede decir que el corte molecular del filtrado usado para obtener el jugo de agave de las hojas de agave influye significativamente en el contenido de glucosa y sacarosa. El jugo de agave sin filtrar obtenido de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* mostró el menor contenido de glucosa y sacarosa, respectivamente, mientras que *A. angustifolia* presentó el mayor contenido

de glucosa con un tamaño de membrana de 3 kDa. Por lo tanto, el contenido de azúcares y los FOS con grados de polimerización entre 2 y 60, puede estar influenciado por el método de extracción, la especie de agave y la parte de la planta.

### 9.2.3 Identificación de FOS en jugo de agave

En la figura 9 se muestra la cromatografía de alta resolución en capa fina. Se puede apreciar la presencia de diferentes compuestos en los fraccionamientos por peso molecular (3 kDa y 10 kDa) obtenidas de las hojas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*. De acuerdo con los estándares de referencia usados en la cromatografía, se puede decir que se identificaron los cinco compuestos referenciados que corresponden a questosa, nistosa, glucosa, sacarosa, fructosa. En el corte molecular de 3 kDa se observaron los compuestos de glucosa, sacarosa y fructosa de forma eclipsada entre ellos, mientras que en el corte molecular 10 kDa los mismos compuestos mostraron menor saturación sin una identificación definida. En el caso de la identificación de questosa y nistosa, se puede observar que estos compuestos estuvieron presentes en ambos cortes moleculares, y son representados por bandas bien definidas con ligeras saturaciones.

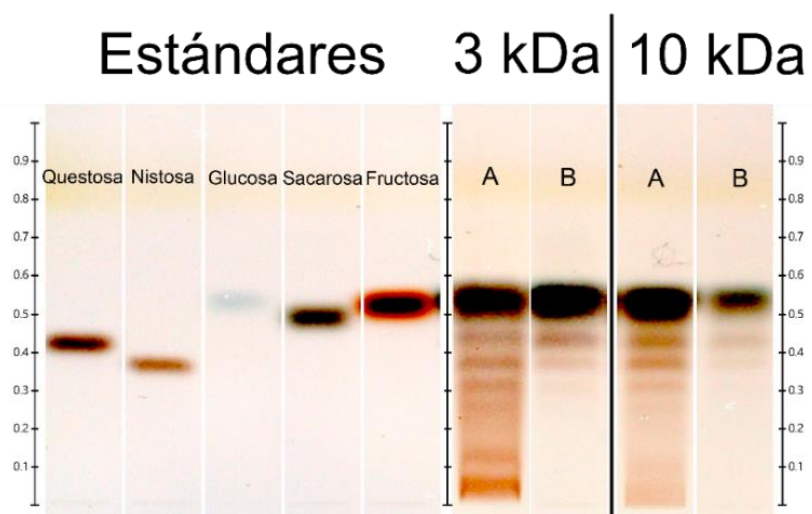


Figura 9. Cromatografía en capa fina de alta resolución con revelado para azúcares, grupo cetónico y aldehído, de los fraccionamientos por peso molecular de 3 y 10 kDa en las hojas de agave.

**Revelado:** anilina 4%, difenilamida 4% y ácido fosfórico (5:5:1). **A:** *Agave fourcroydes*, **B:** *Agave angustifolia*.

La identificación cualitativa de los compuestos observados en las bandas se comprobó con la comparación del factor de retención calculado ( $R_f$ ) de cada compuesto con los estándares de referencia, los valores obtenidos se presentan en la tabla 15. De forma general se puede observar, que la mayoría de los valores  $R_f$  de los compuestos son similares a los valores de los estándares de referencia, de los cuales resalta fructosa. Questosa no fue identificada en el fraccionamiento por peso molecular de 10 kDa de las hojas de *Agave angustifolia*

Tabla 15. Valor del factor de retención de los compuestos presentes en los fraccionamientos por peso molecular de 3 y 10 kDa en las hojas de *Agave fourcroydes* y *Agave angustifolia*.

Valor $R_f$ estándar		3 kDa		10 kDa	
		A	B	A	B
Questosa	0.75	0.77	0.78	0.00	0.78
Nistosa	0.63	0.65	0.62	0.72	0.62
Glucosa	0.93	0.96	0.93	1.00	0.93
Sacarosa	0.87	0.80	0.85	0.87	0.85
Fructosa	0.95	0.94	0.95	1.00	0.95

A: *Agave angustifolia* Haw., B: *Agave fourcroydes* Lem.

Las bandas observadas en las placas de cromatografía se cuantificaron con un densitómetro para identificar el compuesto correspondiente de cada mancha revelada. Los resultados se interpretaron a partir de los cromatogramas obtenidos de los fraccionamientos por peso molecular 3 kDa de las hojas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* (figura 10 y figura 11, respectivamente). Se puede observar que los picos de cada cromatograma coinciden con las bandas de las placas. Por lo tanto, se puede decir, que en ambos agaves el pico con mayor saturación, que está representado por el área bajo la campana corresponde al compuesto de glucosa, seguido de questosa y nistosa. En el caso del cromatograma del agave *A. fourcroydes*, en la figura 10 se observan tres picos que se pueden relacionar con bandas de otros compuestos no identificados correspondientes a la polimerización de los FOScc, a los cuales se adiciona fructosa creciendo la cadena de hidratos de carbono, en proporciones constantes con la longitud de la cadena hasta llegar a un

compuesto altamente polimerizado que permanece muy cerca del punto de aplicación de la muestra. Es decir, un FOS de cadena larga por su alto peso molecular, con el consecuente aumento de polaridad.

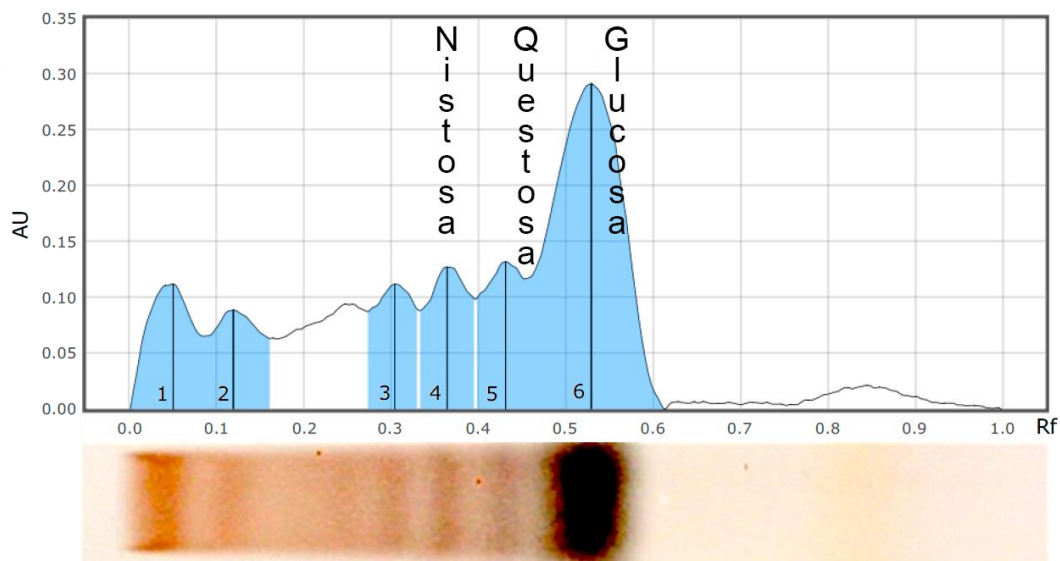


Figura 10. Reporte de cromatografía en capa fina de alta resolución con revelado de cromatografía para el *Agave fourcroydes*.

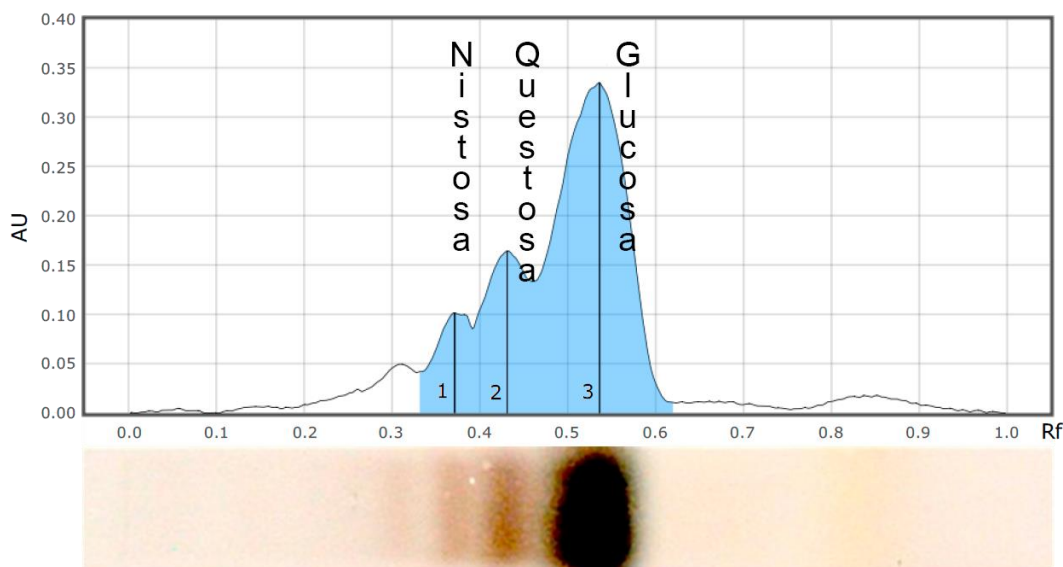


Figura 11. Reporte de cromatografía en capa fina de alta resolución con revelado de cromatografía para el *Agave angustifolia*.

Estudios del análisis de cromatografía en capa fina para el agave *A. fourcroydes* a partir de extracto seco, reportan la identificación de glucosa y fructosa (monosacáridos), sacarosa (disacáridos) y questosa, neoquestosa o 6G-questosa, 1-questosa, nistosa y 1,1,1-questopentaosa (fructooligosacáridos, FOS). De esta forma García Curbelo et al. (2015) identificaron que *A. fourcroydes* puede tener una mezcla de diferentes tipos de hidratos de carbono. De acuerdo con esta información, los picos no identificados en el cromatograma de HPTLC de las hojas de *A. fourcroydes* pueden atribuirse al compuesto 1,1,1-questopentaosa. Mientras que los compuestos identificados de glucosa y sacarosa, coinciden con el trabajo reportado por García Albornoz (2006) quien reportó la presencia de glucosa y sacarosa, así como fructanos con un grado de polimerización de 3 – 5 provenientes de hojas de *A. fourcroydes* cultivados en viveros.

