



**Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química**

**“Evaluación de los mecanismos de acción de una bebida de frutos rojos enriquecida con polifenoles extraíbles, no extraíbles y fibra dietaria sobre factores de riesgo cardiovascular”**

Presenta:

**M. C. Ana María Sotelo González**

Dirigido por:

**Dra. Rosalía Reynoso Camacho**

Codirigido por:

**Dra. Lucía Méndez López**

Santiago de Querétaro, Qro. Enero del 2025

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencia de los Alimentos

“Evaluación de los mecanismos de acción de una bebida de frutos rojos enriquecida con polifenoles extraíbles, no extraíbles y fibra dietaria sobre factores de riesgo cardiovascular”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctorado en Ciencia de los Alimentos

**Presenta:**

M.C. Ana María Sotelo González

**Dirigido por:**

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

**Co-dirigido por:**

Dra. Lucía Méndez López

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Directora

Dra. Lucía Méndez López  
Co-directora

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez  
Asesora

Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola  
Asesora

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Asesora

Centro Universitario, Querétaro, Qro. México

#### DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

*Dedicado para ese hombre que jamás tuvo miedo y quitó el mío. Tú siempre fuiste parte de esta historia y desde el inicio tu mano me sostuvo en cada paso.*

*Gracias por tanto. Desde el cielo compartes este logro conmigo.*

*Jorge G.*

## Agradecimientos

A Dios, que inspiró y me instruyó en este gran sueño, trabajo y aprendizaje. A Él debo todo mi entendimiento, mis habilidades y todo lo que pude alcanzar en estos años. Tu siempre sostuviste mis temores y me fortaleciste en todo.

A mi esposo y gran compañero Jordy, que estuvo desde el inicio de este camino, y me motivó a disfrutar cada momento, y a dar lo mejor de mí en cada etapa, te amo. Gracias por quedarte y acompañarme en cada situación y por afrontarla a mi lado.

A mi hijo Elías Isaac, que llegó en el momento menos esperado pero indicado, sin él no podría haber llegado al final de todo esto. Eres mi impulso cada día que paso a tu lado.

A mis padres, que siempre confiaron en mi capacidad, y apostaban por mí de que sería capaz de lograr este sueño, incluso a la distancia. Sin su apoyo en mi carrera profesional no podría haberlo conseguido. A mis hermanas que me hacen ser mejor cada día.

A todos mis sinodales, empezando por la Dra. Rosalía, que creyó en mis capacidades, habilidades. Gracias por darme la oportunidad de crecimiento y por enseñarme todo lo necesario y comprometerse conmigo en cada etapa. A la Dra. Lucía por su motivación, seguimiento, interés y apoyo para mi formación y por aceptar la codirección de este proyecto. A la Dra. Miriam que pudo asesorarme y orientarme en los objetivos de esta investigación y a la Dra. Flavia por compartir su conocimiento y retroalimentar todo lo necesario.

A la Dra. Iza, por confiar en mí desde el primer momento para poder cumplir con los compromisos del proyecto y por hacerme ver el potencial y mi capacidad para ejercer esta profesión. Gracias doctora por esas palabras que me motivaron a no rendirme y por toda su experiencia y conocimientos transmitidos.

No me olvido de todos mis compañeros y amigos del laboratorio de bioquímica molecular, generaciones que jamás olvidaré y que vivieron conmigo cada proceso: Alex, Haiku, Ale, Yuri, Mariana, Hugo, Cecy, Jorge, Yaz, Ere, Bere, Lupita, Eve e Iván. Gracias por su apoyo, ayuda y compartir tantas experiencias.

Incluyo también a todos los estudiantes de servicio social y prácticas que confiaron en una servidora y trabajaron en este proyecto: Isa, Anita, Liz, Gaby y July.

Agradezco a Carmelita y a Myriam por la orientación y apoyo en cada parte del proceso. Gracias por su paciencia y comprensión.

Finalmente, a la UAQ y a CONAHCYT por el apoyo brindado en la realización de este proyecto y por el otorgamiento de la beca.

## RESUMEN

El consumo de polifenoles y fibra dietética disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares. La fresa y sus subproductos son fuente de dichos compuestos así como de polifenoles no extraíbles. Estos fitoquímicos mejoran la microbiota intestinal y su metabolismo, potenciando la absorción de compuestos. El objetivo del estudio consiste en evaluar una bebida estable de frutos rojos enriquecida con polifenoles extraíbles, no extraíbles y fibra dietaria sobre el control de factores de riesgo cardiovascular en población y establecer su asociación con la microbiota intestinal y sus metabolitos y la oxidación de proteínas. Se elaboraron bebidas de fresa y mora y se seleccionó la que presentó una mayor estabilidad de color y contenido de compuestos polifenólicos, para evaluar su efecto por 28 días en adultos jóvenes con  $\geq 2$  factores de riesgo cardiovascular determinando su composición corporal, bioquímica, análisis de la microbiota fecal, metaboloma en suero, orina y heces, y proteínas oxidadas en suero. La adición del residuo de jugo de fresa incrementó significativamente hasta 50 veces las antocianinas y 11 veces los elagitaninos con respecto a la bebida control. El grupo con bebida control disminuyó principalmente su consumo de lípidos (18.7 %) y azúcares (12.7 %) en la última semana de tratamiento, mientras que el grupo con bebida enriquecida mostró un aumento en el consumo de energía (785.2 kcal) y lípidos (42.8 g), explicando la disminución significativa en HOMA-IR del grupo con la bebida control en comparación con la bebida enriquecida. La bebida enriquecida redujo el índice *Firmicutes/Bacteroidetes* en un 32 %, así como las familias *Rikenellaceae* y *Ruminococcaceae*, asociadas con obesidad y dietas hipercalóricas. Finalmente, la falta de significancia en las correlaciones entre la carbonilación de proteínas y la composición corporal y resistencia a la insulina, sugieren que el consumo de estas bebidas de fresa no afectó significativamente en la modulación del estrés oxidativo. En conclusión, el consumo de bebidas de fresa enriquecidas con polifenoles puede ser una estrategia efectiva para modular la microbiota intestinal y promover la salud. Los resultados de este estudio respaldan la importancia de incluir alimentos ricos en polifenoles en la dieta para mejorar la salud intestinal.

**Palabras clave:** Frutos rojos, riesgo cardiovascular, microbiota intestinal, bebidas funcionales.

## ABSTRACT

The consumption of polyphenols and dietary fiber decreases the risk of cardiovascular diseases. Strawberry and its by-products are a source of these compounds as well as non-extractable polyphenols. These phytochemicals improve the intestinal microbiota and its metabolism, enhancing the absorption of compounds. The aim of the study is to evaluate a stable berry drink enriched with extractable and non-extractable polyphenols and dietary fiber on the control of cardiovascular risk factors in the population and to establish its association with the intestinal microbiota and its metabolites and protein oxidation. Strawberry and blackberry drinks were prepared and the one with the greatest color stability and polyphenolic compound content was selected to evaluate its effect for 28 days in young adults with  $\geq 2$  cardiovascular risk factors by determining their body composition, biochemistry, fecal microbiota analysis, serum, urine and feces metabolome, and oxidized proteins in serum. The addition of strawberry juice residue significantly increased anthocyanins by up to 50 times and ellagitannins by 11 times compared to the control drink. The control drink group mainly decreased their lipid (18.7%) and sugar (12.7%) intake in the last week of treatment, while the enriched drink group showed an increase in energy (785.2 kcal) and lipid (42.8 g) intake, explaining the significant decrease in HOMA-IR of the control drink group compared to the enriched drink. The enriched drink reduced the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio by 32%, as well as the *Rikenellaceae* and *Ruminococcaceae* families, associated with obesity and high-calorie diets. Finally, the lack of significance in the correlations between protein carbonylation and body composition and insulin resistance, suggests that the consumption of these strawberry drinks did not significantly affect the modulation of oxidative stress. In conclusion, consumption of polyphenol-enriched strawberry drinks may be an effective strategy to modulate the intestinal microbiota and promote health. The results of this study support the importance of including polyphenol-rich foods in the diet to improve intestinal health.

**Keywords:** Berries, cardiovascular risk, intestinal microbiota, functional beverages.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	vi
ÍNDICE GENERAL .....	viii
ÍNDICE DE CUADROS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Factores de riesgo cardiovascular .....	16
2.2 Estrés oxidativo en los factores de riesgo cardiovascular.....	18
2.3 Consumo de frutas como prevención y tratamiento de factores de riesgo cardiovascular.....	20
2.4 Subproductos de frutas como fuente de compuestos con beneficios a la salud.....	22
2.5 Frutos rojos para el control de los factores de riesgo cardiovascular .....	23
2.6 Microbiota intestinal y su relación con los factores de riesgo cardiovascular .....	28
2.7 Metabolómica multicompartimental.....	31
2.8 Proteómica redox.....	32
2.9 Estabilidad de las propiedades fisicoquímicas y compuestos polifenólicos de bebidas elaboradas con frutos rojos .....	33
3. HIPÓTESIS.....	35
4. OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo general.....	36
4.2 Objetivos específicos .....	36

5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1	Materiales .....	37
5.2	Métodos .....	37
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	60
6.1	Desarrollo, caracterización y evaluación de la estabilidad de bebidas elaboradas con decocción de fresa y mora azul.....	60
6.2	Estabilidad del color en decocciones y jugos de frutos rojos .....	72
6.3	Elaboración y caracterización de las bebidas elaboradas a partir de jugo de fresa.....	74
6.4	Evaluación de la bebida de fresa enriquecida sobre los factores de riesgo cardiovascular en un estudio clínico .....	89
6.5	Evaluación de la bebida de fresa enriquecida sobre la regulación de la diversidad microbiana fecal .....	104
6.6	Evaluación de la bebida de fresa enriquecida sobre el perfil metabólico de suero, orina y heces de los participantes.....	117
6.7	Evaluación de la bebida de fresa enriquecida sobre la carbonilación de proteínas en suero y su asociación con el riesgo cardiovascular .....	122
7.	CONCLUSIONES .....	125
8.	REFERENCIAS .....	127
9.	ANEXOS .....	143

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Carbonilación de proteínas y su relación con los factores de riesgo cardiovascular.....	6
<b>Cuadro 2.</b>	Estudios clínicos de los efectos de intervención de bebidas de fresa sobre factores de riesgo cardiovascular .....	11
<b>Cuadro 3.</b>	Estudios clínicos en los efectos de intervención de bebidas de mora azul sobre factores de riesgo cardiovascular .....	14
<b>Cuadro 4.</b>	Efecto de la suplementación de frutos rojos sobre la microbiota intestinal en factores de riesgo cardiovascular.....	16
<b>Cuadro 5.</b>	Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de los participantes en el estudio clínico.....	34
<b>Cuadro 6.</b>	Monitoreo del estudio clínico de bebidas de fresa.....	39
<b>Cuadro 7.</b>	Evaluación sensorial hedónica de las bebidas de decocción de frutos rojos.....	44
<b>Cuadro 8.</b>	Identificación de compuestos polifenólicos en las bebidas de decocción de frutos rojos por UPLC-ESI-Q-Tof-MS <sup>E</sup> .....	47
<b>Cuadro 9.</b>	Cinética de degradación de primer orden para la estabilidad de compuestos polifenólicos de bebidas de frutos rojos durante el almacenamiento.....	55
<b>Cuadro 10.</b>	Contenido total de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles de jugo de fresa y su residuo.....	59
<b>Cuadro 11.</b>	Contenido de polifenoles extraíbles y no extraíbles de las formulaciones de bebidas de fresa enriquecidas con residuo.....	60
<b>Cuadro 12.</b>	Composición nutrimental de las bebidas de fresa.....	62
<b>Cuadro 13.</b>	Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles de las bebidas de fresa.....	63
<b>Cuadro 14.</b>	Determinación de la calidad microbiológica de las bebidas de fresa.....	66
<b>Cuadro 15.</b>	Evaluación sensorial hedónica de bebidas de fresa....	67
<b>Cuadro 16.</b>	Identificación de compuestos polifenólicos en las bebidas de fresa por UPLC-ESI-Q-Tof-MS <sup>E</sup> .....	70
<b>Cuadro 17.</b>	Características basales de los participantes del estudio.....	73
<b>Cuadro 18.</b>	Adherencia al tratamiento de los participantes en cada grupo por semana.....	76

<b>Cuadro 19.</b>	Cambios en los parámetros bioquímicos en sangre de los grupos tratados con bebidas de fresa.....	79
<b>Cuadro 20.</b>	Consumo promedio de macronutrientes, fibra dietaria y sodio de la dieta y las bebidas de fresa.....	82
<b>Cuadro 21.</b>	Fuentes de consumo de compuestos polifenólicos en la dieta de los participantes en estudio.....	86
<b>Cuadro 22.</b>	Gasto energético total y equivalente metabólico por semana de los grupos en estudio.....	87
<b>Cuadro 23.</b>	Coefficientes de correlación de Pearson entre la carbonilación de proteínas séricas y parámetros de composición corporal y resistencia a la insulina de los participantes en estudio.....	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Diagrama general del metabolismo de compuestos polifenólicos.....	8
<b>Figura 2.</b>	Elaboración de las bebidas a base de decocción de frutos rojos.....	23
<b>Figura 3.</b>	Elaboración de las bebidas de fresa.....	31
<b>Figura 4.</b>	Cambios de color e índice de pardeamiento de las bebidas de decocción de frutos rojos en el almacenamiento.....	49
<b>Figura 5.</b>	Cinéticas de degradación del contenido de compuestos polifenólicos extraíbles de las bebidas de frutos rojos control en el almacenamiento.....	52
<b>Figura 6.</b>	Estabilidad del parámetro de color $a^*$ e índice de pardeamiento durante el almacenamiento de decocción y jugos de frutos rojos.....	57
<b>Figura 7.</b>	Índice de aceptabilidad de formulaciones de bebidas enriquecidas con residuos de fresa.....	61
<b>Figura 8.</b>	Diseño del estudio triple ciego aleatorizado.....	72
<b>Figura 9.</b>	Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular de los participantes.....	74
<b>Figura 10.</b>	Consumo diario promedio de compuestos polifenólicos promedio de la dieta y de las bebidas de fresa por día en el estudio.....	83
<b>Figura 11.</b>	Curvas de rarefacción de especies bacterianas observadas en heces de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 (A) y 28 (B).....	89
<b>Figura 12.</b>	Índices de alfa diversidad de Shannon y Simpson de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 (A) y 28 (B).....	91
<b>Figura 13.</b>	Análisis de componentes principales (PCA) de la beta diversidad por las distancias de Bray-Curtis de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 (A) y 28 (B).....	92
<b>Figura 14.</b>	Abundancia relativa a nivel filo de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 y 28.....	94
<b>Figura 15.</b>	Índice <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 y 28.....	96
<b>Figura 16.</b>	Abundancia relativa a nivel familia de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 y 28.....	98

