



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesinas de Grado

Moreira, Natalia Soledad

Estudio in vitro de la potencialidad de polisacáridos para ser utilizados en alimentos funcionales

2024

Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – No comercial – Compartir igual 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Moreira, N. S. (2024). *Estudio in vitro de la potencialidad de polisacáridos para ser utilizados en alimentos funcionales* [Trabajo Final de Grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche].

<https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/2954>



Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Licenciatura en Bioquímica

Trabajo Final:

**“ESTUDIO *in vitro* DE LA POTENCIALIDAD DE POLISACARIDOS PARA
SER UTILIZADOS EN ALIMENTOS FUNCIONALES”**

Alumna: Moreira, Natalia Soledad

Directora: Dra. Medrano, Micaela

Tutor: Bioq. Simonelli, Nicolas

Fecha de entrega: 17/4/24

ÍNDICE:

1. Resumen.....	4
2. Marco Teórico e importancia del tema	5
2.1 Polisacáridos no digeribles, microbiota intestinal y salud.....	5
2.2 Productos de fermentación bacteriana en el colon.....	6
2.3 Importancia del ácido butírico.....	8
2.4 Disbiosis.....	9
2.5 Alimentos funcionales como alternativa para la modulación de la microbiota.....	9
2.6 Intervenciones Dietarias Personalizadas	11
3. Objetivos	11
4. Materiales y métodos.....	12
4.1 Caracterización estructural de los polisacáridos mediante espectroscopía de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	12
4.2 Utilización de los polisacáridos por bacterias probióticas.....	14
4.3 Reclutamiento y selección de donantes para posterior inclusión al ensayo experimental..	17
4.4 Análisis de ácidos orgánicos presentes en la materia fecal de los donantes incluidos en el estudio	17
4.5 Ensayos de fermentación <i>in vitro</i> de los polisacáridos.....	18
5. Resultados y discusión.....	20
5.1 Caracterización estructural de los polisacáridos mediante ATR-FTIR.....	20
5.2 Evaluación de la capacidad de los polisacáridos para ser fermentados por una cepa probiótica comercial (<i>Lacticaseibacillus casei</i> 01).....	24
5.4 Relevamiento de donantes y análisis de encuesta.....	27
5.4 Selección de donantes para la inclusión en el estudio y evaluación del perfil de ácidos orgánicos en materia fecal inicial.....	29
5.5 Fermentación <i>in vitro</i> de los polisacáridos.....	33
5.5.1 Análisis de la producción de ácido butírico por la microbiota intestinal perteneciente a los individuos sin patologías.....	33
5.5.2 Análisis de la producción de ácido butírico por la microbiota intestinal perteneciente a los individuos con pólipos o adenomas.....	35
5.5.3 Análisis de la producción de ácido butírico por la microbiota intestinal perteneciente a los individuos con colitis ulcerosa diagnosticada y con sospecha.....	37
5.6 Producción de ácidos grasos de cadena ramificada <i>in vitro</i>	39
6. Conclusiones	45
7. Perspectivas.....	46
8. Fuente de información y referencias bibliográficas	47
9. Material anexo.....	52

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la Universidad Nacional Arturo Jauretche por permitirme convertir en esta profesional que siempre desee, poder sentar las bases de lo que hoy me apasiona y por compartir este camino con tan buenos profesores que te hacen sentir una colega más y eso es tan gratificante que te da ganas y fuerzas para seguir.

Toda esta etapa no fue fácil, hubieron altas y bajas, frustraciones y alegrías pero sin el apoyo y las palabras de aliento de mucha gente de mi alrededor no hubiera logrado llegar a esta instancia, así que este es el momento para agradecer a todos y todas los que me acompañaron, a los que pasaron por mi vida y quizás hoy no están pero marcaron un rumbo.

Primeramente agradecer a mi familia: a mi hermana, mi sobrina y mi pareja que fueron mis pilares aguantando noches de desvelo, suspensiones de salidas y muchas cosas más que no llegaría a enumerar todas y de seguro me quedo corta, gracias Rosa, Vanina y Jorge...gracias por siempre estar en cada uno de mis proyectos y en especial a mi compañero que sin su aguante estos años de carrera hubiera sido más difícil, así que gracias Jor, gracias por acompañar este proceso hasta el final, sé que no fue fácil pero esto como siempre te digo es para los dos.

Agradezco a mis amigas y amigos, aquellos que me ayudaron a tomar la decisión de inscribirme en la carrera y aquellos que la universidad me dió y de la cual algunos se convirtieron en familia. Si tuviera que dar nombres serían tantos y todos tienen un lugar especial para mí pero a riesgo de sentirme en falta con algunos no quiero dejar de agradecer especialmente a mis grandes amigas Angie, Coni, Meli, Male, Aye, Gise, Juli, Lili, Mica, Sabri, Estefi, gracias por estar, gracias por aguantarme y por celebrar conmigo cada etapa, así como apoyar cada vez que fue mal; por estar atentas a cada examen, por motivarme a no dejarme caer y principalmente por recordarme siempre a valorar todo el esfuerzo que vengo haciendo, así que gracias por todo lo bueno.

También necesito expresar mi gran agradecimiento a mi tutor Simonelli Nicolas, por su gran ayuda en enseñarme nuevos métodos de análisis y darme consejos para mejorar mi tesis y gracias a Rivero Sandra por capacitarme en el uso del FTIR y ayudarnos con la interpretación de los espectros. Y principalmente a mi directora Medrano Micaela, porque ella vio algo en mí en un momento que no yo ví y fue un placer que me haya elegido y se haya ofrecido para hacer mi tesis con ella: Gracias Micaela por abrirme a un mundo nuevo de la investigación, por brindarme y abrirme las puertas al CIDCA y gracias a cada una de las personas de ese lugar que me recibieron como una colega más. Gracias por formarme, por enseñarme cosas nuevas, por recordarme lo mucho que me gustaba el área de alimentos. Sin tu dedicación y esfuerzo tampoco hubiera logrado cumplir con los plazos y llegar correctamente, así que gracias infinitas.

Por último, una mención especial a una gran profesora que hasta el día de hoy sigue mis pasos y fue muy crucial en un momento muy importante de la carrera, ella es Ana Valino. Ana sin tu compromiso con tus alumnos, sin tu amor por la enseñanza y sin tu gran ayuda por explicarnos hasta que entendamos (por más que sea mil veces) no hubiera llegado donde llegue y que gracias a tu empatía y cariño pude lograr que te sientas orgullosa con mi “gran final de cursada” y mucho de eso es mérito tuyo también, porque “No nos dejaste vencer ni aún vencidas” (como dice el dicho), lograste hacernos amar Orgánica como no la hubiéramos pensado antes, y lograste transmitirnos ese mismo amor que tenés en tu profesión a nuestra carrera. Así que gracias Ana espero que en un futuro nos volvamos a cruzar!

Para finalizar, gracias a cada una de las personas que no he nombrado pero sí son importantes y que han apoyado en esta gran meta, que acompañan mis logros y progresos que hoy día me permiten crecer profesionalmente y seguir avanzando siempre mejorando.

*“La educación no cambia al mundo, cambia a las personas que van a cambiar al mundo”
Paulo Freire*

1) RESUMEN

En este trabajo se evaluaron las características estructurales de polisacáridos aislados a partir de subproductos de la industria alimentaria. Mediante espectroscopía FTIR se comprobó que los polímeros coinciden con lo descrito en bibliografía y, por lo tanto, podemos concluir que se pueden obtener polisacáridos con un grado de pureza aceptable mediante metodologías relativamente sencillas y amigables con el ambiente.

Por otro lado, se evaluó la capacidad de los polisacáridos para ser utilizados como fuente de carbohidratos por una cepa probiótica comercial de *Lactocaseibacillus casei* 01 de la compañía ChHansen, se encontró que el kefiran permite el desarrollo de los microorganismos de un modo similar al medio con glucosa, por tanto, se podría postular que este polisacárido podría ser adecuado para un synbiótico sinérgico. Además, en el medio con dextranos no se observó un crecimiento de los microorganismos dado que se mantuvieron en un número similar al medio sin azúcar y diferente estadísticamente del medio con glucosa por lo que indicaría que *Lactocaseibacillus casei* 01 no es capaces de fermentar este polisacárido, por lo tanto, tendría potencialidad para ser utilizado en un synbiótico complementario.

Adicionalmente se evaluó *in vitro* la fermentación de los polisacáridos por las bacterias intestinales de 8 donantes seleccionados, en cuanto a la producción de butirato y en cuanto a la producción de ácidos grasos de cadena ramificada (ácidos isobutírico e isovalerico). Respecto a estos resultados, en el caso de la producción de butirato como producto de fermentación, se pudo observar que la microbiota perteneciente al control (sin patologías) responde frente a los dextranos, pero esto no se repite para los individuos que presentan pólipos intestinales, ni para los individuos que padecen colitis ulcerosa. Con respecto a la producción de ácidos ramificados, se pudo observar que el kefiran fue el polisacárido con el cual se produjo mayor cantidad de ácido isobutírico e isovalerico en la mayoría de los casos. Además, se observaron diferencias entre individuos en cuanto a la producción de estos ácidos ramificados.

Los resultados alcanzados luego del cumplimiento de los objetivos de este trabajo final constituyen un aporte a la comprensión de la respuesta individual de la microbiota intestinal frente a un estímulo dietario. La inclusión de donantes de muestras de materia fecal con patologías intestinales de origen inflamatorio es relevante para comparación de la respuesta entre individuos con y sin patologías frente a la administración de un prebiótico.

Las actividades presentadas en este trabajo final están enmarcadas en una beca de entrenamiento (BIEI UNAJ 2023) y en un proyecto de investigación (UNAJ-Investiga 2020).

2) MARCO TEÓRICO

Polisacáridos no digeribles, microbiota intestinal y salud

Dentro de la amplia variedad de polisacáridos que los humanos incorporamos en la dieta, algunos presentan uniones glicosídicas que no pueden ser degradadas por las enzimas presentes en nuestro tracto gastrointestinal. De este modo, estos polisacáridos llegan al colon, donde son utilizados como sustrato para la gran población de microorganismos residente (Gibson *et al.*, 2017), a la que se denomina **microbiota intestinal**. Este es un gran reservorio de microorganismos con células que superan en número a las células del hospedador por un factor de 10 y genes microbianos que superan a los genes del hospedador en más de 100 veces. Estos microorganismos incluyen bacterias, hongos, arqueas, protozoos, virus y algunos eucariotas, que colonizan el tracto digestivo después del nacimiento (Bull y Plummer, 2014; Zamora *et al.*, 2019). El estado de una microbiota en equilibrio se denomina “*eubiosis*”, mientras que un estado de desequilibrio se denomina “*disbiosis*” (Iebba *et al.*, 2016). Entre las funciones esenciales de la microbiota intestinal se encuentra la producción de ácidos grasos de cadena corta o SCFA (del inglés *Short Chain Fatty Acids*), los cuales tienen efecto a nivel local y sistémico; otras de las funciones importantes de la microbiota es la protección frente a microorganismos patógenos, ya que contribuye a mantener la barrera de la mucosa intestinal; adicionalmente, fortalece la inmunidad del hospedador al participar en la modulación del sistema inmunológico (Bull y Plummer, 2014). Otras funciones están relacionadas con el metabolismo: ciertos microorganismos presentes en una microbiota saludable contribuyen en la biosíntesis de ciertas vitaminas como la vitamina K y la vitamina B12 (Vyas y Ranganathan, 2012), participan en la biotransformación de los ácidos biliares y permiten la digestión de carbohidratos no digeribles como polisacáridos (almidones resistentes, hemicelulosa, pectinas, gomas y otros), oligosacáridos no digeridos y mucinas derivadas del hospedador (Koropatkin *et al.*, 2012). Estas funciones se resumen en la Figura 1.

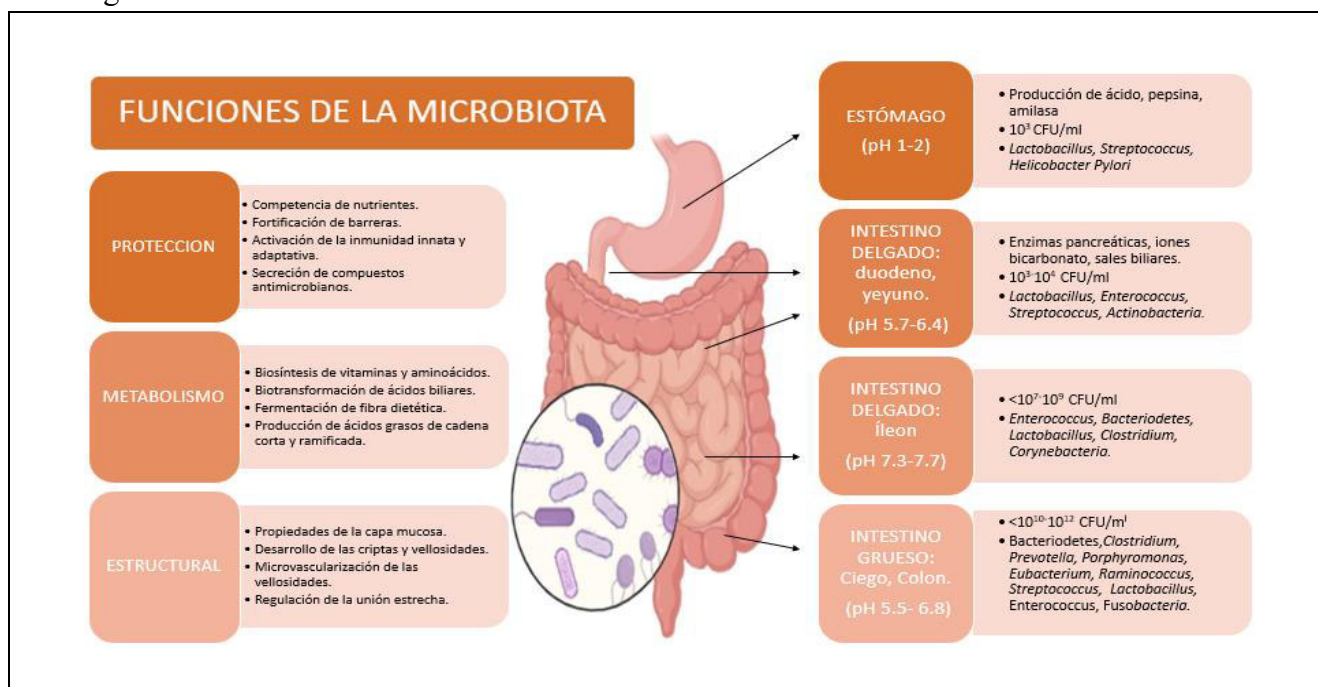


Figura 1: Distribución de la microbiota intestinal normal en diferentes partes del sistema digestivo y sus actividades funcionales (Imagen adaptada de Adak y Khan, 2019).

Los niveles altos de consumo de polisacáridos no digeribles son comunes en muchas dietas. Estos carbohidratos complejos son mayormente de origen vegetal, aunque los polisacáridos sintetizados por hongos, bacterias y algas pueden ser también frecuentes en ciertas dietas, y al ser en su mayoría no digeribles, pueden ser incluidos en la categoría de “fibra”. La fibra generalmente se clasifica según su solubilidad y fermentabilidad, aunque también existen clasificaciones que tienen en cuenta su estructura, viscosidad y fuente de alimento. La fibra soluble como el almidón resistente se disuelve en agua y la microbiota puede fermentarla en el colon para generar ácidos grasos de cadena corta; la fibra insoluble no se disuelve y añade volumen a las heces y es menos probable que se fermente.

Las dietas ricas en fibra se han asociado con la buena salud y con una reducción de la mortalidad así como con una mayor diversidad de microorganismos en la microbiota en los seres humanos (Reynolds *et al.*, 2019). Por el contrario, se ha demostrado que las dietas bajas en fibra tienen efectos nocivos sobre la microbiota porque conducen a una reducción progresiva e irreversible de la diversidad microbiana (Perler *et al.*, 2023; Sonnenburg *et al.*, 2016), así como también disminuyen la producción de ácidos grasos de cadena corta SCFA (Sonnenburg y Sonnenburg, 2014). Durante el último siglo, la ingesta de fibra por parte de los seres humanos en las comunidades industrializadas ha disminuido sustancialmente en comparación con comunidades de poblaciones rurales, que consumen dietas tradicionales ricas en fibra (Kolodziejczyk *et al.*, 2021; Sonnenburg *et al.*, 2019). En el caso de los países de ingresos altos, donde la alergia, la diabetes tipo 1, la enfermedad inflamatoria intestinal y las enfermedades autoinmunes han aumentado constantemente en los últimos 60 años, se observa una correlación directa con la disminución en el consumo de fibra (Thorburn *et al.*, 2014).

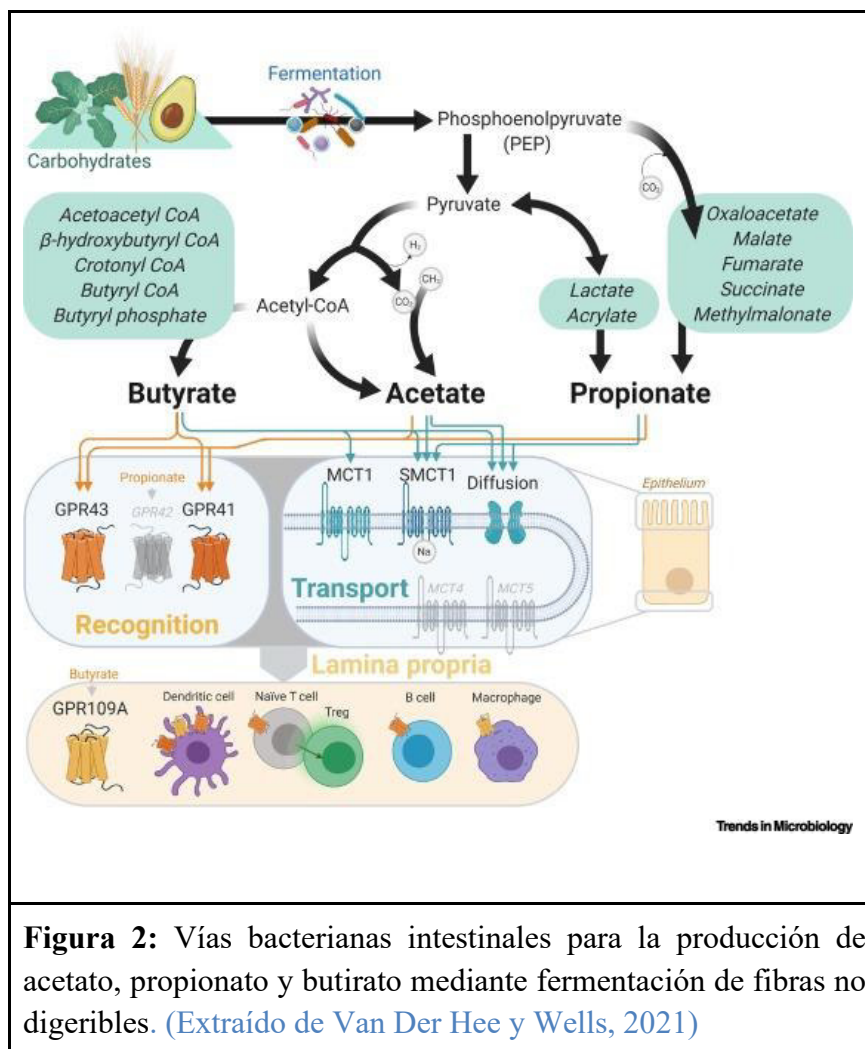
Teniendo en cuenta entonces que el consumo de fibra se asocia con la buena salud a través del mantenimiento de la diversidad de la microbiota intestinal y la producción de SCFA, y al mismo tiempo con la disminución de la incidencia de ciertas patologías como enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y diversos tipos de cáncer (Reynolds *et al.*, 2019), resulta relevante estudiar el efecto que tienen ciertas fibras componentes de la dieta en la microbiota intestinal humana.

Productos de fermentación bacteriana en el colon

Los macronutrientes no digeridos (lípidos, hidratos de carbono y proteínas) y fibras dietéticas complejas que alcanzan el colon, se someten a fermentación bacteriana y catabolismo, lo que resulta en la producción de metabolitos como los SCFA. Aunque el colon es el principal lugar de esta fermentación, la microbiota de otros sitios, como el intestino delgado (principalmente lactobacilos y estreptococos), contribuyen al metabolismo de macronutrientes provenientes de la alimentación y a la consecuente absorción de nutrientes (Hosseinkhani *et al.*, 2021; Mowat *et al.*, 2014).

La microbiota comensal también tiene un efecto trófico, regulando la proliferación de las células epiteliales y el mantenimiento de las uniones intercelulares estrechas y, de este modo, contribuye a fortalecer la función del epitelio como barrera física frente a la entrada de agentes exógenos (Soderholm y Pedicord, 2019). Este efecto es ejercido a través de la producción de **ácidos grasos de cadena corta (SCFA)**. Estos contienen de 2 a 6 átomos de carbono, y son ejemplo de ellos: el ácido acético, propiónico y butírico, o acetato, butirato y propionato (en sus formas protonadas); los SCFA se forman a partir de la digestión de carbohidratos complejos por parte de las bacterias del colon (Zhang *et al.*, 2015).

Estos SCFA son aprovechados por el epitelio intestinal como sustrato energético para mantener su integridad y función. Destacando en este sentido el ácido butírico, por ser el principal metabolito energético utilizado por los colonocitos (Manrique y González Sánchez, 2017). La mayoría de los SCFA (hasta el 95 %) son absorbidos rápidamente por los colonocitos, lo que resulta en una disminución de las concentraciones desde el colon proximal hasta el distal. En general, los ácidos grasos de cadena corta mantienen una proporción 2:1:1 (acético: propiónico: butírico), y si los valores se encuentran dentro de parámetros normales, se consideran indicadores de buena salud intestinal (Topping y Clifton, 2001). En la Figura 2 se sintetizan las vías metabólicas que generan estos ácidos a partir de la fermentación de carbohidratos, por todo el conjunto de bacterias intestinales.



Por otro lado, los **ácidos grasos de cadena ramificada BCFA** (del inglés *Branched-Chain Fatty Acids*) son una clase de ácidos grasos, en su mayoría saturados con una o más ramas de metilo, en su mayoría ubicados cerca del grupo metilo terminal. Se sintetizan en las glándulas sebáceas y son componentes del sebo; la grasa de vacuno y láctea contienen aproximadamente un 2% de BCFA (Liu *et al.*, 2017), por lo que recientemente han sido reconocidos como componentes dietéticos bioactivos comúnmente consumidos por los seres humanos. Además, los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, que resultan del fraccionamiento de las proteínas, pueden ser transformados por la microbiota intestinal en ácidos grasos ramificados (isobutírico, isovalerato y 2-metil butirato,

respectivamente), los cuales representan aproximadamente un 5% del total de ácidos grasos (SCFA y BCFA) en heces (Verbeke *et al.*, 2015). Los BCFA, por tanto, son el resultado de la degradación bacteriana de las proteínas y la fermentación de aminoácidos de cadena ramificada, y esto genera un debate importante dado que se sabe muy poco sobre el papel que desempeña la fermentación proteolítica por parte de la microbiota intestinal en la salud y el metabolismo del hospedador.

Hasta el momento no hay consenso en la comunidad científica sobre el papel de los BCFA producidos *in situ* en la salud intestinal ni sistémica. Por un lado, algunos autores consideran que su efecto es **positivo**, ya que se demostró que actúan como reguladores de la absorción colónica de sodio (Blachier *et al.*, 2007) o tienen un efecto anticancerígeno (Ran-Ressler *et al.*, 2011; Taormina *et al.*, 2020), o que mejoran la sensibilidad a la insulina en individuos con metabolismo alterado (Heimann *et al.*, 2016). Por otro lado, dentro de los trabajos que consideran que los BCFA tienen un efecto **negativo** se pueden mencionar estudios *in vitro* que sugieren un efecto en la generación de úlceras (Sakurazawa y Ohkusa, 2005), otros donde se encontró que su incremento en materia fecal podría relacionarse con obesidad (Lange *et al.*, 2023), hiperplasia prostática benigna (Ratajczak *et al.*, 2021) o que son marcadores fecales de fermentación proteica asociados a la presencia de productos perjudiciales (Kim *et al.*, 2003; Verbeke *et al.*, 2015). En general, se reconoce que los BCFA en materia fecal se ven reducidos luego del consumo de prebióticos (Alles *et al.*, 1997; Mäkeläinen *et al.*, 2007; Marzorati *et al.*, 2023; Rios-Covian *et al.*, 2020; Swanson *et al.*, 2002); por el contrario, se incrementan luego de dietas ricas en proteínas (Aguirre *et al.*, 2016). En ausencia de un consenso, las concentraciones fecales de BCFA se consideran sólo como marcadores de la fermentación de proteínas bacterianas en lugar de marcadores de la salud del colon (Kim *et al.*, 2013; Verbeke *et al.*, 2015). Se necesitan más estudios para comprender la relación existente entre la presencia de estos BCFA y la salud del hospedador, así como identificar las poblaciones bacterianas responsables de su síntesis (Rios-Covian *et al.*, 2020).