En el trabajo realizado por Velázquez-Martínez et al. (2014) se evaluó el potencial prebiótico de *A. angustifolia*, para ello identificaron mediante cromatografía de capa fina la presencia de bandas tenues de nistosa en una fracción de fructanos de 1 a 3 kDa, mientras que en la fracción de <1 kDa identificaron sacarosa, questosa y nistosa. Estos compuestos identificados son similares al presente trabajo experimental, por lo tanto, se puede decir que las hojas de *A. angustifolia* tienen compuestos de glucosa, questosa y nistosa, como se muestra en la figura 11.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir, que los jugos de agave que se extrajeron de las hojas de los agaves estudiados contienen principalmente nistosa, questosa y glucosa. Por lo tanto, el *A. fourcroydes* y el *A. angustifolia* pueden considerarse como fuente de obtención de fructooligosacáridos (FOS), siendo las hojas del *A. fourcroydes* con más compuestos identificados. Esto quiere decir que, sus FOS pueden usarse en la industria alimentaria, por ejemplo, como ingrediente para elaborar alimentos con propiedades prebióticas.

#### 9.2.4 Cinética de crecimiento de probiótico comercial en jugo de agave

En la figura 12 se presenta la cinética de crecimiento del probiótico *Saccharomyces boulardii* usando como fuente de alimentación los compuestos de los dos fraccionamientos por peso molecular (3 kDa y 10 kDa) obtenidas de las hojas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*. Se pueden observar las fases de crecimiento del probiótico en los diferentes medios compuestos por los FOS de agaves, las cuales son representadas por los valores de densidad óptica ( $DO_{630\text{ nm}}$ ) en función del tiempo (min). Se aprecia que *S. boulardii* presentó un mayor crecimiento en presencia de los compuestos obtenidos del corte molecular de 3 kDa del *A. fourcroydes* en comparación con el control, que corresponde a una composición mínima de alimento sin FOS (figura 12 A). Los componentes de FOS obtenidos del *A. angustifolia* produjeron un crecimiento menor de *S. boulardii* en comparación con los FOS obtenidos de *A. fourcroydes* (figura 12 B). El mayor crecimiento de *S. boulardii* fue representado por la  $DO_{630\text{ nm}} = 0.856$  aproximadamente entre las 20 horas y 22 horas 30 min en la fase de crecimiento estacionaria. Sin embargo, en el mismo rango de tiempo se observó la fase de muerte de *S. boulardii* en presencia de los compuestos obtenidos del corte molecular de 10 kDa del *A. angustifolia*.

Estudios relacionados con el crecimiento de microorganismos probióticos indican mayor crecimiento con alimentos ricos en FOS en comparación con probióticos comerciales, tal como lo reporta García et al. (2012). Estos autores evaluaron los fructanos como fuente de glucosa obtenidos de extractos secos del *A. fourcroydes*. En este medio se crecieron los probióticos del género *Lactobacillus acidophilus* ATCC 250, *L. casei* ATCC 393 y *L. paracasei* ATCC 25302 así como *Bifidobacterium adolescentes* ATCC 460, *B. bifidum* ATCC 12400 y *B. breve* ATCC 15700. Los resultados mostraron el mayor crecimiento en *Lactobacillus* con  $DO = 1.200$ , seguido *Bifidobacterium* con  $DO = 0.850$ . En otro estudio, Velázquez Martínez et al. (2014) reportaron que los compuestos obtenidos del corte molecular  $<1$  kDa del *A. angustifolia* fueron usados como alimento para generar un mayor crecimiento de *Bifidobacterium animalis* ATCC 25527, *B. breve* ATCC 15700, *B. longum* ATCC 15707 y *B. lactis* DSM 10140 con una máxima  $DO = 0.800$  en 24 horas. El



comportamiento de crecimiento de los probióticos de estos estudios, fueron similares a los resultados del presente trabajo experimental en ambos agaves frente al probiótico evaluado *S. boulardii*. Sin embargo, se puede decir, que los FOS y posiblemente algunos otros compuestos del grupo de hidratos de carbono contenidos en el *A. fourcroydes*, sirven como mejor fuente de carbono para el crecimiento del probiótico *S. boulardii*.

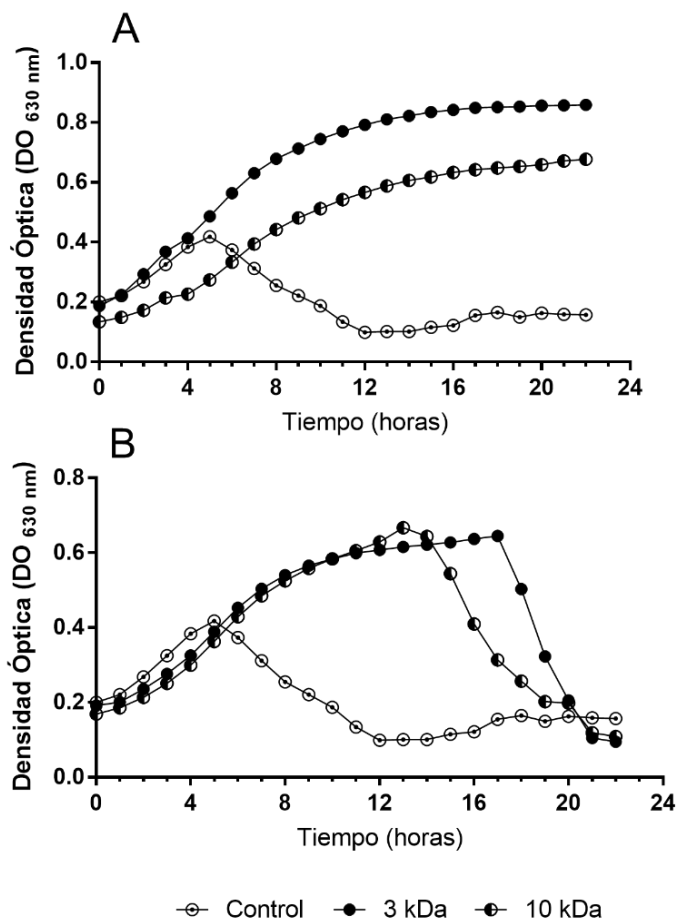


Figura 12. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces boulardii* en función de la densidad óptica (DO 630 nm) y tiempo (horas) en dos fracciones por peso molecular (3 kDa y 10 kDa) obtenidos de las hojas de agave.

**A:** *A. fourcroydes*; **B:** *A. angustifolia*.

Es importante mencionar, que en la elección de los compuestos contenidos en los agaves como fuente de carbono para el crecimiento de *S. boulardii* se debe considerar el tiempo, ya que, si desea mantener vivo por más tiempo el probiótico,

para ayudar a la colonización en el SGI, será idea utilizar los hidratos de carbono obtenidos de *A. fourcroydes*, o bien como una fuente alterna de carbono para estimular el crecimiento de los probióticos, como se refleja en la figura 12 A, en donde el tiempo de la fase de crecimiento es extendida. Pero si se desea realizar un proceso en un periodo corto de tiempo, los hidratos de carbono obtenidos de *A. angustifolia* cumplirán su función en menor tiempo, lo que supone una mayor utilización de este recurso, y por ende un incremento en costos a lo largo de la cadena de suministros, como se muestra en la figura 12 B.

Los resultados de la composición bromatológica de las hojas de agave, la identificación y cuantificación de FOS presentes en estos agaves, así como el crecimiento de *S. boulardii* en presencia de FOS, muestran que los FOS del *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* pueden ser compuestos con propiedades prebióticas y usarse para el crecimiento de probióticos. Por lo tanto, estos FOS pueden ser una alternativa de uso como prebióticos incorporados en fórmulas lácteas consumidas por lactantes y preescolares.

---

## 10 Conclusiones

En este trabajo experimental se evidencio la presencia de FOS en las hojas de agave mediante la elaboración de jugo de agave y su posterior ultrafiltración lograron demostrar, al igual que otros autores, que los FOS de interés son separados en relación con su peso molecular (3 o 10 kDa). El uso de tecnologías como el HPTLC que favorece una disminución del error por parte del analista, así como distintas perspectivas o análisis preliminares mediante software.

Los FOS de interés recuperados e identificados por HPTLC de las hojas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* fueron similares a los reportados por otros autores logrando observar la presencia de más picos de unidades de abundancia para *A. fourcroydes* que puede ser representativo a otro tipo de serie de FOS como los neo-fructanos. La mayor presencia de pico asociados a FOS puede ser vista como un punto clave para lograr un mejor desarrollo de microorganismos probióticos en pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*. En contraste, los FOS identificados en *A. angustifolia* se pudo observar un patrón de separación similar a lo reportado por otros autores, observando únicamente los disacáridos y FOS de interés. Generando un contraste de la presencia de FOS en las hojas de dos especies de agaves crecidas en las mismas condiciones geográficas y de requerimientos nutricionales.

Al realizar la cinética de crecimiento se puede concluir que la presencia de hidratos de carbono no identificados en el jugo de agave de *A. fourcroydes* puede proporcionar nutrientes extra como sustrato en el mantenimiento de la vida de microbiológicas reconocidas como probióticas, como es el caso de la levadura comercial *Saccharomyces boulardii* evaluada.

Al realizarse la colecta de heces fecales fuera de una institución o centro de salud, la población objetivo demuestra cierta desconfianza para poder brindar la información detallada sobre el proyecto y las necesidades que se puedan requerir. Otro punto negativo para establecer relaciones de trabajo está dado por la edad de los donantes. La edad requerida genera más desconfianza, así como una suposición

sobre si se les dará de comer algo o si la muestras requerida será de una mayor sensibilidad, como pueden ser muestras de sangre.

Cuando pudo ser posible establecer una red de trabajo, el acercamiento con los padres se vuelve más sencillo pero el apego a las indicaciones no lo es tanto. Por lo que el acercamiento y constancia con una institución educativa o centro de salud se vuelve clave en la obtención de muestras de heces fecales.

Otro aspecto para considerar en la colecta y posterior evaluación en biorreactores la microbiota intestinal proveniente de heces fecales proveniente de lactantes y preescolares dentro del laboratorio “Digestión *ex vivo*” de CIATEJ sede Guadalajara, fue el inicio y permanencia de la contingencia sanitaria por el virus del SARS-CoV-2 (COVID-19), por lo que se tuvieron que detener todas las actividades a nivel nacional retrasando y limitando los alcances de esta etapa experimental.

La evaluación del estado nutricio se vuelve de gran importancia, ya que brinda una doble confirmación dependiendo del criterio de inclusión que se haya planteado, así como una homogeneidad de la población al todos estar en las mismas condiciones de crecimiento además que es un método económico y el personal del área de la salud está siempre capacitado en las mediciones básicas como masa y talla.