<b>Figura 17.</b>	Heatmap para la visualización de las mediciones de datos faltantes (“missing values”) del metaboloma de suero (A), orina (B) y heces (C).....	101
<b>Figura 18.</b>	Heatmap para la agrupación de las muestras con base en el perfil metabolómico no dirigido en suero (A), orina (B) y heces (C).....	102
<b>Figura 19.</b>	Análisis de Componentes Principales del perfil metabolómico no dirigido en suero (A), orina (B) y heces (C) de jóvenes tras el consumo de bebidas de fresa.....	103
<b>Figura 20.</b>	Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados parciales del perfil metabolómico no dirigido en suero (A), orina (B) y heces (C) de jóvenes tras el consumo de bebidas de fresa.....	104
<b>Figura 21.</b>	Concentración de proteínas de suero carboniladas por el consumo de las bebidas de fresa por 28 días de tratamiento.....	106

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. México presenta altas prevalencias de los factores de riesgo cardiovascular en adultos jóvenes como el sobrepeso y la obesidad (68%), obesidad abdominal (70.9%), dislipidemias (25%), hipertensión (14.4%), así como glucosa elevada en sangre (6.1%) de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud del 2022 (Campos-Nonato et al., 2023).

Estos factores de riesgo cardiovascular tienen en común un incremento del estrés oxidativo y una disminución del sistema de defensa antioxidante propio del organismo. La formación de especies oxidantes en exceso desencadena, entre otras alteraciones, la disfunción mitocondrial y la acumulación de productos de oxidación, mayoritariamente proteínas, lo que está correlacionado con niveles altos de carbonilación proteica, que es la forma principal de oxidación de estas macromoléculas. La carbonilación de proteínas consiste en una modificación postraduccional irreversible que genera un resto carbonilo reactivo en una proteína. Estos cambios conformacionales en la cadena polipeptídica conducen a una pérdida de su función, lo que conlleva a la progresión de la enfermedad (Akagawa, 2020).

Para el control de estas enfermedades cardiovasculares se ha recomendado incluir patrones alimentarios saludables. Entre estos alimentos están los frutos rojos como la fresa y la mora azul, los cuales son los más consumidos en todo el mundo, que además de su elevado valor nutricional, han demostrado ser alimentos funcionales, empleados para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares.

Los estudios clínicos muestran que el consumo en fresco de fresa y mora azul, así como sus bebidas inducen protección de riesgo cardiovascular, regulando el metabolismo de glucosa, lípidos, estrés oxidativo e inflamación (Higuera-Hernández et al., 2019). Estos estudios han atribuido la protección cardiovascular a las antocianinas; no obstante, los polifenoles no extraíbles

también presentes en estos frutos han sido poco estudiados como precursores de dichos beneficios.

Del mismo modo, los subproductos generados del procesamiento de la fresa y mora azul retienen compuestos bioactivos, como polifenoles extraíbles, no extraíbles y fibra dietaria. Su incorporación en dietas ha mejorado el metabolismo de lípidos y glucosa (Jaroslawska et al., 2011). Por lo que su uso como ingrediente funcional para enriquecer otras matrices alimentarias permitiría aprovechar sus compuestos y mejorar los beneficios relacionados con el control de factores de riesgo cardiovascular.

Adicionalmente, se ha reportado que el consumo de estos frutos rojos modula la microbiota intestinal, incrementando bacterias benéficas como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Akkermansia*; y disminuyendo la abundancia de bacterias relacionadas con la obesidad y diabetes como *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Oscillibacter* y *Alistipes* (Petersen et al., 2019).

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es evaluar una bebida estable de frutos rojos enriquecida con polifenoles extraíbles, no extraíbles y fibra dietaria sobre el control de factores de riesgo cardiovascular en la población y establecer su asociación con la microbiota intestinal y la oxidación de proteínas.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Factores de riesgo cardiovascular**

#### **2.1.1 Sobrepeso y obesidad**

La obesidad se define como la acumulación excesiva de grasa en el organismo, cuyos efectos anatómicos característicos son el aumento de volumen del músculo esquelético, hígado y otros órganos y tejidos, debido a la acumulación de lípidos, principalmente triglicéridos (Heymsfield y Wadden, 2017). Estos triglicéridos se hidrolizan, logrando que los niveles de ácidos grasos libres en plasma también se aumenten. Este efecto está relacionado con una secreción excesiva de adipocinas pro-inflamatorias por los adipocitos y macrófagos, influida por la distribución y cantidad de tejido adiposo presente, generando un estado inflamatorio sistémico en ciertos individuos y por ende, mayor liberación de ácidos grasos, lo que conlleva a complicaciones de la obesidad (Tchkonina et al., 2013).

#### **2.1.2 Dislipidemias**

La dislipidemia consiste en un conjunto de desórdenes en el metabolismo de lípidos, que conducen a cambios en los niveles de lípidos circulantes en suero y de lipoproteínas (NOM-037-SSA2-2012). En la obesidad existe una liberación poco controlada de ácidos grasos del tejido adiposo visceral por medio de la lipólisis, incrementando el suministro de ácidos grasos al hígado y la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Este aumento de los niveles de ácidos grasos libres pueden disminuir los niveles de la expresión del ARNm o la actividad de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo y el músculo esquelético, enzima encargada de la hidrólisis de triglicéridos provenientes de quilomicrones y de VLDL; mientras que el aumento de la síntesis de VLDL en el hígado puede inhibir la lipólisis de quilomicrones, promoviendo la hipertrigliceridemia (Qureshi y Abrams, 2007).

Por otro lado, la hipertrigliceridemia induce el intercambio de triglicéridos localizados en lipoproteínas ricas en triglicéridos, las VLDL, por ésteres de colesterol localizados en lipoproteínas ricas en estos últimos, las LDL y HDL, por

medio de proteínas de transferencia. Esto conduce a una producción de LDL y HDL ricas en triglicéridos (Klop et al., 2013).

### **2.1.3 Hipertensión**

La hipertensión consiste en el aumento de la presión con la que el corazón bombea sangre a las arterias para su circulación en todo el cuerpo. Dentro de los principales mecanismos que conducen a la hipertensión arterial se encuentra un aumento de la inflamación vascular y el estrés oxidativo, la desregulación de los factores neurohumorales, lesiones vasculares y disfunción renal (Zhu et al., 2013). En presencia de hipertensión arterial, los adipocitos comienzan un proceso de hipertrofia y secretan adipocinas pro-inflamatorias, como la leptina, el angiotensinógeno, la aldosterona y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), que incrementan la resistencia a la insulina y generan efectos proateroscleróticos y pro-hipertensivos (Tanaka, 2019).

Por otro lado, el incremento de la actividad del sistema nervioso simpático estimula la reabsorción tubular renal de sodio de manera directa e indirecta, al promover la liberación de renina, que activa el sistema de renina-angiotensina-aldosterona, provocando un aumento de la presión hidrostática (Hall et al., 2019).

### **2.1.4 Hiperglucemia**

La hiperglucemia se define como una concentración elevada de glucosa en sangre (OMS, 2006; American Heart Association, 2019). La hiperglucemia en ayunas está relacionada principalmente con una acción inadecuada de la insulina, que es la principal hormona hipoglucemiante. La insulina estimula la entrada de glucosa al músculo, la síntesis de glucógeno en el hígado y músculo, el control de la gluconeogénesis, así como el almacenamiento de grasa en los adipocitos (Saltiel y Kahn, 2001).

Por lo tanto, una resistencia a la insulina puede definirse como una disminución en la respuesta tisular a la estimulación de la insulina, caracterizada por defectos en la captación y oxidación de glucosa, aumento de la gluconeogénesis, una

disminución en la síntesis de glucógeno y, en menor medida, una menor capacidad para suprimir la oxidación de lípidos (Ormazabal et al., 2018).

## **2.2 Estrés oxidativo en los factores de riesgo cardiovascular**

El estrés oxidativo y el desequilibrio redox intracelular se encuentran vinculados a los diferentes factores de riesgo cardiovascular, causados por el incremento de inflamación crónica. El aumento en la formación de especies oxidantes constituye un mecanismo clave en la disfunción mitocondrial, la acumulación de productos de oxidación de proteínas y lípidos, y el deterioro o agotamiento de los sistemas antioxidantes (Vona et al., 2019).

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, dando lugar a una interrupción de la señalización y el control redox y/o daño molecular (Sies y Jones, 2007). Por tanto, en condiciones de estrés oxidativo ocurre una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) y/o una disminución de la cantidad, expresión y actividad de los sistemas antioxidantes. Además, esta producción excesiva de agentes oxidantes, muchos siendo especies altamente reactivas, pueden conducir a la oxidación o modificación oxidativa irreversible de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Janssen-Heininger et al., 2008). Estas últimas son el principal blanco de EROS y ERN, ya que se encuentran en altas concentraciones en los sistemas biológicos y eliminan del 50-75% de las EROS generadas.

### **2.2.1 Carbonilación de proteínas**

La carbonilación de proteínas es una modificación postraduccional irreversible que ocurre cuando un grupo carbonilo (C=O), como un grupo aldehído, cetona o lactama (amida cíclica), se introduce en una proteína. Esto puede inducir cambios conformacionales en la cadena polipeptídica y posteriormente una pérdida de la función de la proteína (Akagawa, 2020). La estructura de la proteína es dependiente de la carbonilación, que puede tener lugar de diferentes formas como la oxidación directa en los residuos de lisina, arginina, prolina y

treonina; o por interacción con especies reactivas de carbonilo producidas por oxidación de carbohidratos y lípidos, así como por reacciones no oxidativas con compuestos dicarbonilo (Caimi et al., 2013). Se ha reportado que las alteraciones metabólicas como la obesidad, hipertensión, dislipidemias e hiperglucemias se encuentran fuertemente correlacionadas con niveles altos de carbonilación proteica (**Cuadro 1**):

**Cuadro 1.** Carbonilación de proteínas y su relación con los factores de riesgo cardiovascular\*

<b>Riesgo Cardiovascular</b>	<b>Posibles mecanismos</b>	<b>Referencias</b>
Obesidad	↑Carbonilación de proteínas en tejido adiposo ↑Tejido adiposo subcutáneo.	Frohnert y Bernlohr, 2013
Hipertensión	↑EROS, ↓NO y ↑NADPH oxidasa. Actividad alterada de los sistemas antioxidantes enzimáticos.	Hopps y Caimi, 2013
Dislipidemias	↑correlación entre el CT y niveles de proteínas carboniladas. ↑correlación entre oxidación de proteínas, TG y el TG/HDL-C.	Klafke et al., 2010
Resistencia a la insulina	↑Oxidación de proteínas en plasma e hígado: albúmina, CPS1, ALDH2, ASS, ATP sintasa subunidad β, actina citoplasmática 1, GDH1.	Méndez et al., 2014.

\*EROS: especies reactivas de oxígeno; NO: óxido nítrico; NADPH: nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; HDL-C: lipoproteínas de colesterol de alta densidad; CPS1: carbamoil fosfato sintasa mitocondrial; ALDH2: aldehído deshidrogenasa mitocondrial; ASS: argininosuccinato sintetasa; ATP: adenosina trifosfato; GDH: glutamato mitocondrial deshidrogenasa.

## **2.3 Consumo de frutas como prevención y tratamiento de factores de riesgo cardiovascular**

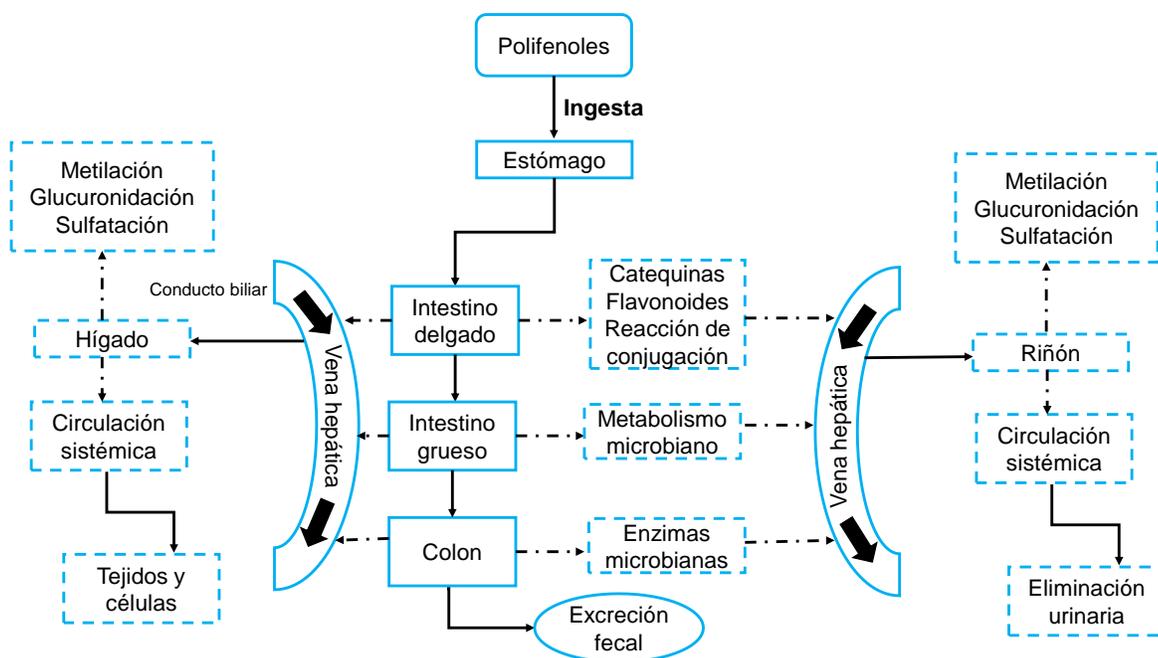
De acuerdo con diferentes estudios epidemiológicos, una ingesta elevada de frutas ha mostrado asociaciones inversas con el riesgo cardiovascular. Las frutas son ricas en nutrientes y compuestos como vitaminas, minerales, compuestos polifenólicos y fibra dietaria; siendo los compuestos polifenólicos y la fibra dietaria los que han generado un importante interés en el estudio de sus mecanismos de acción relacionados con sus beneficios en el tratamiento de factores de riesgo cardiovascular (Loo et al., 2020).