Importancia del ácido butírico

Dentro de los ácidos grasos de cadena corta producidos *in situ* en el colon por la fermentación bacteriana de las fibras, el ácido butírico tiene especial relevancia, ya que es el principal sustrato energético de las células epiteliales del colon para la realización de todas sus funciones metabólicas, estimulando la absorción de sodio y agua. Por otro lado, interviene en el mantenimiento de las uniones estrechas, contribuyendo a la homeostasis intestinal (Chen *et al.*, 2020; Duncan *et al.*, 2004) y tiene la particularidad de inducir apoptosis en células tumorales (Donohoe *et al.*, 2013). El butirato puede inhibir las histonas desacetilasas de las células tumorales del hospedador (Jan *et al.*, 2002). Por lo tanto, es importante destacar el potencial clínico que tiene la producción de este metabolito en el colon para la prevención de enfermedades inflamatorias intestinales (Manrique y González Sánchez, 2017).

El butirato es producido por poblaciones de microorganismos particulares, como por ejemplo representantes de la familia Ruminococcaceae y del género *Roseburia* (Duncan *et al.*, 2004; Farup *et al.*, 2016), *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol *et al.*, 2008) o *Clostridium butyricum* (Chen *et al.*, 2020); estas poblaciones se ven incrementadas en individuos que consumen dietas ricas en fibra. Al mismo tiempo, se correlacionan con la reducción de la probabilidad de padecer enfermedades inflamatorias como cáncer de colon.

Disbiosis

Cualquier modificación en las especies microbianas dentro del tracto gastrointestinal puede afectar sus respectivas concentraciones de metabolitos. Así, la dieta, el estilo de vida, el consumo de antibióticos o el proceso de envejecimiento, van a determinar cambios en la composición de la microbiota y, como consecuencia, van a incrementar la posibilidad de padecer enfermedades crónicas no transmisibles teniendo graves implicaciones para la salud (Kolodziejczyk *et al.*, 2021). Este estado de desequilibrio entre las bacterias protectoras o benéficas y las bacterias patógenas se denomina “disbiosis” (Iebba *et al.*, 2016). En dicho estado, las bacterias que promueven enfermedades proliferan, se altera el balance de metabolitos bacterianos y su concentración, y se pueden presentar disrupciones en la modulación de la inmunidad del hospedador, inflamación crónica y aparición de enfermedades no transmisibles (Satokari, 2015). Además, se reduce la diversidad microbiana y disminuye la población de bacterias estrictamente anaeróbicas con funciones protectoras, como la producción de ácidos grasos de cadena corta (Walker *et al.*, 2013).

En diversas enfermedades (enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer colorrectal, síndrome metabólico, diabetes) se ha observado que el estado de disbiosis lleva a una alteración de la función de barrera de las células epiteliales y se pone en contacto el contenido intestinal con otros tejidos, provocando una respuesta inflamatoria. En las enfermedades con reacción inflamatoria se utilizan fármacos antiinflamatorios, pero no se trata la disbiosis intestinal ni se restaura la integridad del epitelio, que es lo que mantiene la homeostasis intestinal.

Alimentos funcionales como alternativa para la modulación de la microbiota

Como se mencionó, los medicamentos antiinflamatorios pueden amortiguar la inflamación intestinal de manera efectiva, pero hoy en día se sabe que la modulación de la microbiota intestinal es una alternativa posible y saludable para la prevención y el tratamiento temprano de algunas patologías de origen inflamatorio. El patrón alimentario establecido en los últimos años se centra en el consumo de alimentos que tengan funcionalidad para la salud y en el desarrollo de nuevos productos alimenticios, con énfasis en el uso de microorganismos probióticos, compuestos prebióticos y combinación de ambos (synbióticos), entre otros (Barros *et al.*, 2020; Gibson *et al.*, 2017; Hill *et al.*, 2014).

Los **probióticos** son los componentes de alimentos funcionales más conocidos; se trata de microorganismos vivos que administrados en dosis adecuadas confieren beneficios en la salud del consumidor (Código Alimentario Argentino, Cap. XVII Art 1389). Los probióticos de nueva generación son nuevas cepas comensales potencialmente beneficiosas para la salud, que aún no se han utilizado con fines nutricionales y terapéuticos y que podrían explotarse en aplicaciones dietéticas y farmacéuticas (Gibson *et al.*, 2017).

A lo largo de las décadas, los lactobacilos se han administrado ampliamente en alimentos y suplementos dietéticos debido a su seguridad, eficacia e intereses comerciales (de Brito Alves *et al.*, 2016). Existen cepas de probióticos comerciales que pueden ser incorporadas en alimentos funcionales. Por ejemplo, *Lactobacillus casei* de Chr. Hansen es una cepa probiótica comercial que está bien documentada y se ha asociado con beneficios en varias áreas de la salud, como la inmunitaria, la respiratoria y la función intestinal, siendo una cepa muy estable y que puede sobrevivir en el sistema digestivo. Se utiliza en alimentos y suplementos dietéticos desde 1995, ya que tiene además una gran tolerancia a la bilis y los ácidos (Pimentel *et al.*, 2021). Este microorganismo con status GRAS (“generalmente reconocido como seguro”) se encuentra dentro de las especies más

comunes que se emplean en las preparaciones probióticas, con capacidad inhibitoria frente a una gran diversidad de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 (Ruiz *et al.*, 2017; Roldan *et al.*, 2011), *Salmonella spp.* (Ray, 2019). *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Calderón *et al.*, 2007). Adicionalmente, esta cepa -como muchas otras bacterias lácticas- produce sustancias antimicrobianas (ácidos láctico y acético, metabolitos) y numerosas bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos con una potente acción antimicrobiana y bioconservadora, que normalmente actúan contra microorganismos no deseados o patógenos, estrechamente relacionados o responsables del deterioro de los alimentos y causantes de enfermedades. Por esta razón, estos probióticos son interesantes para ser incorporados en alimentos a fin de extender su vida útil mediante procesos de bioconservación (Marcos Balciunas *et al.*, 2013).

Por su lado, los **prebióticos** son compuestos (mayoritariamente oligosacáridos y polisacáridos) no digeribles capaces de “estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales que favorecen la salud” (Gibson *et al.*, 2017). La evidencia científica que relaciona su consumo con el favorecimiento de poblaciones bacterianas benéficas, la producción de metabolitos bioactivos y la disminución de la incidencia de patologías intestinales -entre otros beneficios- crece exponencialmente (Sanders *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2022). Los prebióticos se pueden considerar alimentos funcionales capaces de otorgar un beneficio en la salud del consumidor, y se encuentran regulados por el Código Alimentario Argentino (Capítulo XVII, Art 1390).

Otros alimentos funcionales relativamente nuevos son los **synbióticos**, que resultan de la combinación de probióticos y prebióticos (Gibson *et al.*, 2017; Yadav *et al.*, 2022). El término “*synbiótico*” resulta de la combinación del prefijo griego “*syn*”, que significa “juntos”, y la base de derivación “*biótico*”, que significa “perteneciente a la vida”. La traducción de este término al castellano es “sinbiótico”, pero debe diferenciarse del término similar “simbiótico”, ya que los conceptos son diferentes. “Simbiótico”, tal y como se utiliza en biología, se refiere a una relación ecológica en la que un organismo (el huésped simbiote) vive en una relación a largo plazo en un ecosistema con otro organismo (el hospedador), es decir, viven en simbiosis. Cuando nos referimos a “sinbióticos”, no hacemos referencia a dos organismos, sino a un microorganismo combinado con un ingrediente alimentario, i.e. una molécula; como la inulina (Vazquez-Frías *et al.*, 2022). En este trabajo final utilizaremos el término original “synbiótico”.

Los synbióticos se pueden formular utilizando dos enfoques. Un **synbiótico complementario** comprende un probiótico más un prebiótico (o más de uno de cada uno), que trabajan de forma independiente para lograr uno o más beneficios para la salud. Los componentes probióticos y prebióticos del synbiótico complementario deben cumplir cada uno con sus requisitos mínimos, según las normativas legales del país donde se comercializan (en nuestro caso, artículos 1389 y 1390 del CAA). Por otro lado, un **synbiótico sinérgico** está compuesto por un microorganismo vivo y un sustrato que debe ser utilizado selectivamente por el microorganismo coadministrado. En este caso, no es requisito que probiótico y prebiótico cumplan con sus requisitos mínimos, ya que en este caso el synbiótico está diseñado para actuar de manera sinérgica. Muchos trabajos sostienen que el efecto que tienen los synbióticos sinérgicos es diferente y en muchos casos superior a la que tienen los probióticos y prebióticos de manera individual (Pandley *et al.*, 2015; Duque *et al.*, 2021; Tierney *et al.*, 2023; Ceylan & Atasoy, 2023).

Esta clasificación de los synbióticos fue recientemente discutida y aprobada por la ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) en un trabajo consensado (Swanson *et al.*, 2020). Los synbióticos han sido introducidos en la industria desde hace una década

aproximadamente, y los ejemplos incluyen productos lácteos (queso, yogur, leche, helado), bebidas fermentadas, chocolate, suplementos nutricionales, jugos, etc. (Chauhan & Sharma, 2023). Cabe destacar que los synbióticos no están incluidos en el CAA al día de la fecha.

Intervenciones Dietarias Personalizadas

La modulación de la microbiota intestinal a través de la intervención dietaria se ha convertido en una estrategia terapéutica y preventiva emergente para el tratamiento y prevención de muchas enfermedades. En los últimos años se ha comenzado a reconocer la relevancia de la respuesta diferencial e individual, y se propone la implementación de intervenciones dietarias personalizadas, basadas en la respuesta individual de la microbiota, y en que no existe un único prebiótico favorable para todos los individuos que lo consuman (Kolodziejczyk *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2018).

La microbiota presente en materia fecal se considera como representativa del microbiota del colon (Robertfroid *et al.*, 2010) y se usa como modelo de estudio *in vitro* de lo que ocurriría en el intestino grueso. La microbiota fecal de individuos sin patologías o afectados por patologías intestinales de tipo inflamatorio puede utilizarse en estudios para evaluar la respuesta frente a la administración de diferentes fuentes de fibra con la consiguiente producción de butirato y/o el consiguiente favorecimiento de poblaciones bacterianas benéficas. De este modo, se podría establecer un modo de intervención “personalizado” en la dieta, orientado a la prevención, o a la reversión de la enfermedad en etapas tempranas.

3) OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo final es:

“Estudiar *in vitro* la fermentabilidad de polisacáridos con diferente composición, para evaluar su potencialidad para ser utilizados como prebióticos o componentes de synbióticos”




Para alcanzar el objetivo principal, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1) Caracterizar estructuralmente polisacáridos no digeribles provenientes de subproductos de la industria alimentaria.
- 2) Evaluar la capacidad de los polisacáridos para ser utilizados como fuente de carbohidratos por una cepa probiótica comercial (*Lactocaseibacillus casei* 01 ChHansen).
- 3) Relevar donantes de materia fecal para ser incluidos en estudios de fermentación *in vitro*.
- 4) Seleccionar algunos de ellos y evaluar el perfil de ácidos orgánicos en materia fecal.
- 5) Evaluar *in vitro* la fermentación de los polisacáridos por las bacterias intestinales de los donantes seleccionados en cuanto a la producción de butirato.
- 6) Evaluar la producción *in vitro* de ácidos grasos de cadena ramificada por parte de las bacterias intestinales en presencia de los polisacáridos.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Caracterización estructural de los polisacáridos mediante espectroscopía de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Se trabajó con tres polisacáridos no digeribles, extraídos y caracterizados previamente en el laboratorio: un **glucogalactano (kefiran)** proveniente de gránulos de kefir de leche; **α -glucanos (dextranos)** proveniente de gránulos de kefir de agua y **β -glucanos** proveniente de paredes de levaduras cerveceras. La composición de monómeros, el tipo de uniones químicas y el peso molecular ha sido descrita por otros autores, así como por integrantes del laboratorio de Microbiología del CIDCA. En la Tabla 1 se resume la información relativa a estos polímeros.

TABLA 1: Información sobre polisacáridos utilizados en este trabajo. Fuente, uniones, peso molecular, referencias.			
	KEFIRAN	DEXTRANOS	β-GLUCANOS
	Gránulos de kefir de leche CIDCA AGK 1	Gránulos de kefir de agua	Crema de levaduras
Fuente			
Síntesis	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Monómeros	Glucosa y galactosa 1:1 (Kooiman, 1968)	Glucosa (Fels <i>et al.</i> , 2018)	Glucosa (Caruso <i>et al.</i> , 2022)
Uniones glicosídicas	α 1-4 y β 1-6 (Kooiman, 1968)	α 1-6 y α 1,3 (Fels <i>et al.</i> , 2018)	β 1-3 y β 1-6 (Caruso <i>et al.</i> , 2022)
Peso molecular	Mayor a 4×10^6 Da (Piermaria <i>et al.</i> , 2008)	$1,9 \times 10^7$ Da (Fels <i>et al.</i> , 2018)	$2-5 \times 10^6$ Da (Reymar, 2023)

Brevemente, el glucogalactano kefiran se aisló previamente de gránulos de kefir de leche (AGK1) pertenecientes a la colección del CIDCA, mediante disolución en agua caliente y precipitación con etanol frío (Piermaria *et al.*, 2008). Se resuspendió en agua destilada caliente y se liofilizó en un liofilizador Heto-Lab FD (San Francisco, USA).

La fracción de dextranos proveniente de los gránulos de kefir de agua se extrajo de acuerdo con (Simonelli *et al.*, 2023). Brevemente, los gránulos de kefir de agua cedidos por una empresa productora de kefir de agua de Buenos Aires (Sr. Kefir) fueron escurridos y dispersados en 1 litro de solución alcalina (pH 10 con NaOH 1M) y se dejaron en agitación durante 30 min a 60 °C. A continuación, la solución fue neutralizada con HCl y se centrifugó el extracto resultante a 10000 x g durante 15 minutos. El pellet fue resuspendido en etanol frío al 96 % e incubado overnight. Luego, la solución fue centrifugada a 10000 x g 15 min y el pellet fue resuspendido en agua destilada caliente para posteriormente ser liofilizado en las mismas condiciones indicadas anteriormente.

Los β -glucanos de paredes de levaduras fueron purificados a partir de crema de levaduras *Sacharomyces cerevisiae* (Estilo: Golden Ale, SafeAle S04, Fermentis, Bélgica) donada por una fábrica de cerveza de La Plata (Dackel). Las levaduras fueron sometidas a un primer paso de lisis (pH 5.0, 50 °C durante 48 h y 80 °C, 15 min en agitación), incubación con NaOH (1M, 80 °C, 2 h en agitación), centrifugación, incubación con ácido acético (1M, 2 h, 80 °C), lavado y secado. El extracto resultante se liofilizó en un Heto-Lab FD (San Francisco, USA) (Miller *et al.*, 2019).

En la figura 3 se puede observar el aspecto de los tres polisacáridos.

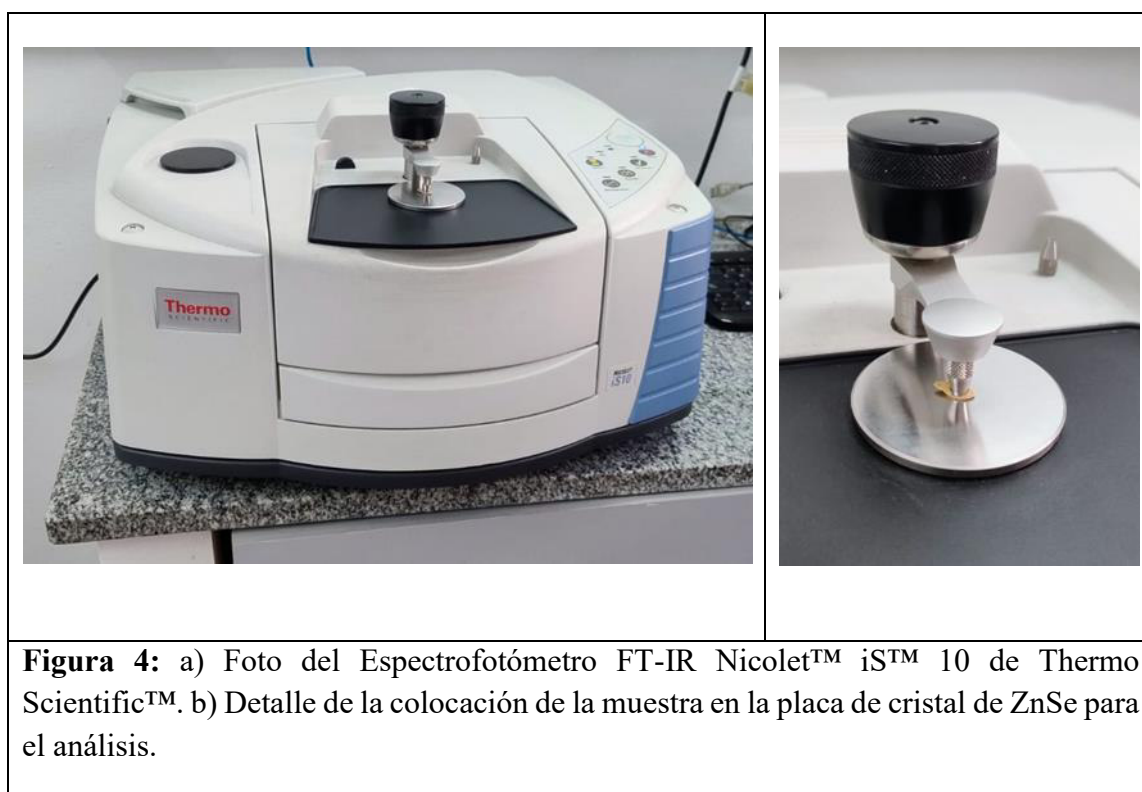


Figura 3: Carbohidratos incluidos en el estudio: glucosa y fibras dietarias no digeribles (polisacáridos)

1. Glucosa.
2. Glucogalactano (Kefiran).
3. α -glucanos (dextranos).
4. β -glucanos.

Los polisacáridos así obtenidos y liofilizados fueron caracterizados en este trabajo final mediante espectroscopía infrarroja combinada con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en un espectrómetro FT-IR Nicolet™ iS™ 10 de Thermo Scientific™. La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) es una técnica empleada para obtener la huella dactilar molecular de una muestra biológica que absorbe la onda infrarroja de acuerdo con los enlaces químicos y estructurales de las moléculas, proporcionando información de la estructura específica de biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, a través de una serie de bandas identificables de grupos funcionales en la región electromagnética del infrarrojo medio (Lasch y Naumann, 2015).

Una porción de cada una de las tres muestras de polisacáridos fue colocada sobre la placa de cristal de ZnSe del equipo y se registraron los espectros infrarrojos en la región comprendida entre 4000 y 400 cm^{-1} empleando un espectrómetro FTIR Nicolet iS10 (Figura 4) con una resolución de 4 cm^{-1} en el modo de absorbancia realizando 64 escaneos por ensayo de acuerdo con Rivero *et al.*, (2017). Los espectros fueron analizados empleando el software Omnic 8.3 (ThermoScientific, Madison, EE. UU.).



4.2 Utilización de los polisacáridos por bacterias probióticas

Con el objetivo de evaluar si los polisacáridos pueden ser utilizados como vehículo para el desarrollo de un suplemento *synbiótico* (es decir, aquel que contiene un microorganismo probiótico y un polisacárido prebiótico), se evaluó el crecimiento de un probiótico comercial en un medio formulado conteniendo cada uno de los polisacáridos como única fuente de carbohidratos. Se consideró que un incremento en el número de microorganismos (UFC/ml) hasta alcanzar el valor del medio control (con glucosa) luego de 24 hs de incubación indicaría que los microorganismos lo pueden utilizar como sustrato. Por el contrario, un número de microorganismos similar al control negativo

(medio sin azúcares) indicaría que la cepa probiótica no utiliza al polisacárido como sustrato fermentable.

Se utilizó la cepa probiótica comercial *Lacticaseibacillus casei* 01 (antes *Lactobacillus casei* 01) donada al laboratorio de Microbiología del CIDCA por la empresa Chr. Hansen Argentina S.A.I.C. *Lacticaseibacillus casei* de Chr. Hansen es una cepa que está bien caracterizada y documentada y se ha asociado con beneficios en la salud, como efectos positivos en el sistema inmune, vías respiratorias y la función intestinal, siendo una cepa muy estable y que puede sobrevivir en el sistema digestivo. Se utiliza en alimentos y suplementos dietarios desde 1995. Tiene una gran tolerancia a la bilis y los ácidos (Pimentel *et al.*, 2021) y se utiliza como modelo de microorganismo para la formulación de *synbióticos* o microorganismos incluidos en películas comestibles (Balthazar *et al.*, 2018).

a) Mantenimiento rutinario de la cepa y condiciones de cultivo

Los microorganismos fueron conservados a -80 °C y fueron reactivados y repicados en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (Biokar Diagnostics, Francia) e incubados a 37 °C durante 24 hs. El medio de cultivo MRS es un medio de cultivo líquido utilizado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave.

b) Estudio de la capacidad de la cepa de utilizar los polisacáridos como fuente de carbono

Los microorganismos crecidos en medio MRS durante 48 hs fueron resuspendidos en medio fresco, y se llevó el cultivo a una $DO_{600} = 1$ utilizando un espectrofotómetro 330-1000 nm (Metrolab, Argentina). Al mismo tiempo, se realizó un recuento inicial en placa de agar-MRS para correlacionar el valor de DO_{600} con el número de UFC/ml.

Luego, 200 µL de la suspensión $DO=1$ se inocularon en los diferentes medios. Se usó como base un medio formulado según Al-Tamimi *et al.*, 2006. Se prepararon medios conteniendo las diferentes fibras en una concentración de 300 mg/L. Se incluyó un control con glucosa (300 mg/L) y un control sin fuente de azúcares. La composición del medio se detalla en la Tabla 2.

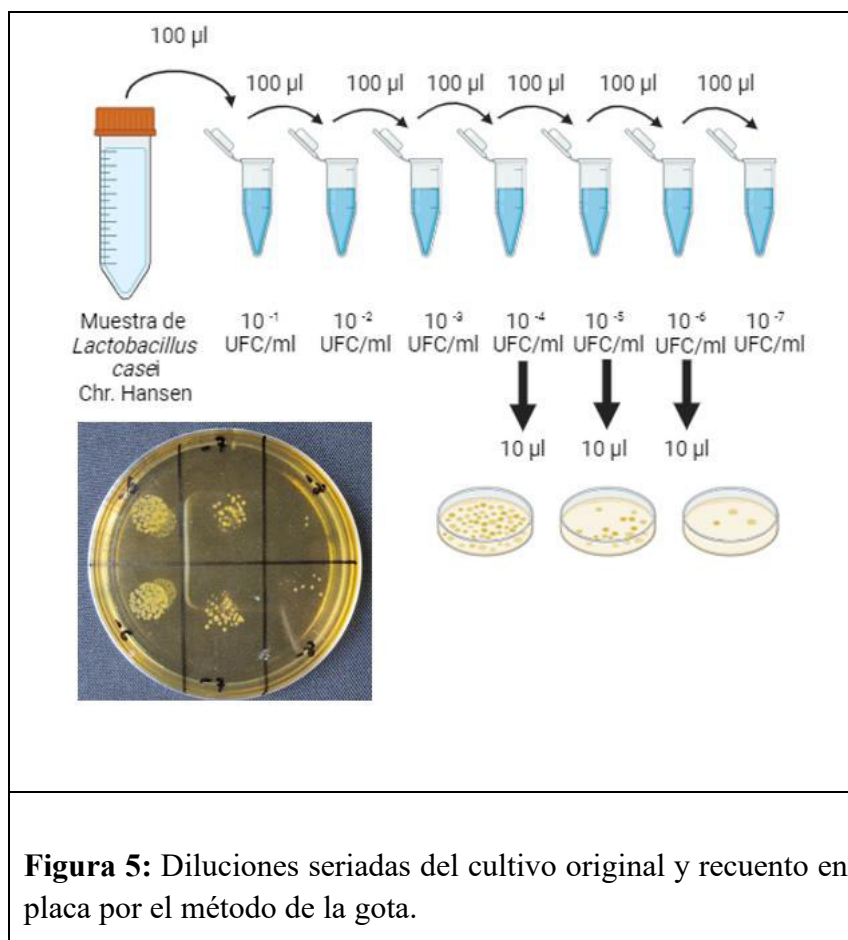
TABLA 2: Composición del medio formulado por Al-Tamimi <i>et al.</i> , (2006).	
COMPONENTE	CANTIDAD (GR) c.s.p 1000 mL
Peptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
NaCl	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.04 g
MgSO ₄	0.01 g
CaCl ₂ . 6 H ₂ O	0.01 g
NaHCO ₃	2 g
Sales biliares	0.5 g

El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, luego del autoclavado y una vez que el medio estuvo a temperatura ambiente se adicionaron en esterilidad: 1 ml/L de solución de hemina (ICN) al 0,5 % p/v, 10 µg/ml de solución de vitamina K comercial (Laboratorio Roche) al 0,1 % p/v y 0,5 g/L de cisteína acidulada con HCl (Anhedra) (Tabla 3). El pH se llevó a 7,5.