El uso de una historia clínico-nutriológica nos permite generar suposiciones sobre el tipo de microbiota que se puede encontrar en cada donante, así como los factores externos y extrínsecos que están influenciando a la microbiota intestinal. La desventaja que se genera es la predisposición de los participantes, ya que se genera el “efecto de la bata”, en donde los participantes llegan a modificar sus respuestas para evitar ser juzgados por el personal de salud o entrevistador. Dentro de los resultados obtenidos pudo apreciarse este efecto, ya que algunas respuestas se hacía referencia a una alimentación adecuada y equilibrada.

El cultivo y crecimiento de los microorganismos presentes en las heces fecales conlleva grandes cantidades de tiempo y esfuerzo para el analista, los crecimientos obtenidos tienen la limitación de ser comparados ya que solo son aislados tres de

cuatro filos bacterianos. Pese a ello, la recuperación de microbiota intestinal total se encuentra dentro de los rangos reportados por otros autores o las cantidades encontradas a lo largo de todo el colon. Los géneros encontrados en las heces fecales de los lactantes y preescolares son similares a los reportados en estudios previos. Lo que marca este estudio como un primer acercamiento en el conocimiento de la microbiota intestinal de este grupo de edad.

---

## 11 Perspectivas

Es necesario realizar otra cromatografía HPTLC en donde se incluya un carril conteniendo glucosa + fructosa + sacarosa, con lo cual ayudará a develar si en la banda obtenida para glucosa en este trabajo corresponde al ancho de banda que se genere además de estar presentes los estándares de interés. De igual forma una cuantificación mediante HPLC podrá confirmar y corroborar la presencia de FOS con interés prebiótico y descartar así el uso de *A. fourcroydes* o *A. angustifolia* como fuente de FOS.

Al realizar las cinéticas de crecimiento deberá probarse los diferentes grados de polimerización que se logran obtener ya que como han reportado otros autores en fraccionamientos por peso molecular superiores a los 3 kDa se pueden obtener fructanos de 3 – 60 grados de polimerización, en 1 a 3 kDa los fructanos obtenidos son de 2 – 40 grados de polimerización y los menores a 1 kDa tienen un grado de polimerización de 2 – 22, ello servirá para identificar cual es la afinidad de los probióticos con el grado de polimerización de los FOS y fase estacionaria, específicamente para *A. fourcroydes*.

Será necesario realizar una complementación de los análisis microbiológicos con pruebas bioquímicas que permitan determinar develar los aislamientos en medios diferenciales o selectivos así como el uso de técnicas moleculares para cuantificar el porcentaje abundancia y así tener un resultado más preciso sobre las especies o subespecies que pueden estar presentes o de acuerdo a las condiciones de crecimiento que se necesitan (anaerobios estrictos, anaerobios facultativos o microbiota transitoria, etc.).

Debido al actual transcurso de la actual contingencia sanitaria por el virus del SARS-CoV-2, es necesario considerar en el planteamiento del estudio las alternativas necesarias para completar los objetivos y alcances, ya que derivado del confinamiento social, se limita el tiempo de trabajo en el laboratorio y reduce la capacidad productiva del estudiante. Por otro lado, el confinamiento social tiene una

afectación y repercusión sobre la población vulnerable y alta mente controlada por las autoridades sanitarias, lactantes y preescolares, restringiendo el acceso a ellos durante el desarrollo de la actual pandemia y limitando el contacto con personal ajeno al centro de salud y guarderías, tanto públicas como privadas. Ante estas situaciones se debe establecer alternativas concretas en cuanto a las fuentes de colecta de materiales biológicos, en este caso de heces fecales de lactantes y preescolares.

---

## 12 Referencias

- Aguilar-Barojas, S., 2005. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco* 11, 333–338.
- Alles, M.J.L., Tessaro, I.C., Noreña, C.P.Z., 2015. Concentration and Purification of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Root Fructooligosaccharides Using Membrane Technology. *Food technology and biotechnology* 53, 190–200. <https://doi.org/10.17113/ft.b.53.02.15.3766>
- Antošová, M., Polakovič, M., Bálež, V., 1999. Separation of fructooligosaccharides on a cation-exchange HPLC column in silver form with refractometric detection. *Biotechnology Techniques* 13, 889–892. <https://doi.org/10.1023/A:1008986426849>
- AOAC International, 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th ed. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- Apolinário, A.C., de Lima Damasceno, B.P.G., de Macêdo Beltrão, N.E., Pessoa, A., Converti, A., da Silva, J.A., 2014. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers* 101, 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.081>
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., Monsan, P., 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of Agave tequilana plants of different ages. *Food Chemistry* 122, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.028>
- Atlas, R.M., 2010. Handbook of Microbiological Media, Fourth Ed. ed. CRC Press, Washington, DC, EE.UU.
- Avila-Lizarraga, Y.G., 2018. Evaluación in vitro del Efecto de la Fibra Soluble Contenida en los Residuos Agroindustriales de la Desfibración de Agave fourcroydes. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.
- Beltrán de Heredia, M.R., 2017. Nutrición. *Farmacia profesional* 31, 17–21.
- BeMiller, J.N., 2019. 3 - Oligosaccharides, en: BeMiller, J.N.B.T.-C.C. for F.S. (Third E. (Ed.), *Carbohydrate Chemistry for Food Scientist*. AACCC International Press, pp. 49–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00003-0>



- Benkeblia, N., 2013. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *Journal of Chromatography A* 1313, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.013>
- Benno, Y., Sawada, K., Mitsuoka, T., 1984. The Intestinal Microflora of Infants: Composition of Fecal Flora in Breast-Fed and Bottle-Fed Infants. *Microbiology and Immunology* 28, 975–986. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1984.tb00754.x>
- Biavati, B., Mattarelli, P., 2006. The Family Bifidobacteriaceae, en: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackerbrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Volume 3. Springer, New York, NY, pp. 322–382. [https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5\\_17](https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_17)
- Bokulich, N.A., Chung, J., Battagli, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., Lieber, A., Wu, F., Perez-Perez, G.I., Chen, Y., Schweizer, W., Zheng, X., Contreras, M., Dominguez-Bello, M.G., Blaser, M.J., 2016. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Science Translational Medicine* 8, 343ra82. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7121>
- Buck, M.L., Pharm, D., 2009. *Saccharomyces boulardii* as a Probiotic for Children. *Pediatric Pharmacotherapy* 15, 2–5.
- Campbell, J.M., Bauer, L.L., Fahey, G.C., Hogarth, A.J.C.L., Wolf, B.W., Hunter, D.E., 1997. Selected Fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose, and 1 F - $\beta$ -Fructofuranosylnystose) Composition of Foods and Feeds . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3076–3082. <https://doi.org/10.1021/jf970087g>
- Cárdenas-López, C., Haua-Navarro, K., Suverza-Fernández, A., Perichart-Perera, O., 2005. Mediciones antropométricas en el neonato. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 62, 214–224.
- Castañeda-Guillot, C., 2018. Microbiota Intestinal y Salud Infantil. *Revista Cubana de Pediatría* 90, 94–110.
- Castro, M., 2019. Bioestadística aplicada en investigación clínica: conceptos básicos. *Revista Médica Clínica Las Condes* 30, 50–65. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2018.12.002>

- Cho, I., Blaser, M.J., 2012. The Human Microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* 13, 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>
- Clark, D.S., 1967. *Journal of Microbiology. Canadian Journal of Microbiology* 13, 11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/m67-187>
- Coluccini, M.L., Sánchez, R.J., Oberto, M.G., Giraud, A.R., Otermin, C.B., Perazzoli, R.E., 2020. Factores que influncian el desarrollo de la microbiota intestinal y su relación con el estado nutricional antropométrico. *Revista de Salud Pública* 2, 65–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.31052/1853.1180.v24n1>
- Colunga-García Marín, P., 1998. Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 62, 109–128. <https://doi.org/10.17129/botsoci.1555>
- Cong, X., Judge, M., Xu, W., Diallo, A., Janton, S., Brownell, E.A., Maas, K., Graf, J., 2017. Influence of Feeding Type on Gut Microbiome Development in Hospitalized Preterm Infants. *Nursing Research* 66, 123–133. <https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000208>
- Cong, X., Xu, W., Janton, S., Henderson, W.A., Matson, A., McGrath, J.M., Maas, K., Graf, J., 2016. Gut Microbiome Developmental Patterns in Early Life of Preterm Infants: Impacts of Feeding and Gender. *PLOS ONE* 11, e0152751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152751>
- Cooke, G., Behan, J., Clarke, N., Gorman, W., Costello, M., 2005. Comparing the gut flora of Irish breastfed and formula-fed neonates aged between birth and 6 weeks old. *Microbial Ecology in Health and Disease* 17, 163–168. <https://doi.org/10.1080/08910600500430664>
- Cruz-García, H., Enríquez-del Valle, José Raymundo-VelascoVelasco, V.A., Ruiz-Luna, J., Campos-Ángeles, G.V., Aquino-García, D.E., 2013. Nutrimientos y carbohidratos en plantas de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave karwinskii* Zucc. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1161–1173. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i6.1280>
- Cruz-Ramos, C.A., Orellana, R., Robert, M.L., 1985. *Agave Research Progress in Yucatan. Desert Plants* 7, 71–92.
- Cunha, S.C., Fernandes, J.O., 2020. Chapter 21 - Application in Food Analysis, en:

- Poole, C.F.B.T.-L.-P.E. (Ed.), *Handbooks in Separation Science*. Elsevier, pp. 643–665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00021-9>
- Curbelo, Y.G., López, M.G., Bocourt, R., 2009. Fructans in *Agave fourcroydes*, potentialities for its utilization in animal feeding. *Cuban Journal of Agricultural Science* 43, 169–171.
- Dart, R.K., 1996. *Microbiology for the Analytical Chemist*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (Eds.), 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Ed. ed. Springer-Verlag New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Derrien, M., Alvarez, A.S., de Vos, W.M., 2019. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology* 27, 997–1010. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.001>
- Díaz, R., Garrido, D., 2020. Chapter 4 - Recent advances in the infant gut microbiome and health, en: Faintuch, J., Faintuch, S. (Eds.), *Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers*. Academic Press, London, pp. 33–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819178-1.00004-6>
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science (New York, N.Y.)* 308, 1635–1638. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Eidelman, A.I., Schanler, R.J., 2012. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 129. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-3552>
- Elliermeier, C.D., Slauch, J.M., 2006. The Genus *Salmonella*, en: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Volume 6. Springer, New York, NY, pp. 123–158. [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x\\_8](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_8)
- Ellis, K.J., 2006. Methods of measuring body composition, en: Thureen, P.J., Hay, W.W. (Eds.), *Neonatal Nutrition and Metabolism*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 602–608. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511544712.042>