### **2.3.1 Compuestos polifenólicos**

De acuerdo con su solubilidad, los polifenoles se clasifican en polifenoles extraíbles (PE), los cuales son solubles en soluciones de agua-solventes orgánicos, y polifenoles no extraíbles (PNE) que se encuentran retenidos en los residuos de extracción (Saura-Calixto, 2012). Los PE son una mezcla compleja de compuestos de bajo y medio peso molecular (monómeros a decámeros) que incluyen flavonoides, ácidos fenólicos, proantocianidinas extraíbles y taninos hidrolizables. Asimismo, los PNE son polifenoles poliméricos que incluyen proantocianidinas no extraíbles y polifenoles hidrolizables, que son de alto peso molecular ligados a componentes de la pared celular como proteínas y polisacáridos presentes en la fibra dietaria o atrapados dentro de la matriz (Macagnan et al., 2018).

Los polifenoles presentan formas de ésteres, glicósidos y polímeros que requieren de una hidrólisis por enzimas intestinales o por la microbiota para ser absorbidos, siendo las estructuras agliconas, monoméricas y diméricas las que principalmente son absorbidas en el intestino delgado (Lavefve et al., 2019). Antes del transporte pasivo a la vena hepática y a la circulación sistémica, las agliconas de los polifenoles se metabolizan por medio de enzimas de fase II, que comprenden a las sulfotransferasas, glucuronosiltransferasas uridina-5'-difosfato y catecol-O-metiltransferasas, responsables de la desintoxicación y producción de conjugados glucuronidados, sulfatados y metilados (**Figura 1**).

Una vez en el torrente sanguíneo, los metabolitos llegan al hígado donde pueden someterse a un mayor metabolismo de fase II. Por otro lado, la recirculación enterohepática permite el reciclaje de regreso al intestino delgado a través de la excreción de bilis (Teng y Chen, 2019).



**Figura 1.** Diagrama general del metabolismo de compuestos polifenólicos.

(Adaptado de Ten y Chen, 2019)

Tanto los metabolitos de fase II como los metabolitos microbianos llegan a la circulación sistémica y se distribuyen a diferentes órganos y tejidos, o pueden llegar a los riñones para ser excretados a través de la orina. Los polifenoles que no son absorbidos en el intestino delgado (90-95% de la ingesta inicial) llegan al colon. En el colon, la microbiota intestinal, hidroliza los glicósidos en agliconas, lo que facilita su posterior absorción (Fraga et al., 2019).

### **2.3.2 Fibra dietaria**

La fibra dietaria se define como aquellos carbohidratos no digeribles (por enzimas humanas digestivas) y lignina, que se encuentran intactos en plantas, compuestos por un polímero complejo de subunidades fenilpropanoides (Soliman, 2019). De manera general, la fibra dietaria se clasifica como soluble e insoluble en agua. La fibra dietaria se encuentra dentro de los alimentos en las paredes celulares o en partículas de tamaño variable.

En el proceso de la masticación en la boca, las células se fracturan y se producen fragmentos de material de la pared celular. En el estómago e intestino delgado, la fibra dietaria absorberá el agua y se hinchará en un grado que depende de su propiedad química y estructural, seguida de la solubilización de la fracción soluble de la fibra. Posteriormente, la fibra es hidrolizada en el estómago y fermentada por la microbiota del íleon. La fracción fermentable de la fibra dietaria se obtiene en el intestino grueso dejando restos formados por la fibra dietaria no fermentable, además, en este mismo sitio se producen ácidos grasos de cadena corta (Capuano, 2017).

### **2.4 Subproductos de frutas como fuente de compuestos con beneficios a la salud**

Durante la elaboración de diferentes productos derivados del procesamiento de las frutas, se generan residuos y subproductos que son desechados. En general, los subproductos más abundantes provienen del procesamiento de frutas y hortalizas, y constituyen entre el 40-50 % del total de desechos. Estos subproductos se descartan en forma de semillas, pulpa, piel u orujo, que representan entre el 10 y el 35 % de la masa cruda (Dilucia et al., 2020).

Se ha reportado que el proceso de elaboración de jugos de frutas genera una cantidad importante de subproductos que corresponden a aproximadamente 20 % del peso inicial del fruto (Šarić et al., 2015). No obstante, estos subproductos de frutas son una fuente natural de compuestos bioactivos, como fibra, ácidos fenólicos, carotenoides, flavonoides, entre otros; por lo que poseen propiedades

antioxidantes que pueden emplearse para el enriquecimiento de alimentos y mejorar con ello sus propiedades nutricionales.

## **2.5 Frutos rojos para el control de los factores de riesgo cardiovascular**

### **2.5.1 Fresa**

Con respecto a los compuestos polifenólicos extraíbles, la fresa presenta ácidos fenólicos como ácido cafeico, *p*-cumárico, cinámico; antocianinas como pelargonidina principalmente y peonidina; flavonoides como catequina, quercetina y kaempferol; proantocianidinas en forma de propelargonidinas y elagitaninos como sanguiin-H6 y lambertianin C (Skrovankova et al., 2015; Reynoso-Camacho et al., 2021).

Los polifenoles no extraíbles han sido poco estudiados, no obstante, existen reportes como el de Reynoso-Camacho y colaboradores (2021), donde el residuo de decocción de fresa presentó 43 mg de proantocianidinas no extraíbles por gramo de peso seco. Además, se encontraron polifenoles hidrolizables como ácido elágico, que fue el más abundante, el cual posiblemente se encuentra unido a la matriz por enlaces glucosídicos y enlaces éter/éster.

Finalmente, con respecto a la fibra dietaria, se ha reportado que la fresa cruda contiene 2 g de fibra total/100 g (USDA, 2018). Los subproductos del procesamiento de jugo de fresa contienen un promedio de 60 g de fibra dietaria total/100 g de muestra seca (Sójka et al., 2013).

Previamente, se han reportado diversos efectos benéficos por el consumo de bebidas de fresa sobre diferentes factores de riesgo cardiovascular y estrés oxidativo (**Cuadro 2**). Dichos estudios han determinado que la suplementación de bebidas de fresa en individuos con obesidad y alteraciones en el perfil lipídico disminuye significativamente los triglicéridos postprandiales (Burton-Freeman et al., 2010), colesterol total en suero (Basu et al., 2010), resistencia a la insulina y la concentración del marcador PAI-1 (Basu et al., 2021).

**Cuadro 2.** Estudios clínicos de los efectos de intervención de bebidas de fresa sobre factores de riesgo cardiovascular\*

<b>Participantes</b>	<b>Intervención diaria</b>	<b>Hallazgos significativos</b>	<b>Referencias</b>
Adultos obesos con dislipidemias	1 porción de bebida de fresa en polvo (10 g) = 338 mg polifenoles 12 semanas	↓TG postprandiales	Burton-Freeman et al., 2010
Adultos con síndrome metabólico	2 tazas de bebida de FL (50 g) = 2006 mg polifenoles 8 semanas	↓CT ↓LDL-C ↓VCAM-1	Basu et al., 2010
Adultos con DM2	2 tazas de bebida de FL (25 g puré) = 2006 mg polifenoles 6 semanas	↓CT ↓CT/HDL-C ↓Presión diastólica	Amani et al., 2014
Adultos con adiposidad abdominal y lípidos séricos elevados	1) 25 g FL + 2 tazas agua =1001 mg polifenoles 2) 50 g FL + 2 tazas agua =2005 mg polifenoles 12 semanas	↓LDL-C y CT en dosis alta de bebida ↓Malondialdehído en ambas dosis de bebida	Basu et al., 2014
Adultos obesos con osteoartritis de rodilla	50 g de FL resuspendida en agua = 1585 mg polifenoles 26 semanas	↓IL-6 y IL-1β ↓MMP-3 ↓Dolor constante, intermitente y total	Schell et al., 2017
Adultos obesos con LDL-C elevado	1) 13 g de FL + agua = 400 mg polifenoles 2) 32 g de FL + agua = 960 mg polifenoles 14 semanas	↓Insulina ↓RI ↓Partículas totales de VLDL pequeñas y LDL ↓PAI-1 En dosis alta de bebida.	Basu et al., 2021

\*CT: colesterol total; TG: triglicéridos totales; DM2: diabetes mellitus tipo 2; LDL-C: lipoproteínas de colesterol de baja densidad; FL: fresa liofilizada; VCAM: molécula de adhesión de células vasculares; MMP: metaloproteínasa de matriz; RI: resistencia a la insulina; PAI: inhibidor del activador del plasminógeno.

Además, Basu y colaboradores (2014) demostraron que en adultos con adiposidad abdominal y lípidos elevados en suero, dos diferentes dosis de bebidas de fresa disminuyen significativamente el índice de peroxidación de lípidos (malondialdehído en suero) respecto a los grupos sin tratamiento.

Otros de los efectos de estas bebidas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 consisten en una disminución significativa de colesterol total en suero y de la presión diastólica (Amani et al., 2014); los niveles de proteína C-reactiva, como marcador de inflamación, peroxidación de lípidos y un incremento del estatus antioxidante (Moazen et al., 2013).

El subproducto de fresa también ha mostrado beneficios, como la disminución de triglicéridos y colesterol séricos de animales alimentados con una dieta alta en fructosa suplementados con 7.7% de subproducto de fresa durante 4 semanas (Jaroslawska et al., 2011). Durante este estudio, no se asociaron compuestos del residuo de fresa que pudieran explicar los resultados observados.

Entre los mecanismos asociados a la fresa se reporta una mejora de la actividad de las enzimas antioxidantes, debido a la protección de los polifenoles al activar el sistema de defensa endógeno, modulando la expresión de algunos genes de dichas enzimas (Giampieri et al., 2016).

Por otro lado, se ha reportado que el contenido de fibra dietaria en fresa contribuye en la regulación de los niveles de azúcar en sangre al ralentizar la digestión. Además, produce saciedad, ya que controla la ingesta de calorías en los individuos (Giampieri et al., 2015). Conjuntamente, la fibra se une con el colesterol e incrementa su excreción, disminuyendo los niveles de colesterol circulantes, lo que permite que las lipoproteínas sean menos susceptibles a la oxidación (Holt et al., 2019). No obstante, solo dos estudios realizados en bebidas de fresa liofilizadas (8g/día) han asociado el contenido de fibra de estas

en la disminución de los niveles de lípidos en plasma (Basu et al., 2009; Zunino et al., 2012).

Entre las principales limitaciones que presentan estos estudios son que ninguno establece una asociación de los compuestos bioactivos de la fresa, tales como polifenoles extraíbles o no extraíbles, con los efectos observados en la suplementación de bebidas. A pesar de que se conoce que las antocianinas pueden lograr dichos beneficios, estas son poco absorbidas; por lo tanto, identificar sus mecanismos de acción es de gran relevancia.

### **2.5.2 Mora azul**

La mora azul es un fruto caracterizado por el número y variedad de antocianinas que contiene. Algunas de ellas son glucósidos de cianidina, delphinidina, malvidina, petunidina y peonidina. Con respecto a los flavonoides, se ha reportado que estas moras contienen principalmente epigallocatequina, catequina, quercetina y naringenina principalmente (Eichholz et al., 2015). La mora azul también presenta ácidos fenólicos como ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido siríngico, sinápico y ferúlico (Skrovankova et al., 2015). En cuanto a los polifenoles poliméricos, se ha estudiado que la mora azul presenta proantocianidinas desde monómeros hasta octámeros, con un grado medio de polimerización de entre 3.1 a 5.3 (Schmidt et al., 2006).

Los subproductos del procesamiento de mora azul contienen 34 mg proantocianidinas extraíbles/g de muestra, así como 56 mg proantocianidinas no extraíbles/g. El ácido gálico y clorogénico, la antocianina malvidina hexósido y quercetina como flavonoide fueron los principales compuestos identificados en un subproducto de decocción de mora azul (Reynoso-Camacho et al., 2021).

Finalmente, con respecto a la fibra dietaria en mora azul, se han reportado 2.4 g por cada 100 g de fruto fresco (USDA, 2018). Hotchkiss-Jr y colaboradores (2021) concluyeron que el subproducto de mora azul contenía 60.8% de fibra dietaria, que en su mayoría era insoluble (46.2%) y fibra soluble (14.6%).

De igual manera, se han estudiado los efectos benéficos del consumo de diferentes bebidas elaboradas a partir de mora azul (**Cuadro 3**), destacando principalmente sus efectos antihipertensivos en población con síndrome metabólico (Basu et al., 2010; Johnson et al., 2015), así como la mejora en la función endotelial y vascular tanto en individuos con riesgo cardiovascular (Stull et al., 2015) como en sujetos con predisposición a diabetes mellitus tipo 2 (Stote et al., 2017).