Sc. de Hemina	50 mg/ml
Vitamina K	10 µg/ml
Cisteína HCl	0.5 g/l

La cepa inoculada en los diferentes medios conteniendo los distintos polisacáridos, junto con el control con glucosa y el control sin azúcar, se incubó a 37 °C durante 24 hs y luego se procedió a evaluar el desarrollo mediante medición de DO₆₀₀ en espectrofotómetro (Metrolab) y recuento en placa de agar MRS.

Para el recuento en placa se realizaron diluciones seriadas en solución salina (CINa 0.9 % p/v) y se utilizaron dos tipos de metodología: recuento en placa por un método clásico utilizando perlas de vidrio estériles y por el método de la gota (Figura 5) (Golowczyc *et al.*, 2010), usando dos técnicas diferentes a fines comparativos.



4.3 Reclutamiento y selección de donantes para posterior inclusión al ensayo experimental

Se utilizó como instrumento de recolección de datos una encuesta diseñada desde la plataforma Google Formularios, elaborada para el proyecto UNAJ-Investiga 2020 en el cual está enmarcado este trabajo final, difundida por WhatsApp y redes sociales. A partir de esta encuesta, se logró realizar un relevamiento sobre patologías intestinales y hábitos de vida, logrando recabar datos acerca de la población residente en La Plata, Florencio Varela y alrededores. A partir de las respuestas obtenidas, y de la decisión de los voluntarios en participar (a través de la donación de una muestra de materia fecal), se seleccionaron individuos control (sin patologías) e individuos con patologías gastrointestinales (pólipos y colitis ulcerosa).

Las muestras de materia fecal fueron entregadas por los donantes junto con una nota de consentimiento informado donde declaraban su participación voluntaria en el estudio (Anexo A). El diseño experimental de este plan de trabajo cuenta con el aval del Comité de ética del Hospital de Alta Complejidad El Cruce Dr. Néstor C. Kirchner (D00019 julio 2023). Las muestras fueron procesadas en el laboratorio dentro de las 4 hs posteriores a la deposición.

4.4 Análisis de ácidos orgánicos presentes en la materia fecal de los donantes incluidos en el estudio

Las muestras de materia fecal se diluyeron 1/10 p/v en medio formulado según [Al-Tamimi y col. \(2006\)](#) (Figura 6) y se reservaron para ser utilizadas en el cumplimiento de actividades propuestas en el Objetivo 5. Se tomó una alícuota de 1 ml, se centrifugó (3600 rpm durante 5 min) (centrifuga Eppendorf) y se filtraron con una membrana de 0,22 μm de diámetro de poro. Estas muestras se destinaron para realizar la identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos en materia fecal mediante cromatografía gaseosa.



Figura 6: Barros fecales preparados a partir de inóculo de heces humanas.

Para la identificación y cuantificación de ácidos orgánicos se utilizó un cromatógrafo gaseoso (Agilent Technologies, Modelo 7890A, USA) asociado a una columna DBFATWAX UI. 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm. Las condiciones operativas de las corridas fueron: Inlet 280 °C; Split 50:1, flow 1 ml/min; Oven rampa 120 °C; 2 min-5 °C x min hasta 140 °C. Se utilizaron curvas de calibración conteniendo ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico en concentraciones 0, 5, 7.5 y 10 mM (Sigma Aldrich, USA).

4.5 Ensayos de fermentación *in vitro* de los polisacáridos

Para llevar a cabo los experimentos de fermentación se preparó un medio de cultivo base según Al-Tamimi *et al.* (2006). A partir de este medio base se prepararon otros medios a los cuales se les agregaron los polisacáridos en una concentración final de 300 mg/L. Se incluyó un control con glucosa 300 mg/L y un control sin el agregado de azúcares.

Se utilizaron como inóculo muestras de materia fecal de adultos sin patologías (n=3) y otros afectados por patologías intestinales (n=5). Se tomó como criterio de selección que no hayan recibido un tratamiento antibiótico en los últimos 6 meses previos a la realización del ensayo.

Con la materia fecal de cada donante se preparó un barro fecal para inocular los medios de cultivo realizando una dilución 1/10 de la materia fecal en el medio de cultivo base tal como se mencionó en el ítem anterior.

Los medios de cultivo fueron inoculados con los barros fecales en una dilución 1/10 e incubados a 37 °C en condiciones de anaerobiosis durante 24 y 48 hs (Figura 7). En dichos tiempos, se tomaron alícuotas para la determinación de ácidos orgánicos producidos. Los ácidos orgánicos se cuantificaron mediante cromatografía gaseosa, tal como se describió en el ítem anterior.



Figura 7: Muestras en las jarras de anaerobiosis, previamente preparadas en cabina de flujo laminar y post incubación a 37 °C en estufa de cultivo.

Análisis estadístico

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba T de Student (Excel, Microsoft).

Salvaguarda ética y ambiental

Las actividades que se plantearon no atentaron contra las normas bioéticas nacionales e internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Se trabajó respetando la Ley Nacional 26.529 "Derechos del Paciente" y Ley Nacional 25.326 "Protección de los Datos Personales". Todas las muestras de materia fecal fueron procesadas luego de recibir la nota de consentimiento informado por parte del donante. El diseño experimental que se planteó en este proyecto cuenta con el aval del Comité de ética del Hospital de Alta Complejidad El Cruce Dr. Néstor C. Kirchner (D00019 julio 2023).

Se trabajó de acuerdo con el "REGLAMENTO INTERNO DE SEGURIDAD, SALUD E HIGIENE EN EL TRABAJO Y MEDIO AMBIENTE (CCT-La Plata), elaborado de acuerdo a lo dispuesto en el Art. N.º 213, Capítulo 21 del Decreto Reglamentario 351/79 de la Ley Nacional N.º 19.587, de "Higiene y Seguridad en el Trabajo". Durante el desarrollo de este proyecto no se llevaron a cabo actividades que atenten contra el medio ambiente. Los residuos fueron manipulados de acuerdo con el "PROTOCOLO de PROCEDIMIENTOS PARA EL MANEJO DE RESIDUOS PATOGÉNICOS", elaborado por la Comisión de Seguridad e Higiene del Trabajo de la Facultad de Ciencias Exactas – UNLP (Resolución 2367 – Expediente 0700-006966-2010 - Fecha 18/10/10), elaborada de acuerdo con la Ley 24.051 de "Residuos Peligrosos" y a la Ley 11.347 de "Residuos Patogénicos".

5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización estructural de los polisacáridos mediante ATR-FTIR

Para el desarrollo de las tareas propuestas en el plan de actividades, se contó con tres polisacáridos previamente purificados en el laboratorio, a los cuales se les había realizado una caracterización parcial, tal como se describió anteriormente (Tabla 1). Con el objetivo de comprobar la pureza de los extractos obtenidos, los mismos fueron caracterizados mediante espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) a fin de identificar sus principales grupos funcionales.

Del análisis espectral obtenido por ATR-FTIR se comprobó que los espectros infrarrojos de los polímeros coinciden con los espectros característicos de polisacáridos. En general, los carbohidratos se reconocen por presentar picos característicos en las regiones comprendidas entre **4000-3000 cm^{-1}** (asignada a los modos vibracionales de estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos **O-H** característicos de estos polímeros); **3000-2840 cm^{-1}** (asignada a los modos de vibración simétricos y asimétricos de los grupos **C-H**) y región **1285-800 cm^{-1}** correspondiente a las uniones **C-O-C** y **C-O** de los anillos de D-glucosa y de las uniones glicosídicas (Wang *et al.*, 2008). Se muestra en la Figura 8 el espectro FTIR correspondiente a los **β -glucanos**.

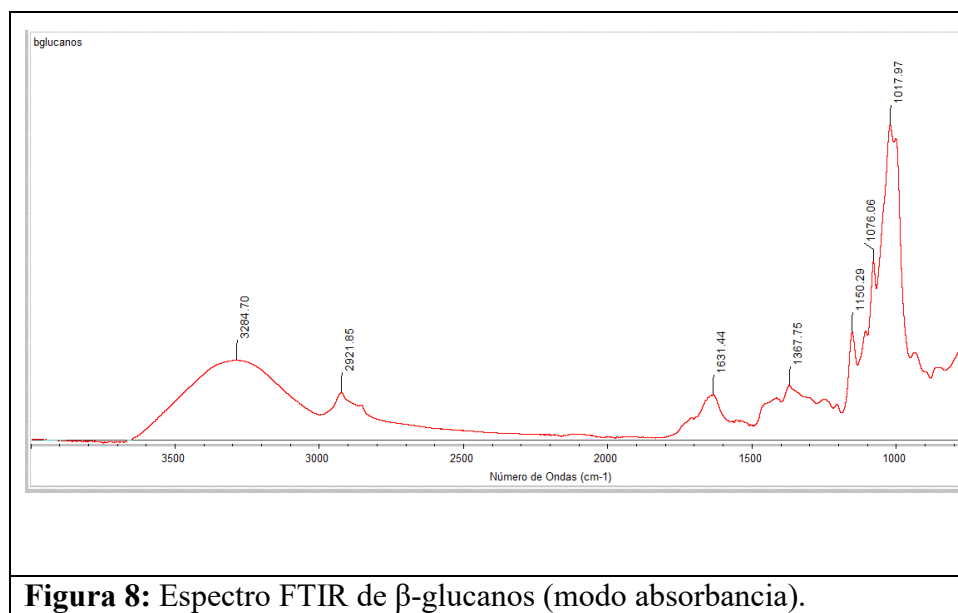


Figura 8: Espectro FTIR de β -glucanos (modo absorbancia).

Tal como se puede observar, se identificó uno de los picos característicos para carbohidratos, en la región comprendida entre $4000\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ (estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos **OH**) (Wang *et al.*, 2008). En particular, la señal se ubicó a **3284 cm^{-1}** .

Por otro lado, se identificó un pico en la región $3000\text{-}2840 \text{ cm}^{-1}$, asignada a los modos de vibración simétricos y asimétricos de los grupos **CH** (Vieira, 1998). En particular, la señal se detectó a **2921 cm^{-1}** . Ambos picos mencionados son característicos de polisacáridos.

La señal detectada a 1631 cm^{-1} se podría deber al estiramiento de grupos **CN** y **NH** que se encuentran en las proteínas, indicando la presencia de enlaces tipo amida y la presencia de proteína en la muestra (Ahmad *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2008). Además, la señal localizada a 1367 cm^{-1} se puede atribuir a la región $1392\text{-}1372 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a los grupos **COO** presentes en aminoácidos (Rodríguez Arzuaga *et al.*, 2020). La presencia de proteínas fue reportada por otros autores en β -

glucanos comerciales (Ahmad *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2008). En este caso, se podría explicar la presencia de este pico dada la dificultad de separar proteínas de polisacáridos en este tipo complejo de muestra, proveniente de pared celular asociada a membrana en levaduras.

En la región de la “huella” $1100-900\text{ cm}^{-1}$ se encontraron picos correspondientes a las uniones C-O-C y C-O de los anillos de D-glucosa y de las uniones glicosídicas (Wang *et al.*, 2008). En particular, las señales situadas a 1153 cm^{-1} y 1017 cm^{-1} pueden estar asociadas a los modos vibracionales de glucosa, y unión glicosídica tipo beta (Kacurakova *et al.*, 2000; Naumann, 2000; Piermaria *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008).

Los espectros FTIR de los β -glucanos obtenidos son compatibles con los de β -glucanos comerciales descritos en bibliografía (Johansson and *et al.* 2004; Limberger-Bayer *et al.*, 2014). Esto indica que el polímero obtenido mediante las metodologías utilizadas en el laboratorio es de una pureza aceptable, y que es adecuado para ser utilizado en los ensayos de fermentación *in vitro* propuestos.

Con respecto a los espectros infrarrojos obtenidos con la muestra de **kefiran**, de modo similar a lo hallado en los espectros pertenecientes a las muestras de β -glucanos, se observó gran similitud con los espectros característicos de polisacáridos, presentando los picos característicos y difiriendo mayormente en la intensidad de las bandas (Figura 9).

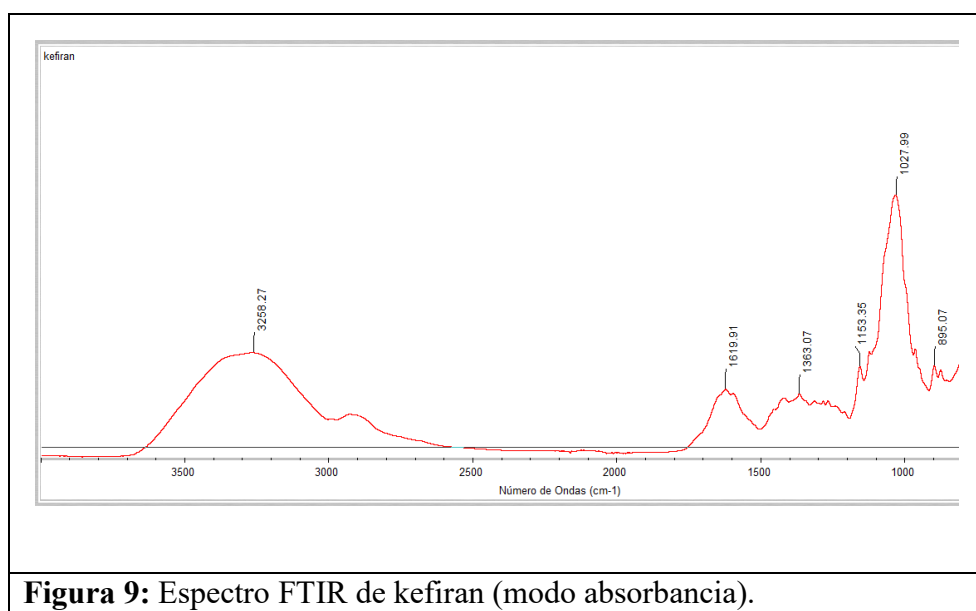


Figura 9: Espectro FTIR de kefiran (modo absorbancia).

Como se puede observar en la Figura 9, se identificaron los picos característicos en la región comprendida entre $4000-3000\text{ cm}^{-1}$, en particular, se observó una señal a 3258 cm^{-1} asignada a la vibración de estiramiento O-H (Lasch y Naumann, 2015). En la región $3000-2840\text{ cm}^{-1}$ (asignada a los modos de vibración simétricos y antisimétricos de los grupos CH, grupo funcional metilo (CH_3) y metileno (CH_2) (Vieira, 1998), se detectó un pico a 2900 cm^{-1} . Ambos picos son característicos para carbohidratos.

Las señales situadas a 1619 cm^{-1} y 1363 cm^{-1} se asocian a proteínas (Ahmad *et al.*, 2010; Rodríguez Arzuaga *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2008), aunque también se pueden atribuir a moléculas de agua. La banda cercana a 1630 cm^{-1} se ha atribuido a la presencia de moléculas de agua que hayan permanecido asociadas, aun luego de la liofilización, dada la alta afinidad de estos polisacáridos por

el agua. La presencia de estos picos se ha reportado en análisis de kefiran por otros autores (Piermaria *et al.*, 2011).

En la región de la “huella” 1100 a 900 cm^{-1} se observaron picos que se asignan a los modos de estiramiento de los anillos de los carbohidratos (COC, COH, CH) (Kacurakova *et al.*, 2000; Naumann, 2000). En particular, en esta última región se detectaron picos a **1153 cm^{-1}** y **1027 cm^{-1}** asociados a los modos vibracionales de glucosa, galactosa y unión glicosídica tipo beta que se correlacionan con la estructura del kefiran (Ahmed *et al.*, 2008; Kacurakova *et al.*, 2000; Piermaria *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008).

El espectro infrarrojo obtenido se comparó con otros obtenidos por otros autores. Gagliarini *et al.* (2022) y Piermaria *et al.* (2011) obtuvieron espectros similares. Por lo tanto, se concluye que el polisacárido obtenido es de una pureza aceptable, ya que los espectros coinciden con los descritos por otros autores. Por lo tanto, es adecuado para ser utilizado en las determinaciones que siguen a continuación.

Con respecto a los **dextranos**, también presentaron espectros característicos de polisacáridos (Figura 10).

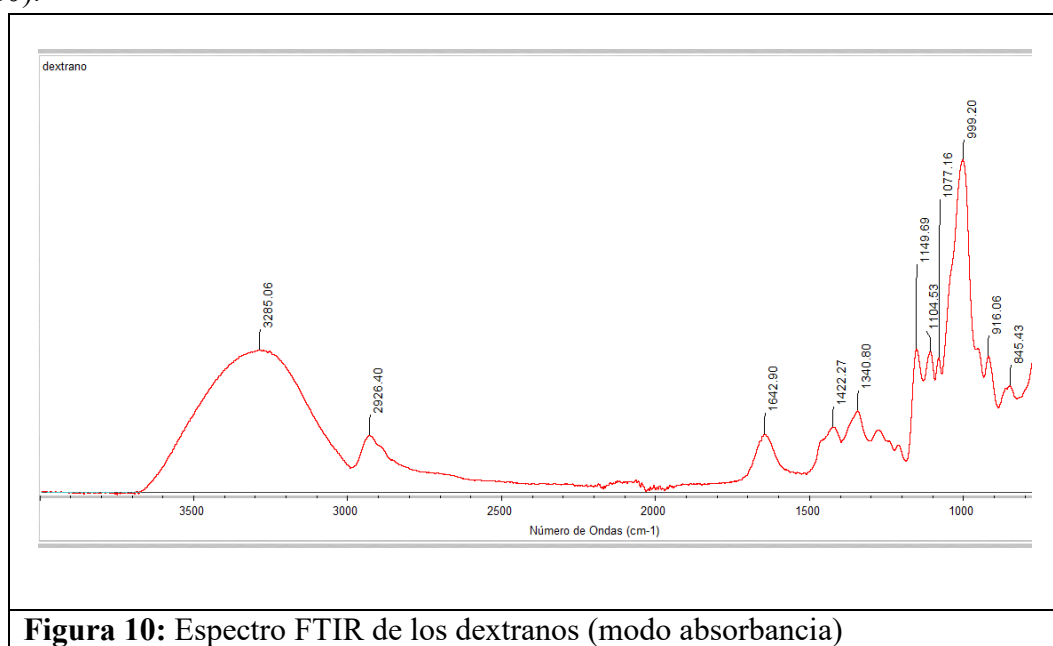


Figura 10: Espectro FTIR de los dextranos (modo absorbancia)

Se observaron picos en la región comprendida entre 4000-3000 cm^{-1} (adscrita a los modos vibracionales de estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos **O-H**), en este caso, el pico se observó a **3285 cm^{-1}** . En la región **3000-2840 cm^{-1}** (asignada a los modos de vibración simétricos y antisimétricos de los grupos **CH**) (Vieira, 1998) se observó un pico a **2926 cm^{-1}** .

Las señales detectadas a 1642 cm^{-1} , 1422 cm^{-1} y 1340 cm^{-1} se pueden asignar a la presencia de proteínas (Lasch & Naumann, 2015; Ahmad *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2008; Rodríguez Arzuaga *et al.*, 2020) o a la presencia de agua ligada, tal como se mencionó para el caso del kefiran.

En la región de la “huella”, el pico a **1149 cm^{-1}** se podría asociar a glucosa (Kacurakova *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008; Piermaria *et al.*, 2011), mientras que el pico a **1074 cm^{-1}** se puede atribuir a las uniones glicosídicas (El-Halem *et al.*, 2023).

Recientemente, otros autores han estudiado los espectros de dextranos mediante FTIR, encontraron también picos en la región 2950 cm^{-1} (grupos OH), 1620 cm^{-1} (C-N) 1074 cm^{-1} (asociada con las uniones glicosídicas) (El-Halem *et al.*, 2023). Se puede concluir que la pureza de la fracción de dextranos obtenida por los métodos utilizados es de una pureza aceptable y es adecuada para ser utilizado en los ensayos de fermentación.

Comparación de los espectros FTIR de los polisacáridos

Si se comparan los tres espectros de los polímeros, se encuentran similitudes, ya que los tres son polisacáridos. En los tres casos encontramos las regiones características de polisacáridos, tal como se describió anteriormente (Figura 11).

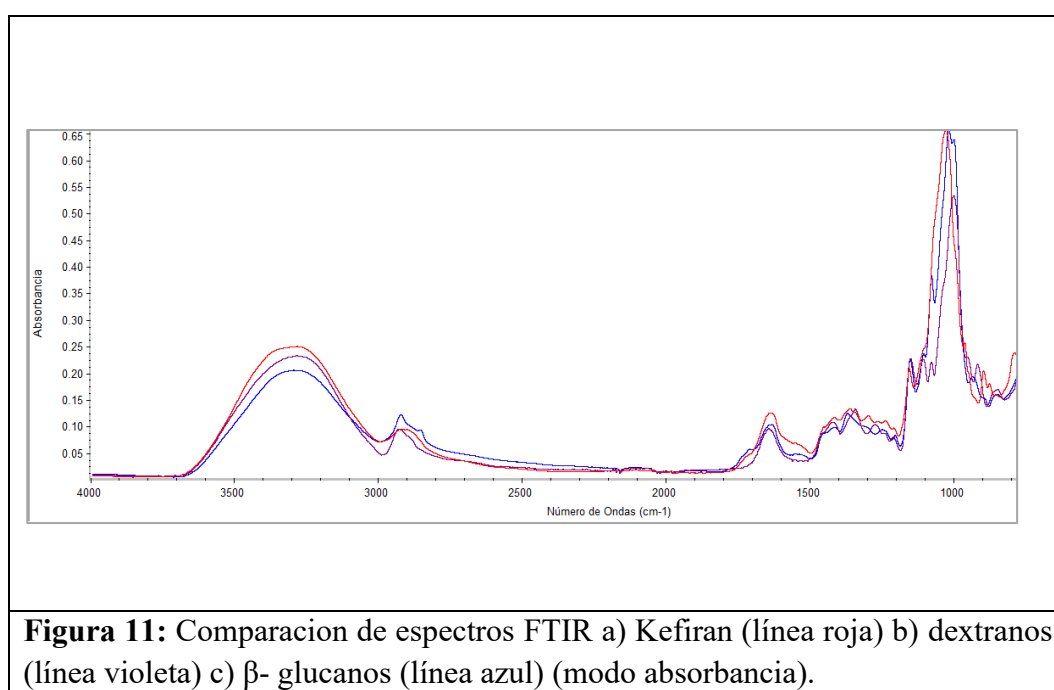


Figura 11: Comparación de espectros FTIR a) Kefiran (línea roja) b) dextranos (línea violeta) c) β - glucanos (línea azul) (modo absorbancia).

Sin embargo, los espectros no son iguales. Sobre todo, en la región de la huella (1100 a 900 cm^{-1}) hay desplazamientos, y los picos no se encuentran en la misma longitud de onda. Para resolver esto, se podría utilizar la segunda derivada de los espectros para estimar el número, la posición y la contribución relativa de los componentes individuales a la banda espectral (Piermaria *et al.*, 2011; Rivero *et al.*, 2017).

A partir de la evaluación de los espectros infrarrojos obtenidos a partir del análisis de los polímeros, podemos concluir que es posible obtener polisacáridos con un grado de pureza aceptable, a partir de gránulos de kefir de leche y de agua, así como de paredes de levaduras mediante metodologías relativamente sencillas. Estos polisacáridos se utilizaron para los ensayos y determinaciones que siguieron a continuación en este trabajo final.

5.2 Evaluación de la capacidad de los polisacáridos para ser fermentados por una cepa probiótica comercial (*Lacticaseibacillus casei* 01)

La cepa *Lacticaseibacillus casei* 01 (producto comercial de Chr. Hansen) se cultivó en caldo MRS y se realizó una tinción de Gram; luego se observó al microscopio para corroborar la pureza del cultivo, esto es que no hubiese otras formas bacterianas presentes. Se observó que los microorganismos son bacilos Gram positivos (Figura 12).