- Esparza-Ros, F., Vaquero-Cristóbal, R., Marfell-Jones, M., 2019. Protocolo internacional para la valoración antropométrica. UCAM Universidad Católica de Murcia, Murcia.
- Fouhy, F., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Cotter, P.D., 2012. Composition of the early intestinal microbiota. *Gut Microbes* 3, 203–220. <https://doi.org/10.4161/gmic.20169>
- Franco-Robles, E., López, M.G., 2015. Implication of Fructans in Health: Immunomodulatory and Antioxidant Mechanisms. *The Scientific World Journal* 2015, 15. <https://doi.org/10.1155/2015/289267>
- García-Albornoz, M.A., 2006. Determinación y Caracterización de Fructanos Provenientes de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.
- García-Curbelo, Y., López, M.G., Bocourt, R., Collado, E., Albelo, N., Nuñez, O., 2015. Structural characterization of fructans from *Agave fourcroydes* (Lem.) with potential as prebiotic. *Cuban Journal of Agricultural Science* 49, 75–80.
- García, Y., López, M.G., Bocourt, R., Rodríguez, Z., Urias-Silvas, J., Herrera, M., 2012. In vitro fermentation of the extract of *Agave fourcroydes* (henequen) by lactic acid bacteria. *Cuban Journal of Agricultural Science* 46, 203–209.
- Global Fructooligosaccharides (FOS) Market Insights, Forecast to 2025 [WWW Document], 2019. . 360 Market Updates. URL <https://www.360marketupdates.com/global-fructooligosaccharide-fos-market-13720737#collapse3> (consultado 4.12.21).
- Gómez-Álvarez, B., 2015. Obtención, Purificación, Caracterización y Evaluación de Nuevos Prebióticos a Partir de Subproductos Agroindustriales. Universidad de Vigo.
- Gómez-Álvarez Salinas, P., 2002. Fórmulas infantiles. Alimentación adaptada. *Farmacia Profesional* 16, 72–83.
- Guaraldi, F., Salvatori, G., 2012. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 94. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00094>
- Guna-Serrano, M.R., Larrosa-Escartín, N., Marín-Arriaza, M., Rodríguez-Díaz, J.C.,

2019. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 37, 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.03.005>
- Hall, V., Copsey, S.D., 2015. *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and Other Non-Spore-Forming Anaerobic Gram-Positive Rods, en: Jorgensen, J.H., Carroll, K.C., Funke, G., Pfaller, M.A., Landry, M.L., Richter, S.S., Warnock, D.W. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 920–939. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch52>
- Hammes, W.P., Hertel, C., 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, en: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Volume 4. Springer, New York, NY, pp. 320–403. [https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3\\_10](https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_10)
- Hayashi, S., Yoshiyama, T., Fujii, N., Shinohara, S., 2000. Production of a novel syrup containing neofructo-oligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Letters* 22, 1465–1469. <https://doi.org/10.1023/A:1005627828876>
- Heller-Rouassant, S., Pegueros-Fernández, V., 2013. Evaluación nutricional en pediatría, en: *Nutrición y gastroenterología pediátrica*. McGraw Hill Mexico, pp. 11–19.
- Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J., 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 44, 121–129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)
- Horan, N.J., 2003. Faecal indicator organisms, en: Mara, D., Horan, N. (Eds.), *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press, London, pp. 105–112. <https://doi.org/10.1016/B978-012470100-7/50008-X>
- Icaza-Chávez, M.E., 2013. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México* 78, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2017. Anuario estadístico y geográfico de Jalisco 2017. Guadalajara, Jalisco.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., Chassard, C., 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent

- approaches. *British Journal of Nutrition* 110, 1253–1262. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000597>
- Kayser, F.H., 2005. Bacteria as Human Pathogens, en: Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M. (Eds.), *Medical Microbiology*. Thieme, Zurich, pp. 229–347.
- Kook, S.Y., Kim, Y., Kang, B., Choe, Y.H., Kim, Y.H., Kim, S., 2018. Characterization of the fecal microbiota differs between age groups in Koreans. *Intestinal Research* 16, 246–254. <https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.2.246>
- Koren, O., Goodrich, J.K., Cullender, T.C., Spor, A., Laitinen, K., Kling Bäckhed, H., Gonzalez, A., Werner, J.J., Angenent, L.T., Knight, R., Bäckhed, F., Isolauri, E., Salminen, S., Ley, R.E., 2012. Host Remodeling of the Gut Microbiome and Metabolic Changes during Pregnancy. *Cell* 150, 470–480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.008>
- Kumar, C.G., Sripada, S., Poornachandra, Y., 2018. Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals, en: Grumezescu, A.M., Holba, A.M. (Eds.), *Role of Materials Science in Food Bioengineering*. Elsevier, pp. 451–503. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3.00014-0>
- Kumar, P., Dubey, K.K., 2019. Chapter 10 - Current Perspectives and Future Strategies for Fructooligosaccharides Production Through Membrane Bioreactor, en: Shukla, P.B.T.-A.M. and B. (Ed.), *Applied Microbiology and Bioengineering*. Academic Press, pp. 185–202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815407-6.00010-1>
- LaTuga, M., Stuebe, A., Seed, P., 2014. A Review of the Source and Function of Microbiota in Breast Milk. *Seminars in Reproductive Medicine* 32, 068–073. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361824>
- Lewis, Z.T., Totten, S.M., Smilowitz, J.T., Popovic, M., Parker, E., Lemay, D.G., Tassell, M.L. Van, Miller, M.J., Jin, Y., German, J.B., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., 2015. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 3, 1–21. <https://doi.org/doi.org/10.1186/s40168-015-0071-z>
- LFPDPPP, 2010. Ley Federal De Protección De Datos Personales En Posesión De

---

Los Particulares.

- LGPDPESO, 2017. Ley General De Protección De Datos Personales En Posesión De Sujetos Obligados.
- López-Romero, J.C., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A., Peña-Ramos, E.A., González-Ríos, H., 2018. Biological activities of Agave by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98, 2461–2474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8738>
- Macfarlane, G.T., Macfarlane, S., Gibson, G.R., 1998. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology* 35, 180–187. <https://doi.org/10.1007/s002489900072>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2015. *Brock. Biología de los microorganismos*, 14a edición. ed. Pearson, Madrid.
- Mancilla-Margalli, N.A., Lopez, M.G., 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliro species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7832–7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Maresca, D., Zotta, T., Mauriello, G., 2018. Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains. *Frontiers in Microbiology* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00157>
- Marín-Flores, M. de los Á., González-Pareles, M. del C., Alonso-Ramírez, M.E., Beltrán-Villa, M., 1993. Circunferencia de Brazo como Indicador de Riesgo de Desnutrición en Preescolares. *Salud Pública de México* 33, 667–672.
- Martínez-Suárez, V., 2015. Uso de Probióticos y Prebióticos en las Fórmulas Infantiles. *Nutrición Hospitalaria* 31, 72–77. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8711>
- Martínez-Torres, J., 2005. Estudio del contenido de azúcares y rendimiento en etanol en dos variedades de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.
- MINTEL, 2017. Nutrition Insight: Infant nutrition (Ingredient focus).
- Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., Ramos-Ramírez, E., 2011. Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la

- cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber AZUL. *BIOAGRO* 23, 199–206.
- Montesinos-Correa, H., 2014. Crecimiento y antropometría: aplicación clínica. *Acta Pediátrica de México* 35, 159–165.
- Moreno-Villares, J.M., 2010. Prebiotics in Infant Formulas: Risks and Benefits, en: *Bioactive Foods in Promoting Health*. Academic Press, pp. 117–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374938-3.00008-6>
- Moreno-Villares, J.M., 2008. Prebióticos en las fórmulas para lactantes. ¿Podemos modificar la respuesta inmune? *Anales de Pediatría* 68, 286–294. <https://doi.org/10.1157/13116712>
- Moreno Villares, J.M., 2008. Prebióticos en las fórmulas para lactantes. ¿Podemos modificar la respuesta inmune? *Anales de Pediatría* 68, 286–294. <https://doi.org/10.1157/13116712>
- Moreno, X., Santamaria, G., Sánchez, R., e la Torre, B., Garcés, F., Hernández, C., Martínez, C., Márquez, A., López, K., 2015. Microbiota gastrointestinal aeróbica en niños con trastorno del espectro autista. Estudio preliminar. *Gen* 69, 36–44.
- Murry, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2020a. Enterobacteraceae, en: *Medical Microbiology*. Elsevier, pp. 257–270.
- Murry, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2020b. Non-spore-Forming Anaerobic Bacteria, en: *Medical Microbiology*. Elsevier, pp. 318–326.
- Murry, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2020c. Clostridium, en: *Medical Microbiology*. Elsevier, pp. 307–317.
- Nieto-sotelo, J., 2017. Panorama del aprovechamiento de los Agaves en México.
- Niu, J., Xu, L., Qian, Y., Sun, Z., Yu, D., Huang, J., Zhou, X., Wang, Y., Zhang, T., Ren, R., Li, Z., Yu, J., Gao, X., 2020. Evolution of the Gut Microbiome in Early Childhood: A Cross-Sectional Study of Chinese Children. *Frontiers in Microbiology* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00439>
- NOM-004-SSA3-2012, 2012. NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.
- NOM-008-SSA2-1993, 1993. NOM-008-SSA2-1993, Control de la nutrición, crecimiento y desarrollo del niño y adolescente. Criterios y procedimientos para



- la prestación del servicio.
- NOM-051-SCFI/SSA1-2010, 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria.
- NOM-092-SSA1-1994, 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Métodos para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-113-SSA1-1994, 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Métodos para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- NOM-131-SSA1-2012, 2012. NORMA Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones.
- NOM-174-SSA1-1998, 1998. NORMA Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998, Para el manejo integral de la obesidad.
- Oliveros-Leal, L., Moreno-Villares, J.M., 2006. Prebióticos en fórmulas infantiles. *Anales de Pediatría* 4, 20–29.
- Olsen, E.M., Wright, C.M., 2012. Failure to Thrive in Infancy: Anthropometric Definitions, en: Preedy, V.R. (Ed.), *Handbook of Anthropometry Physical Measures of Human Form in Health and Disease*. Springer-Verlag New York, pp. 1139–1150. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1788-1>
- Osborne, G., Wu, F., Yang, L., Kelly, D., Hu, J., Li, H., Jasmine, F., Kibriya, M.G., Parvez, F., Shaheen, I., Sarwar, G., Ahmed, A., Eunos, M., Islam, T., Pei, Z., Ahsan, H., Chen, Y., 2020. The association between gut microbiome and anthropometric measurements in Bangladesh. *Gut Microbes* 11, 63–76. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1614394>
- Paineu, D., Respondek, F., Menet, V., Suavage, R., Bornet, F., Wagner, A., 2014. Effects of Short-Chain Fructooligosaccharides on Faecal Bifidobacteria and Specific Immune Response in Formula-Fed Term Infants: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 60, 167–175. <https://doi.org/10.3177/jnsv.60.167>