Con respecto a la evaluación de subproductos de mora azul, en un estudio se examinó el efecto de extractos de cáscara de mora azul contra la obesidad en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas, y se observó una disminución de la ganancia de peso corporal y del tejido adiposo perirrenal, sugiriendo que los efectos anti-obesogénicos de este tratamiento resultan de una disminución de la adipogénesis en los animales (Song et al., 2013).

Se ha propuesto que los polifenoles de la mora azul se incorporan en las bicapas lipídicas de la membrana y actúan como donadores de hidrógeno, atrapan los radicales libres e inhiben la formación de radicales lipídicos. También se ha demostrado que la disminución de la oxidación de lípidos y proteínas se relaciona con el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Ströher et al., 2015).

A pesar de los resultados interesantes que evalúan el consumo de estas bebidas y sus beneficios, ninguno de ellos demuestra los mecanismos posibles de los compuestos bioactivos de las bebidas de este fruto, aunque se ha reconocido que las antocianinas son responsables, por ser los polifenoles mayoritarios en dicho fruto. Sin embargo, los polifenoles no extraíbles y la fibra dietaria también se encuentran presentes y han sido poco estudiados, por lo que se espera que la adición del subproducto de esta fruta a una bebida mejore los beneficios sobre el tratamiento de diversos factores de riesgo cardiovascular.

**Cuadro 3.** Estudios clínicos en los efectos de intervención de bebidas de mora azul sobre factores de riesgo cardiovascular<sup>r\*</sup>

Participantes	Intervención diaria	Hallazgos significativos	Referencias
Adultos con síndrome metabólico	2 tazas de bebida de MAL (50 g) = 1624 mg polifenoles 8 semanas	↓PAS y PAD ↓LDL-oxidadas ↑Malondialdehído	Basu et al., 2010
Hombres con al menos un factor de riesgo cardiovascular	25 g de MAL + 250 mL agua = 375 mg antocianinas 6 semanas	↓Bases de ADN oxidadas ↓Niveles de daño inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en ADN	Riso et al., 2013
Mujeres posmenopáusicas con hipertensión previa y en etapa 1	Bebida con 22 g de MAL resuspendidos en agua = 185.9 mg polifenoles 8 semanas	↓PAS y PAD ↓Rigidez arterial ↑NO	Johnson et al., 2015
Adultos con alteración de glucosa en ayunas o en la tolerancia a glucosa y más de 2 factores de riesgo cardiovascular	Batido con 12 onzas de yogurt, leche desnatada y 22.5 g MAL, dos veces al día = 773.6 mg polifenoles 6 semanas	Mejora en la función endotelial en reposo	Stull et al., 2015
Adultos con mayor riesgo de diabetes mellitus tipo 2	240 mL de jugo de mora azul = 2138 mg polifenoles 7 días	↓PAS ↑NO	Stote et al., 2017

\*PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; MAL: mora azul liofilizada; NO: óxido nítrico.

## 2.6 Microbiota intestinal y su relación con los factores de riesgo cardiovascular

Se ha demostrado que la obesidad puede desencadenar una disbiosis en la microbiota intestinal y con ello modificar diferentes parámetros en distintos niveles del organismo. El aumento en la ingesta de alimentos calóricos y una disminución de la fibra dietaria, produce un decremento de la fermentación de

carbohidratos no digeribles y una menor producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Koh et al., 2016). Estos AGCC mejoran la función de la barrera intestinal al prevenir la migración de compuestos tóxicos (Canfora et al., 2019).

El intestino es el principal sitio donde se metabolizan los polifenoles complejos a compuestos fenólicos más pequeños mediante la acción de microorganismos. Estos polifenoles y sus metabolitos pueden modular las poblaciones microbianas (Lavefve et al., 2019). Se han reportado algunos estudios sobre el efecto de los compuestos bioactivos de frutos rojos en la modulación de la microbiota intestinal, así como de los metabolitos generados por la misma, que demuestran mejoras en los factores de riesgo cardiovascular (**Cuadro 4**).

La modulación de la microbiota intestinal de los frutos rojos de fresa y mora azul se ha demostrado en el incremento de bacterias probióticas como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Akkermansia*; así como en la disminución de la abundancia de bacterias relacionadas con la obesidad y la diabetes, como *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Oscillibacter* y *Alistipes* (Petersen et al., 2019; Zhong et al., 2020).

Por otro lado, los metabolitos microbianos generados por el consumo de estos compuestos polifenólicos de frutos rojos se han estudiado a nivel *in vitro*, principalmente en la disminución de mediadores de inflamación y regulación del metabolismo de triglicéridos, logrados por metabolitos como las urolitinas y los ácidos fenólicos (Amin et al., 2015; Tomás-Barberán et al., 2016).

**Cuadro 4.** Efecto de la suplementación de frutos rojos sobre la microbiota intestinal en factores de riesgo cardiovascular\*

Fruto	Intervención	Efectos observados	Referencias
Fresa	Dieta estándar + 2.35% de FL en ratones diabéticos <i>db/db</i> por 10 semanas.	↓Verrucomicrobia ↑Bifidobacterium	Petersen et al., 2019

	Urolitina A y B de elagitaninos <i>in vitro</i> .	↓Oxidación de LDL-C ↓PPAR-γ ↓AMPK	Tomás-Barberán et al., 2016
Mora azul	Jugo fermentado en ratones con obesidad inducida por 17 semanas.	↓Acumulación de grasa y los niveles de LDL-C ↓Firmicutes, Oscillibacter y Alistipes ↑Bifidobacterium, Lactobacillus y Akkermansia	Zhong et al., 2020
	Ácido protocatecuico y floroglucinaldehído de cianidina-3-O-glucósido y sus metabolitos de fase II <i>in vitro</i> .	↓Proteínas y genes de IL-6 y VCAM-1.	Amin et al., 2015

\*FL: fresa liofilizada, LDL-C: lipoproteínas de colesterol de baja densidad; PPAR- γ: receptor activado de peroxisoma-proliferador gamma; AMPK: proteína cinasa activada por AMP; IL: interleucina; VCAM: y molécula de adhesión de células vasculares.

En otro estudio se comprobaron los efectos ateroprotectores de siete ácidos fenólicos identificados como metabolitos en suero de ratas alimentadas con una dieta suplementada con un 10 % de moras azules liofilizadas. Dichos fenoles se evaluaron en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, y después de dos semanas demostraron la inhibición de la expresión de ARNm inducida por LPS (lipopolisacárido) y los niveles de proteína de las citocinas proinflamatorias TNF-α e IL-6, al reducir la fosforilación de MAPK JNK, p38 y Erk1/2 (Xie et al., 2011).

Con base en lo anterior, se identifica que se requieren más estudios para esclarecer los mecanismos de acción de los metabolitos microbianos y su relación con los factores de riesgo cardiovascular, así como la evaluación clínica de los mismos. Es por ello que, el uso de herramientas como las ciencias ómicas, pueden identificar el estado funcional de las relaciones huésped-microbiota.

Los avances en las ciencias ómicas como la proteómica y metabolómica producen conjuntos de datos a gran escala que han aumentado el interés en el análisis de los sistemas biológicos en su conjunto. Esto permite identificar nuevos marcadores o mecanismos de la intervención de alimentos funcionales sobre diferentes condiciones fisiopatológicas (Oberbach et al., 2011).

### **2.7 Metabolómica multicompartmental**

Los perfiles de diferentes muestras obtenidas del mismo sujeto, pero de diferentes compartimentos y/o analizadas por diferentes métodos analíticos, comprende a la metabolómica multicompartmental. Es por ello que, los enfoques de bloques múltiples permiten el análisis simultáneo de diferentes conjuntos de datos con los mismos sujetos, y conocer cuáles de ellos muestran mayores diferencias debido a la intervención de un tratamiento, así como la integración de vías metabólicas que expliquen los mecanismos realizados por los compuestos bioactivos responsables (Yde et al., 2014).

Algunos estudios previos han aplicado el enfoque de la metabolómica multicompartmental para estudiar el efecto beneficioso del consumo de fresas y moras azules. Así, en muestras de plasma, orina y heces de adultos con sobrepeso y obesidad que consumieron una bebida de fresa (25 g de fresa liofilizada) durante 4 semanas, se identificaron 81 ácidos biliares. Se observó una disminución significativa de las concentraciones de ácidos grasos biliares secundarios como ácido desoxicólico, ácido litocólico y sus conjugados de glicina, así como ácido glico-ursodesoxicólico. Por lo tanto, esta disminución en la concentración de ácidos biliares secundarios sugiere que la ingesta regular de fresas modula el metabolismo microbiano de los ácidos biliares (Zhao et al., 2020).

En personas con sobrepeso/obesidad, se evaluaron los efectos postprandiales de comidas altas en grasas y con alta carga glucémica y enriquecidas con moras azules. En las muestras de orina recolectadas se presentó una disminución de

los niveles de acetoacetato y acetona, metilaminas y succinato, indicadores de diabetes mellitus tipo 2. (Sobolev et al., 2019).

### **2.8 Proteómica redox**

De acuerdo a lo descrito por Furdui y Poole (2014), los objetivos de la proteómica redox implican: a) identificación de sensores y blancos que presentan modificaciones oxidativas; b) la naturaleza de estas modificaciones en las proteínas; c) la aparición de modificaciones oxidativas específicas; d) la identificación de sitios de oxidación específicos dentro de las proteínas y e) las consecuencias de las modificaciones oxidativas respectivas en las actividades biológicas de las proteínas blanco, así como en sus diferentes rutas metabólicas.

Méndez y colaboradores (2020), evaluaron la modulación de las proteínas carboniladas del plasma e hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y sacarosa por el consumo de un extracto rico en polifenoles de uva y aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 durante 24 semanas. Entre los resultados principales se encontró una reducción significativa de la carbonilación de la albúmina en plasma en los animales con tratamiento, así como una disminución del índice de carbonilación de proteínas específicas en el hígado, implicando una modulación significativa de rutas metabólicas claves para la función hepática, incluyendo la glucólisis y la gluconeogénesis, la beta-oxidación de lípidos y el sistema antioxidante, mediante el control del nivel específico de carbonilación proteica.

También se demostró que, el consumo del extracto de polifenoles de uva junto con el aceite de pescado regulaba adicionalmente las concentraciones celulares de diferentes clases de proteínas implicadas en dichas rutas metabólicas, ejerciendo por tanto un papel fundamental en la regulación del proteoma hepático, actuando tanto a nivel de regulación de la expresión proteica como a nivel de la formación de modificaciones postraduccionales oxidativas, concretamente, la carbonilación. (Méndez *et al.*, 2017).

Por lo tanto, los estudios integrales de microbiota intestinal, metabolómica y proteómica redox aplicados a los factores de riesgo cardiovascular, permitirán explicar las modificaciones de las poblaciones bacterianas en dichos factores, y su relación con los metabolitos y proteínas encontrados en diferentes compartimentos para proponer posibles mecanismos de acción del consumo de bebidas de frutos rojos enriquecidas con compuestos polifenólicos extraíbles, no extraíbles y fibra dietaria.

## **2.9 Estabilidad de las propiedades fisicoquímicas y compuestos polifenólicos de bebidas elaboradas con frutos rojos**

Una de las principales limitaciones de las bebidas que contienen compuestos bioactivos es que sus propiedades físicas, químicas y sensoriales pueden cambiar durante el almacenamiento debido a factores externos. Por lo tanto, el proceso de producción, transporte y almacenamiento de las bebidas son pasos fundamentales que deben considerarse para mantener estables dichos productos, y por lo tanto, sus ingredientes bioactivos.

Los polifenoles tienen enlaces insaturados que los hacen sensibles a altas temperaturas, variaciones de pH, luz, actividades enzimáticas y presencia de iones metálicos y oxígeno. Estos compuestos muestran falta de estabilidad a largo plazo, y esta dependerá de la composición global del extracto en el que se encuentran, ya que los diferentes compuestos presentes en la matriz podrían potenciar o mitigar los procesos de degradación de una determinada molécula (Esparza et al., 2020).

Las antocianinas son altamente susceptibles a los cambios químicos durante el almacenamiento, los cuales generan una decoloración y pérdida de bioactividad. La estabilidad fisicoquímica de las antocianinas se ve afectada por factores como pH, oxígeno, luz, temperatura, enzimas, entre otros (Chung et al., 2016). Se ha reportado que un incremento en la hidroxilación de las antocianinas incrementa su inestabilidad, mientras que un aumento en la glucosilación confiere mayor estabilidad. Por ello, la pelargonidina es considerada la

antocianina más estable bajo condiciones neutras de pH, mientras que antocianinas con sustitución O-dihidroxil, como cianidina y delphinidina, son más susceptibles a reacciones de oxidación y, por lo tanto, presentan menor estabilidad (Reque et al., 2014). En los estudios realizados con compuestos polifenólicos, en los cuales se evalúan sus beneficios, no se determina su sensibilidad durante el almacenamiento a pesar de que podría afectar sus propiedades biológicas, y por lo tanto, los efectos observados.

### 3. HIPÓTESIS

Los polifenoles extraíbles, no extraíbles y fibra dietaria de una bebida estable de frutos rojos disminuyen los factores de riesgo cardiovascular en adultos jóvenes mediante una modificación de la microbiota intestinal, incrementando la abundancia de *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* y *Akkermansia*. Estos cambios aumentan la producción y la absorción de sus metabolitos colónicos derivados de los compuestos polifenólicos de la bebida, provocando una reducción del estrés oxidativo y por lo tanto, de la carbonilación de proteínas en suero.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar una bebida estable de frutos rojos enriquecida con polifenoles extraíbles, no extraíbles y fibra dietaria sobre el control de factores de riesgo cardiovascular en población y establecer su asociación con la microbiota intestinal y sus metabolitos y la oxidación de proteínas.