El cultivo se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en medio MRS fresco. Para ajustar la concentración de *Lacticaseibacillus casei* 01 inicial, se ajustó la densidad óptica (DO) a 1 a través de la medida de la Abs₆₀₀ en un espectrofotómetro 330-1000 nm (Metrolab). Luego, se procedió a hacer un recuento en placa agar-MRS, a fin de poder correlacionar la DO con el número de microorganismos, expresado como UFC/ml. De acuerdo con esto, se encontró que un valor de densidad óptica DO=1 corresponde a un recuento de concentración de 1.10^8 UFC/ml que fue la que se tomó como inóculo inicial



Figura 12: Observación de la morfología de *Lacticaseibacillus casei* 01 por tinción de Gram. Microscopía óptica 100 X.

El objetivo de esta actividad fue evaluar si la cepa probiótica comercial es capaz de fermentar los polisacáridos. Esto se realizó para evaluar si los polisacáridos podrían incluirse en un alimento sinbiótico, en combinación con el probiótico comercial con beneficios demostrados.

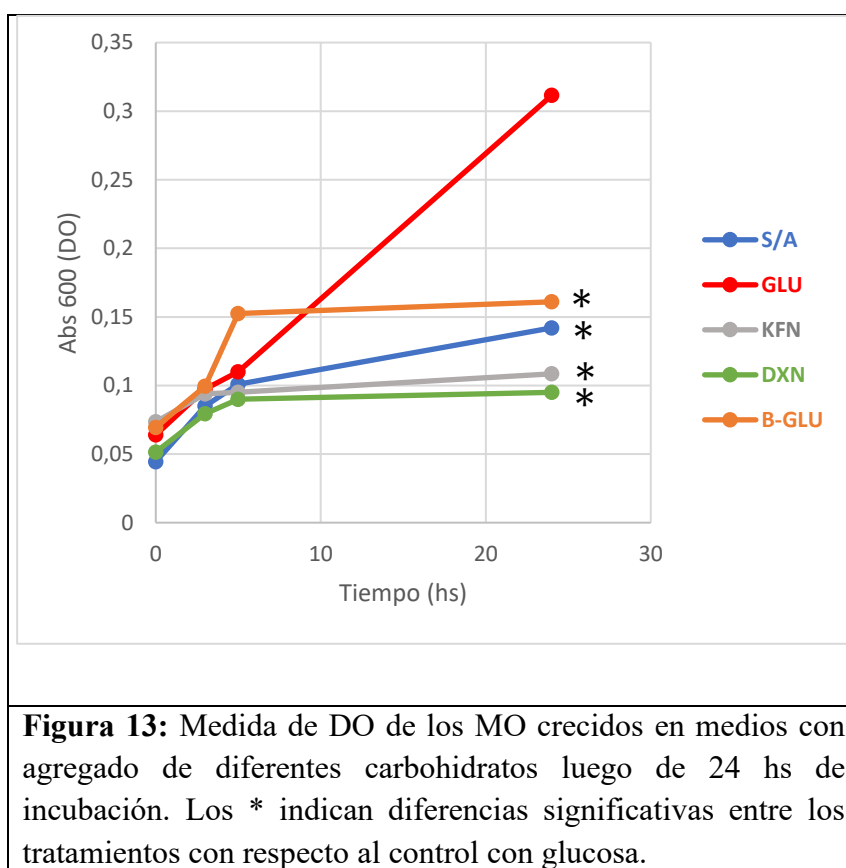
Para cumplir con este objetivo, la cepa se inoculó en diferentes medios de cultivo conteniendo los distintos polisacáridos como única fuente de carbono. Para monitorear el crecimiento y actividad de la cepa, se midió la densidad óptica, el pH y el recuento en placa (método de la gota) a tiempos inicial, final, e intermedios (3hs, 6 hs, 16 hs y 24 hs).

Lo que se intentó comprobar es si la cepa crece en los medios conteniendo las fibras como única fuente de carbono (en una concentración de 300 mg/L), para lo cual se utilizaron los siguientes medios:

- 1) Sin azúcar - sólo medio Al Tamimi (S/A).
- 2) Glucosa (GLU) (medio Al Tamimi adicionado con glucosa)
- 3) Kefiran (KFN) (medio Al Tamimi adicionado con kefiran)
- 4) Dextranos (DXN) (medio Al Tamimi adicionado con dextranos)
- 5) β - glucanos (β - GLU) (medio Al Tamimi adicionado con β - glucanos)

Los medios se dispusieron en tubos de vidrio estériles (volumen de 2000 μ l) por triplicado. Los medios se inocularon con 100 μ l de la cepa *Lacticaseibacillus casei* 01 OD=1, midiéndose la DO a tiempo 0 hs, 3 hs y 6 hs, 16 hs y 24 hs post inoculación. A tiempo 0 y luego de 24 hs de incubación a 37 °C, se procedió al recuento en placa en agar MRS. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones de microorganismos crecidas en los tubos. Las diluciones adecuadas se sembraron en placas con agar-MRS y se incubaron en estufa a 37 °C durante 24-48 hs. Luego, se procedió al conteo de número de colonias para que luego mediante la aplicación del correspondiente del factor de conversión, obtener el número de microorganismos viables en la muestra expresado como UFC/ml.

En la Figura 13 se muestra el incremento de la DO en función del tiempo para todos los medios. Como puede observarse, en el medio con glucosa se observó el mayor incremento de la DO alcanzando un valor de 0.31 a las 24 hs. Por otro lado, el medio sin azúcar (control negativo) alcanzó un valor menor, con diferencias estadísticamente significativas en comparación con el medio con glucosa. Los medios conteniendo los polisacáridos (kefiran, dextranos, β -glucanos) presentaron valores similares al medio sin azúcar y estadísticamente diferentes al medio con glucosa.

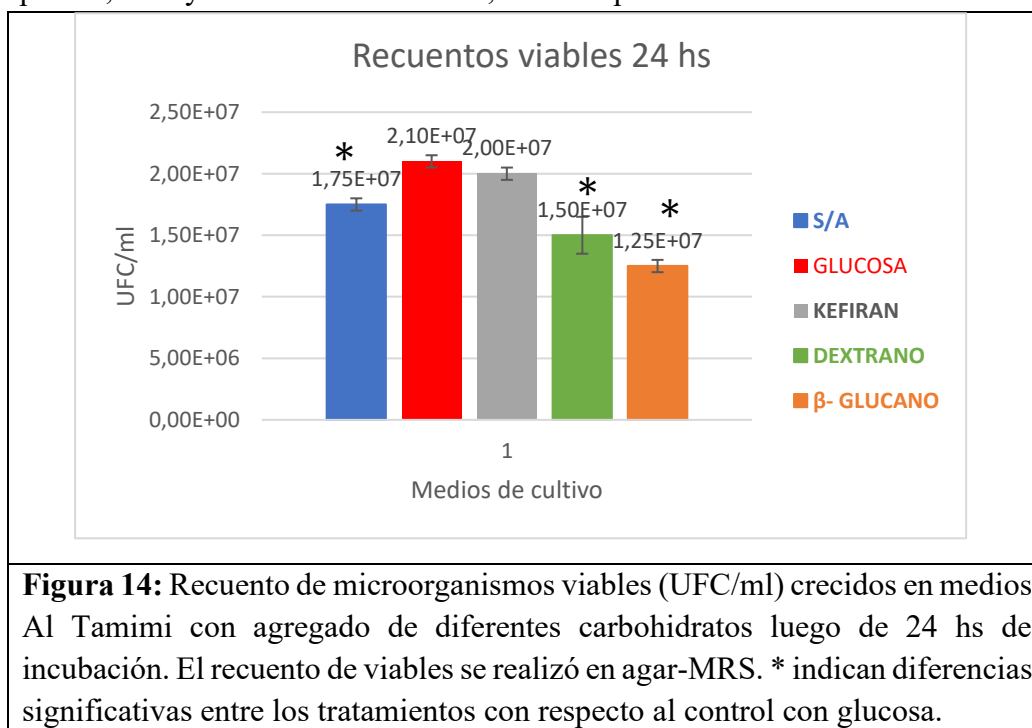


De la observación de la figura anterior (Figura 13) también puede observarse que el valor de DO del medio con glucosa es bajo (0,3). Esto puede explicarse porque el medio Al Tamimi no es el medio de cultivo rutinario de *Lacticaseibacillus casei* 01. En nuestro caso, fue útil como control positivo ya que observamos un mayor crecimiento de los microorganismos en comparación con el medio sin azúcar. Si se hubiese agregado un control en medio MRS probablemente se hubiese llegado a una DO=1, tal como ocurrió con el inóculo inicial. Por otro lado, de la figura también se observa que *Lacticaseibacillus casei* 01 no fue capaz de crecer en los medios conteniendo los polisacáridos, ya que la DO alcanzada es similar a la DO del medio sin azúcar.

Estos resultados correlacionan con la medida de pH. El pH de los medios sin inocular fue de 7,5. Al final de la incubación, solo el medio con glucosa alcanzó un pH de 6,5. Mientras que los demás medios alcanzaron un pH de 7. Esto está en concordancia con los datos de DO y estaría indicando que el *Lacticaseibacillus casei* 01 no produjo ácidos a partir de los polisacáridos. En el medio con glucosa la acidificación fue escasa. Sería necesario comprobar la cantidad de ácido láctico mediante técnicas con mayor sensibilidad, por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En la Figura 14 se muestra el número de microorganismos viables en los diferentes medios luego de 24 hs de incubación a 37 °C. Como puede observarse, el medio en el cual hubo mayor desarrollo fue el medio con glucosa (barra color roja), como era de esperar. Por el contrario, el medio sin azúcar (barra color celeste) fue el control negativo. Se encontró que los microorganismos crecieron de manera diferente en los medios conteniendo los distintos polisacáridos.

El medio conteniendo kefirán (barra color gris) mostro un crecimiento de los *Lacticaseibacillus casei* 01 similar al medio con glucosa. El medio con dextranos (barra color verde) presentó un crecimiento ligeramente menor al medio sin azúcar. El medio con β - glucanos (barra color naranja) fue el que presentó menor desarrollo. Estos resultados están en concordancia con los datos de DO mostrados en la figura anterior (Figura 13). Excepto en el caso del kefirán, que por DO dio un bajo desarrollo de microorganismos y por recuento en placa dio un número mayor. Estos experimentos deberían repetirse, incluyendo otras mediciones, como la producción de ácido láctico.



Si bien estos resultados no permiten concluir si los polisacáridos son adecuados para el desarrollo de un alimento synbiótico o no (ya que se necesitan estudios adicionales), según los resultados de recuento de viables en placa (Figura 14) se puede concluir que el kefiran permite el desarrollo de los microorganismos de un modo similar al medio con glucosa y es diferente estadísticamente al medio sin azúcar. Habría que realizar otras pruebas (por ejemplo, evaluar cambio en el peso molecular del polímero mediante HPLC) para verificar si *Lactocaseibacillus casei* 01 consume o no el kefiran. De ese modo se podría evaluar si el kefiran sería o no adecuado para un synbiótico sinérgico de acuerdo con el trabajo consensado de la ISAPP (Swanson *et al.*, 2020).

Por otro lado, en el medio con dextranos, se observó que los microorganismos se mantuvieron en un número similar al medio sin azúcar y diferente estadísticamente del medio con glucosa. Esto indicaría que *Lactocaseibacillus casei* 01 no es capaz de fermentar este polisacárido. En este caso, se podría postular que este polisacárido tendría potencialidad para ser utilizado en un synbiótico complementario, ya que este tipo de alimento funcional está diseñado para que los componentes trabajen de forma independiente para promover un beneficio para la salud, siempre que los componentes cumplan con las respectivas definiciones de probiótico y prebiótico (Swanson *et al.* 2020).

Finalmente, en el medio conteniendo los β -glucanos, se observó el menor desarrollo de microorganismos, con diferencias significativas con respecto al grupo control sin azúcar. Serían necesarios ensayos adicionales para evaluar si estos polisacáridos tienen actividad inhibitoria.

5.3 Relevamiento de donantes y análisis de encuesta

La difusión de la encuesta de donantes de la zona CABA-Florencio Varela-La Plata difundida por redes sociales alcanzó a 163 personas, que respondieron preguntas relativas a hábitos alimenticios y patologías intestinales. La encuesta estaba abierta para ser completada por todas las personas que lo desearan. Si bien fue diseñada con el objetivo de recolectar información sobre personas con algún tipo de patología gastrointestinal (colitis ulcerosa, enfermedad diverticular, pólipos, cáncer de colorrectal, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, constipación, colon irritable, intolerancia a lactosa, gastritis), se incluyeron también (para poder realizar un análisis comparativo) datos proporcionados por individuos sanos sin ningún tipo de patología subyacente.

Las preguntas estuvieron orientadas a recolectar datos sobre: sexo, edad, patología intestinal, hábitos dietarios, consumo de medicamentos y otras sustancias como tabaco y alcohol, realización de actividad física, entre otras. El objetivo de estas preguntas fue recolectar información adicional que pueda ser utilizada para correlacionar con datos relativos a la composición de la microbiota (en etapas posteriores a este trabajo final). Un objetivo adicional de la encuesta fue reclutar individuos que manifestaran su voluntad de donar una muestra de materia fecal para ser incluida en los estudios de este trabajo y de otros, enmarcados en proyectos de investigación del grupo. El 30% de los individuos que respondieron la encuesta manifestaron la voluntad de donar una muestra, el 40% respondió que “tal vez” lo haría, y el 30% restante respondió negativamente. Esto permite contar con una base de datos de personas con patologías intestinales que podrían ser incluidas en estudios sobre microbiota y salud.

De los individuos que completaron la encuesta (de edad media de 38 años y rango de 19 a 79 años) se arribó a los siguientes resultados respecto a la cantidad de individuos con las patologías enumeradas en la Tabla 4. En la Figura 15 se muestra el porcentaje de individuos que padecen diferentes patologías, junto con el porcentaje de individuos sanos.

Tabla 4: prevalencia de diferentes patologías intestinales de los individuos encuestados	
TIPO DE PATOLOGÍAS	N.º DE INDIVIDUOS QUE SUFREN ESA PATOLOGÍA
Diverticulitis	9
Cáncer de colon	2
Colitis ulcerosa	5
Pólipos	2
Otros (sin especificar)	17
Síndrome de intestino irritable	8
Celiaquía	15
Varias patologías gastrointestinales (más de una)	19
Ninguna	86
TOTAL	163

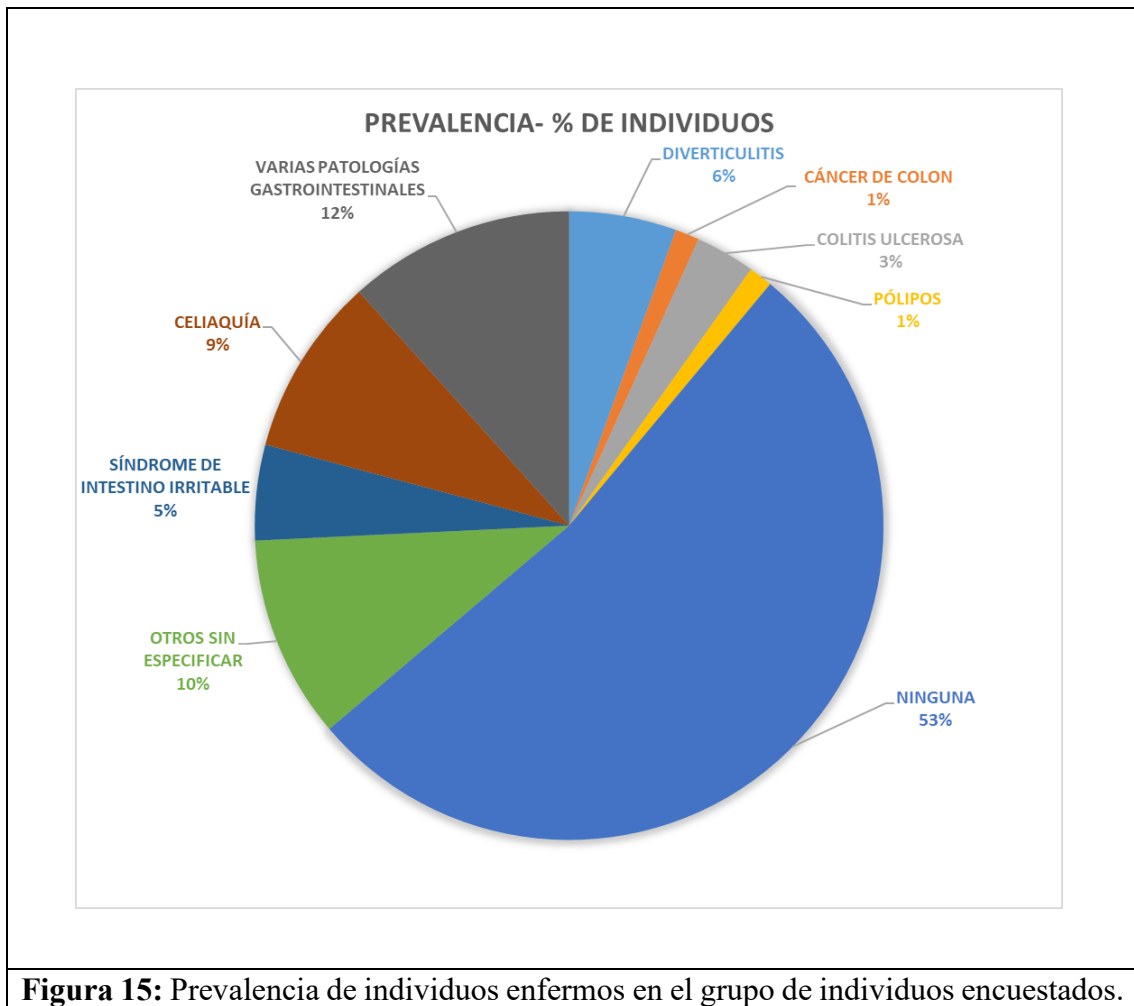


Figura 15: Prevalencia de individuos enfermos en el grupo de individuos encuestados.

A partir de los resultados de la encuesta pudimos observar que, del total de personas que respondieron, el 53 % reconoció no tener ninguna patología intestinal; mientras que el 47 % restante reconoció tener alguna. Dentro del 47 % que manifestó tener alguna patología intestinal, el 10 % de los encuestados respondieron que tenían “otras patologías” (sin especificar cuál), y el 12 % seleccionó más de una opción (ej: pólipos intestinales y cáncer de colon; gastritis y síndrome de intestino irritable; diverticulitis y enfermedad celíaca, etc.). Dentro del grupo restante (es decir, el 25% con una sola patología) las patologías con mayor prevalencia podemos mencionar la enfermedad celíaca (9 %), diverticulitis (6 %), síndrome de intestino irritable (5 %), colitis ulcerosa (3 %). Cáncer de colon (1 %) y pólipos intestinales (1 %) fueron las patologías con menos prevalencia dentro de los encuestados. Estos porcentajes corresponden a la cantidad de individuos que padecen alguna de estas enfermedades calculado sobre el total de individuos encuestados (n=163).

Se obtuvieron datos relevantes en cuanto a dieta, actividad física, consumo de medicamentos y otras sustancias que pudiesen afectar la microbiota intestinal. Más del 50 % reconoció no consumir probióticos o desconocer si los consume; el 50 % restante consume productos fermentados y se detectó confusión entre el concepto de probióticos con alimentos lácteos. Otros datos relevantes corresponden a ritmo evacuatorio y características de las heces.

La realización de esta encuesta permitió conocer la situación de la población regional en cuanto al padecimiento de enfermedades intestinales, indagar sobre la relación entre estas patologías y hábitos de vida, y disponer de un banco de donantes dispuestos a colaborar con muestras para realizar las fermentaciones *in vitro* en proyectos de investigación en curso. De las personas que completaron la encuesta, se seleccionaron 8 individuos que fueron incluidos en los estudios que se detallan a continuación.

5.4 Selección de donantes para la inclusión en el estudio y evaluación del perfil de ácidos orgánicos en materia fecal inicial.

Se seleccionaron 8 donantes, de los cuales 3 eran individuos control que no presentaban ningún tipo de patología gastrointestinal y 5 eran individuos que padecían afecciones gastrointestinales (colitis ulcerosa) y patologías preneoplásicas (pólipos intestinales).

Los individuos control sin patologías, fueron nombrados como individuo 1 (individuo de 1 año de edad, masculino), individuo 2 (individuo de 38 años, femenino), individuo 3 (individuo de 48 años, femenino) y entre los individuos con patologías gastrointestinales, fueron nombrados como individuo 4 (individuo de 43 años, femenino, con pólipos intestinales, síndrome de intestino irritable y displasia de colon), individuo 5 (individuo de 50 años, femenino, con pólipos intestinales), individuo 6 (individuo de 59 años, femenino, con pólipos intestinales), individuo 7 (individuo de 47 años, masculino, con colitis ulcerosa), individuo 8 (individuo de 45 años, femenino, con diverticulitis y sospecha de colitis ulcerosa).

En estos individuos se relevó en primera instancia las patologías asociadas, el consumo de carnes, fibras e hidratos de carbono. También se recabaron datos sobre realización de actividad física y consumo de probióticos. Se verificó que no hayan consumido antibióticos en los 6 meses previos al estudio. Los resultados se reflejan en la Tabla 5.

TABLA 5: Datos obtenidos de la encuesta realizada por los individuos (n=8) incluidos en el presente estudio.								
Abreviaturas: SII: síndrome de intestino irritable; Divert: diverticulitis								
INDIVIDUOS								
	1	2	3	4	5	6	7	8
EDAD (años)	1	38	48	43	50	59	47	45
PATOLOGIA	ninguna	ninguna	ninguna	pólipos / SII/ adenoma con displasia de colon	pólipos	pólipos intestinales	colitis ulcerosa	Divert/ Sospecha de colitis ulcerosa
HABITOS DE CONSUMO DE ALIMENTOS (días / semana)								
FRUTAS	6-7	3-5	6-7	6-7	6-7	6-7	2	2
CARNES	3-5	3-5	2	NO	2	3-5	3-5	3-5
FIBRAS	6-7	3-5	6-7	6-7	6-7	3-5	2	3-5
HIDRATOS de CARBONO	6-7	3-5	3-5	3-5	3-5	3-5	6-7	3-5
PROBIÓTICOS	SI	NO	NO	NO	SI	SI	NO	NO

Como puede observarse en la Tabla 5, y con respecto a los hábitos alimenticios, encontramos variedad en las respuestas. Con respecto al consumo de frutas y verduras, el 62,5 % de los individuos consumen frutas y verduras de 6 a 7 veces por semana. El 25 % lo hace 2 veces por semana o menos. Y el 12.5 % lo hace de 3 a 5 veces por semana. Con respecto al consumo de carnes, el 62,5 % de los individuos consumen carnes de 3 a 5 veces por semana. El 25 % lo hace 2 veces por semana o menos. Y el 12.5 % (que representa a un solo individuo) no consume. Con respecto al consumo de fibras, el 50 % de los individuos consumen hidratos de 6 a 7 veces por semana. El 37.5 % lo hace de 3 a 5 veces por semana y el 12.5 % (un individuo) lo hace 2 veces por semana o menos. Con respecto al consumo de hidratos de carbono, el 75 % de los individuos consumen fibras de 3 a 5 veces por semana y el 25 % lo hace de 6 a 7 veces por semana. Con respecto al consumo de probióticos, el 63 % consume probióticos y un 37 % no los consume. Los gráficos de tortas que representan estos porcentajes se encuentran en el material ANEXO C. Estos resultados son relevantes ya que nos permiten conocer los hábitos dietarios de las personas incluidas en el estudio, y nos permitirían correlacionar los resultados en etapas posteriores, una vez caracterizada la microbiota mediante secuenciación.

Contenido de ácidos orgánicos en la materia fecal inicial

Se evaluó mediante cromatografía gaseosa (CG) el contenido de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) así como el contenido de los ácidos de cadena corta ramificados (BCFA). Para ello, se realizaron en primera instancia, curvas de calibración de los ácidos con patrones comerciales y se estableció la correlación entre área y concentración, utilizando la ecuación de la recta. Esto se realizó para los ácidos grasos de cadena corta: acético, propiónico, butírico, valérico, y para los ramificados: isobutírico, isovalérico. Se muestra en la Figura 16 a modo de ejemplo, la curva de calibración correspondiente al ácido butírico.