- Palafox López, M.E., Ledesma Solano, J.Á., 2015. Manual de fórmulas y tablas para la intervención nutricional, Tercera. ed. McGraw-Hill, México, D.F.
- Park, J.P., Oh, T.K., Yun, J.W., 2001. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Process Biochemistry* 37, 471–476. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00237-0)
- Penders, J., Stobberingh, E.E., Brandt, P.A.V. Den, Thijs, C., 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 62, 1223–1236. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01462.x>
- Penders, J., Vink, C., Driessen, C., London, N., Thijs, C., Stobberingh, E.E., 2005. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters* 243, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.052>
- Pérez-Lizaur, A.B., Palacios-González, B., Castro-Becerra, A.L., Flores-Galicia, I., 2014. SMAE: Sistema mexicano de alimentos equivalentes, 4ta ed. Ogali, CDMX.
- Prapulla, S.G., Subhaprada, V., Karanth, N.G., 2000. Microbial Production of Oligosaccharides: A Review, en: Neidleman, S., Laskin, A., Bennett, J., Gadd, G. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*, Volumen 47. Academic Press, pp. 299–337.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, Shaochuan, Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, Shengting, Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, Songgang, Qin, N., Yang, H., Wang, Jian, Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, Jun, 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Reiffová, K., 2014. Analysis of Food Bioactive Oligosaccharides by Thin-Layer

- Chromatography, en: Moreno, F.J., Sanz, L.M. (Eds.), Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 350–369. <https://doi.org/10.1002/9781118817360.ch19>
- Reyman, M., van Houten, M.A., van Baarle, D., Bosch, A.A.T.M., Man, W.H., Chu, M.L.J.N., Arp, K., Watson, R.L., Sanders, E.A.M., Fuentes, S., Bogaert, D., 2019. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nature Communications* 10, 4997. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13014-7>
- Riedel, S., Morse, S.A., Mietzner, T., Miller, S., 2019. Jawetz, Melnic & Adelberg's Medical Microbiology, 28th Editi. ed. McGraw-Hill.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., Mele, M., 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7, 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Ripoll, C., Chappuis, E., Respondek, F., Wagner, A., Gottrand, F., 2015. ScFOS supplemented follow-on formula in healthy infants: Impact on vaccine specific faecal secretory IGA response, faecal bifidobacteria, growth and digestive tolerance. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.03.006>
- Ruiz-Alvarez, B.E., Galvez-Alvarez, N.S., Hernandez-Moedano, A., Carmona-Vargas, G.A., Gonzalez-Avila, M., 2014. A supplement enriched with agave fructans for childhood obesity evaluated in ex vivo system. *Sustainable and Integral Exploitation of Agave* 104–107.
- Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y., Tao, F., 2016. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: A systematic review. *BMC Gastroenterology* 16, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0498-0>
- Sánchez-Martínez, M.J., Soto-Jover, S., Antolinos, V., Martínez-Hernández, G.B., López-Gómez, A., 2020. Manufacturing of Short-Chain Fructooligosaccharides: from Laboratory to Industrial Scale. *Food Engineering Reviews* 12, 149–172. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09209-0>

- Sánchez, O.F., Rodríguez, A.M., Silva, E., Caicedo, L.A., 2010. Sucrose Biotransformation to Fructooligosaccharides by *Aspergillus* sp. N74 Free Cells. *Food and Bioprocess Technology* 3, 662–673. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0121-7>
- Sato, Y., Sakurai, K., Tanabe, H., Kato, T., Nakanishi, Y., Ohno, H., Mori, C., 2019. Maternal gut microbiota is associated with newborn anthropometrics in a sex-specific manner. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 10, 659–666. <https://doi.org/10.1017/S2040174419000138>
- Sebastián Domingo, J.J., Sánchez Sánchez, C., 2017. De la flora intestinal al microbioma. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 110, 51–56. <https://doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>
- Serrano-Cervantes, L., Sermeño-Chicas, J.M., 2012. La nuez maya (*Brosimum alicastrum* Swartz) atacado por *Mallodon dasystomus*. *Bioma* 2, 4–7.
- Serrano-Honeyman, C.A., Leon-Rios, M.A., Harris-Diez, P.R., 2016. Desarrollo de la Microbiota Gastrointestinal en Lactantes y Su Rol en Salud y Enfermedad. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas* 41, 35–43. <https://doi.org/10.11565/arsmed.v41i1.53>
- Shiomi, N., Onodera, S., Chatterton, N.J., Harrison, P.A., 1991. Separation of Fructooligosaccharide Isomers by Anion-exchange Chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 1427–1428. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.55.1427>
- Suverza-Fernández, A., 2010. A: Antropometría y composición corporal, en: Suverza Fernández, A., Haua Navarro, K. (Eds.), *El ABCD de la Evaluación del Estado de Nutrición*. McGraw Hill Mexico, pp. 29–70.
- Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Wolf, B.W., Chow, J., Garleb, K.A., Williams, J.A., Fahey, G.C., 2002. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* Modify Bowel Function and Protein Catabolites Excreted by Healthy Humans. *The Journal of Nutrition* 132, 3042–3050. <https://doi.org/10.1093/jn/131.10.3042>
- Torres, M.F., 1996. *Manual práctico de bacteriología médica*. Editorial Serviprensa C.A., Guatemala.

- Tortora, Gerard, J., Nielsen, M., 2017. Principles of Human Anatomy, 14th Edition, 14th ed. Wiley.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2019. Microbiology: An Introduction, Thirteenth E. ed. Pearson, Boston.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B. a, Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Unión, C. de la, 2020. Ley General de Salud: Reformada El 24 de Enero de 2020. Independently Published.
- van den Elsen, L.W.J., Garssen, J., Burcelin, R., Verhasselt, V., 2019. Shaping the gut microbiota by breastfeeding: The gateway to allergy prevention? *Frontiers in Pediatrics* 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00047>
- Vandenplas, Y., Brunser, O., Szajewska, H., 2009. *Saccharomyces boulardii* in childhood. *European Journal of Pediatrics* 168, 253–265. <https://doi.org/10.1007/s00431-008-0879-7>
- Vandenplas, Y., Carnielli, V.P., Ksiazek, J., Sanchez-Luna, M., Migacheva, N., Mosselmans, J.M., Picaud, J.C., Possner, M., Singhal, A., Wabitsch, M., 2020. Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition* 78, 110812. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110812>
- Vandenplas, Y., De Greef, E., Veereman, G., 2014. Gut Microbes Prebiotics in infant formula Prebiotics in infant formula. *Gut Microbes* 681–687.
- Velázquez-Martínez, J.R., González-Cervantes, R.M., Hernández-Gallegos, M.A., Campos-Mnediola, R., Jiménez-Aparicio, A.R., Arenas-Ocampo, M.L., 2014. Prebiotic Potential of *Agave angustifolia* Haw Fructans with Different Degrees of Polymerization. *Molecules* 19, 12660–12675. <https://doi.org/10.3390/molecules190812660>
- Villegas-Sepúlveda, C.J., 2010. Recolección de la información sobre el estado de nutrición, en: Suverza Fernández, A., Haua Navarro, K. (Eds.), *El ABCD de la Evaluación del Estado de Nutrición*. McGraw Hill Mexico, pp. 15–27.
- Wainwright, L., 2006. Does the addition of prebiotics to infant formula have beneficial

- effects for the baby? *Journal of Neonatal Nursing* 12, 130–137.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnn.2006.05.003>
- World Health Organization, 2008. Training Course on Child Growth Assessment - WHO Child Growth Standards, World Health Organization.
- Yang, I., Corwin, E.J., Brennan, P.A., Jordan, S., Murphy, J.R., Dunlop, A., 2016. The Infant Microbiome: Implications for infant Health and Neurocognitive Development. *Nursing Research* 65, 76–88.  
<https://doi.org/10.1097/NNR.000000000000133>
- Zamudio-Vázquez, V.P., Ramírez-Mayans, J.A., Toro-Monjaraz, E.M., Cervantes-Bustamante, R., Zárate-Mondragón, F., Montijo-Barrios, E., Cadena-León, J.F., Cázares-Méndez, J.M., 2017. Importancia de la microbiota gastrointestinal en pediatría. *Acta Pediatrica de Mexico* 38, 49–62.  
<https://doi.org/10.18233/apm1no1pp49-621323>
- Zavala Olivas, P.S., 2009. Panículos adiposos en la valoración del estado nutricional de preescolares fronterizos. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- Zhuang, L., Chen, H., Zhang, S., Zhuang, J., Li, Q., Feng, Z., 2019. Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 17, 13–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.10.002>
- Zotta, T., Parente, E., Ricciardi, A., 2017. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry. *Journal of Applied Microbiology* 122, 857–869.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13399>

---

## Anexo A.

### *Mediciones antropométricas*

*Masa corporal* – Se coloca al sujeto de pie en el centro de la báscula, sin aplicar algún tipo de apoyo, el sujeto permanece inmóvil y con su peso distribuido equitativamente en ambos pies.

Cuando se trate de menores de 2 años, primero se realizará la medición de la masa de una persona, como se ha descrito. Después se procede a tomar al menor en brazos y se registra la masa de ambos (menor y persona que carga al menor). Calculado la masa del menor por una diferencia entre la segunda masa y la primera masa.



Figura 13. Registro de masa corporal en preescolar (>24 meses).

*Talla, estatura o altura:* Mediante la tracción de la cabeza, colocada en el plano de Frankfort. Para colocar la cabeza en el plano de Frankfort se colocan las puntas de los dedos pulgares en los puntos orbitales y los dedos índices en los puntos tragiones (cuando la cabeza está en el plano de Frankfort no necesita tocar el tallímetro). Una vez colocado plano de Frankfort, se reubican los dedos pulgar e índice posteriormente, hacia las rejas del sujeto y lo suficientemente separados de la mandíbula del sujeto. Asegurando que la tracción hacia arriba se transfiera a la apófisis mastoidea (Esparza-Ros et al., 2019).



Figura 14. Registro de talla en preescolar (>24 meses).

*Pliegue subescapular y tríceps:* El brazo del infante es colocado en posición supina ligeramente girado al lado derecho y paralelo al eje longitudinal y relajado, el antropometrista toma con el dedo índice y pulgar la marca del pliegue (subescapular o tríceps) y colocando las ramas del plicómetro a un centímetro de distancia de la marca para el pliegue del tríceps: un ángulo de  $90^\circ$  de un plano horizontal; o del pliegue subescapular: dos centímetros de distancia un ángulo de  $45^\circ$  del punto subscapulare.. Realizando la lectura dos segundos después de aplicar la presión total del plicómetro para finalmente tomar la lectura (Cárdenas-López et al., 2005; Esparza-Ros et al., 2019).