### **4.2 Objetivos específicos**

4.2.1 Elaborar bebidas de frutos rojos con polifenoles extraíbles, no extraíbles y fibra dietaria para seleccionar aquella que presente una mayor estabilidad durante el almacenamiento.

4.2.2 Determinar el efecto del consumo de una bebida de frutos rojos enriquecida sobre el control de factores de riesgo cardiovascular en adultos jóvenes mediante la evaluación de la composición corporal, parámetros antropométricos y bioquímicos.

4.2.3 Evaluar los cambios de los metabolitos exógenos y endógenos de las vías de carbohidratos, lípidos y proteínas por el consumo de una bebida de frutos rojos enriquecida para la identificación de los mecanismos de acción en el control del riesgo cardiovascular.

4.2.4 Identificar las modificaciones de la microbiota intestinal en individuos tratados con una bebida de frutos rojos enriquecida.

4.2.5 Determinar la capacidad de una bebida de frutos rojos para disminuir la carbonilación de proteínas en suero y su asociación con los factores de riesgo cardiovascular

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materiales**

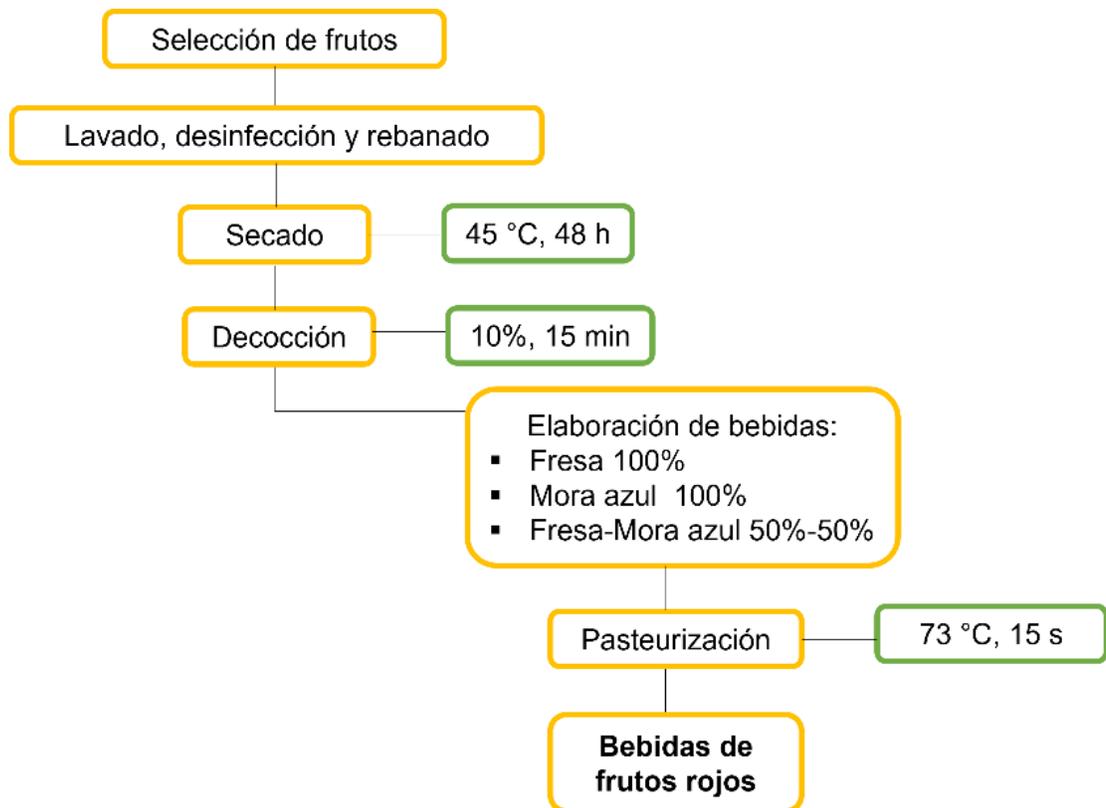
Los frutos de fresa (*Fragaria* L.) y mora azul (*Vaccinium corymbosum*) fueron proporcionados por agricultores locales del estado de Michoacán, México (19°10'07"N 101°53'59"O).

### **5.2 Métodos**

En la **Figura 2** se presenta un diagrama general del desarrollo de las bebidas a base de decocción de frutos rojos, el cual se describirá a continuación.

#### **5.2.1 Elaboración de las bebidas de decocción de frutos rojos**

Los frutos seleccionados para la elaboración de las bebidas fueron aquellos que presentaron superficies libres de mohos y de magullamiento, y con al menos 2/3 partes de su superficie de color rojo o rosado. Posteriormente, los frutos fueron lavados con jabón, desinfectados con una solución de NaClO (100 ppm) y se rebanaron para secarse a 45 °C en un horno de circulación de aire forzado marca Binder durante 48 h. A continuación, se elaboraron decocciones de los frutos secos al 10 % por 15 min de ebullición. Los residuos obtenidos de las decocciones se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso. Se elaboraron 3 bebidas a partir de las decocciones: fresa (100 %), mora azul (100 %) y fresa-mora azul (50-50 %) utilizando sucralosa y acesulfame como edulcolantes no calóricos, sorbato de potasio como conservador y ácido cítrico como regulador de pH y sabor. Finalmente, las bebidas se pasteurizaron a 73 °C por 15 s, siguiendo las buenas prácticas de manufactura.



**Figura 2.** Elaboración de las bebidas a base de decocción de frutos rojos.

### 5.2.2 Evaluación microbiológica de las bebidas de decocción frutos rojos

Para garantizar la inocuidad de las bebidas desarrolladas, se realizaron los análisis microbiológicos correspondientes en la Unidad de Análisis Clínicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, que incluyeron la determinación de mesófilos aerobios totales, coliformes totales y fecales, así como el recuento de hongos y levaduras de acuerdo con la NOM-218-SSA1-2011 correspondiente a bebidas saborizadas no alcohólicas.

### 5.2.3 Evaluación sensorial hedónica de las bebidas de decocción de frutos rojos

La evaluación sensorial se realizó con 50 jóvenes de 18 a 30 años no entrenados. Los participantes se reclutaron en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por medio de las redes sociales de la misma. Los participantes contaron con buena salud, eran consumidores

frecuentes de bebidas, no se encontraban en medicación y no presentaban alergias a los frutos rojos. Ellos tuvieron la oportunidad de retirarse de la prueba sensorial en cualquier momento que lo desearon. Aquellos que no cumplieron con las características anteriores, fueron eliminados. Los participantes que estuvieron de acuerdo firmaron el consentimiento informado del estudio. Cabe mencionar, que el protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética con el número de oficio **CBQ21/098**, el cual se muestra en el **Anexo 5**.

Se llevó a cabo una prueba de aceptabilidad donde se proporcionaron 20 mL de las bebidas correspondientes (4 °C). Los participantes evaluaron los atributos de olor, sabor, color y aceptabilidad general en un cuestionario con una escala hedónica de 9 puntos, donde 1 representó “me disgusta extremadamente” hasta 9 me gusta extremadamente” (Amorim et al., 2018). Previamente, se realizó el análisis microbiológico de las bebidas tal como se describió previamente en el punto 5.2.2, por parte de la Unidad de Análisis Clínicos de la Facultad de Química.

#### **5.2.4 Perfil de compuestos polifenólicos por UPLC-ESI-Q-ToF MS en bebidas de decocción de frutos rojos**

El perfil de polifenoles se determinó a partir de los sobrenadantes obtenidos de las bebidas de frutos rojos, que se filtraron (0.45 µm) y se inyectaron en una columna BEH Acquity C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm) a 35 °C en un UPLC acoplado a un MS de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-ToF MSE) con una interfase ESI (Vion, Waters Co). La fase móvil consistió en (A) agua con 0.1% ácido fórmico y (B) acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico a 0.5 mL/min. Los gradientes de concentración fueron: 0 min un 0% B, 2.5 min un 15% B, 10 min un 21% B, 12 min un 90% B, 13 min un 95% B, 15 min un 0% B y a 17 min un 0% B. Las condiciones del Q-ToF MS fueron las siguientes: ionización en modo negativo y positivo (ESI- y ESI+) con un rango de masas de 100-1200 Da, realizando la corrección de la masa de bloqueo con leucina-encefalina (50 pg/mL) a 10 µL/min. Los polifenoles se identificaron analizando su masa exacta (error de masa <5 ppm), distribución de isótopos y patrón de fragmentación. Las curvas

de calibración se construyeron con ácido elálgico (ácidos hidroxicinámicos y elagitaninos), ácido gálico (ácidos hidroxibenzoicos), (-)-epicatequina (flavanoles), naringenina (flavanonas), quercetina (flavonoles) y cloruro de cianidina (antocianinas) (Reynoso-Camacho et al., 2021).

### **5.2.5 Evaluación de la estabilidad durante almacenamiento de las bebidas de decocción de frutos rojos**

Las bebidas se guardaron en frascos de tapa de rosca de 500 mL a tres temperaturas comerciales de almacenamiento (4 °C, 25 °C y 34 °C). Posteriormente, se monitorearon las características fisicoquímicas, que incluyeron pH, acidez titulable, °Brix, color e índice de pardeamiento; así como el contenido de compuestos fenólicos totales, antocianinas monoméricas totales y proantocianidinas totales, cuyas metodologías se describen a continuación. Las bebidas almacenadas a 4 °C se monitorearon de forma quincenal durante 90 días, mientras que las bebidas a 25 °C y 34 °C se monitorearon cada 3 días durante 12 días, conforme a pruebas previas que establecieron este periodo como adecuado según su calidad microbiana permitida.

#### **5.2.5.1 Color**

Se colocaron 300 µL de cada muestra y se realizó una medición de las absorbancias en una longitud de onda de 380 nm a 780 nm con una resolución de 5 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific). Los datos obtenidos se procesaron en el software ColorBySpectra, donde se obtuvieron los parámetros del sistema CIE: L\*, a\* y b\* (Tang y Giusti, 2018). Por otro lado, la diferencia de color ( $\Delta E$ ) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0)^2 + (a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2}$$

Donde L\*, a\* y b\* corresponden a la luminosidad, cambio de color rojo/verde y cambio de color azul/amarillo al final del tiempo de almacenamiento, mientras que L<sub>0</sub>, a<sub>0</sub> y b<sub>0</sub> corresponden al inicio del tiempo de almacenamiento.

### 5.2.5.2 Índice de pardeamiento

El índice de pardeamiento se calculó con el cociente entre la absorbancia de pigmentos rojos ( $\lambda_{\max}= 520$  nm) y absorbancia de pigmentos cafés ( $\lambda_{\max}= 430$  nm) medidas por espectrofotometría en 200  $\mu$ L de muestra (Ling et al., 2015).

### 5.2.5.3 Cuantificación de compuestos polifenólicos extraíbles

#### a) Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales se determinaron diluyendo 200  $\mu$ L de muestra con 800  $\mu$ L de agua destilada. Una alícuota de 10  $\mu$ L de esta solución se mezcló con 40  $\mu$ L de agua destilada, 25  $\mu$ L del reactivo de Folin Cicalteu 1 N y 125  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10 %). Se dejó reposar la mezcla en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min y se midieron las absorbancias a 765 nm. La cuantificación se realizó de acuerdo con una curva estándar de ácido gálico (0 a 0.1 mg/mL) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por mL de bebida (Singleton et al., 1999).

#### b) Antocianinas monoméricas totales

Las antocianinas monoméricas se determinaron utilizando 50  $\mu$ L de muestra y 175  $\mu$ L de una solución de KCl 0.025 M (pH 1) y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0.4 M (pH 4.5). Finalmente, se midieron sus absorbancias a 510 nm y 700 nm (Giusti y Wrolstad 2001). Los resultados se expresaron como mg de cianidina-3-O-glucósido/mL de bebida a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Absorbancia total} = (\text{Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{Abs}_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (\text{Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{Abs}_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5}$$

$$\text{Antocianinas totales} = \frac{\text{Absorbancia total} * 1000 * \text{PM} * \text{FD}}{\epsilon * d}$$

Donde:

*Abs*: Absorbancia

*PM*: Peso molecular de cianidina – 3 – O – glucósido ( $448.8 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ )

*FD*: Factor de dilución

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar de cianidina – 3 – O – glucósido ( $26900 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ )

*d*: distancia (1 cm)

### **c) Proantocianidinas totales**

El contenido de proantocianidinas totales en las bebidas se determinó a partir de una alícuota de 100 µL adicionando 600 µL de vanillina (4 % p/v vanillina en metanol). Después, se le agregaron 300 µL de HCl concentrado y se agitaron. Finalmente, la solución se guardó en oscuridad por 15 min y se midió su absorbancia a 500 nm. Se utilizó una curva estándar de catequina (0 a 0.1 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg eq de catequina/mL de bebida (Zielinski y Haminiuk 2018).

#### **5.2.5.4 Modelo de cinética de degradación**

Se han reportado cinéticas de primer orden para fenoles totales, antocianinas y proantocianidinas (Pérez-Ramírez et al., 2015; Xu et al., 2015). Los parámetros del modelo se identificaron mediante regresiones lineales sobre las curvas logarítmicas siguiendo el modelo de Arrhenius a partir de la siguiente ecuación:

$$\ln\left(\frac{Y_t}{Y_0}\right) = -kt$$

Donde  $Y_0$  e  $Y_t$  son los valores en el tiempo  $t = 0$  días y después del almacenamiento en el tiempo y  $k$  es el factor pre exponencial. Se estimaron las constantes de la tasa de degradación a partir de las cuales se calculó la vida media ( $t_{1/2}$ ) a partir de la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = \ln(2)/k$$

Finalmente, se seleccionó el sabor de bebida que presentó una mayor aceptabilidad sensorial, así como una mayor estabilidad de sus compuestos polifenólicos y su color en el almacenamiento.