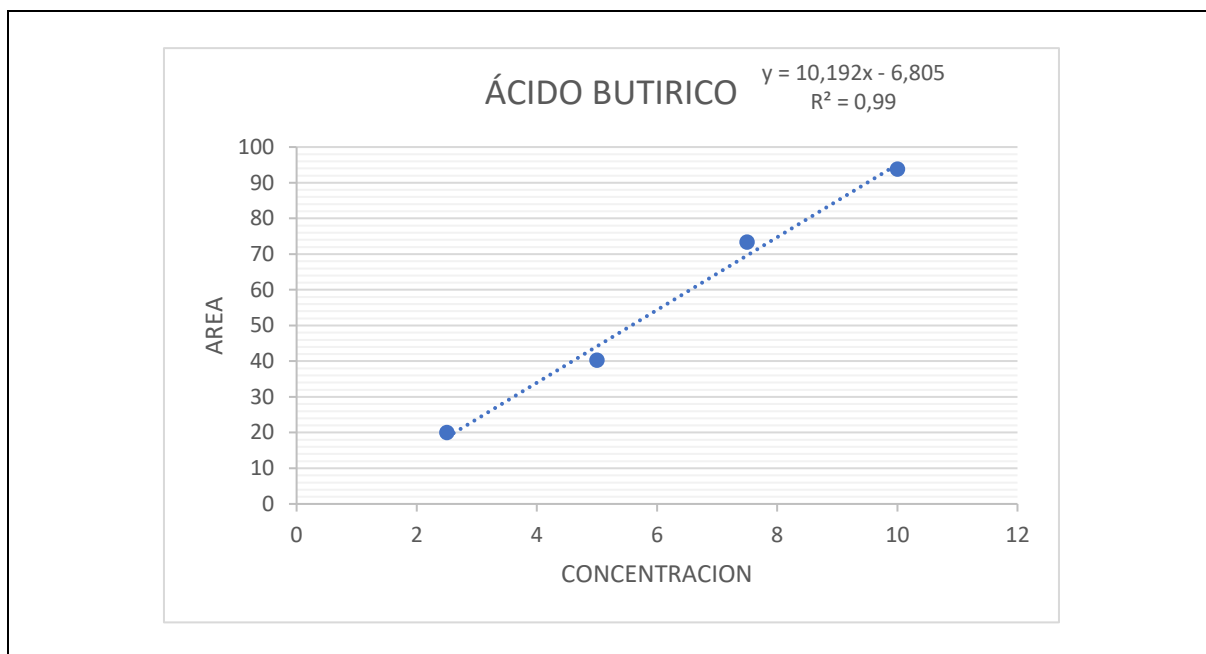


Figura 16: Curva de calibración del ácido butírico. Área de los picos en función de la concentración para las curvas de calibración correspondiente al ácido butírico. Se muestra la ecuación correspondiente al ajuste de los puntos experimentales a una recta y el coeficiente de correlación (R^2) de dicha regresión lineal.

Las muestras de materia fecal diluidas 1/10 (p/v) en medio Al Tamimi fueron centrifugadas y filtradas. Luego, se cuantificaron los ácidos: acético, propiónico, butírico en todas las muestras de materia fecal de los individuos incluidos en el estudio (n=8). También, se evaluó el contenido de ácidos ramificados BCFA (isobutírico e isovalérico) y el contenido de ácido valérico. En la Tabla 6 se muestran las cantidades de ácidos presentes en materia fecal.

Tabla 6: Cantidades de ácidos presentes en materia fecal por individuo.							
INDIVIDUOS		PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS EN MATERIA FECAL INICIAL mM					
		ACÉTICO	PROPIÓNICO	ISOBUTÍRICO	BUTÍRICO	ISOVALÉRICO	VALÉRICO
SANO	1	23	++++	-	-	-	++
SANO	2	9,2	+	-	-	-	n/d
SANO	3	6,4	++++	-	-	-	++
POLIPOS	4	6,6	++++	+	+	-	+
POLIPOS	5	7,7	++++	++	+	-	+
POLIPOS	6	12,2	+++	-	++	-	+
COLITIS ULCEROSA	7	15,2	++++	+	++++	++	+
SOSPECHA DE CU	8	27,8	++++	+	++++	+++	++

Referencias:

- : 0; +: 0-1 mM; ++: 1-2 mM; +++: 2-3 mM; ++++: 3-4 mM; +++++ 4 o más mM; n/d: no determinado.

En el caso del ácido acético, que presentó mayor concentración, se utilizaron directamente los valores sin símbolos.

Se puede observar que las muestras de materia fecal contienen diferente proporción de ácidos grasos de cadena corta y de cadena ramificada, observándose que entre estas muestras el contenido de ácido acético fue mayoritario en todos los individuos respecto a los demás ácidos, seguido por el ácido propiónico, el cual también se observa en una gran proporción en todos los individuos evaluados. El ácido butírico fue minoritario, y llamativamente no estuvo presente en la materia fecal de los tres individuos sanos.

Esta proporción de ácidos está en concordancia con lo descrito en la bibliografía, así como también las variaciones entre los individuos (den Besten *et al.*, 2013), las cuales a su vez están relacionadas con la diferente microbiota (Kolodziejczyk *et al.*, 2019; Hamet *et al.*, 2016). La producción de ácidos en el colon tiene relación directa no solo con la microbiota sino también con la última ingesta que realizó el individuo en estudio. Por ejemplo, la ausencia de propionato o butirato podría estar relacionada con tiempos de ayunos cortos antes de la deposición (pregunta no incluida en la encuesta), ya que las vías metabólicas que conducen a la síntesis de estos ácidos no han sido cumplidas en su totalidad (den Besten *et al.*, 2013).

Por su parte, los BCFA fueron minoritarios, pero en algún caso su concentración fue alta. Por ejemplo, la cantidad de ácido valérico encontrada en la materia fecal de algunos individuos fue elevada (individuo 1 y 8), y la cantidad de ácido isovalérico fue elevada en el individuo 8.

Si bien las cantidades y proporciones de ácidos halladas en la materia fecal de todos los individuos fue diferente, y sería relevante poder contar con datos sobre la composición de la microbiota, se puede encontrar cierto patrón en el tipo y cantidad de ácidos dentro de cada grupo (control, pólipos y colitis ulcerosa). En el próximo ítem se comparan estos perfiles de ácidos. Los pellets conteniendo la microbiota fecal de todos los individuos incluidos en el estudio fueron reservados para identificación de poblaciones microbianas mediante secuenciación masiva en etapas posteriores a este trabajo.

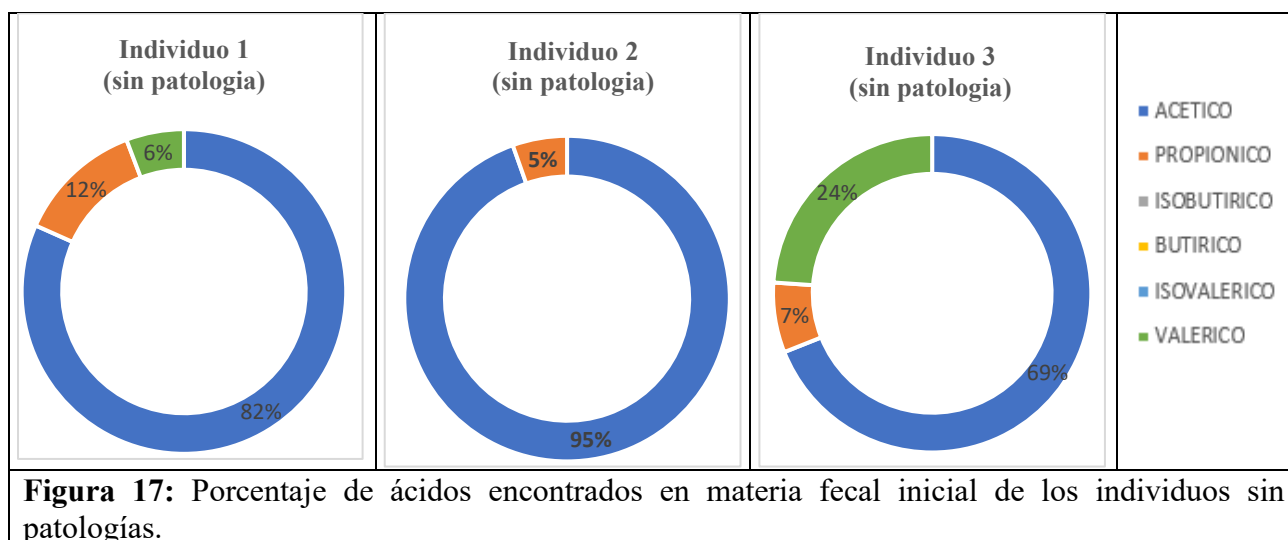
5.5 Fermentación *in vitro* de los polisacáridos

La fermentación de polisacáridos en el colon por parte de la microbiota intestinal genera como producto final ácidos grasos de cadena corta (SCFA): acético, propiónico, butírico y valérico. La microbiota presente en la materia fecal de los 8 individuos produjo diferente proporción de SCFA en el medio conteniendo glucosa como fuente de carbono (control positivo) (datos no mostrados). Esta diversidad de la respuesta en cuanto a la producción de ácidos indica una diversidad en la composición de la microbiota, lo cual fue reportado por varios autores (Hamet *et al.*, 2016; Kolodziejczyk *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2021).

Dada la relevancia del ácido butírico en la salud intestinal y en la prevención de patologías de tipo inflamatorio, en este trabajo se hizo foco en este ácido, y no se muestran los resultados relativos a los otros ácidos. Los individuos se agruparon en grupos: CONTROL SIN PATOLOGIAS (n=3), POLIPOS (n=3) y COLITIS ULCEROSA (n=2).

5.5.1 Análisis de la producción de ácido butírico por la microbiota intestinal perteneciente a los individuos sin patologías (individuos 1 a 3)

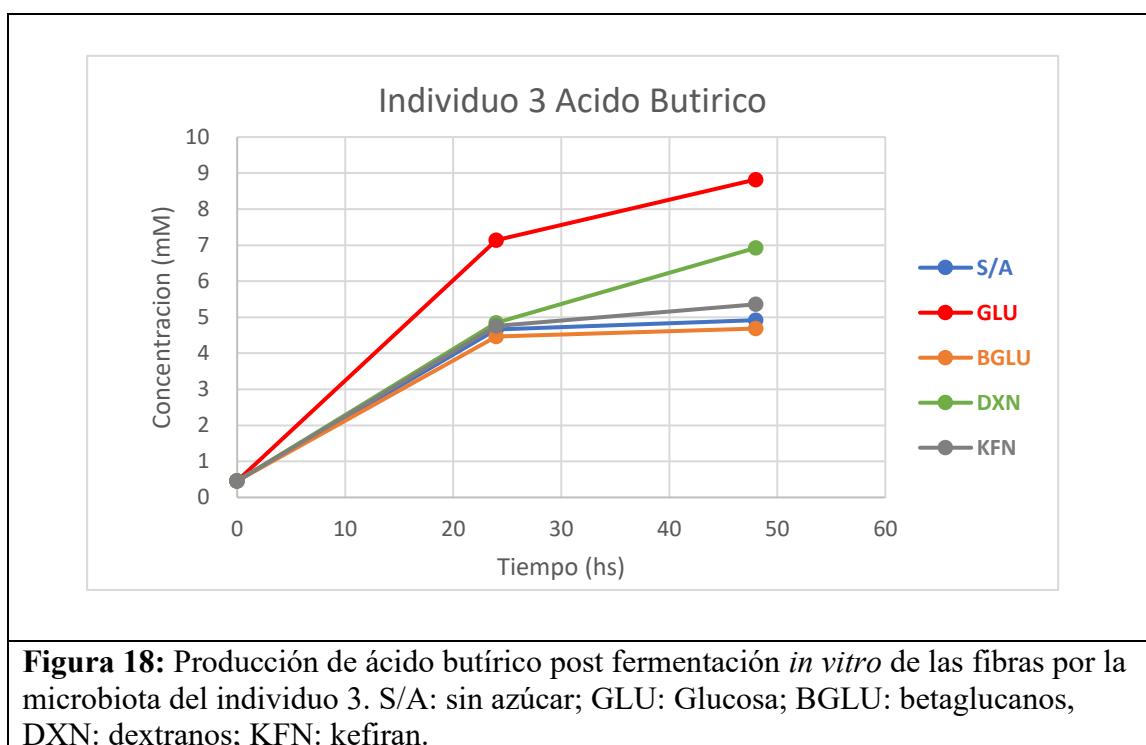
Tal como se mostró en la Tabla 6 en la sección anterior, se encontró diversidad en la proporción de ácidos orgánicos en microbiota intestinal presente en la materia fecal inicial de todos los individuos. Sin embargo, si se comparan los perfiles de los tres individuos incluidos en el grupo control (sin patología), se puede observar que, en los tres casos, el ácido acético fue mayoritario (rango: 70-95 %). En la materia fecal de los tres individuos se encontró ácido propiónico (rango 5-12 %). Dos de ellos presentaron ácido valérico (6 % en el individuo 1 y 24 % en el individuo 3). No se encontró ácido butírico en ninguna de las tres muestras de materia fecal.



Se realizaron las fermentaciones *in vitro* de los medios conteniendo los diferentes polisacáridos utilizando la materia fecal de los tres individuos por separado. Se pudieron analizar únicamente los resultados de las fermentaciones correspondientes a la microbiota del individuo 3 de este grupo, por motivos relacionados con el funcionamiento del cromatógrafo gaseoso en el lugar donde se desarrolló el trabajo final. Dichas muestras (fermentaciones realizadas con la microbiota intestinal de los individuos 1 y 2) quedan pendientes para etapas posteriores a la presentación de este trabajo. Por motivos relacionados con la demanda del uso del cromatógrafo gaseoso, los duplicados y triplicados

de las condiciones del ensayo no pudieron ser analizados, sino que se pudo pasar una muestra de cada condición, como para tener un resultado estimativo y seleccionar las condiciones para las cuales se puedan pasar las muestras por triplicado. En la experiencia del grupo, las variaciones entre las muestras no son significativas, y expresamos en este trabajo final los resultados como una tendencia.

Con respecto a las fermentaciones realizadas con la microbiota intestinal del individuo 3 y a la producción de ácido butírico encontramos que la microbiota de este individuo produjo a las 48 hs de fermentación, mayor cantidad de butirato (9 mM) en el medio con glucosa (control positivo) y, en segundo lugar, en el medio conteniendo **dextranos** como fuente de carbono (7 mM) (Figura 18). Estos valores están dentro del rango de lo que fue reportado por otros autores (den Besten *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2021) o en el mismo grupo de trabajo (Medrano *et al.*, 2020). En particular, el ácido butírico se observa a tiempos largos de fermentación (48 hs) (den Besten *et al.*, 2013).



Hace un tiempo se comenzó a utilizar la clasificación de individuos que “responden” e individuos que “no responden” al consumo de fibra. En el caso de los individuos que “no responden” se ha descrito que su microbiota no se ve afectada por el consumo de una determinada fibra y que no muestran una respuesta específica. Esta clasificación fue demostrada claramente en un estudio, donde se observaron las respuestas postprandiales individualizadas luego de ingestas de prueba estandarizadas en 1000 individuos, incluidos gemelos y sus familiares (Berry *et al.* 2020). Desde ese estudio, muchos estudios científicos han utilizado esta clasificación (Kolodziejczyk *et al.*, 2021; Kok *et al.*, 2023). Según esto, la microbiota del individuo 3 se podría clasificar como “respondedora” a los dextranos, al menos en cuanto a la producción de butirato.

En el medio conteniendo kefiran y en el medio conteniendo β -glucanos, no se observaron diferencias con respecto a la producción de ácido butírico en comparación con el medio sin azúcar (control negativo). Por lo tanto, dados estos resultados, se podría decir que, en el caso de este individuo, la microbiota intestinal respondió de manera diferente a los tres polisacáridos. Mientras que β -glucanos

y kefiran no presentaron diferencias con respecto al control sin azúcar, los dextranos fue el polisacárido que indujo la mayor producción de ácido butírico, solo superado por el control positivo con glucosa. Cabe mencionar que en estudios previos realizados en el grupo de trabajo, el kefiran fue capaz de estimular la producción de butirato por parte de la microbiota de algunos individuos sanos (niños de dieta omnívora), aunque no de todos (Medrano *et al.*, 2020).

5.5.2 Análisis de la producción de ácido butírico por la microbiota intestinal perteneciente a los individuos con pólipos o adenomas (individuos 4, 5 y 6)

En la Tabla 6 en la sección anterior, se mostró la cantidad de ácidos presentes en materia fecal de todos los individuos. Si se analiza el porcentaje de ácidos presentes en la materia fecal inicial de los individuos de este grupo que presentan pólipos y adenomas, se puede observar que el perfil de ácidos fue diferente al grupo control sin patologías. En la Figura 19 se muestran los porcentajes de cada uno de los ácidos en materia fecal inicial. En este caso, si bien el ácido acético continuó siendo el mayoritario (rango 50-70 %), el ácido propiónico se encontró en concentraciones elevadas (30-40 %). Se encontró ácido butírico (4 a 6 %). Y se encontró ácido isobutírico en la materia fecal de dos de los individuos (8 %).

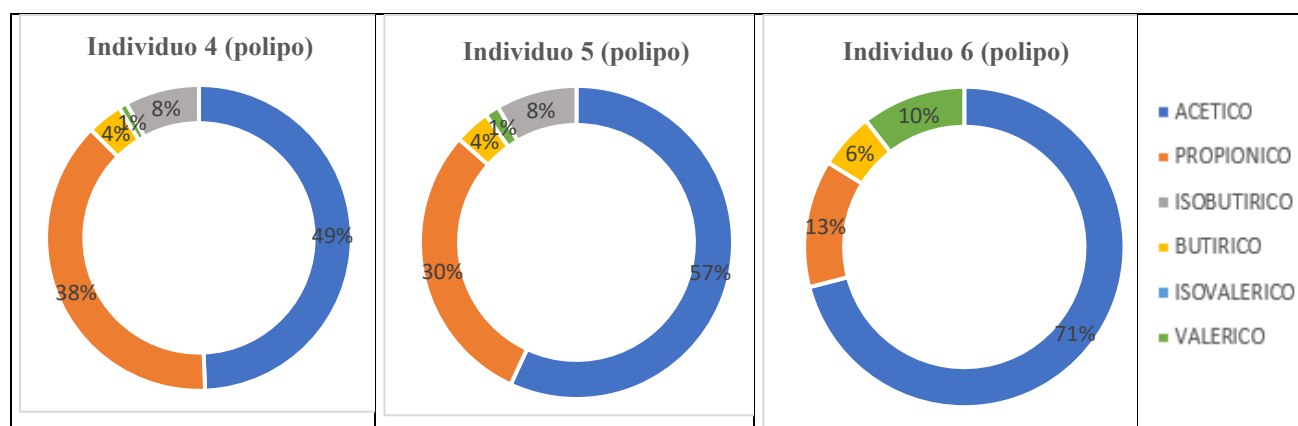


Figura 19: Porcentaje de ácidos encontrados en materia fecal inicial de los individuos con pólipos intestinales.

La presencia de ácido butírico en heces de individuos con una patología intestinal inflamatoria podría resultar llamativa, siendo que este ácido está asociado a la buena salud intestinal. Sin embargo, el incremento de este ácido en pacientes con pólipos y adenocarcinoma de colon fue descrita por otros autores (Chen *et al.*, 2021).

La presencia de ácido isobutírico en la materia fecal de este grupo de individuos con pólipos estaría en concordancia con los autores que sostienen que la presencia de estos ácidos en la materia fecal están relacionados con patologías intestinales (Sakurazawa y Ohkusa, 2005; Verbeke *et al.*, 2015).

Con respecto a los ensayos de fermentación, en este grupo fue posible estudiar la fermentación *in vitro* de los individuos 4 y 5, quedando para etapas posteriores el análisis de los datos relativos a la fermentación por parte de la microbiota intestinal perteneciente al individuo 6. Se pudo observar que la producción de ácido butírico por parte de la microbiota intestinal perteneciente al individuo 4 produjo la mayor cantidad de ácido butírico en el medio con glucosa (control positivo) a las 24 hs (6 mM). Luego, a las 48 hs, todas las condiciones resultaron en la misma situación (5 mM) (Figura 20).

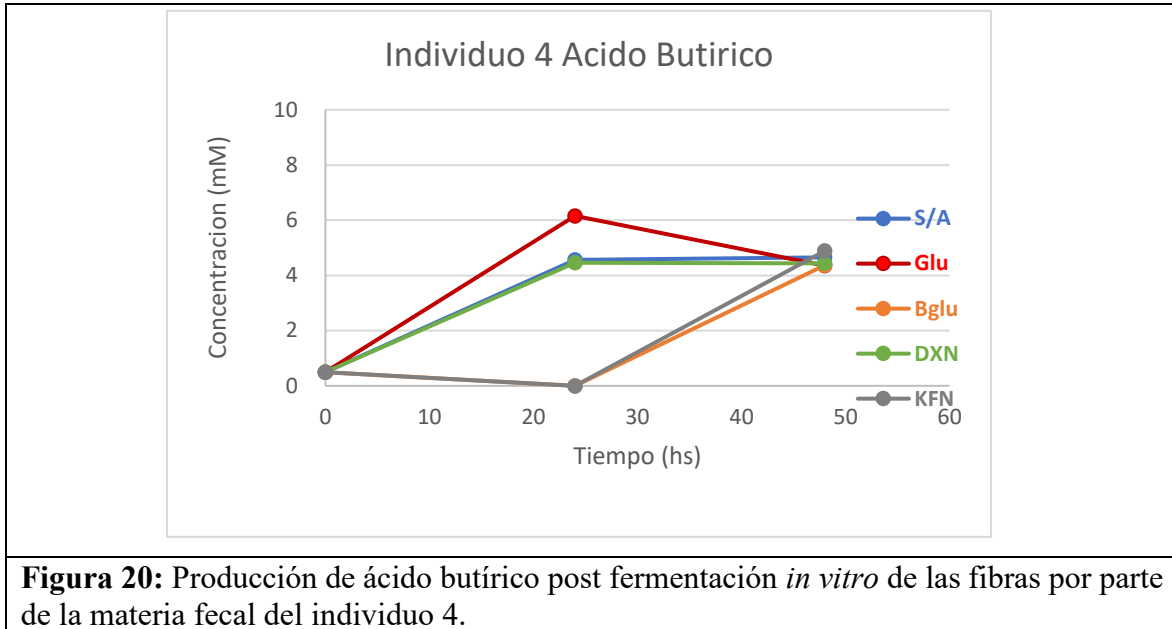


Figura 20: Producción de ácido butírico post fermentación *in vitro* de las fibras por parte de la materia fecal del individuo 4.

De acuerdo con la clasificación de individuos “respondedores y no respondedores” mencionada anteriormente, podría clasificarse a este individuo como “no respondedor” ya que su microbiota intestinal no responde produciendo butirato a ninguna fibra. Eso podría relacionarse con una baja diversidad de microorganismos productores de butirato asociado a la disbiosis (Duncan *et al.*, 2004; Iebba *et al.*, 2016; Zang *et al.*, 2015).

Con respecto a la fermentación *in vitro* de las fibras por parte de la microbiota intestinal presente en la materia fecal del individuo 5 ocurrió una situación similar como puede observarse en la Figura 21. La microbiota intestinal perteneciente al individuo 5 produjo la misma cantidad de ácido butírico en el medio con glucosa (control positivo) a las 24 hs (4 mM). Luego, a las 48 hs, todas las condiciones resultaron en la misma situación (5 mM) (Figura 21). Podría pensarse que la microbiota intestinal de este individuo no responde a ninguna fibra para la producción de este ácido. De acuerdo con esto, podría clasificarse a este individuo como “no respondedor” ya que la microbiota de este individuo no se vería afectada con el consumo de ningunas de las fibras utilizadas.

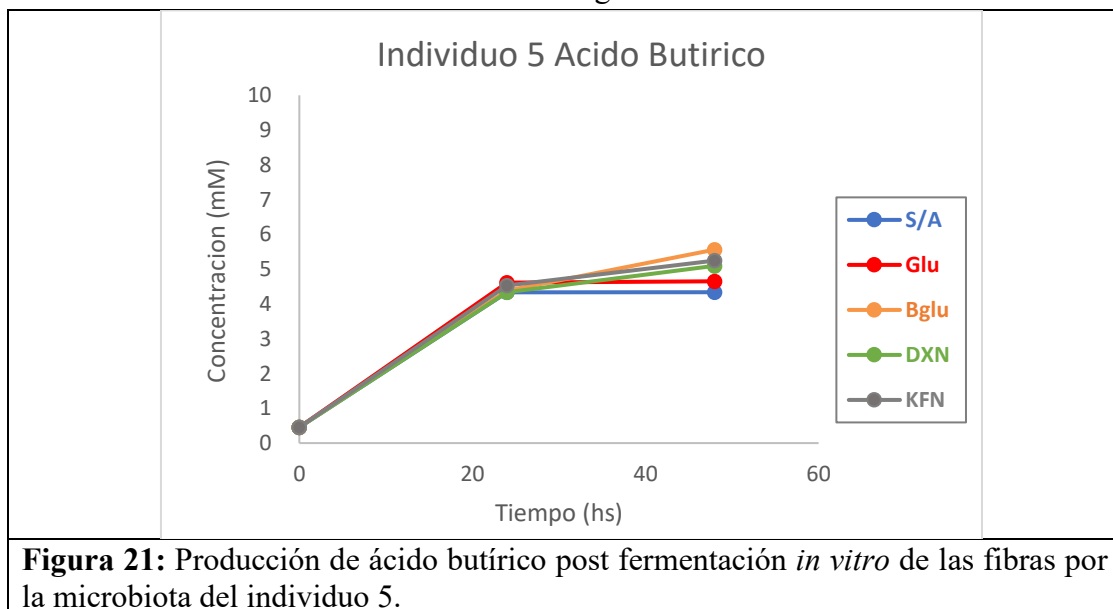


Figura 21: Producción de ácido butírico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 5.