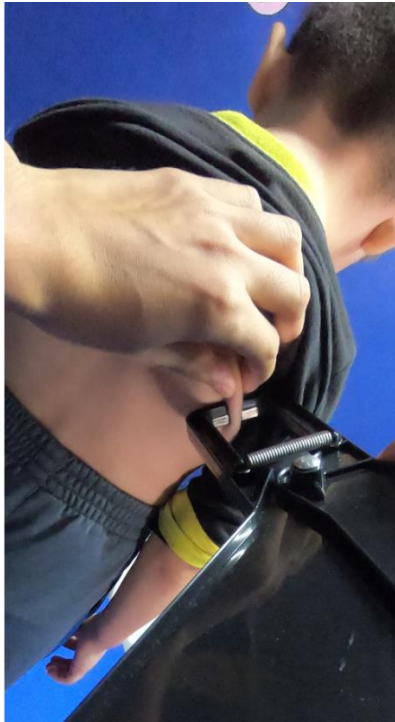


Figura 15. Medición pliegue subescapular.

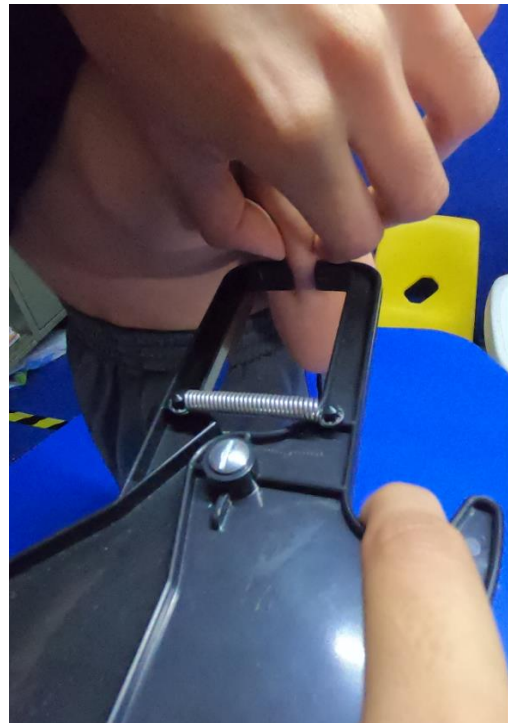


Figura 16. Medición pliegue de tríceps.

*Perímetro de brazo relajado:* Se coloca la cinta de forma que la marca del punto acromiale-radiale medio esté centrada entre las dos partes de la cinta (Esparza-Ros et al., 2019).



Figura 17. Medición de perímetro de brazo relajado (circunferencia media de brazo).

*Longitud:* Se coloca al infante de espaldas en el infantómetro con la cabeza sobre la parte inmóvil y rígida. Se coloca la cabeza de manera que se crea una línea imaginaria vertical desde el canal auditivo hasta el borde inferior de la cuenca del ojo (perpendicular al infantómetro. Los ojos del infante deben mirar siempre hacia arriba; el ayudante se coloca detrás de la cabeza, comprima el cabello con la parte fija y mantenga dicha posición. Los hombros deben tocar el infantómetro y la columna vertebral no debe estar arqueada.

Sujetando las piernas y aplicando una presión suave sobre las rodillas, se coloca la parte móvil de tal forma que la superficie de la planta de los pies esté en un ángulo de 90° respecto de la parte móvil. Registrando la longitud del menor de dos años en centímetros de acuerdo con la escala del infantómetro (World Health Organization, 2008).



Figura 18. Registro de longitud en lactantes (<24 meses).

*Perímetro cefálico:* El infante debe estar con la cabeza libre de objetos y sin contacto con algún objeto suave como la cuna. La cinta se coloca en su perímetro máximo de la cabeza y como referencia se utiliza el hueso frontal, entre las cejas, y la protuberancia occipital posterior del cráneo. Situando la cinta en un plano horizontal,

de tal forma que se encuentren a la misma altura en ambos lados de la cabeza. La marca de cero debe colocar entre las cejas. Ejerciendo una leve presión, al momento de realizar la medición, para comprimir el cabello y la piel, aproximado al 1 mm más cercano (Cárdenas-López et al., 2005).

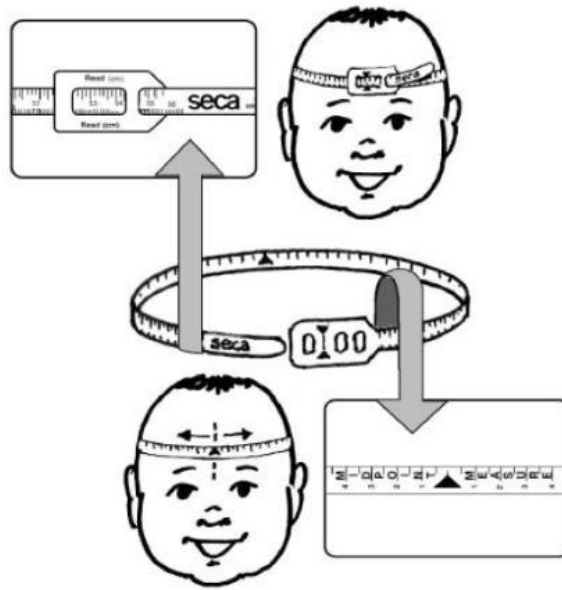


Figura 19. Guía visual de la medición de perímetro cefálico.

---

## Anexo B.

Certificación en técnicas ISAK nivel 1



International Society for the Advancement of Kinanthropometry

*This is to certify that*

**Francisco Humberto Ortiz Salazar**

*has attended an ISAK training course at the  
Zona Nutrición  
Guadalajara, Mexico*

*From 02/08/2019 to 04/08/2019*

*and has met all requirements for accreditation as a*

**Level One Anthropometrist**

**(Technician - Restricted profile)**

*Accreditation valid until  
04/12/2023*

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M.J. Marfell-Jones'.

*Professor M.J. Marfell-Jones  
President ISAK*

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Francisco Esparza-Ros'.

*Professor Francisco Esparza-Ros  
Secretary-General ISAK*



The International Society for the  
Advancement of Kinanthropometry

Certificate #637110358658633605. Printed on 04/12/2019

## Anexo C.

Tríptico entregado a los padres de familia asistentes a las reuniones informativas de participación en el experimento.

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS

- ⇒ 1 año cero meses y cero días a 2 años 11 meses y 30 días.
- ⇒ Historia clínica saludable.
- ⇒ Sin vómitos o diarreas.
- ⇒ Sin alergias (ambientales, alimenticias o animales).
- ⇒ Sin tratamientos médicos o consumo de medicamentos.



L.N. Francisco Ortiz Salazar

Estudiante de posgrado:  
Maestría en Innovación  
Biotecnológica

Centro de Investigación y  
Asistencia en Tecnología y Diseño  
del Estado de Jalisco, A.C.

Dirección CIATEJ Guadalajara:  
Avenida normalistas #800

Teléfono: 099 122 9329

Correo electrónico:  
froitiz\_al@ciatej.edu.mx



### Información para colecta de muestras



Importancia de una microbiota sana desde la niñez

L.N. Francisco Ortiz Salazar





### ¿Qué es la microbiota intestinal?

Es un conjunto de microorganismos residentes en el tracto gastrointestinal, con características de microorganismos beneficiosos, que son efectivos en dosis de  $10^6$  a  $10^9$  unidades formadoras de colonias.

Los probióticos y otros microorganismos se desarrollan en un nicho ecológico es denominado microbiota siendo la del humano una de las más deasamente pobladas, en especial el intestino grueso.

La importancia de la microbiota es por sus beneficios nutricionales e inmunológicos para la transformación de sustancias complejas en otras de fácil absorción por el hospedero.

### ¿CÓMO SE MODIFICA LA MICROBIOTA INTESTINAL?

Se modifica con el tiempo y depende de varios factores que pueden ser desde el nacimiento del ser humano hasta los medioambientales en la vida adulta.

En los primeros meses de la vida la microbiota esta dada por factores externos, como lo es el canal de nacimiento (vía vaginal o por cesárea), la alimentación en el primer año (lactancia exclusiva por 6 meses o fórmula láctea) y la presencia o limitación de alimento. La modificación de la microbiota está dada por las fuentes de alimentación (omnívoros, carnívoros o herbívoros) y la genética familiar.

### ¿CUÁLES ES EL BENEFICIO NUTRICIONAL?

En la actualidad la microbiota es considerada como un "órgano metabólico" ya que se pueden generar productos de degradación como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o el bióxido de carbono ( $CO_2$ ); así como ciertos productos de transformación, formando ácidos grasos de cadena corta (AGCC) [ácido propiónico, butírico y acético] que causan daño a microorganismos patógenos, una fuente de energía para los enterocitos en el intestino junto con una buena absorción de minerales como calcio, hierro y magnesio y la síntesis de vitaminas como la K y del complejo B (B5, B9 y B12).

### PROCESO PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS



**En casa:** Abrir el frasco de boca ancha y tapa rosca, se colocará de tal forma que se ayude a que el niño defeeque por la mañana (antes de ir al kinder) llenado hasta un 50% de la capacidad del frasco, cerrando la tapa y rotulándola con las iniciales del niño, la fecha de la toma de muestra y el sexo del niño. Entregar por la mañana a personal de CIATEJ.



**En kinder:** Se realizarán mediciones antropométricas que consisten en:



- Peso (báscula).
- Estatura acostado (1 año a 2 años) o estatura de pie (2 años en adelante).
- Perímetro cefálico (hasta los 5 años).
- Frecuencia de consumo de alimentos\*.
- Recordatorio de 24 horas\*.

\*Información recopilada por en el kinder mediante entrevista con los papás.