De acuerdo con estos resultados, se determinó que las bebidas a base de decocción de frutos rojos, a pesar de tener aceptabilidad sensorial por parte de los consumidores, no presentaron la estabilidad en el almacenamiento requerida para conservar sus propiedades de color y contenido de compuestos polifenólicos. Por tanto, se decidió elaborar las bebidas a partir del jugo de dichos

frutos y comparar su estabilidad con la de las bebidas elaboradas a base de decocción durante el almacenamiento.

#### **5.2.6 Elaboración de jugo de frutos rojos**

A partir de las características de selección, lavado y desinfectado descritos en el apartado 5.2.1, los frutos se procesaron en un prototipo de despulpadora para obtener el jugo correspondiente. El residuo, que contenía semillas y remanentes de pulpa, se reservó para su posterior análisis.

#### **5.2.7 Estabilidad del color en decocciones y jugos de frutos rojos**

Se realizaron mediciones de color e índice de pardeamiento, conforme a lo descrito en los apartados 5.2.5.1 y 5.2.5.2 en las decocciones y jugos de frutos rojos durante 7 días a 4 °C y 25 °C para comparar la estabilidad de dichos parámetros con el objetivo de elegir el fruto adecuado y la matriz para el desarrollo de las bebidas del estudio.

#### **5.2.8 Extracción de compuestos polifenólicos totales del residuo de jugo de frutos rojos**

Los residuos obtenidos del proceso de despulpado se secaron a 45 °C por 24 h. Posteriormente, se realizó una extracción de polifenoles extraíbles y no extraíbles siguiendo la metodología descrita por Hassan y colaboradores (2011), utilizando una solución de metanol-agua (50:50 v/v, pH 2) y una solución acetona-agua (70:30 v/v). Los sobrenadantes resultantes de estas extracciones se combinaron para conformar la fracción extraíble, mientras que los residuos, que comprendían la fracción no extraíble, se secaron a 45 °C durante 48 h y se almacenaron a 20 °C hasta su uso.

#### **5.2.9 Cuantificación de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles del residuo de jugo de frutos rojos**

La cuantificación de compuestos polifenólicos extraíbles se realizó en base a la metodología descrita previamente en el apartado 5.2.5.3. En el caso de los polifenoles no extraíbles, se realizó la determinación de proantocianidinas no extraíbles y polifenoles hidrolizables, que se describe a continuación.

### **a) Proantocianidinas no extraíbles**

La cuantificación de proantocianidinas no extraíbles se llevó a cabo por hidrólisis ácida. Los residuos se mezclaron con 10 mL de una solución de HCl:butanol (5:95, v/v) con 0.7 g de  $\text{FeCl}_3/\text{L}$  y se incubaron a 100 °C durante 1 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (2500 x g, 10 min) para obtener los sobrenadantes. Se realizaron 2 lavados posteriores con la solución HCl/butanol/ $\text{FeCl}_3$  hasta completar un volumen de 25 mL. Las absorbancias se midieron a 450 y 555 nm, y los resultados se expresaron como mg eq de proantocianidinas/100 mL de bebida de acuerdo con la curva de calibración reportada por Zurita y colaboradores (2012).

### **b) Polifenoles hidrolizables**

La determinación de polifenoles hidrolizables se llevó a cabo mediante una hidrólisis ácida y alcalina, siguiendo el protocolo descrito por Quatrin y colaboradores (2019). Para la hidrólisis alcalina, los residuos se mezclaron con 12 mL de agua y 5 mL de NaOH (10 M) y se sometieron a agitación durante 16 h. Posteriormente, el pH de las muestras se ajustó a un rango de 2.0-3.0 utilizando HCl (6 M), y se centrifugaron (2000 x g, 10 min) para recuperar los sobrenadantes. Los residuos se lavaron dos veces con 5 mL de agua destilada y se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Los sobrenadantes se combinaron para cuantificar sus compuestos fenólicos totales correspondientes a la hidrólisis alcalina.

Los residuos resultantes de la hidrólisis alcalina entonces se sometieron a hidrólisis ácida, mezclándolos con 2.5 mL de HCl incubándolos a 85 °C durante 30 min. Posteriormente, el pH se ajustó a un rango de 2.0-3.0 con NaOH (10 M), y las muestras se centrifugaron (2000 x g, 10 min) para recuperar los sobrenadantes. Los residuos se lavaron dos veces con 5 mL de agua destilada y se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Finalmente, los sobrenadantes se combinaron para cuantificar sus compuestos fenólicos totales correspondientes a la hidrólisis ácida.

Los resultados se expresaron como mg eq de ácido gálico/100 mL de bebida, sumando las concentraciones de ambas hidrólisis.

#### **5.2.10 Enriquecimiento de la bebida de frutos rojos**

El enriquecimiento de la bebida de frutos rojos seleccionada se realizó adicionando el subproducto en fresco, buscando que la bebida aportara un intervalo de polifenoles totales de 1000-2000 mg eq ácido gálico/día. Este rango ha demostrado beneficios en el control de riesgo cardiovascular en estudios realizados con bebidas elaboradas a base de fresa y mora azul (Basu et al., 2014; Stote et al., 2017). Asimismo, se consideró que el consumo promedio de polifenoles totales en una dieta mexicana varía entre 445-1240 mg eq ácido gálico/día, con reportes que indican que las bebidas no alcohólicas aportan 340.5 mg eq ácido gálico/día (Galvan-Portillo, et al., 2007; Zamora-Ros et al., 2018).

#### **5.2.11 Elaboración y desarrollo de las bebidas de fresa**

De acuerdo con los resultados obtenidos en apartados previos, se seleccionó el fruto de fresa para el desarrollo de las bebidas control (sin residuo) y enriquecida (con residuo). La elaboración de estas bebidas se muestra en la **Figura 3**, realizando las formulaciones de acuerdo con los aditivos mencionados en el apartado 5.2.1. Las bebidas se sometieron a un proceso de pasteurización a 73 °C durante 15 s y, posteriormente se embotellaron en caliente, para su etiquetado.

Como parte de la evaluación clínica, se incluyó una bebida comercial en polvo sabor fresa marca Zuko® para comparar con las bebidas en estudio. Esta bebida se preparó siguiendo las indicaciones del proveedor y, al igual que las demás, fue pasteurizada, embotellada y etiquetada bajo las mismas condiciones. Se seleccionó esta bebida debido a que presentaba características organolépticas similares a las bebidas de estudio, además de no aportar compuestos polifenólicos, macronutrientes ni micronutrientes que pudieran causar alguna interferencia en los resultados esperados.

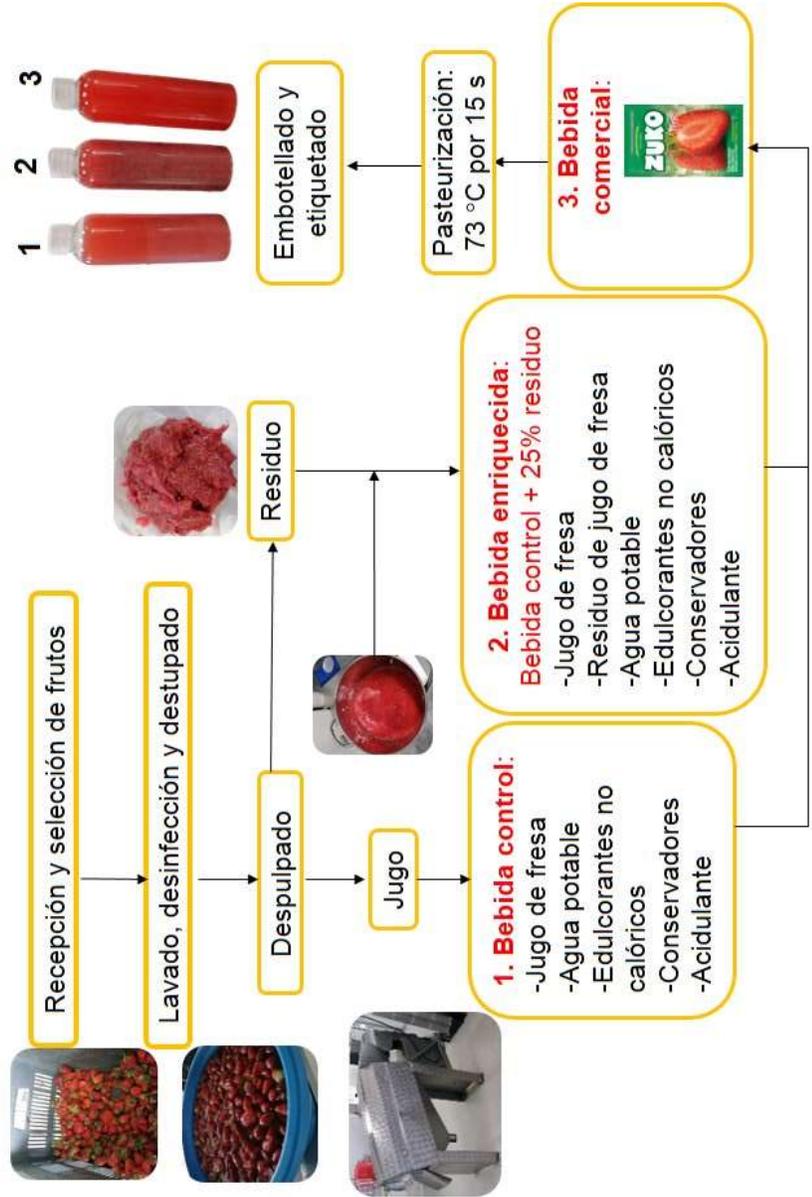


Figura 3. Elaboración de las bebidas de fresa

#### **5.2.12 Composición proximal y nutrimental de las bebidas de fresa**

La determinación de la composición proximal y nutrimental comprendió humedad, cenizas, densidad, proteína, grasa total, carbohidratos disponibles, fibra dietaria, azúcares reductores totales y calorías totales. Estas mediciones se realizaron por parte de los Laboratorios Becar, Monterrey, Nuevo León.

#### **5.2.13 Cuantificación de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles de las bebidas de fresa**

La determinación de los compuestos polifenólicos extraíbles de las bebidas de fresa se realizó de acuerdo con las metodologías descritas en el apartado 5.2.5.3, tanto en la bebida control, la bebida enriquecida y la bebida comercial, así como los polifenoles no extraíbles de la bebida enriquecida de acuerdo con el apartado 5.2.10.

#### **5.2.14 Evaluación sensorial hedónica de las bebidas de fresa**

La evaluación sensorial hedónica de las bebidas control, enriquecida con el residuo y comercial se hizo en base a la metodología descrita en el apartado 5.2.2, evaluando además la aceptabilidad en el contenido de sólidos totales presentes. Se realizó el análisis microbiológico correspondiente, siendo además estas formulaciones aprobadas por el Comité de bioética.

#### **5.2.15 Perfil de compuestos polifenólicos de las bebidas de fresa**

Se realizó la identificación de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles por UPLC-ESI-Q-ToF MS<sup>E</sup> de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 5.2.3.

#### **5.2.16 Evaluación de las bebidas de fresa sobre los factores de riesgo cardiovascular en un estudio clínico**

##### **a) Tipo de estudio, población y reclutamiento**

El estudio fue aleatorio triple ciego paralelo utilizando una bebida comercial. Los participantes fueron adultos jóvenes con un rango de edad de 18 a 35 años, residentes del estado de Querétaro y de nacionalidad mexicana. El reclutamiento de voluntarios se realizó mediante anuncios, carteles y redes sociales de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

Las personas interesadas en el estudio asistieron a una reunión en el posgrado de alimentos de la Facultad de Química para explicarles los objetivos del estudio, así como las condiciones de participación. Posteriormente, las personas con intención de participar en el reclutamiento acudieron a las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Facultad de Química de la UAQ, en estado de ayuno de por lo menos 8 h, sin tomar medicamentos, sin desvelo y sin hacer ejercicio la noche anterior a la visita.

El reclutamiento de los participantes se realizó de acuerdo con los criterios de inclusión, exclusión y eliminación que se detallan en el **Cuadro 5**. Los participantes que fueron seleccionados para el estudio y desearon participar, firmaron el consentimiento informado correspondiente, siendo este procedimiento aprobado por el Comité de bioética.

#### **b) Presión arterial**

La toma de la presión arterial diastólica, y sistólica se realizó con ayuda de un baumanómetro digital marca Omron en el brazo derecho de cada participante.

#### **c) Análisis antropométricos**

Las mediciones antropométricas se llevaron a cabo por duplicado en los participantes del estudio en condiciones de ayuno de 12 h de acuerdo con los métodos establecidos por la OMS, evaluando los siguientes indicadores:

- Peso y estatura. El peso se tomó utilizando el equipo de composición corporal (Seca modelo mBCA 514), mientras que la estatura se midió con un estadímetro de pared fijo modelo 222 (SECA). A partir de estas mediciones se calculó el IMC ( $\text{kg/m}^2$ ) el cual se calculó dividiendo el peso en kilogramos entre la estatura en metros al cuadrado.
- Circunferencia de cintura (CC). Se tomó una cinta métrica metálica en el punto medio del reborde inferior de la última costilla y la posición de la cresta iliaca.

- Circunferencia de cadera (CCad). La medición de cadera se realizó a nivel de los trocánteres mayores del fémur que coinciden con la sínfisis pubiana en la parte ventral y en la parte dorsal donde se encuentran más prominentes los glúteos por medio de una cinta métrica metálica.
- Índice de cintura-cadera (ICC). Se calculó dividiendo la circunferencia de la cintura entre la circunferencia de la cadera.

#### **d) Composición corporal**

La composición corporal se determinó con un equipo de bioimpedancia eléctrica de múltiple frecuencia (Seca modelo mBCA 514) obteniéndose los valores de masa grasa (%), masa libre de grasa (%), el índice de masa grasa (IMG) ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), el índice de masa libre de grasa (IMLG) ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), tejido adiposo visceral (kg) y masa muscular esquelética (MME) (kg).