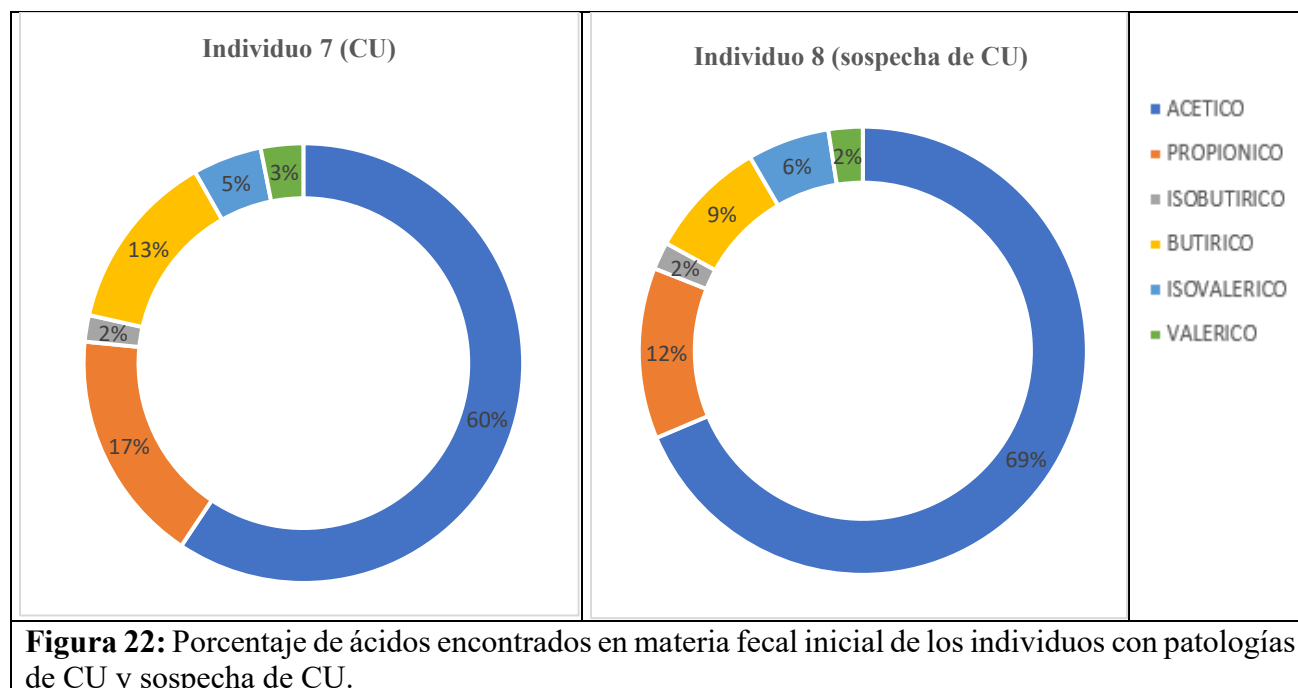
Teniendo en cuenta la patología de base de estas personas, los resultados pueden relacionarse con una microbiota deficiente en bacterias productoras de butirato, lo cual lleva a estados inflamatorios y pólipos y cáncer. Dentro de las poblaciones de microorganismos productores de butirato se encuentran representantes de la familia *Ruminococcaceae* y del género *Roseburia* (Duncan *et al.*, 2004; Farup *et al.*, 2016), *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol *et al.*, 2008) o *Clostridium butyricum* (Chen *et al.*, 2020). La abundancia de estas poblaciones en la microbiota intestinal se correlaciona con el consumo de fibra y con la reducción de la incidencia o probabilidad de padecer enfermedades inflamatorias como cáncer de colon.

En el caso de estos individuos con patología intestinal como pólipos, podría explicarse la ausencia de butirato en los medios fermentados por la baja proporción de microorganismos productores de butirato, y en este sentido, es relevante realizar la secuenciación de las muestras de materia fecal para conocer las poblaciones presentes. La secuenciación de las muestras está prevista para ser realizada en etapas posteriores a este trabajo.

5.5.3 Análisis de la producción de ácido butírico por la microbiota intestinal perteneciente a los individuos con colitis ulcerosa diagnosticada y con sospecha (individuos 7 y 8)

Dos de los individuos incluidos en el estudio tenían como patología colitis ulcerosa (CU) o sospecha de tenerla. De modo interesante, en la materia fecal de estos individuos se encontraron todos los ácidos SCFA y también los BCFA (Figura 22). Este resultado estaría en concordancia con las observaciones previas de otros autores que indican que los BCFA no están relacionados con aspectos positivos para la salud (Kim *et al.*, 2003; Sakurazawa y Ohkusa, 2005; Verbeke *et al.*, 2015).

Por otro lado, es de destacar que estos dos individuos son convivientes. La similitud entre los dos perfiles es notable, y está en concordancia con trabajos que postulan que la transferencia de microbiota entre convivientes es un factor relevante en la composición (Dill-McFarland *et al.*, 2019).



Con respecto a la fermentación de los polisacáridos por parte de las bacterias intestinales de estos individuos, y con respecto a la producción de butirato, se encontró que ninguna fibra fue capaz de estimular su producción ya que todas dan como el control negativo, incluso la glucosa (Figuras 23 y 24).

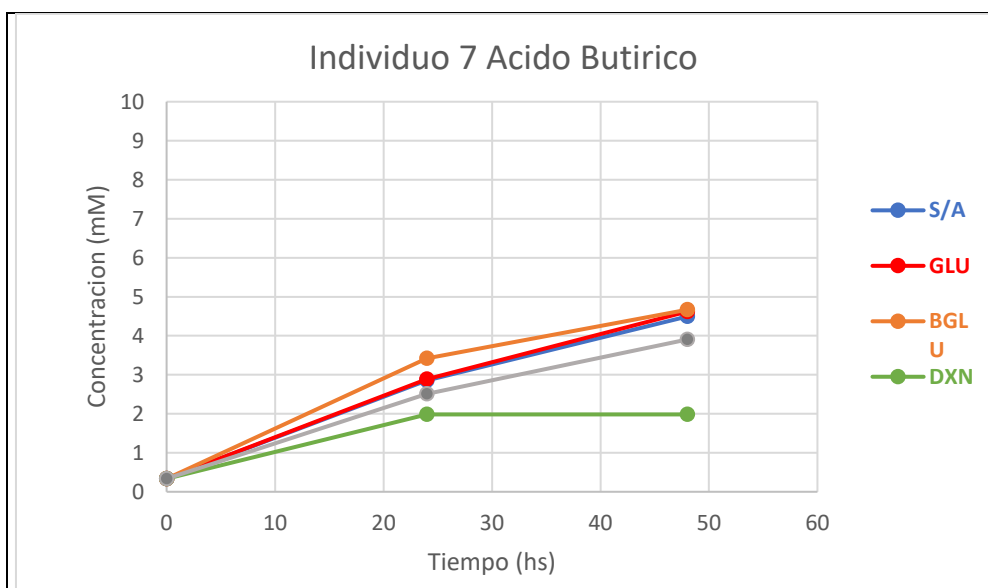


Figura 23: Producción de ácido butírico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 7.

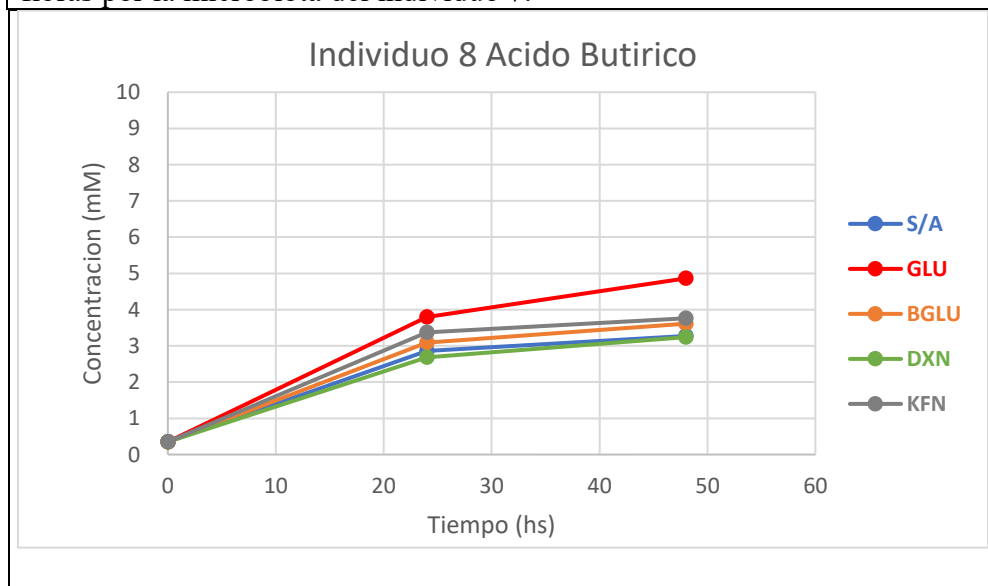


Figura 24: Producción de ácido butírico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 8.

Nuevamente, la microbiota de estos individuos parecería no estar respondiendo al estímulo de fibras en cuanto a la producción de butirato. Esto se correlaciona con lo mencionado anteriormente en el caso de los individuos con adenomas en concordancia con los autores que sostienen que la presencia de estos ácidos en la materia fecal están relacionados con patologías intestinales (Kolodziejczyk *et al.*, 2019; Kok *et al.*, 2023).

Se puede concluir que la microbiota intestinal de los individuos con patologías intestinales de origen inflamatorio (individuos 4 a 8) no fue capaz de producir de butirato con ninguna de las fibras

utilizadas en este estudio. Esto estaría relacionado con los desbalances en la microbiota asociados a estas patologías y a una disminución de las poblaciones de bacterias productoras de butirato (Farup *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2020).

5.6 Producción de ácidos grasos de cadena ramificada *in vitro*

Como se mencionó en la introducción, los ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) resultan de la degradación bacteriana de las proteínas y la fermentación de aminoácidos de cadena ramificada, generando ácidos grasos ramificados como el isobutírico y el isovalérico (Liu *et al.*, 2017). Si bien no hay consenso en la comunidad científica sobre el rol que tienen estos productos de fermentación en la salud del hospedador (Verbeke *et al.*, 2015; Rios-Covian *et al.*, 2020), algunos autores postulan que tienen efectos positivos (Blachier *et al.*, 2007; Taormina *et al.*, 2020; Ran-Ressler *et al.*, 2011), mientras que otros indican que su contenido intestinal se reduce luego de la ingesta de un prebiótico (Aguirre *et al.*, 2016).

En este trabajo se evaluó la producción de ácidos de cadena ramificada (ácido isobutírico y ácido isovalérico) en los medios fermentados conteniendo los polisacáridos en estudio.

En el caso de la microbiota intestinal perteneciente al individuo 3 (sin patología), se encontró que el kefirán fue el polisacárido que incrementó la producción de los dos BCFA (isobutírico e isovalérico) a las 48 hs (Figuras 25 y 26) alcanzando valores de 1,6 mM en el caso del ácido isobutírico y 0,9 mM en el caso del ácido isovalérico. Contrariamente, β -glucanos y dextranos no estimularon producción significativa de estos ácidos.

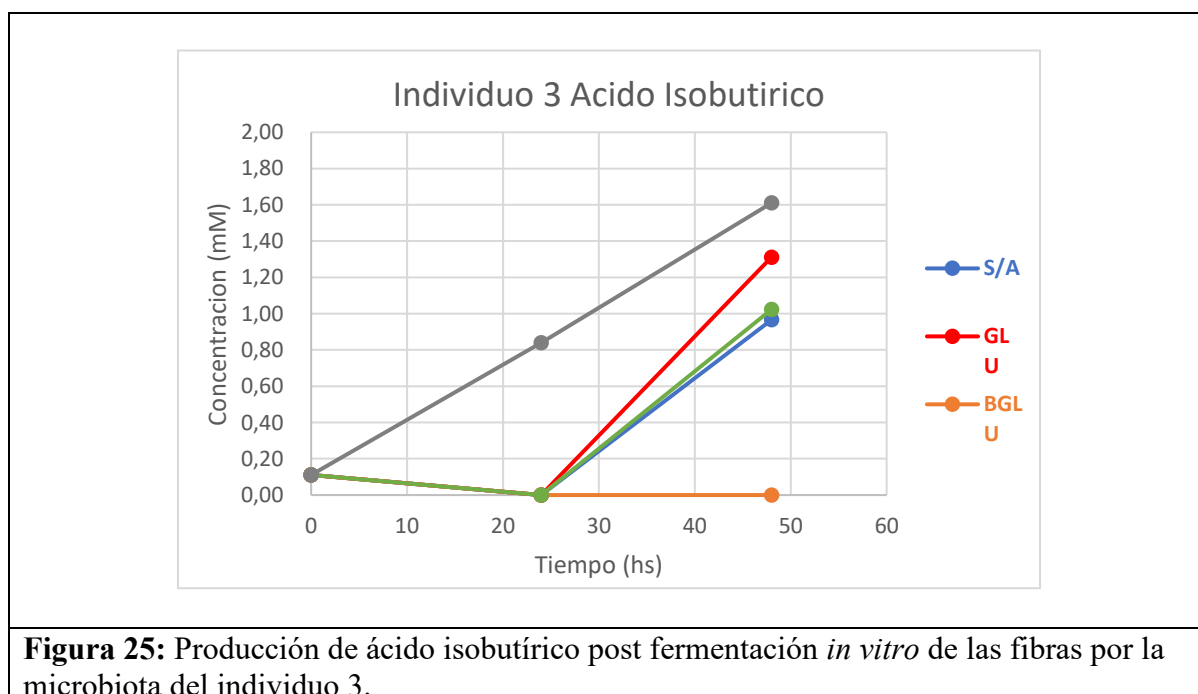
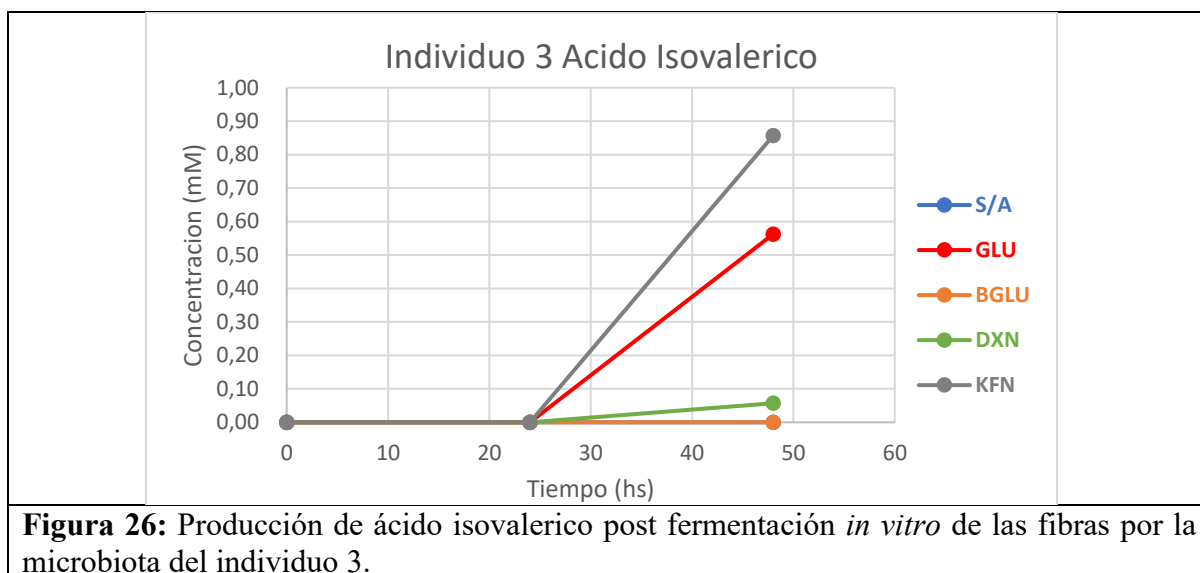


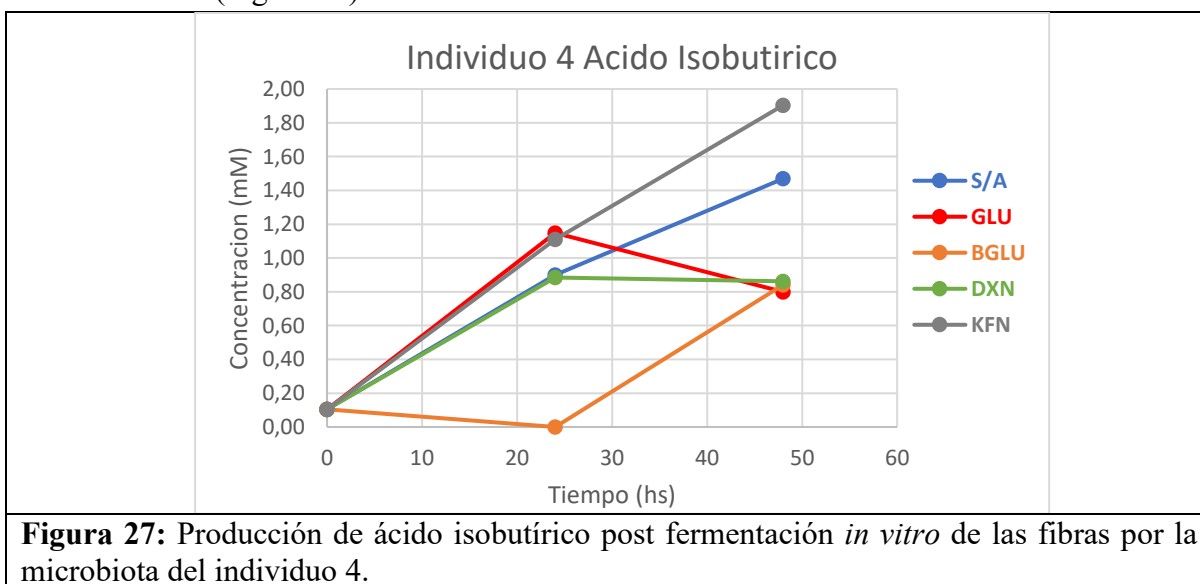
Figura 25: Producción de ácido isobutírico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 3.



Para este individuo entonces se puede afirmar que el kefirán estimula la síntesis de ácidos ramificados (isobutírico e isovalérico). De acuerdo con esto, podría clasificarse a este individuo como “respondedor” al kefirán para la producción de ácidos ramificados.

Si se relaciona este hallazgo con los resultados presentados anteriormente sobre producción de butirato (Figura 18), en los que se había observado que el polisacárido que incrementaba su producción era los dextranos, se puede acordar con el trabajo de [Aguirre et al., \(2016\)](#), quien había propuesto que la producción de BCFA disminuye frente a la fermentación de un prebiótico. En este caso, para el individuo 3, el polisacárido prebiótico sería los dextranos.

En el caso de la microbiota intestinal perteneciente al individuo 4 (con pólipos intestinales), con respecto a los ácidos ramificados se encontró que el kefirán fue el polisacárido que incrementó significativamente la producción del ácido isobutírico a las 48 hs (Figura 27) alcanzando valores de 1,9 mM. En el caso del ácido isovalerico no se produjo con ninguna de las fibras ni con glucosa ni en el medio sin azúcar (Figura 28).



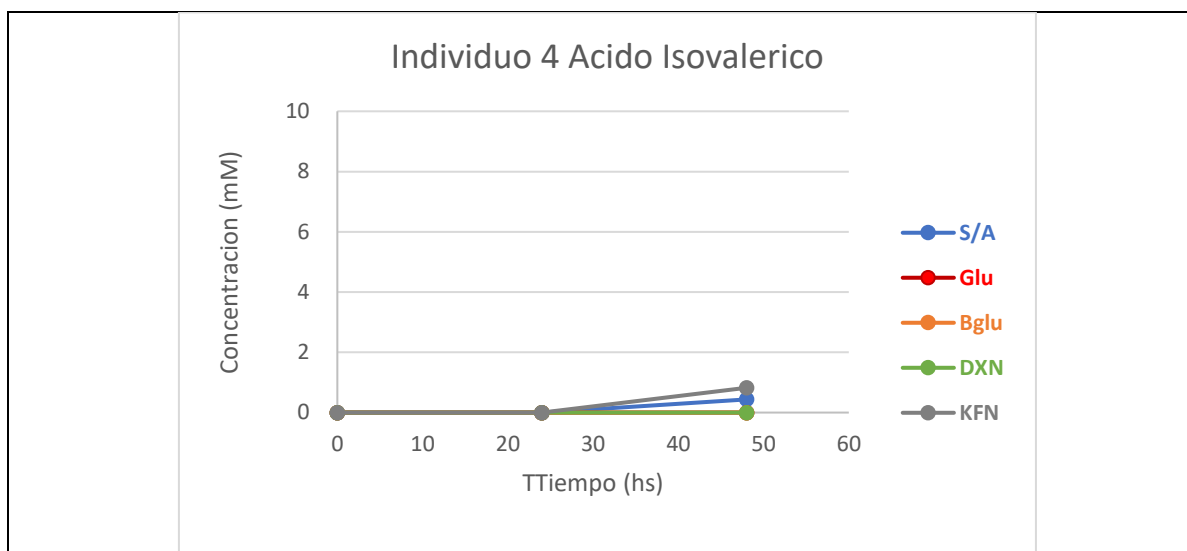


Figura 28: Producción de ácido isovalerico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 4.

Por lo tanto, dados estos resultados, se podría decir que, en el caso de este individuo, la microbiota intestinal respondió de manera diferente a los tres polisacáridos. Mientras que β -glucanos y dextranos no indujeron de manera significativa la producción de estos ácidos, el kefiran fue el polisacárido que indujo la mayor producción de ácido isovalerico, superando el control positivo con glucosa.

En el caso de la microbiota intestinal perteneciente al individuo 5 (con pólipos intestinales), se observó que el ácido isobutírico se incrementó a las 48 hs con β -glucanos, dextranos y kefiran (Figura 29) alcanzando valores de 0.9 Mm mientras que el ácido isovalérico no se vio incrementado con ninguna de las fibras ni con β -glucanos, dextranos ni kefiran (Figuras 29 y 30).

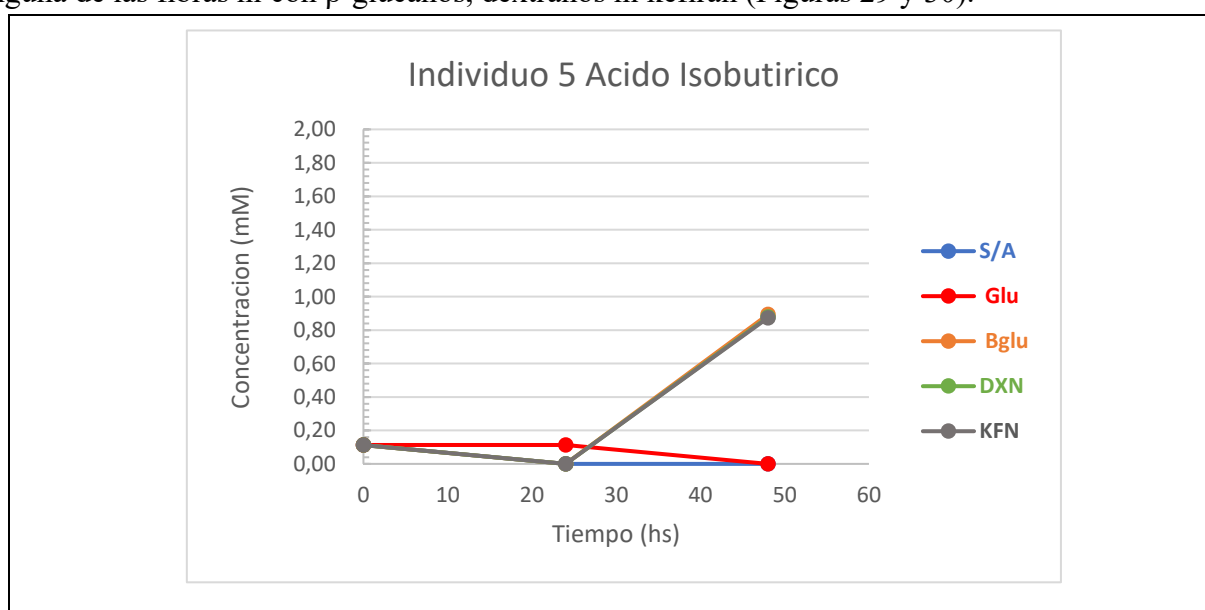


Figura 29: Producción de ácido isobutírico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 5.