## Anexo D.



### Historia clínico-nutricional



Fecha de registro: \_\_\_\_\_

Código de participante: \_\_\_\_\_

Las siguientes preguntas forman parte de la Historia clínica-nutricional, creada únicamente para la donación de muestras de heces fecales y estudio de la microbiota en niños de 1 a 3 años, en la cual aceptó participar y es dirigida por el LN. Francisco Ortiz (estudiante de posgrado, Maestría en Innovación Biotecnológica en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C [CIATEJ])

#### 1 Datos generales

- 1.1 Nombre del padre o tutor: \_\_\_\_\_
- 1.2 Iniciales del niño donante: \_\_\_\_\_
- 1.3 Sexo del niño donante: (0) Femenino (1) Masculino
- 1.4 Fecha de nacimiento del niño donante: \_\_\_\_\_
- 1.5 Semanas de gestación: \_\_\_\_\_
- 1.6 Masa al nacer (kg): \_\_\_\_\_
- 1.7 Longitud al nacer (cm): \_\_\_\_\_
- 1.8 Vía de parto: (0) Vaginal (1) Cesárea
- 1.9 Lugar de nacimiento del niño donante: (0) Otra ciudad (1) Guadalajara

#### 2 Antecedentes heredo-familiares

2.1 Marque las enfermedades que han tenido los abuelos (paternos y maternos) del niño donantes

Diabetes tipo 1	(0) No (1) Sí	Cáncer (cualquier tipo de cáncer)	(0) No (1) Sí
Diabetes tipo 2	(0) No (1) Sí	Insuficiencia renal	(0) No (1) Sí
Cirrosis hepática	(0) No (1) Sí	Alzheimer	(0) No (1) Sí
Hipertensión	(0) No (1) Sí	Esquizofrenia	(0) No (1) Sí
Enfermedades coronarias	(0) No (1) Sí	Otro (indique)	(3)



## Historia clínico-nutricional



### 3 Antecedentes clínicos

- 3.1 El niño donante ha tenido cirugías previas: (0) No (1) Sí
- 3.2 El niño donante ha tenido previamente tratamientos con medicamentos:  
(0) No (1) Estreñimiento (2) Reflujo
- 3.3 El niño donante ha presentado previamente alguna de las siguientes enfermedades (puede seleccionar más de una)

Alergias	(0) No (1) Sí	Estreñimiento	(0) No (1) Sí
Amigdalitis	(0) No (1) Sí	Faringitis estreptocócica	(0) No (1) Sí
Bronquitis	(0) No (1) Sí	Gastroenteritis vírica	(0) No (1) Sí
Dermatitis atópica	(0) No (1) Sí	Glucocorticoides	(0) No (1) Sí
Diarrea infecciosa	(0) No (1) Sí	Infección urinaria	(0) No (1) Sí
Diarrea no infecciosa	(0) No (1) Sí	Reflujo	(0) No (1) Sí
Enfermedad mano-pie-boca	(0) No (1) Sí	Resfriado común	(0) No (1) Sí

- 3.4 El niño donante a consumido alguno de los medicamentos que se enlistan a continuación (puede seleccionar más de uno)

Analgésicos	(0) No (1) Sí	Antiparasitarios	(0) No (1) Sí
Antihistamínicos	(0) No (1) Sí	Antitusígenos	(0) No (1) Sí
Antibióticos	(0) No (1) Sí	Antiviral	(0) No (1) Sí
Antieméticos	(0) No (1) Sí	Glucocorticoides	(0) No (1) Sí
Antiasmáticos	(0) No (1) Sí	Mucolíticos	(0) No (1) Sí
Antiinflamatorios	(0) No (1) Sí	Medicina alternativa	(0) No (1) Sí



## Historia clínico-nutricional



- 3.5 El niño donante tiene todas las piezas dentales:  
 (0) No (1) Sí (2) En proceso
- 3.6 ¿Cuál es el número de evacuaciones al día del niño donante? \_\_\_\_\_ veces al día
- 3.7 De acuerdo con la imagen de la escala de Bristol, ¿Qué tipo de heces es común en el niño donante? (escriba el número entre paréntesis) \_\_\_\_\_



TIPO 1 (0) Trozos duros separados, que pasan con dificultad.



TIPO 2 (1) Como una salchicha compuesta de fragmentos.



TIPO 3 (2) Con forma de morcilla con grietas en la superficie.



TIPO 4 (3) Como una salchicha o serpiente, lisa y blanda.



TIPO 5 (4) Trozos de masa pastosa con bordes definidos.



TIPO 6 (5) Fragmentos pastosos, con bordes irregulares.



TIPO 7 (6) Acuosa, sin pedazos sólidos, totalmente líquida.

- 3.8 Lactancia materna exclusiva (más de 6 meses): (0) No (1) Sí
- 3.9 Si su respuesta anterior fue *no*, escoja el motivo principal (solo puede escoger uno):

Baja producción de leche	(0) No (1) Sí	Sobredemanda de alimento	(0) No (1) Sí
Ingreso a guardería	(0) No (1) Sí	Incorporación al trabajo	(0) No (1) Sí
Preeclampsia	(0) No (1) Sí	Tratamiento médico de la madre	(0) No (1) Sí
Preferencia por fórmula láctea	(0) No (1) Sí	Trombosis	(0) No (1) Sí
Reflujo	(0) No (1) Sí		





## Historia clínico-nutriológica



3.10 Si su respuesta en la pregunta 3.8 fue *no*, indique con cual de las siguientes fórmulas lácteas alimentó o sigue alimentando al niño donante (pueden ser más de una):

Prematuros	(0) No (1) Sí	Para cardiopatías	(0) No (1) Sí
Hipoalergénica	(0) No (1) Sí	A base de soja	(0) No (1) Sí
Deslactosada	(0) No (1) Sí	De proteína animal	(0) No (1) Sí
Para reflujo	(0) No (1) Sí		

### 4 Sociocultural y dietético

- 4.1 ¿Qué tipo de religión profesa?  
(0) Católica (1) Judía (2) Cristiana (3) Otra
- 4.2 ¿El niño donante tiene hermanos? (0) No (1) Sí
- 4.3 Si su respuesta anterior fue *sí*, ¿cuál es el número de hermanos? \_\_\_\_\_
- 4.4 ¿El niño donante tiene contacto con mascotas en el domicilio?  
(0) No (1) Perro (2) Gato (3) Pez (4) Ave (5) Animales de compañía no convencional
- 4.5 ¿Cuál es el lugar que acostumbra para adquirir sus alimentos?  
(0) Mercado local (1) Tianguis (2) Supermercado
- 4.6 ¿Quién es la persona encargada de preparar los alimentos al niño donante?  
(0) Madre (1) Padre (2) Ambos (3) Abuelos (4) Persona de servicio
- 4.7 ¿El niño donante se puede alimentar por si solo?  
(0) No (1) Sí
- 4.8 ¿Cuál es el número de comidas que hace el niño donante al día?  
(0) 3 (1) 4 (2) 5
- 4.9 ¿El niño donante presenta alguna intolerancia alimenticia congénita?  
(0) No (1) Sí (2) Desconozco
- 4.10 ¿El niño donante presenta alguna alergia alimentaria?  
(0) No (1) Sí (2) Desconozco



## Historia clínico-nutricional



4.11 De los siguientes grupos de alimentos, seleccione los que el niño donante consume con mayor frecuencia o tiene mayor gusto

Verduras	(0) No (1) Sí	Alimentos de origen animal	(0) No (1) Sí
Frutas	(0) No (1) Sí	Leche	(0) No (1) Sí
Cereales y tubérculos	(0) No (1) Sí	Aceites y grasas	(0) No (1) Sí
Leguminosas	(0) No (1) Sí	Azúcares	(0) No (1) Sí

## Anexo E.

Consentimiento informado entregado a los padres o tutores de los donantes

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Guadalajara, Jalisco A: \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

Para procedimiento de obtención de muestras de heces fecales.

Nombre del participante: \_\_\_\_\_

**DECLARO** que he leído y comprendo la información que consta en este documento **DOY MI CONSENTIMIENTO (aprobación)** para participar en el estudio denominado: “**EVALUACIÓN EN SIMULADOR DE TRACTO DIGESTIVO DE FÓRMULA PREBIÓTICA ADICIONADA CON FOS DE AGAVE FOURCROYDES PARA LACTANTES**” y con motivo de ello doy mi consentimiento para **DONAR** al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), de forma gratuita las muestras de heces que me sean requeridas, en las condiciones que me indiquen y con los procedimientos que el estudio requiere, los cuales me serán informados en tiempo y forma. Así mismo me serán entregados los materiales necesarios para la recolección de muestras. El proyecto de investigación corresponde al tipo: a) investigación con riesgo mínimo.

**EN VIRTUD DE LO CUAL YO ENTIENDO QUE:**

#### I. La justificación y los objetivos de la investigación son:

La microbiota intestinal es un conjunto de microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal y que se mantiene un equilibrio entre los microorganismos probióticos (benéficos) y los no deseados; siendo nombrado como microbiota al nicho en donde se desarrollan dichos microorganismos, siendo la del humano una de las más densamente pobladas. Se ha demostrado que la microbiota en humanos esta relacionada con el canal de nacimiento (vía vaginal o cesárea) como uno de las principales factores en el desarrollo inmunológico; así mismo la edad, el género, la alimentación, los estilos de vida y actividad física, la zona geográfica e inclusive la herencia genética son factores que a lo largo de la vida modifican la microbiota en cada persona. Entre los beneficios de una microbiota con mayor presencia de probióticos se encuentra la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que limitan el crecimiento de microorganismos patógenos y funcionando como recuperador de iones (calcio, hierro y magnesio); al mismo tiempo se favorece el la síntesis de vitaminas como vitamina K y del complejo B (ácido pantoténico, ácido fólico y cobalamina) esenciales en el desarrollo del niño sano. Por ello, al no conocer ampliamente la microbiota de niños sanos de la ciudad de Guadalajara, Jalisco; en este trabajo se planea identificar la relación que existe entre la diversidad de la microbiota tanto en medidas antropométricas como en el consumo de la frecuencia de alimentos.

Por lo tanto, el objetivo que se pretende alcanzar con esta investigación es: Evaluar una fórmula láctea estándar adicionada con FOS de *Agave fourcroydes* en un

simulador de tracto digestivo, favoreciendo el desarrollo de probióticos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de microbiota nativa de lactantes de 1 a 3 años.

## **II. Los procedimientos a usarse y su propósito:**

- La participación del paciente en este proyecto es totalmente voluntaria y consiste en la donación de las muestras de heces que me sean requeridas.
- Una vez obtenidas las muestras de heces estas deben ser trasladadas en frío al Laboratorio de Digestión *ex vivo* de CIATEJ ubicado en Av. Normalistas 800 Col. Colinas de la Normal en Guadalajara e iniciar los procedimientos para el análisis de microbiota intestinal y su conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  para los posteriores análisis correspondientes. Los restos de las muestras de heces serán desechados de acuerdo con lo que señala la norma oficial mexicana NOM 087-SEMARNAT-SSA1-2002 normatividad para el manejo de residuos biológicos.

## **III. Las molestias o los riesgos esperados:**

- La investigación que se practicará en y con las muestras de heces no conlleva complicaciones y/o efectos secundarios

## **IV. Los beneficios que se pueden observar:**

- Los beneficios que se obtendrán con este estudio son: una evaluación del estado nutricional (percentiles de crecimiento) y dietético, orientación nutricional, así como los resultados de un análisis de microbiota intestinal.