#### **e) Perfil bioquímico en sangre**

Las determinaciones bioquímicas se realizaron con kits comerciales en el suero, e incluyeron glucosa, insulina, triglicéridos totales (TG), colesterol total (CT) y colesterol HDL, de acuerdo con los protocolos del fabricante. La resistencia a la insulina se evaluó mediante el índice HOMA-IR, calculado de la siguiente manera:  $[\text{insulina en ayunas (uUI/mL)} \times \text{glucosa en ayuno (mg/dL)}] / 405$  (Wallace et al., 2004). Por otro lado, se calculó el índice de triglicéridos/glucosa.

**Cuadro 5. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de los participantes en el estudio clínico.**

<b>Criterios de inclusión</b>	<b>Criterios de exclusión</b>	<b>Criterios de eliminación</b>
<u>IMC</u> elevado:	Participantes con alguna enfermedad crónica no transmisible diagnosticada.	Individuos que una vez iniciado el estudio de intervención requieran un tratamiento médico
Mujeres >9.3 kg/m <sup>2</sup>		
Hombres >6.2 kg/m <sup>2</sup>		
Presentar al menos 1 de los siguientes FRC:	Haber presentado infección por Sars-COV2 en las últimas 3 semanas	Participantes que no cubran todas las evaluaciones requeridas durante el estudio
<u>Glucosa elevada en ayuno:</u>	En estado de embarazo o en periodo de lactancia	Participantes que durante el estudio presenten algún criterio de exclusión
100-128 mg/dL		
<u>Resistencia a la insulina elevada:</u>	En tratamiento farmacológico no compatible con el estudio	
HOMA >2.3		
<u>Triglicéridos elevados en ayuno:</u>	Participación actual en un programa de ejercicio o de intervención nutricia	
150-195 mg/dL*		
<u>Colesterol total elevado:</u>	Con alergias a frutos rojos	
200-239 mg/dL*		
<u>Colesterol HDL bajo:</u>		
mujeres <40 mg/DI		
hombres <50 mg/dL*		
<u>Presión arterial:</u>		
sistólica >130 mm Hg		
diastólica >85 mm Hg*		

\* American Heart Association

+Adult Patient Treatment

#### **f) Recordatorio de 24 h de consumo de alimentos y bebidas**

Cada participante en el estudio registró 3 cuestionarios de recordatorio de 24 h para determinar el consumo de alimentos y bebidas registrando el consumo de alimentos y bebidas correspondientes a 2 días de entre semana (lunes a viernes) y 1 de fin de semana (sábado a domingo) durante todo el estudio. Se especificó la preparación, los ingredientes que se emplearon, y si tenían alguna marca. Además de las comidas principales y colaciones, se incluyó goma de mascar, dulces, refrescos, agua, alcohol, suplementos, vitaminas, entre otros. Se realizaron los promedios correspondientes a los 3 días de consumo de energía, macro y micronutrientes, así como de los polifenoles totales (mg eq AG/g o mL). La información nutricional se obtuvo a través de la base de datos de U.S. Department of Agriculture (USDA), mientras que el contenido de polifenoles a través de la base Phenol-Explorer. Las concentraciones de polifenoles totales de las preparaciones tradicionales mexicanas se consultaron en la literatura de estudios poblacionales de la dieta mexicana (Galvan-Portillo et al., 2007; Silva-Cristobal et al., 2010), así como el efecto de la cocción en los alimentos (Xu y Chang, 2008; De Santiago et al., 2018).

#### **g) Cuestionario de actividad física**

Del mismo modo, se realizó una evaluación de la actividad física, mediante el cuestionario de recordatorio de actividad física de 24 h de Bouchard y colaboradores (1983), que consistió en registrar las actividades del día en fracciones de 15 min de acuerdo con una escala del 1 al 9, donde 1 son actividades de menor gasto energético y 9 actividades de mayor gasto energético. Se respondieron 2 cuestionarios de 2 días de entre semana y 1 de fin de semana. Se calculó el gasto energético total de cada día de acuerdo con la metodología del artículo.

#### **h) Evaluación de adherencia al tratamiento**

De manera independiente, los participantes realizaron un cuestionario de adherencia al tratamiento por semana, para monitorear el consumo de la bebida

de frutos rojos, utilizando una escala Likert de 4 puntos (1=nunca, 2= algunas veces, 3= casi siempre, 4=siempre).

### **i) Tamaño de la muestra**

El cálculo para el tamaño de muestra del estudio clínico en adultos jóvenes (n=13) se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación, según García-García, Reding-Bernal y López-Alvarenga (2013):

$$n = \frac{2 * (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * (1 - p) * S^2}{|M_{de} - M_{dc}|^2}$$

Donde:

*n*: sujetos necesarios para cada tratamiento

$Z_{\alpha}$ : Corresponde al valor del error tipo I aceptado (nivel de significancia)

$Z_{\beta}$ : Corresponde al valor del error tipo II aceptado (potencia estadística)

*S*: varianza de la variable principal en un grupo de referencia

$M_{dc}$ : diferencia entre valores iniciales y finales en grupo de los controles

$M_{de}$ : diferencia entre valores iniciales y finales en el grupo con tratamiento

Para ello se consideró una potencia del 95% y un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ . Como variable principal se tomó en cuenta una tasa de deserción del 15 % y la disminución del índice HOMA-IR observada en un estudio clínico con adultos obesos suplementados con fresa en polvo durante 14 semanas (Basu et al., 2021).

### **j) Recomendaciones generales del estudio clínico**

Antes de iniciar el estudio se realizó una sesión de capacitación para los participantes seleccionados, en la que se les enseñó a completar los recordatorios de 24 h de consumo de alimentos y bebidas y el cuestionario de actividad física anteriormente descritos, así como un cuestionario de adherencia del tratamiento, que se describirá más adelante.

Por otro lado, se brindó una capacitación a los participantes para la recolección de muestras de orina y heces, sobre el consumo de la bebida de frutos rojos correspondiente, así como algunas recomendaciones y restricciones durante el estudio clínico.

Los voluntarios incluidos en el estudio recibieron instrucciones para seguir una dieta cardiosaludable basada en las recomendaciones de la American Heart Association. Esta consistió en disminuir el consumo de alimentos altos en grasas, carnes rojas, bebidas azucaradas, y aumentar la ingesta de frutas y verduras, cereales enteros y productos alimenticios con bajo contenido de grasa. Se les sugirió comer pescado al menos dos veces a la semana, así como preparar sus alimentos con poca o ninguna sal. Adicionalmente, se les sugirió evitar consumir frutos rojos (fresa, mora azul, entre otros) durante el periodo del estudio. Por otro lado, se les recomendó no cambiar sus hábitos de actividad física.

#### **k) Diseño experimental y administración de tratamientos**

Los participantes fueron asignados al azar a uno de los 3 grupos: grupo con bebida control (n=15), grupo con bebida enriquecida (n=15) y grupo con bebida comercial (n=13). El estudio tuvo una duración de 4 semanas, en la que cada semana los participantes recibieron 7 porciones de 125 mL de la bebida correspondiente con la indicación de almacenar las bebidas a 4 °C. Cabe mencionar que para garantizar la calidad microbiológica y la estabilidad del color y contenido de compuestos fenólicos y antocianinas, se realizó el monitoreo de dichos parámetros, cuyos resultados se muestran en el **Anexo 1**. Los participantes consumieron una porción de bebida al día, en el horario de su elección, en ausencia o compañía de otros alimentos.

Las bebidas del estudio contaron con las características de inocuidad necesarias para ser evaluadas. La categoría de riesgo del estudio correspondió a la A=sin riesgo. En un estudio previo llevado a cabo *in vivo* no se encontraron

alteraciones en los parámetros renales, hepáticos ni cardiacos que sugieran algún efecto tóxico de las bebidas de frutos rojos (Sotelo-González, 2020).

Los datos proporcionados por los voluntarios se recogieron en un expediente individual al que sólo tuvieron acceso tres miembros del equipo de investigación, siguiendo las especificaciones de la Ley Federal de Protección de Datos Personales (DOF 05-07-2010). En dicha ficha se asignó un folio numérico a cada voluntario, el cual se utilizó para designar sus muestras y cuestionarios durante todo el estudio.

En el **Cuadro 6** se muestra el monitoreo del estudio clínico. En cada columna se observan las determinaciones que se realizaron en cada día del tratamiento en que los participantes asistieron a una cita. Para cada una de las citas, los participantes asistieron en ayuno de 12 h, sin tomar medicamentos, sin desvelo y sin hacer ejercicio la noche anterior a la visita.

**Cuadro 6.** Monitoreo del estudio clínico de bebidas de fresa\*

<b>Determinaciones y recolección de muestras</b>	<b>Días</b>			
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<b>Signos vitales</b>	X	X	X	X
<b>Antropometría</b>	X	X	X	X
<b>Composición corporal</b>	X	X	X	X
<b>Muestra de sangre</b>	X			X
<b>Muestra de orina</b>	X			X
<b>Muestra de heces</b>	X			X

\*Las celdas marcadas con una X indican la determinación o monitoreo realizado en el día correspondiente.

### **I) Recolección de muestras biológicas**

Para la recolección de muestras de sangre, los participantes asistieron con 12 h de ayuno. En la cita correspondiente, se tomó una muestra de sangre de cada participante en tubos de plástico para suero marca Vacutainer de tapón rojo de 6 mL. Posteriormente, todos los tubos se centrifugaron a 850 x g durante 15 min a 4 °C para separar el suero. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para la recolección de muestras de orina y heces, se dio instrucciones de dicho procedimiento a los participantes previamente a la cita, donde entregaron sus muestras correspondientes por separado en frascos de plástico redondos de tapa ancha. Las muestras se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **5.2.17 Evaluación de las bebidas de fresa sobre la regulación de la diversidad microbiana intestinal**

#### **a) Extracción de ADN y secuenciación**

Las muestras se procesaron y analizaron utilizando el servicio de secuenciación dirigida ZymoBIOMICS® (Zymo Research, Irvine, CA). Para el análisis de la microbiota de las muestras fecales se realizó la extracción del ADN de los microorganismos presentes en las heces utilizando el kit comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

La secuenciación dirigida del gen del ARN ribosómico 16S bacteriano se realizó utilizando el kit de preparación de la biblioteca NGS Quick-16S™ (Zymo Research, Irvine, CA), amplificando la región V3-V4 del gen 16S rRNA. La biblioteca de secuenciación se preparó utilizando PCR en tiempo real para controlar los ciclos y limitar la formación de quimeras de PCR. Los productos finales de la PCR se cuantificaron con lecturas de fluorescencia de qPCR y se agruparon basándose en la misma molaridad. La biblioteca combinada final se limpió con Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA) y luego se cuantificó con TapeStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA).

Se utilizó el estándar comunitario microbiano ZymoBIOMICS® (Zymo Research, Irvine, CA) como control positivo para cada extracción de ADN. La biblioteca final se secuenció en la plataforma Illumina® MiSeq™ (San Diego, CA, USA).

#### **b) Análisis bioinformático**

Las secuencias de amplicones se infirieron a partir de las lecturas sin procesar utilizando el DADA2 (Callahan et al., 2016). La asignación taxonómica se realizó

utilizando Uclust del Qiime v.1.9.1 con la base de datos de Zymo Research, 16s. La visualización de la composición, diversidad alfa y la diversidad beta se realizó con Qiime v.1.9.1 (Caporaso et al., 2010).

#### **5.2.18 Determinación del perfil metabolómico multicompartmental e identificación de vías metabólicas reguladas por el consumo de la bebida de fresa enriquecida**

Para la identificación del perfil metabolómico multicompartmental, se realizó la extracción de metabolitos polares de las muestras de suero, orina y heces de acuerdo con la metodología reportada por Zhou y colaboradores (2019). Todas las muestras se descongelaron a 4 °C por 24 h previas a la extracción.

Se utilizaron 100 µL de cada muestra de suero y se adicionaron 10 µL de una solución de sulfadimetoxina (250 µM) como estándar interno y 290 µL de acetonitrilo frío (100 %). Posteriormente, se sonicó durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 4 °C a 18,000 x g durante 10 min. Finalmente, se recuperaron 100 µL de sobrenadante. Para la extracción en orina se tomaron 100 µL de cada muestra y se mezclaron con 2 µL de sulfadimetoxina (250 µM) como estándar interno y 98 µL de acetonitrilo frío (100 %). Se sonicó y centrifugó a las condiciones previamente descritas y se recuperó el sobrenadante. Finalmente, para la extracción en heces, se utilizaron 50 mg de muestra y se mezclaron con 10 µL de sulfadimetoxina (250 µM) y 490 µL de acetonitrilo frío (50 %). Se sonicó y centrifugó bajo las mismas condiciones mencionadas previamente y a continuación se recuperó el sobrenadante.

El perfil metabolómico se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Acoplado a un Espectrómetro de Masas Híbrido de Cuadrupolo Tiempo de Vuelo (HPLC-QTOF MS<sup>E</sup>, Xevo G2-XS. Waters Co.). La separación cromatográfica se realizó inyectando 5 µL de cada muestra a 8 °C en una columna C18 BEH a 35 °C. Se utilizaron como fase móvil agua con 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (B) a un flujo constante de 0.5 mL/min. El gradiente inició con 5 % de B y terminó con 95 % de A después

de 35 min de un gradiente lineal, regresando a las condiciones iniciales (5 % B), las cuales se mantuvieron durante 5 min, con un tiempo total de corrida de 40 min.

La espectrometría de masas se realizó con una fuente de ionización de electrospray (ESI) en polaridad negativa, adquiriendo señales de 100 a 1000 m/z cada 0.2 s. Las condiciones del ESI fueron un voltaje de cono de 30 V, con un flujo de gas de 50 L/h, voltaje capilar de 2.5 kV, una temperatura de fuente de 130 °C, utilizando nitrógeno como gas de desolvatación a 550 °C y 800 L/h. Los espectros de masas fueron adquiridos a baja energía de colisión (6 eV) y a alta energía de colisión (10-40 eV) utilizando el modo de analizador de resolución.