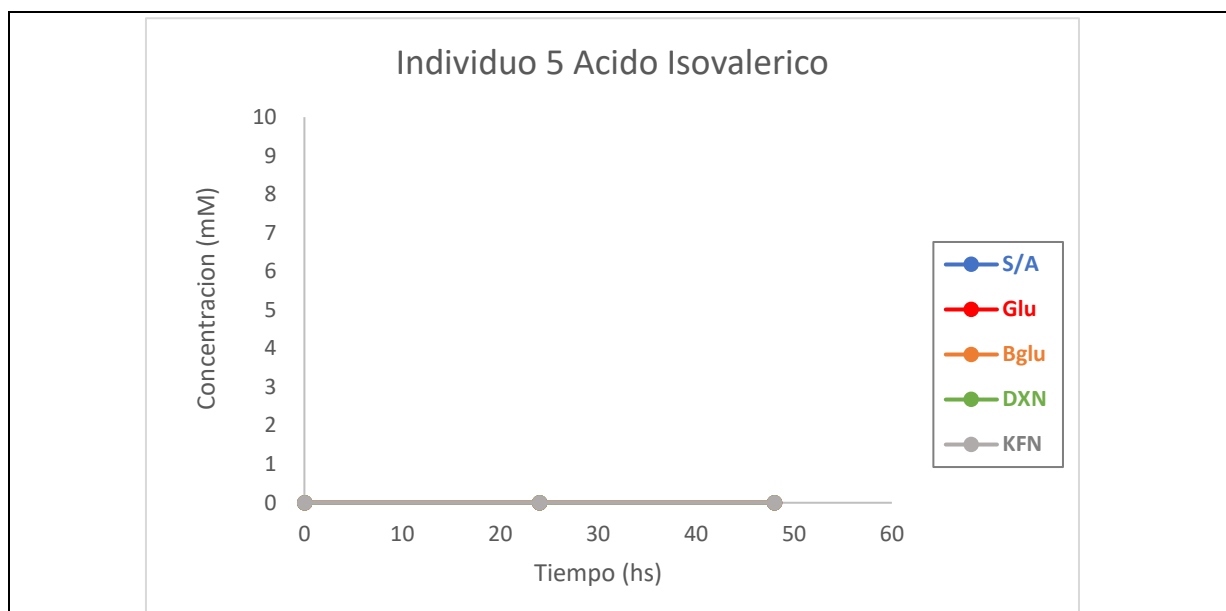


Figura 30: Producción de ácido isovalerico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 5.

Puede concluirse que en estos individuos con pólipos la producción de ácido isobutírico se incrementó con kefiran en el caso del individuo 4 y 5. En el individuo 5 además, los β -glucanos y los dextranos también incrementaron la producción de ácido isobutírico. El ácido isovalerico no se produjo en ningún caso. Estos resultados están en línea con la tendencia a considerar la respuesta individual de la microbiota, ya que un mismo polisacárido (por ejemplo el kefiran) no tiene el mismo efecto en todos los individuos.

Con respecto a la microbiota intestinal perteneciente al individuo 7 (con colitis ulcerosa), se encontró que con los polisacáridos evaluados (β -glucanos, dextranos y el kefiran) incrementan de forma significativa la producción de ácido isobutírico a las 48 hs alcanzando una concentración de 1.0 mM (Figura 31) y de ácido isovalérico alcanzando una concentración de 2.5 mM (Figura 32).

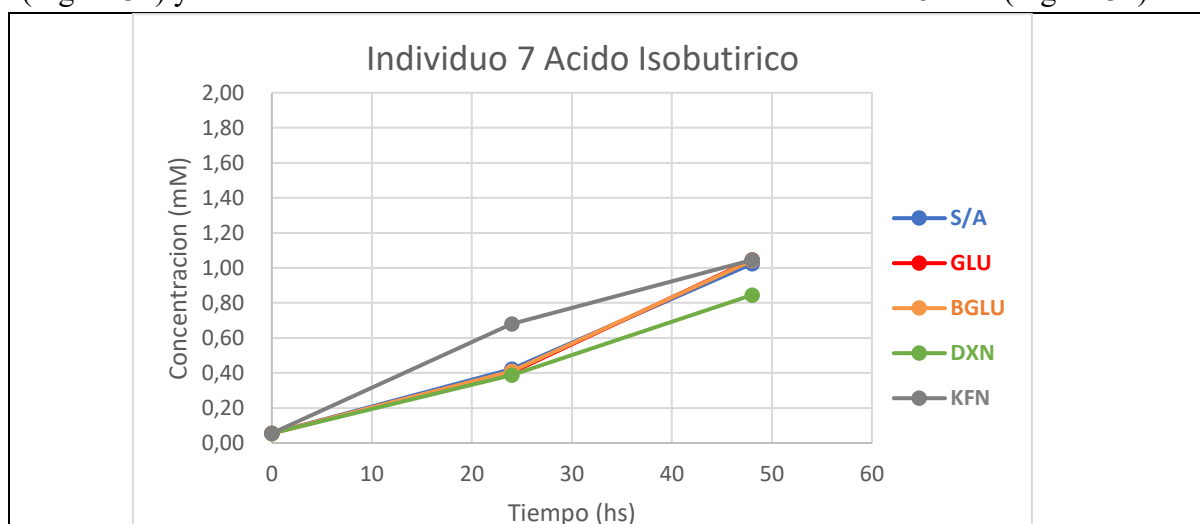


Figura 31: Producción de ácido isobutirico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 7.

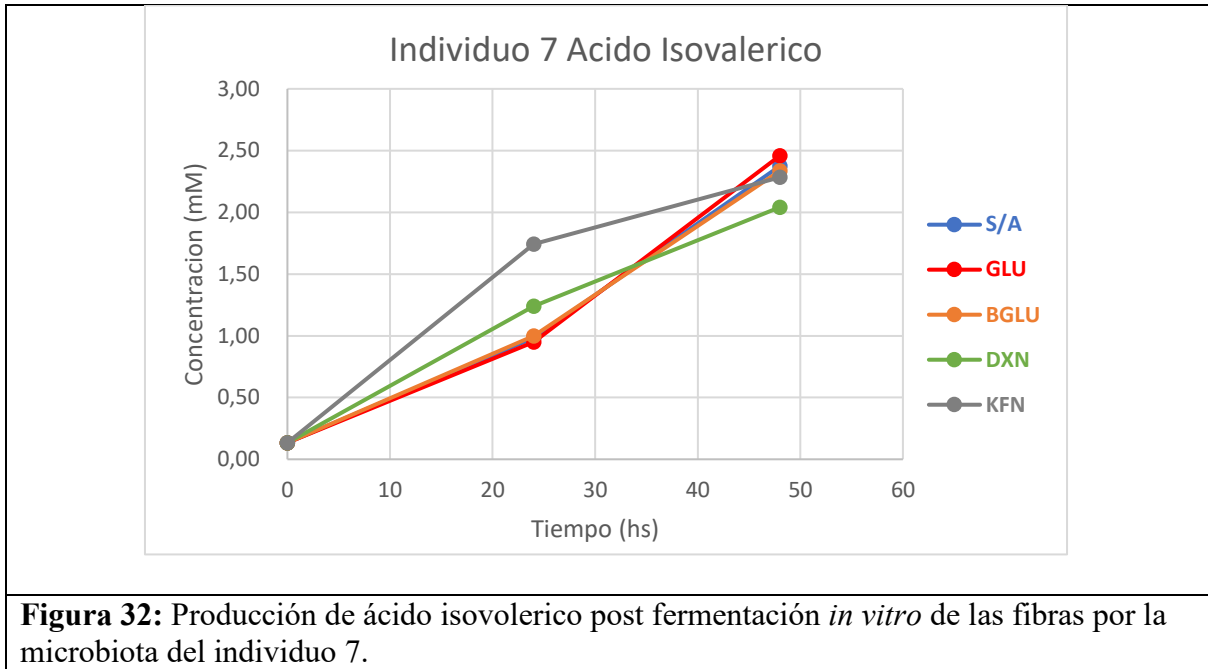


Figura 32: Producción de ácido isovalerico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 7.

Con respecto a la microbiota intestinal perteneciente al individuo 8 (sospecha de colitis ulcerosa), que la producción de ácido isobutírico y ácido isovalerico se comportaron de forma similar a la microbiota intestinal del individuo 7. Se encontró que con los polisacáridos evaluados (β -glucanos, dextranos y kefiran) incrementan de forma significativa la producción de ácido isobutírico a las 48 hs alcanzando una concentración de 1.2 mM (Figura 33). Con respecto al ácido isovalérico se encontró que en todas las condiciones se incrementan de forma significativa la producción de ácido isovalerico a las 48 hs alcanzando una concentración de 2.6 mM (Figura 34).

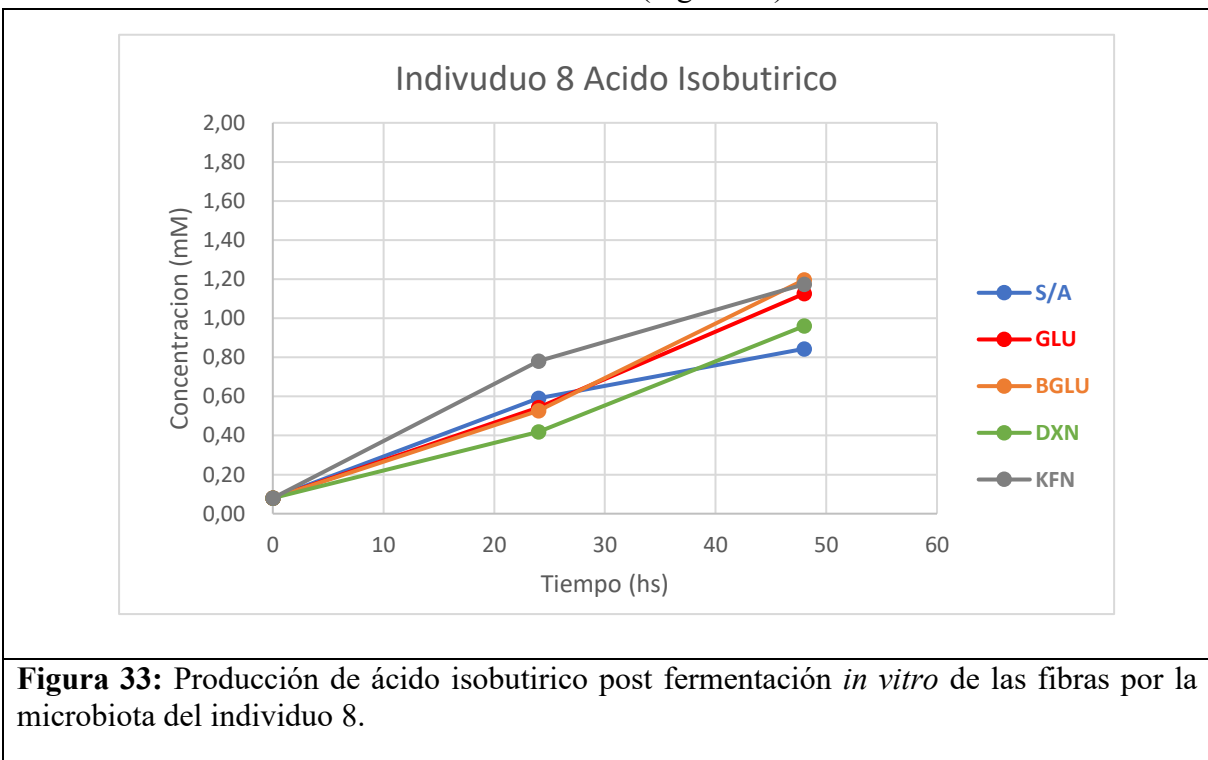
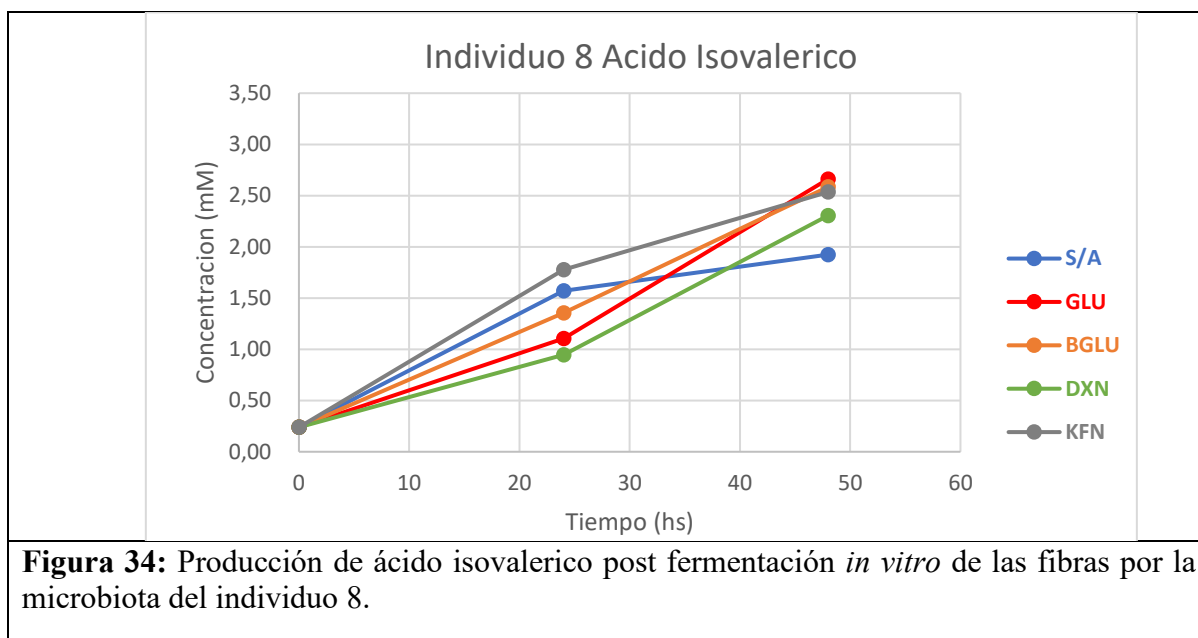


Figura 33: Producción de ácido isobutirico post fermentación *in vitro* de las fibras por la microbiota del individuo 8.



Lo que se pudo observar en este trabajo es que, con respecto al ácido isobutírico, el kefir estimula la síntesis de este ácido, dado que cuando la microbiota intestinal fue sometida a fermentación de este polisacárido produjo mayor cantidad del mismo en los análisis de productos de fermentación pertenecientes a los individuos 3, 4, 5, 7 y 8, siendo en su mayoría individuos con patologías. Además, los β -glucanos y dextranos incrementaron la síntesis del ácido isobutírico en la microbiota perteneciente los individuos 5, 7 y 8 que cursan con patología de pólipos y colitis ulcerosa.

Con respecto al ácido isovalérico, se puede observar el kefir estimula la síntesis de este ácido, dado que cuando la microbiota intestinal de los individuos 3, 7 y 8 fue incubada con este polisacárido, produjo la mayor cantidad de este ácido. Además β -glucanos y dextranos incrementaron la síntesis del ácido isovalérico en las fermentaciones llevadas a cabo por la microbiota perteneciente a los individuos 7 y 8 que cursan con patología de colitis ulcerosa y sospecha de la misma.

Como se mencionó, la presencia de ácidos ramificados, así como su producción por parte de las bacterias intestinales es un tema sobre el cual la comunidad científica aún no ha arribado a un consenso (Rios-Covian et al., 2020). Por un lado, hay autores que postulan que su efecto es positivo mientras que otros postulan que su efecto es negativo.

Si bien no se puede arribar a ninguna tendencia concluyente, estos resultados son importantes ya que es la primera vez que se estudia el efecto de estos polisacáridos en la producción de ácidos ramificados. Por lo tanto, constituye un aporte a la comprensión de este tema controversial, aportando datos claves para el estudio de nuevos conceptos en el contexto de la intervención dietaria. Dado que hoy en día, muchas dietas se van popularizando, es fundamental encontrar estrategias que nos permitan el buen manejo y regulación en la producción de estos ácidos a fin de mejorar nuestra salud, por lo que es importante el conocimiento del impacto en el microbioma intestinal.

Hacen falta más estudios para poder arribar a conclusiones; la identificación de poblaciones bacterianas relevantes es una herramienta que permitirá comprender un poco mejor un sistema tan complejo como es la simulación *in vitro* de la fermentación de varias fibras por parte de la microbiota de varios individuos, algunos de ellos con estados de disbiosis que desencadenan patologías.

6) CONCLUSIONES

En este trabajo se abordó la caracterización de la funcionalidad biológica de tres polisacáridos (kefirán, dextranos y β -glucanos) aislados a partir de subproductos de la industria alimentaria, arribando a las siguientes conclusiones:

- ✓ Se verificó la pureza y características estructurales de estos polisacáridos mediante espectroscopía FTIR, y se comprobó que dichas características coinciden con lo descrito en bibliografía; por lo tanto, se concluye que las metodologías empleadas en el laboratorio para extraer estos polisacáridos son adecuadas.
- ✓ Cuando los polisacáridos se incubaron con una cepa probiótica comercial (*Lactocaseibacillus casei* 01), se encontró que el kefirán permitió el desarrollo de los microorganismos de un modo similar al medio con glucosa (indicando potencialidad para ser utilizado en un synbiótico sinérgico), mientras que en el medio con dextranos no se observó crecimiento (indicando potencialidad para ser utilizado en un synbiótico complementario).
- ✓ En los ensayos de fermentación *in vitro* de los polisacáridos por las bacterias intestinales de los donantes se evaluó la producción de butirato. Se encontró que no todos los polisacáridos estimulan la producción de butirato. En particular, en el caso del control sin patología, únicamente el medio con dextranos incrementó la producción de butirato por las bacterias intestinales. La microbiota de los individuos con patologías no produjo butirato en presencia de ninguno de los polisacáridos, probablemente a causa del estado de disbiosis asociado a la enfermedad.
- ✓ Con respecto a la producción de ácidos ramificados, se pudo observar que el kefirán fue el polisacárido con el cual se produjo mayor cantidad de ácido isobutírico e isovalérico en la mayoría de los casos. Además, se observaron diferencias entre individuos en cuanto a la producción de estos ácidos ramificados.

Los resultados alcanzados luego del cumplimiento de los objetivos de este trabajo final constituyen un aporte a la comprensión de la respuesta individual de la microbiota intestinal frente a un estímulo dietario. La inclusión de donantes de muestras de materia fecal con patologías intestinales de origen inflamatorio es relevante para comparación de la respuesta entre individuos con y sin patologías frente a la administración de un prebiótico.

PERSPECTIVAS

Este trabajo final está enmarcado en un proyecto de investigación radicado en la UNAJ. Los resultados incluidos en este trabajo forman parte de un estudio que abarca un número total de 20 individuos con diferentes patologías intestinales. Concretamente, los resultados obtenidos en el marco de este trabajo final contribuyeron a los resultados correspondientes a los proyectos UNAJ Investiga 2020 y PIO CONICET UNLP UNAJ 2021.

La materia fecal de los donantes reclutados en el marco de este trabajo han contribuido a incrementar el número de muestras analizadas, y se encuentran conservadas a -20 °C con el objeto de extraer el ADN bacteriano y realizar una secuenciación masiva. En este sentido, las muestras serán incluidas en un proyecto de cooperación intencional entre el CIDCA, la UNAJ y la Universidad de Waseda (Japón) cuyos resultados se prevé concretar en octubre 2024.

La evaluación de la producción de ácidos ramificados de cadena corta en relación con prebióticos in vitro ha sido poco explorada hasta la fecha. Los resultados obtenidos en este trabajo resultan novedosos y esta aproximación realizada en este trabajo podrá ser presentada en eventos científicos (4tas Jornadas de Salud Comunitaria o 4tas Jornadas de Investigación UNAJ).

El análisis de espectroscopia FTIR de los polímeros contribuyó al trabajo “POLYSACCHARIDES FROM MILK AND WATER KEFIR GRAINS: COMPARISON OF PREBIOTIC ACTIVITY” (Simonelli, Nicolas, Moreira Natalia, Reymar Martin, Abraham Analía, Medrano Micaela) en preparación para ser enviado al Journal *Food Hydrocolids* con fecha estimada junio 2024.

8) FUENTE DE INFORMACIÓN Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 473-493.
- Aguirre, M., Eck, A., Koenen, M. E., Savelkoul, P. H., Budding, A. E., & Venema, K. (2016). Diet drives quick changes in the metabolic activity and composition of human gut microbiota in a validated in vitro gut model. *Research in microbiology*, 167(2), 114-125.
- Ahmad, A.; F.M. Anjumb, T. Zahoorb, H. Nawazc, Z. Ahmedd (2010). Extraction and characterization of β -d-glucan from oat for industrial utilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46 (2010), pp. 304-309
- Alles, M. S., Katan, M. B., Salemans, J. M., Van Laere, K. M., Gerichhausen, M. J., Rozendaal, M. J., & Nagengast, F. M. (1997). Bacterial fermentation of fructooligosaccharides and resistant starch in patients with an ileal pouch-anal anastomosis. *The American journal of clinical nutrition*, 66(5), 1286-1292.
- Al-Tamimi, MA, Palframan, RJ, Cooper, JM, Gibson, GR, Rastall, RA (2006). In vitro fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *J Appl Microbiol* 100, 407-414.
- Álvarez Calatayud, G., Guarner, F., Requena, T., & Marcos, A. (2018). Dieta y microbiota. Impacto en la salud. *Nutrición hospitalaria*, 35(SPE6), 11-15.
- Balthazar, C. F., Silva, H. L., Esmerino, E. A., Rocha, R. S., Moraes, J., Carmo, M. A., ... & Cruz, A. G. (2018). The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food chemistry*, 246, 464-472.
- Barros, C.P., Guimarães, J.T., Esmerino, E. A., Duarte, M.C.K., Silva, M.C., Silva, R., & Cruz, A. G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current opinion in food science*, 32, 1-8.
- Berry SE, Valdes AM, Drew DA. et al. Human postprandial responses to food and potential for precision nutrition. *Nature medicine*. 2020; 26:964-973.
- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J. F., & Tomé, D. (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino acids*, 33, 547-562.
- Bull, M. J., and Plummer, N. T. (2014). Part 1: the human gut microbiome in health and disease. *Integr. Med. (Encinitas)* 13, 17-22.
- Calderón, O., Padilla, C., Chaves, C., Villalobos, L., & Laura Arias, M. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57(1), 51-56.
- Caruso, A.; Piermaria, J., Abraham, A.; Medrano, M. (2022) Biological activity of β -glucans obtained from beer spent yeast. *food Hydrocolloids*. 133, 107963.
- Ceylan, H.G., Atasoy, A.F. (2023). New bioactive edible packing systems: synbiotic edible films/coatings as carries of probiotics and prebiotics. *Food and Bioprocess Technology*, 16(7), 1413-28.
- Chauhan J, & Sharma RK (2023) Synbiotic formulations with microbial biofilm, animal derived (casein, collagen, chitosan) and plant derived (starch, cellulose, alginate) prebiotic polymers. *Int J Biol Macromol*, 125873.
- Chen D, Jin D, Huang S, et al. (2020). *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota. *Cancer letters*, 469:456-467.
- Chen, C., Niu, M., Pan, J., Du, N., Liu, S., Li, H., ... & Du, Y. (2021). Bacteroides, butyric acid and t10, c12-CLA changes in colorectal adenomatous polyp patients. *Gut Pathogens*, 13, 1-9.
- Código Alimentario Argentino: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- de Brito Alves JL, De Sousa, V. P., Magnani, M., Braga, V. D. A., Leandro, C. G., & Pirola, L. (2016). New insights on the use of dietary polyphenols or probiotics for the management of arterial hypertension. *Frontiers in Physiology*, 7, 210874.
- Cortez, P. M. M. (2020). Análisis de los espectros de infrarrojo. Principios y Aplicaciones de la Espectroscopia de Infrarrojo en el Análisis de Alimentos y Bebidas, 66-82.
- Dill-McFarland, K. A., Tang, Z. Z., Kemis, J. H., Kerby, R. L., Chen, G., Palloni, A., ... & Herd, P. (2019). Close social relationships correlate with human gut microbiota composition. *Scientific reports*, 9(1), 703.
- den Besten, G, van Eunen, K, Groen, A K, Venema, K, Reijngoud, D J, & Bakker, B M (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. of Lipid Research*, 54: 2325-40
- Donohoe, DR, Curry, KP, Bultman, SJ (2013). Microbial oncotarget: bacterial-produced butyrate, chemoprevention and Warburg effect. *Oncotarget*, 4(2), 182.