## **VIII. La seguridad de que no se identificará al participante y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada a su privacidad:**

- El protocolo de investigación se llevará a cabo respetando siempre el derecho a la intimidad y dignidad del paciente, así como la confidencialidad de los datos personales sensibles que se lleguen a recabar relacionados con el estado de salud y no podrán ser usados con fines discriminatorios ni en perjuicio, tampoco podrá facilitarse el acceso de las muestras a otras personas que no formen parte de la investigación. No será aplicable lo anterior cuando el tratamiento de la información sea con fines históricos, estadísticos y/o científicos en cuyo caso no habrá una asociación con los datos personales, evitando así se pueda identificar al paciente, asimismo autorizo la publicación científica de dichos resultados obtenidos de este estudio.

**XI. Que existan gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.**

- Los estudios realizados en la investigación serán cubiertos con el presupuesto aprobado para esta investigación, pero no así los procedimientos para la devolución y entrega de las muestras de heces en el caso de que lo solicite.

Habiendo comprendido lo anterior y una vez que se aclararon todas mis dudas que surgieron con respecto a la participación en este proyecto, acepto participar con la donación de muestra de heces en el estudio titulado:

**“EVALUACIÓN EN SIMULADOR DE TRACTO DIGESTIVO DE FÓRMULA PREBIÓTICA ADICIONADA CON FOS DE AGAVE FOURCROYDES PARA LACTANTES”**

Nombre y Firma del participante

Nombre y firma del testigo 1

Nombre y firma del testigo 2

## Anexo F.

Memoria de congreso SMBB – 2019 “Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C”. (III08 / Vol. 2-23-2019-ISSN0188-4786).



### EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIÓTICO DE LOS JARABES DE AGAVE MEZCALERO Y HENEQUENERO SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE *SACCHAROMYCES BOULARDII*.

Francisco H. Ortiz Salazar<sup>1</sup>, Mariela García Aguilar<sup>2</sup>, Inés Granados Alegria<sup>1</sup>, Tania González Flores<sup>1</sup>, Areli Flores Morales<sup>2</sup>, Ma. Teresa Pulido Salas<sup>3</sup>, B. Marina Vera Ku<sup>4</sup>, Ariel Vázquez Elorza<sup>5</sup> y Ángeles Sánchez Contreras<sup>1\*</sup>.  
 1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Sede Sureste, Parque Científico Tecnológico de Yucatán, Km 5.5 Sierra Papacal-Chuburná Puerto C.P. 97302, Mérida, Yucatán. 2. Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala-Tecnológico Nacional de México. 3. Banco de Germoplasma, Centro de Investigación Científica de Yucatán. 4. Cátedras CONACYT Banco de Germoplasma CICY, 5. Miembro del Laboratorio de Prospección CONACYT- CIATEJ PROTEAA, \*e-mail: msanchez@ciatej.mx  
 Palabras clave: Agaves, oligosacáridos, *Saccharomyces boulardii*.

**Introducción.** Durante el metabolismo del ácido crasuláceo, las variedades de agave generan productos fotosintéticos en tallos y hojas de función osmorreguladora y almacenaje llamados fructooligosacáridos (FOS) con función prebiótica (1). La degradación selectiva de FOS está asociada a microorganismos probióticos, que incrementan su población, se obtienen productos transformados como ácidos grasos de cadena corta, favoreciendo la salud humana e inhibiendo el crecimiento de patógenos. La presencia FOS se relaciona con el origen del cultivo (2, 3). El objetivo del trabajo fue evaluar fisicoquímicamente e identificar los azúcares presentes y actividad antioxidante de jarabes obtenidos de hojas de agave para fibra y para licor: *Agave fourcroydes* Lem. variedad Sac Ki accesión SK-3 (HSK) y *Agave aff. angustifolia* Haw. Telecruz accesión 04397 (HAS) y su aplicación como fuente de carbono para microorganismos probióticos como *Saccharomyces boulardii*.

**Metodología.** Los materiales vegetales se obtuvieron de la colección de agaves del Banco de Germoplasma de Yucatán, del CICY (PCTY) con 7.5 años. La cepa *Saccharomyces boulardii* se adquirió de forma comercial (Florati<sup>®</sup>). Se realizaron análisis proximales a las hojas de agaves según la metodología de la AOAC. Los jarabes se obtuvieron por duplicado, con relación sólido-agua (1:6) y 60°C. El fraccionamiento de peso molecular se realizó por filtración (3 y 10 kDa). Se cuantificaron azúcares (YSI y DNS), fenoles totales (Folin-Ciocalteu) y capacidad antioxidante (DPPH). Evaluando el contenido de FOS por HPTLC y cinética de crecimiento de *S. boulardii* por densidad óptica en lector de placas BiotekELx808.

**Resultados.** En la fig. 1 se muestra la presencia de FOS en dos cortes moleculares, en la fig. 2 se muestra la cinética de crecimiento de *S. boulardii* en los jarabes de agaves en los dos cortes moleculares. En la tabla 1 se reporta la presencia de hidratos de carbono de interés y su actividad antioxidante como porcentaje de inhibición y equivalentes de trolox.

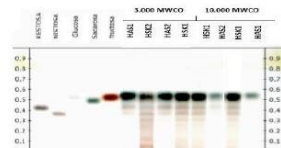


Fig. 1. Cromatografía por HPTLC de jarabes de hoja de accesión SK-3 (HSK) y accesión 04397 (HAS) de 3 y 10 kDa peso molecular.

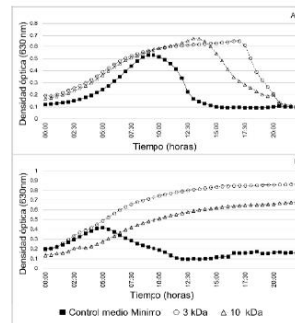


Fig. 2. Cinética de crecimiento de *S. boulardii* con los jarabes de A) Agave mezcalero accesión 04397 (HAS). B) agave henequenero accesión SK-3 (HSK), como fuentes de carbono y en medio mínimo.

Tabla 1. Hidratos de carbono de interés y actividad antioxidante.

		HSK	HAS
YSI	Sacarosa	1.39±0.26	0.00± 0
	Glucosa	0.927±0.75	2.16±0.09
DNS	Azúcares reductores	0.54±0.02	0.49±0.01
DPPH	Polifenol total mgEQ*	0.80± 0.15	0.97± 0.3
	Inhibición %	12.44 ± 0.3	39.2± 1.0
	Equivalentes trolox mg	0.25±0.01	0.72±0.4

\*mg EQ: miligramos equivalentes de quercetina

**Conclusiones.** Las hojas de los agaves henequeneros pueden ser utilizados como fuente de FOS prolongando hasta por 20h la supervivencia *Saccharomyces boulardii*, en comparación con las hojas de agave mezcalero que prolongan hasta 12h, ambos pueden ser aprovechados por microorganismos benéficos como *S. boulardii*.

**Agradecimientos.** A CONACYT por el financiamiento al proyecto Problemas Nacionales PN-1406-2015 y por la beca para estudios de maestría para Francisco Ortiz.

#### Bibliografía.

- Wang, N., y Nobel, P. S. (1998). Phloem Transport of Fructans in the Crassulacean Acid Metabolism Species *Agave deserti*. *Plant Physiol*, 116(2), 709–714
- Beltrán de Heredia, M. R. (2017). Microbiota autóctona. *Farmacía*, 31(2), 17–21.
- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev Gastroenterol Mex*, 4(78), 240–248.



Sociedad Mexicana de  
Biotecnología y Bioingeniería

## Anexo G.

### Carta solicitud colaboración de trabajo



Guadalajara, Jalisco, a 30 de octubre de 2019.

**LEP. Paulina Fabiola Barajas Venegas**  
**Directora de la Guardería y Kinder "Paulo Freire"**  
**PRESENTE**

Por medio de la presente me dirijo a usted con el objetivo de solicitar su apoyo para llevar a cabo una investigación científica.

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ) es un Centro Público de Investigación del CONACYT que impulsa el desarrollo sostenible del país mediante la generación de conocimiento de vanguardia y aplicación innovadora de la ciencia y tecnología. Nuestras actividades de investigación se centran en aportar conocimientos científicos en favor de la sociedad, formar recursos humanos de alto nivel y apoyar al sector productivo en sus necesidades técnicas.

En este sentido, en el Laboratorio de Digestión del CIATEJ se llevan a cabo varios proyectos de investigación relacionados a la salud digestiva. Uno de los objetivos de este Lab. es contar con un *Banco de Microbiota de mexicanos* de todas las edades sanos y no sanos, incluidos lactantes e infantes. Debido a esto, el alumno de Maestría Francisco Humberto Ortiz Salazar se ha dado a la tarea de recolectar muestras de heces fecales de niños de la institución que usted representa, con la finalidad de obtener esta microbiota.

No dude en ponerse en contacto con nosotros para cualquier duda, aclaración, sugerencia.

Gracias por la atención a la presente

Atentamente

**Dra. Marisela González Ávila**  
Responsable del Laboratorio de Digestión  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Tel: +52 (33) 33455200, ext. 1312  
e-mail: mgavila@ciatej.mx

---

## Anexo H.

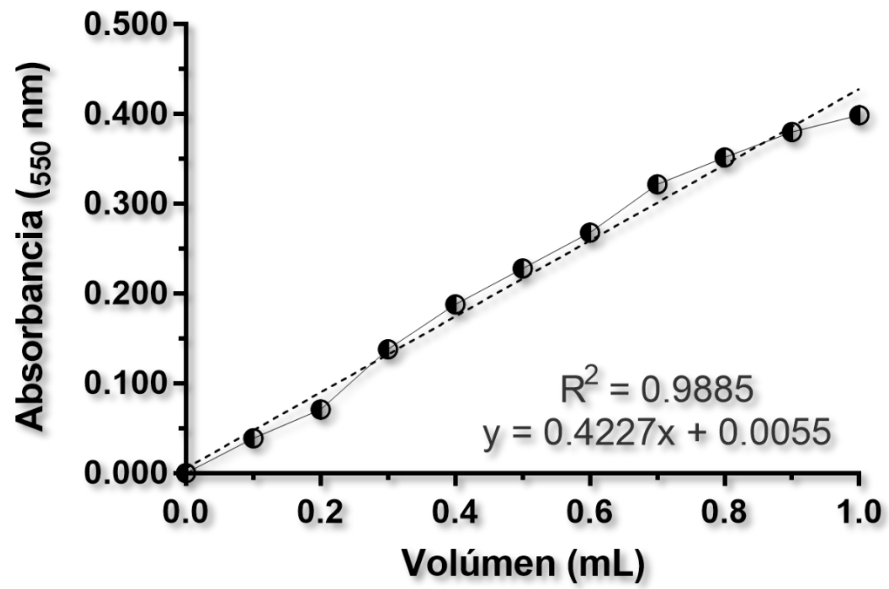


Figura 20. Curva de calibración para cuantificar azúcares por método DNS