- Duncan, SH, Louis, P, Flint, HJ (2004). Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied & Environmental Microbiology*, 70(10), 5810-5817.
- Duque, A. L. R. F., Demarqui, F. M., Santoni, M. M., Zanelli, C. F., Adorno, M. A. T., Milenkovic, D., & Sivieri, K. (2021). Effect of probiotic, prebiotic, and synbiotic on the gut microbiota of autistic children using an in vitro gut microbiome model. *Food Research International*, 149, 110657.
- El-Haleem, D. (2023). Alpha-glucan: a novel bacterial polysaccharide and its application as a biosorbent for heavy metals. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 133.
- Farup P, Rud K, Hestad K (2016) FaecalSCFA a diagnostic biomarker for irritable bowel synd. *BMC Gastroen*16:51-7
- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate polymers*, 189, 296-303.
- Gagliarini N, Figoli CB, Piermaria J, Bosch,A, & Abraham AG (2022). Unraveling molecular interactions in whey protein-kefir composite films to understand their physicochemical and mechanical properties. *Food Bioscience*, 50, 102012.
- Gibson, GR, Hutkins, R, Sanders, ME, Prescott, SL, Reimer, RA, Salminen, SJ, et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491.
- Golowcycz, M. A., Silva, J., Abraham, A. G., De Antoni, G. L., & Teixeira, P. (2010). Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in applied microbiology*, 50(1), 7-12.
- Hamet, MF, Medrano, M, Perez, PF, Abraham, AG (2016). Oral administration of kefir exerts a bifidogenic effect on BALB/c mice intestinal microbiota. *Beneficial microbes*, 7(2), 237-246.
- Heimann, E., Nyman, M., Pålbrink, A. K., Lindkvist-Petersson, K., & Degerman, E. (2016). Branched short-chain fatty acids modulate glucose and lipid metabolism in primary adipocytes. *Adipocyte*, 5(4), 359-368.
- Hill, C., Guarner, F., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature*
- Hosseinkhani, F., Heinken, A., Thiele, I., Lindenburg, P. W., Harms, A. C., & Hankemeier, T. (2021). The contribution of gut bacterial metabolites in the human immune signaling pathway of non-communicable diseases. *Gut microbes*, 13(1), 1882927.
- Iebba V, Totino V, Gagliardi A, et al. (2016) Eubiosis and dysbiosis two sides of the microbiota. *NewMicrobiol* 39:1-12.
- Jan, G. B. A. S., Belzacq, A. S., Haouzi, D., Rouault, A., Metivier, D., Kroemer, G., & Brenner, C. (2002). Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 9(2), 179-188.
- Johansson, L.; P. Tuomainen, M. Ylinen, P. Ekholm, L. Virkki (2004). Structural analysis of water-soluble and -insoluble b-glucans of whole-grain oats and barley. *Carbohydrate Polymers*, 58 (2004), pp. 267-274
- Kacurakova, M.; P. Capek, V. Sasinkova, N. Wellner, A. Ebringerova (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43 (2000), pp. 195-203.
- Kim, E., Coelho, D., & Blachier, F. (2013). Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutrition research*, 33(12), 983-994.
- Kok CR, Rose D, Hutkins R. Predicting personalized responses to dietary fiber interventions: Opportunities for modulation of the gut microbiome to improve health. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2023; 14:157-182.
- Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., & Elinav, E. (2019). Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nature Reviews Microbiology*, 17(12), 742-753.
- Kooiman, P. (1968). The chemical structure of kefir, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, 7(2), 200-211.
- Kopf, J. C., Suhr, M. J., & Clarke, J. Eyun Si, Riethoven J-JM, Ramer-Tait AE, Rose DJ (2018) Role of whole grains versus fruits and vegetables in reducing subclinical inflammation and promoting gastrointestinal health in individuals affected by overweight and obesity: a randomized controlled trial. *Nutr J*, 17(1), 72.
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., & Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 10(5), 323-335.
- Lange O, Proczko-Stepaniak M, & Mika A (2023) Short-Chain Fatty Acids—A Product of the Microbiome and Its Participation in Two-Way Communication on the Microbiome-Host Mammal Line. *Current obesity reports*, 12, 108-126.
- Lasch, P.; D. Naumann (2015). Infrared spectroscopy in microbiology. *Encyclopedia of analytical chemistry* (2015), pp. 1-

- Limberger-Bayer, V. M., de Francisco, A., Chan, A., Oro, T., Ogliari, P. J., & Barreto, P. L. (2014). Barley β -glucans extraction and partial characterization. *Food chemistry*, 154, 84-89.
- Liu, L., Wang, Z., Park, H. G., Xu, C., Lawrence, P., Su, X., ... & Brenna, J. T. (2017). Human fetal intestinal epithelial cells metabolize and incorporate branched chain fatty acids in a structure specific manner. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 116, 32-39.
- Mäkeläinen, H. S., Mäkivuokko, H. A., Salminen, S. J., Rautonen, N. E., & Ouwehand, A. C. (2007). The effects of polydextrose and xylitol on microbial community and activity in a 4-stage colon simulator. *Journal of Food Science*, 72(5), M153-M159.
- Manrique Vergara, David, & González Sánchez, María Eugenia. (2017). Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales. *Nutrición Hospitalaria*, 34(Supl. 4), 58-61.
- Marcos Balciunas E, Castillo Martinez FA, Dimitrov Todorov S, Gombossy de Melo Franco BD, Converti A, & Pinheiro de Souza Oliveira, r. (2013). Novel Biotechnological Applications of Bacteriocins: A review. *Food control*, 32, 134-142.
- Marzorati, M., Ghyselinck, J., Van den Abbeele, P., Maruszak, A., & Harthoorn, L. (2023). Galactooligosaccharide (GOS) Reduces Branched Short-Chain Fatty Acids, Ammonium, and pH in a Short-Term Colonic Fermentation Model. *Applied Microbiology*, 3(1), 90-103.
- Medrano, M, Gangoiti, M, Simonelli, N, Abraham, A (2020) Kefiran fermentation by human faecal microbiota: Organic acids production and in vitro biological activity. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*, 24, 100229.
- Miller, Florencia; Piermaria, Judith A.; Medrano, Micaela (2019). Aplicación de beta-glucanos obtenidos a partir de residuos de la industria cervecera. Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. Florencio Varela, 2 al 4 de diciembre de 2019.
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667-685.
- Naumann, D. (2000). Infrared spectroscopy in microbiology. R.A. Meyer (Ed.), *Encyclopedia of analytical chemistry*, John Wiley & Sons. Ltd, Chichester (2000), pp. 102-131
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology*, 52, 7577-7587.
- Perler, B. K., Friedman, E. S., & Wu, G. D. (2023). The role of the gut microbiota in the relationship between diet and human health. *Annual Review of Physiology*, 85, 449-468.
- Piermaria, J. A., Mariano, L., & Abraham, A. G. (2008). Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1520-1527.
- Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1261-1269.
- Pimentel, T. C., Brandão, L. R., de Oliveira, M. P., da Costa, W. K. A., & Magnani, M. (2021). Health benefits and technological effects of *Lactocaseibacillus casei*-01: An overview of the scientific literature. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 722-737.
- Ran-Ressler, R. R., Khailova, L., Arganbright, K. M., Adkins-Rieck, C. K., Jouni, Z. E., Koren, O., ... & Dvorak, B. (2011). Branched chain fatty acids reduce the incidence of necrotizing enterocolitis and alter gastrointestinal microbial ecology in a neonatal rat model. *PLoS one*, 6(12), e29032.
- Ratajczak, W., Mizerski, A., Rył, A., Słojewski, M., Sipak, O., Piasecka, M., & Laszczyńska, M. (2021). Alterations in fecal short chain fatty acids (SCFAs) and branched short-chain fatty acids (BCFAs) in men with benign prostatic hyperplasia (BPH) and metabolic syndrome (MetS). *Aging (alban ny)*, 13(8), 10934.
- Ray, B. (2019). Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives: an overview. *Food biopreservatives of microbial origin*, 177-205.
- Reymar Martin (2023). "Fibra dietaria no digerible: Impacto en la microbiota y metabolitos asociados a patologías intestinales" TIF Lic. en Bioquímica UNAJ. Directora: Dra. Micaela Medrano. Codirectora: Dra. Judith Piermaria.
- Reynolds, A., Mann, J., Cummings, J., Winter, N., Mete, E., & Te Morenga, L. (2019). Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet*, 393, 434-445.

- Ríos-Covian, D., González, S., Nogacka, A. M., Arbolea, S., Salazar, N., Gueimonde, M., & de Los Reyes-Gavilán, C. G. (2020). An overview on fecal branched short-chain fatty acids along human life and as related with body mass index: associated dietary and anthropometric factors. *Frontiers in microbiology*, *11*, 513909.
- Rivero, S., Lecot, J., & Pinotti, A. (2017). Impregnation of kraft paper support with polylactic acid multilayers. *Advanced Materials Letters*, *8*(6), 741-751.
- Robertfroid, M., Gibson, G., Hoyles, L., McCartney, A., Rastall, R., Rowland, I., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* *104*: S1-S63.
- Rodríguez Arzuaga, M.; A. Bosch, M.C. Añón, A.G. Abraham (2020). Heat induced conformational changes of whey proteins in model infant formulae: Effect of casein and inulin. *International Dairy Journal*, *105* (2020), Article 104695.
- Roldán, M. L., Otero, J. L., Villarreal, F., Baroni, M. R., Carrasco, M. S., Álvarez, C., ... & Simonetta, A. C. (2011). Efecto inhibitor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157: H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, *31*(1), 37-41.
- Ruiz, M. J., Colello, R., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista argentina de microbiología*, *49*(2), 174-177.
- Sakurazawa, T., & Ohkusa, T. (2005). Cytotoxicity of organic acids produced by anaerobic intestinal bacteria on cultured epithelial cells. *Journal of gastroenterology*, *40*, 600-609.
- Sanders, ME, Merenstein, DJ, Reid, G, Gibson, GR, Rastall, RA (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.*16*, 605-616.
- Satokari, R. (2015). Contentious host–microbiota relationship in inflammatory bowel disease—can foes become friends again? *Scandinavian journal of gastroenterology*, *50*(1), 34-42.
- Singh V, Ryu YC, Unno T. Dietary Intervention Induced Distinct Repercussions in Response to the Individual Gut Microbiota as Demonstrated by the In Vitro Fecal Fermentation of Beef. *Appl Sci*. 2021; *11*:6841. doi: 10.3390/app11156841
- Simonelli Nicolas; Reymar Martin; Piermaria Judith; Abraham Analía; Medrano Micaela (2023). Polisacáridos de gránulos de kefir de leche y de agua: comparación de la actividad prebiótica. Congreso CYTAL (4 al 6 oct 2023, CABA). Trabajo in extenso publicado en actas. ISBN: 978-987-47615-4-5.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an antiinflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16731-16736
- Soderholm, A. T., & Pedicord, V. A. (2019). Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity. *Immunology*, *158*(4), 267-280.
- Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, *529*(7585), 212-215.
- Sonnenburg, E. D., & Sonnenburg, J. L. (2014). Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell metabolism*, *20*(5), 779-786.
- Sonnenburg, E. D., & Sonnenburg, J. L. (2019). The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(6), 383-390.
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., ... & Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *17*(11), 687-701.
- Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Wolf, B. W., Chow, J., ... & Fahey Jr, G. C. (2002). Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify bowel function and protein catabolites excreted by healthy humans. *The Journal of nutrition*, *132*(10), 3042-3050..
- Taormina, V. M., Unger, A. L., Schiksnis, M. R., Torres-Gonzalez, M., & Kraft, J. (2020). Branched-chain fatty acids—An underexplored class of dairy-derived fatty acids. *Nutrients*, *12*(9), 2875.
- Thorburn, A. N., Macia, L., & Mackay, C. R. (2014). Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases. *Immunity*, *40*(6), 833-842.
- Tierney, B. T., Van den Abbeele, P., Al-Ghalith, G. A., Verstrepen, L., Ghyselinck, J., Calatayud, M., & Simmons, S. L. (2023). Capacity of a Microbial Synbiotic To Rescue the In Vitro Metabolic Activity of the Gut Microbiome following Perturbation with Alcohol or Antibiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*(3), e01880-22.
- Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, *81*(3), 1031-1064.

- Van der Hee, B., & Wells, J. M. (2021). Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids. *Trends in Microbiology*, 29(8), 700-712.
- Vázquez-Frias, R., Abraham, A. G., Abreu, A. T., Binetti, A. G., Boggio-Marzet, C., Carrió, C., ... & Vinderola, G. (2022). Acerca del uso del término “sinbióticos” en lengua española. *Revista chilena de nutrición*, 49(6), 775-776.
- Verbeke KA., Boobis AR., Chiodini A, Edwards CA., Franck A, Kleerebezem M, & Tuohy K M (2015). Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutrition research reviews*, 28(1), 42-66.
- Vieira, L. P. (1998). Estudo de propriedades do sistema macromolecular amido por espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Tesis (Magister Scientiae). Course Agrochemistry, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG. Brazil.
- Vyas, U., and Ranganathan, N. (2012). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012:872716. doi: 10.1155/2012/872716
- Walker AW & Lawley TD (2013) Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological research*, 69, 75-86.
- Wastyk, H. C., Fragiadakis, G. K., Perelman, D., Dahan, D., Merrill, B. D., Feiqiao, B. Y., ... & Sonnenburg, J. L. (2021). Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status. *Cell*, 184(16), 4137-4153
- Wang, Y.; Z. Ahmed, W. Feng, C. Li, S. Song (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43 (2008), pp. 283-288.
- Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K., & Tiwari, S. K. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(2), 505-521.
- Zamora, N., Suez, J., & Elinav, E. (2019). You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(1), 35-56.
- Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., & Li, H. B. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 7493-7519.

MATERIAL ANEXO

ANEXO A

Modelo de nota de consentimiento informado completada por los donantes incluidos en el estudio

Estudio/ Protocolo... (nombre del estudio)

Versión: (nº/ fecha de versión)

Investigador Principal: (Nombre y apellido)

Hospital.....

HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPANTES

Lo han invitado a participar de un estudio de investigación en el que se evaluará el efecto prebiótico de fibras, utilizando un modelo de fermentación in vitro con materia fecal humana.

Este formulario de consentimiento contiene información sobre el estudio de investigación. Por favor, lea con atención y pregunte todo lo que no comprenda.

Los investigadores le brindarán una explicación sobre la investigación y responderán a todas las dudas o preguntas que usted realice. Una vez que usted entienda las características del estudio, y si está de acuerdo en participar, se le solicitará que firme este formulario de consentimiento (dos originales). Un original del mismo le será entregado para que lo guarde.

Su participación en este estudio es estrictamente voluntaria y confidencial. Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento. Asimismo, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique de ninguna manera.

¿Por qué se está llevando a cabo esta investigación?

Existen varios estudios que han demostrado que las bacterias presentes en la materia fecal representan un modelo válido para el estudio de lo que ocurre dentro del intestino grueso.

En el estudio que estamos desarrollando se investigará el efecto que tienen algunas fibras no digeribles para estimular el crecimiento de bacterias intestinales benéficas....

Además, se evaluará la producción de ácidos orgánicos por parte de estos microorganismos....

Es importante conocer el comportamiento que tienen estas comunidades microbianas frente a la presencia de una fibra prebiótica en un modelo in vitro, ya que permite predecir el comportamiento que tendrá la misma fibra cuando se ingiere.

Esta investigación está basada, entonces, en el estudio in vitro de la capacidad de ciertas fibras dietarias para estimular el crecimiento de bacterias intestinales benéficas. Para ello, se utiliza materia fecal de origen humano, la cual es cedida por donantes voluntarios.

¿Qué pasará si acepta participar?

Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá que firme este formulario de consentimiento.

Durante las visitas, los investigadores realizarán una breve encuesta con el fin de recabar datos sobre hábitos de vida tales como: tipo de alimentación, actividad física, antecedentes clínicos, consumo de antibióticos y otro tipo de medicamentos, otros. Además, los investigadores recibirán la muestra de materia fecal previamente tomada por el donante y conservada en refrigeración por un tiempo no mayor a 4 hs.

Los investigadores no realizarán ningún procedimiento ni examen físico sobre el paciente.

Los donantes no deben someterse a ningún tipo de dieta antes ni después de entregar la muestra.

La muestra de materia fecal será entregada por única vez.

¿Quién promueve la realización de este estudio?

Este estudio se viene realizando desde el año 2016, está enmarcado en un plan de Carrera de Investigación de CONICET (Dra. Micaela Medrano) y ha recibido financiamiento de diferentes fuentes, entre ellas PICT 2016-0639, UNAJ Investiga 2020-2022; PIO CONICET UNLP UNAJ 2021-2023, PIP 2021-2023.

¿Cuáles son los riesgos de participar en esta investigación?

No existe ningún riesgo relacionado a la participación en el estudio.

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar en este estudio?

Ya que el estudio no se realiza en personas, sino que los ensayos se utilizan utilizando muestras de materia fecal, los donantes no obtienen un beneficio por la participación en el proyecto, ya que no están consumiendo ninguna sustancia.

Sin embargo, cabe mencionar que, si bien no hay beneficios directos por la participación en este estudio, su colaboración en el mismo proporcionara información importante que ayudara a comprender más acerca de su enfermedad. Por lo tanto, es posible que esa información ayude a otros pacientes en el futuro.

¿Tendrá algún costo participar en el estudio?

La participación en este estudio de investigación no tendrá ningún costo para usted ni su cobertura de salud, ni para el Estado

¿Qué ocurrirá si usted decide retirarse del estudio?

Si usted decide retirarse del estudio, deberá informárselo a su médico. Esta decisión no cambiará en absoluto la atención médica que usted recibe y la información generada por el estudio de las muestras será retirada del trabajo.

Usted puede ser discontinuado por decisión del Investigador, si esto ocurre se le explicarán los motivos y no se verá afectada su atención médica habitual.

¿Cómo se utilizará la información referida a su salud?

La información que se recoja sobre su salud será confidencial y solo se usará para esta investigación. Sus datos de la historia clínica, respuestas al cuestionario, o lo que corresponda, serán codificados usando un número de identificación o letras, y por lo tanto, serán anónimos.

La información puede ser requerida por las autoridades sanitarias (Ministerio de Salud, Comité de Ética en Investigación; Autoridades Regulatorias, etc) En ocasiones sus datos podrán ser utilizados en otros países y que estos no tengan el mismo nivel de protección; sin embargo, nos aseguraremos que se brinde el nivel de protección mínimo que se garantiza en este formulario de consentimiento informado.

Información de contacto

Si en el transcurso de la investigación surgen dudas o preguntas sobre su participación en este estudio, puede contactar a la **Dra. Micaela Medrano** al celular: 0221-15-608-6099 o al mail: mmedrano@unaj.edu.ar.

El presente trabajo de investigación ha sido evaluado por el Comité de Ética en Investigación Hospital El Cruce, Inscripto en el Registro Provincial de Comités de Ética en Investigación, dependiente del Comité de Ética Central en Investigación – Ministerio de Salud de La Provincia de Buenos Aires con fecha 05/11/2010, Reacreditado con fecha 04/11/2022 bajo el N°023/2010, Folio 62, Libro de Actas N°1.13.

Si Usted tiene alguna pregunta relacionada con sus derechos como participante de la investigación puede contactarse con el Comité de Ética en Investigación Hospital El Cruce, Coordinador Dr. Juan Pablo von Arx, secretaria Xoana Salerno Martínez, Av. Calchaquí 5401 (B1888AAE), Florencio Varela, Provincia de Bs As, Teléfono: 011 4210 9000 interno 9501/9502. Horarios de Atención: lunes a viernes de 09 a 14 hs”

De acuerdo con la ley de protección de datos personales, usted tiene el derecho de solicitar acceso y corrección de sus datos personales. Este permiso de compartir su información personal de salud para este estudio se mantendrá mientras sea necesario a los fines del estudio. Si ya no quiere compartir su información personal de salud, puede cancelar su permiso en cualquier momento mediante notificación por escrito al personal del estudio y/o al médico del estudio al domicilio que figura en este Formulario de Consentimiento Informado. Como indica la ley N° 25.326, usted tiene el derecho de acceder a sus datos en forma gratuita y la posibilidad de rectificarlos. En caso de no poder acceder a los mismos tiene el derecho a hacer la denuncia correspondiente en la Dirección Nacional de Protección de Datos La Dirección Nacional de Protección de Datos Personales, Órgano de Control de la Ley N° 25.326, (con domicilio en Sarmiento 1185 – Piso 5 “p” – C1041AAX – Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Teléfono (011) 4383-8512/3, correo electrónico: infodnpp@jus.gov.ar), tiene la atribución de atender las denuncias y reclamos que se interpongan con relación al incumplimiento de las normas sobre protección de datos personales.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Acepto participar voluntariamente en esta investigación. He sido informado/a que el objetivo de este estudio es

Me han indicado que tendré que...

Me han explicado claramente las características de la investigación, y han respondido todas mis preguntas. He sido informado/a que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que eso me perjudique ni tenga consecuencias en mi atención médica. También he sido informado que mi participación puede ser limitada por parte del Investigador Principal y que me explicarán por qué sin sufrir consecuencias en mi atención médica.

Sé que la información que yo brinde durante esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito sin mi consentimiento. Entiendo que me entregarán un original de este formulario de consentimiento, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando la investigación haya finalizado.

Nombre y Apellido Paciente	Firma	DNI	Fecha
Nombre y Apellido Representante Legal	Firma	DNI	Fecha
Nombre y Apellido Testigo	Firma	DNI	Fecha

Dirección del Testigo (puede ser citado a declarar según la normativa vigente)

Nombre y Apellido Investigador	Firma	I Investigador	Fecha
Fedatario	Firma	DNI	Fecha

ANEXO B

Tabla de correlaciones en espectroscopía infrarroja

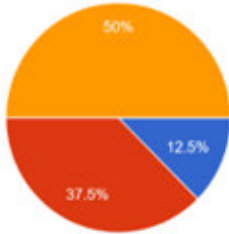
Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
	<i>Alcohol y fenoles</i>
3600	Estiramiento O-H del alcohol
3550-3500	Estiramiento O-H del fenol
1300-1000	Estiramiento C-O
	<i>Éteres</i>
1100	Estiramiento C-O-C
	<i>Aldehídos y cetonas</i>
2900-2700	Estiramiento C-H del aldehído
1740-1720	Estiramiento C=O del aldehído alifático
1730-1700	Estiramiento C=O de la cetona alifática
1720-1680	Estiramiento C=O del aldehído aromático
1700-1680	Estiramiento C=O de la cetona aromática
	<i>Éteres</i>
1750-1730	Estiramiento C=O alifático
1730-1705	Estiramiento C=O aromático
1310-1250	Estiramiento C-O aromático
1300-1100	Estiramiento C-O alifático
	<i>Ácidos carboxílicos</i>
3300-2500	Estiramiento O-H
1700	Estiramiento C=O
1430	Flexión C-O-H en el plano
1240	Estiramiento C-O
930	Flexión C-O-H fuera del plano
	<i>Anhidridos</i>
1840-1800	Estiramiento C=O
1780-1740	Estiramiento C=O
1300-1100	Estiramiento C-O

Anexo: Tabla de correlaciones en espectroscopia infrarroja. Tomado de: Cortez (2020).

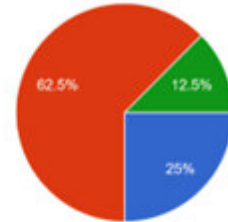
ANEXO C

Gráficos de torta con los porcentajes de individuos incluidos en el estudio (n=8) para cada pregunta sobre hábitos de consumo

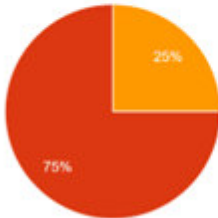
Respecto a su alimentación usted consume fibras (dentro de este grupo de alimentos encontramos productos integrales, verduras de hoja, frutas con cáscara y legumbres)
8 respuestas



Respecto a su alimentación, usted consume carnes rojas:
8 respuestas



Respecto a su alimentación, usted consume hidratos de carbono (Harinas, pastas, productos azucarados, galletitas, etc):
8 respuestas



Respecto a su alimentación, usted consume frutas y verduras:
8 respuestas