A continuación, se realizó la identificación de los metabolitos a través de una estrategia no dirigida utilizando el software Progenesis consultando las bases de datos: Metaboloma Humano, Phenol-Explorer, Metlin, MassBank y Lipidmaps.

#### **5.2.19 Determinación del efecto de las bebidas de fresa sobre la carbonilación de las proteínas de suero.**

Previamente a esta determinación, se realizó la cuantificación de proteínas totales séricas por la técnica de Bradford (1976) con algunas adaptaciones. Se tomaron 10 µL de suero y se diluyeron al 0.5% con 1990 µL de agua destilada, agitando la mezcla en un vórtex durante 30 s. Posteriormente, se colocaron 10 µL de la muestra diluida en el pocillo de microplaca más 200 µL del reactivo de Bradford (20 %). Las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm. Para el análisis de resultados se utilizó una curva de calibración de albúmina (0.1-1 mg/mL) y se expresaron como mg de proteína/mL de suero.

El contenido de proteínas carboniladas se determinó de acuerdo con la metodología de Levine y colaboradores (1990), la cual consistió en la reacción de dichas proteínas con el 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para generar dinitrofenilhidrazonas cromóforas. Se utilizaron 2 tubos con 0.5 mL de suero de cada participante; uno marcado como “prueba” y otro como “control”. Se

adicionaron 2 mL de DNPH al 10 mM preparado con HCl al 2.5 M al tubo de prueba y 2 mL de HCl al 2.5 M al tubo control. Posteriormente, los tubos se mezclaron vigorosamente y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 1 h, agitándolos en intervalos de 15 min. A continuación, se agregaron 2.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % (p/v) a cada tubo, se mezclaron y se dejaron reposar en un baño de hielo durante 10 min. Los tubos se centrifugaron a 3,500 rpm durante 20 min para separar el sedimento de proteínas. El sobrenadante fue recolectado cuidadosamente y descartado. Se procedió con un segundo lavado con TCA al 10 %, como el descrito previamente. Finalmente, los precipitados se lavaron 3 veces con 2 mL de una solución de etanol: etil acetato (1:1 v/v) para eliminar remanentes de DNPH y lípidos. El pellet final de proteína se disolvió con 1 ml de guanidina en HCl al 6 M y se incubó a 37 °C durante 10 min. Los materiales restantes insolubles se removieron por centrifugación. Las concentraciones de carbonilo se determinaron con la diferencia en la absorbancia a 370 nm entre la muestra prueba y el control, usando el coeficiente de extinción molar de 22000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Los niveles de carbonilo se expresaron como pmol/mg de proteína.

#### **5.2.20 Análisis estadísticos**

Para las variables con una distribución normal, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de confianza del 95% o prueba t de Student. Las variables que no siguieron una distribución normal, se analizaron por medio de la prueba de Friedman o Wilcoxon. Suponiendo normalidad en las variables respuestas, la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey. Para las variables que no presentan normalidad, la comparación de medias se realizó por la prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 16.

Los análisis ANCoVA y DiffAbund se realizaron en myPhyloDB, y MicrobiomeAnalyst para calcular las puntuaciones de diversidad alfa y las distancias de Bray-Curtis. Las lecturas de secuencias individuales se filtraron por

el software PGM para eliminar secuencias policlonales y de baja calidad, y posteriormente se analizaron con QIIME. El umbral de similitud de secuencia tanto para la selección de OTU como para la asignación de taxonomía fue del 97%.

La identificación de los metabolitos de mayor impacto en las muestras biológicas de suero, orina y heces se realizó a partir del procesamiento de los datos siguiendo el protocolo descrito por Mock y col., (2020) en el entorno Rstudio 2022.12.0 mediante la construcción de heatmaps, análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Para correlacionar la carbonilación de proteínas en suero con los factores de riesgo cardiovascular que presentaron una mejora después de la suplementación de las bebidas de fresa, se realizó una prueba de Pearson con significancia de  $p < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Desarrollo, caracterización y evaluación de la estabilidad de bebidas elaboradas con decocción de fresa y mora azul

#### 6.1.1 Evaluación sensorial

Las bebidas se elaboraron a partir de las decocciones de fresa y mora azul (10%) y a partir de ellas se preparó una bebida de fresa (100%), mora azul (100%) y fresa-mora azul (50-50%). Para las características sensoriales evaluadas, las puntuaciones entre 7 y 9 de este parámetro se lograron en un 78 % de los participantes que calificaron a la bebida de fresa (BF), 86 % para la bebida de mora azul (BM) y un 98 % en la bebida de fresa-mora azul (BFM) (**Cuadro 7**).

**Cuadro 7.** Evaluación sensorial hedónica de las bebidas de decocción de frutos rojos\*

Características sensoriales	Bebidas		
	Fresa	Mora azul	Fresa-Mora azul
Color	7.24±1.71a	7.82±1.02a	7.80±0.81a
Olor	6.56±1.75a	6.62±1.41a	6.48±1.54a
Sabor	7.08±1.87a	6.74±1.54a	7.28±1.28a
Aceptabilidad general	7.14±1.59a	7.02±1.22a	7.32±1.15a
Índice de aceptabilidad	79.56	78.00	81.33

\*Los datos se muestran como la media ± desviación estándar (DE). Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre bebidas.

Posteriormente, el olor fue evaluado con la menor puntuación por los consumidores (6.5-6.6). En el caso de la BF, esta característica sensorial mostró una asimetría moderada, donde el 54 % de los consumidores la evaluaron entre 5 y 7. Para la bebida de mora azul (BM) y la BFM, estas puntuaciones se observaron en un 64 % de los consumidores. De manera general, los participantes comentaron que el olor de las bebidas fue poco detectado durante la evaluación, lo cual pudiera estar relacionado con las temperaturas empleadas para el secado y decocción de frutos, lo cual puede degradar los compuestos orgánicos volátiles relacionados con el aroma de estos frutos (Martins et al., 2021).

El sabor de las tres bebidas presentó, en promedio, un valor de 7, siendo la BFM la que obtuvo mayor puntuación, con un 7.3, y con un 76 % de los consumidores que la evaluaron entre 7 y 9 puntos. Estas preferencias podrían estar relacionadas a la combinación de sabores de ambos frutos rojos, siendo el sabor de fresa dulce y ácido, mientras que el de mora azul es más astringente (Skrovankova et al., 2015).

Finalmente, en cuanto a la aceptabilidad general, la BFM presentó el mayor índice de aceptabilidad (81.3 %), seguida de la BF con un 79.5 % y la BM con un 78 %, tal como se observa en la **Cuadro 7**, indicando que todas las bebidas fueron sensorialmente aceptables (índice de aceptabilidad >70 %).

#### **6.1.2 Perfil de compuestos polifenólicos por UPLC-ESI-Q-ToF MS en bebidas de decocción de frutos rojos**

La identificación de los polifenoles en las bebidas desarrolladas permitió predecir el potencial antioxidante y sus posibles beneficios en la salud. La identificación de polifenoles de las bebidas se muestra en el **Cuadro 8**, donde se cuantificaron 17 polifenoles en la BF, 19 en la BM y 22 en la BFM, cuya identificación se confirmó por medio de la comparación de su masa exacta con un error de masa <5 ppm, su patrón de fragmentación y por su distribución isotópica.

Las antocianinas fueron los compuestos predominantes en todas las bebidas de frutos rojos. La BM mostró un contenido de 100.6 µg/mL, con malvidina hexósido como el principal compuesto. En cuanto a la BF, esta presentó un contenido de 17.2 µg/mL, destacando la pelargonidina hexósido como el compuesto mayoritario. Por último, el contenido total de antocianinas de la BFM fue 57.57 µg/mL, siendo superior al de la BF debido al alto contenido de antocianinas de la BM. La pelargonidina-3-glucósido, seguida de la pelargonidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido, representan más del 95 % del total de antocianinas en diferentes variedades de fresa, cuyo contenido total de antocianinas reportado para el jugo de fresa oscila entre 40-114 mg/L (Ertan et al., 2019). El contenido total de antocianinas de nuestras bebidas fue inferior al reportado, lo cual puede

estar relacionado con un efecto de dilución durante el proceso de preparación de las bebidas, así como con la degradación térmica de las antocianinas durante el proceso de secado y decocción de los frutos rojos.

Se identificó una amplia variedad de flavonoides no pigmentados como los flavanoles y flavonoles. La quercetina hexósido fue el flavonoide no pigmentado mayoritario en BM y BFM (0.69 y 0.38 mg/100 mL, respectivamente). La BF presentó la mayor cantidad de ácidos hidroxicinámicos (3.1 µg/mL) como el ácido cumárico hexósido y ácido elágico. La identificación de estos ácidos fenólicos fue similar a lo reportado por Díaz-García y colaboradores (2013) en un jugo de fresa comercial. En relación con el contenido de elagitaninos, la BF presentó 1.9 µg/mL de elagitaninos totales mientras que BFM mostró 0.68 µg/mL, incrementando 2.1 veces su concentración con respecto a BM. Estos resultados son interesantes, ya que los elagitaninos se han reportado principalmente en las cáscaras de frutas y en baja cantidad en la pulpa (Sójka et al., 2016).

**Cuadro 8.** Identificación de compuestos polifenólicos en las bebidas de decocción de frutos rojos por UPLC-ESI-Q-Tof-MS<sup>E</sup>.\*

Compuestos	TR (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	Masa observada (Da)	Error de masa (ppm)	Aductos	Bebidas		
							Fresa	Fresa-mora azul	
<i>Antocianinas</i>									
Delphinidina hexóxido	3.5	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465.1033	465.1017	-2.3598	[M]+	ND	10.35±0.15a	4.65±0.84b
Delphinidina arabinósido	3.89	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	435.0927	435.09	-4.9877	[M]+	0.01±0.00c	4.93±0.05a	2.27±0.40b
Cianidina hexóxido	3.94	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.1084	449.1089	2.4493	[M]+	0.24±0.06c	6.88±0.09a	3.38±0.51b
Petunidina hexóxido	4.14	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	479.1119	479.1221	7.7516	[M]+	0.01±0.00c	16.59±0.16a	7.54±1.53b
Cianidina arabinósido	4.27	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	419.0978	419.0969	-0.9809	[M]+	ND	1.23±0.17a	0.49±0.15b
Pelargonidina hexóxido	4.46	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433.1135	433.1134	1.0703	[M]+	16.65±1.72a	3.83±1.38c	11.86±0.44b
Malvidina hexóxido	4.61	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> ClO <sub>12</sub>	493.1346	493.1347	1.3407	[M]+	0.03±0.00c	41.03±0.10a	19.66±3.48b
Peonidina hexóxido	4.86	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	463.124	463.1235	0.004	[M]+	0.01±0.00c	15.78±0.88a	7.58±2.02b
Pelargonidina rutinósido	5.07	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>	579.1714	579.1697	-1.9569	[M]+	0.25±0.00a	ND	0.14±0.00b
Total							17.07±3.61c	100.62±3.45a	57.50±9.26b
<i>Flavonoles</i>									
Procianidina dímero B2	3.45	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	578.1424	577.136	1.48	[M-H]-	0.48±0.02a	0.12±0.08b	0.24±0.10a
(Ep)-catequina isómero I	3.77	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.079	289.0709	-3.0812	[M-H]-	0.56±0.07a	0.02±0.00b	0.22±0.00a
Total							1.04±0.27a	0.13±0.06b	0.36±0.05b
<i>Flavonoles</i>									
(iso)-ramnetina hexóxido	4.18	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	478.1111	477.1052	2.8182	[M-H]-	ND	0.33±0.05a	0.11±0.02b
Miricetina hexóxido	5.19	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	480.0904	479.084	1.9089	[M-H]-	ND	0.45±0.03a	0.16±0.09b
Quercetina rutinósido	5.69	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610.1534	609.1487	4.1921	[M-H]-	ND	1.24±0.05a	0.64±0.03b
Quercetina hexóxido	5.8	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464.0955	463.0902	4.3627	[M-H]-	0.04±0.00b	6.96±0.18a	3.87±0.81ab
Quercetina dihexósido	5.84	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	478.0747	477.0678	0.7692	[M-H]-	0.93±0.46a	0.16±0.00a	0.40±0.17a
Quercetina xilosido	6.16	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	434.0849	433.0788	2.6821	[M-H]-	ND	0.41±0.06a	0.13±0.09a
Quercetina ramnósido	6.4	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448.1006	447.0941	1.7316	[M-H]-	ND	2.64±0.01a	1.50±0.39a
Total							0.95±0.48c	12.12±0.26a	6.81±1.53b
<i>Ácidos hidroxicainámicos</i>									
Ácido cumárico hexósido	4.02	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	326.1002	325.0923	-1.9174	[M-H]-	1.32±0.03a	ND	0.47±0.05b
Ácido elálgico	5.6	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	302.0063	300.9979	-3.7856	[M-H]-	1.78±1.30a	0.17±0.21a	0.61±0.61a
Total							3.10±1.27a	0.18±0.21a	1.08±0.57a
<i>Elágitaninos</i>									
Bis-HHDP-hexosa (pedunculagina)	1.65	C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> O <sub>22</sub>	784.0759	783.0718	4.0607	[M-H]-	1.72±1.14a	0.32±0.00a	0.62±0.61a
Castalina	3.55	C <sub>27</sub> H <sub>20</sub> O <sub>18</sub>	632.065	631.0602	3.908	[M-H]-	0.18±0.11a	ND	0.11±0.00a
Total							1.91±1.25a	0.32±0.00a	0.68±0.69a

Los datos se muestran como la media ± desviación estándar de tres réplicas. Los resultados son expresados como µg/mL. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre muestras ( $p < 0.05$ ). \*Identificación confirmada con estándares comerciales. TR: tiempo de retención. ND: no detectado.

### 6.1.3 Estabilidad en el almacenamiento de las bebidas de decocción de frutos rojos

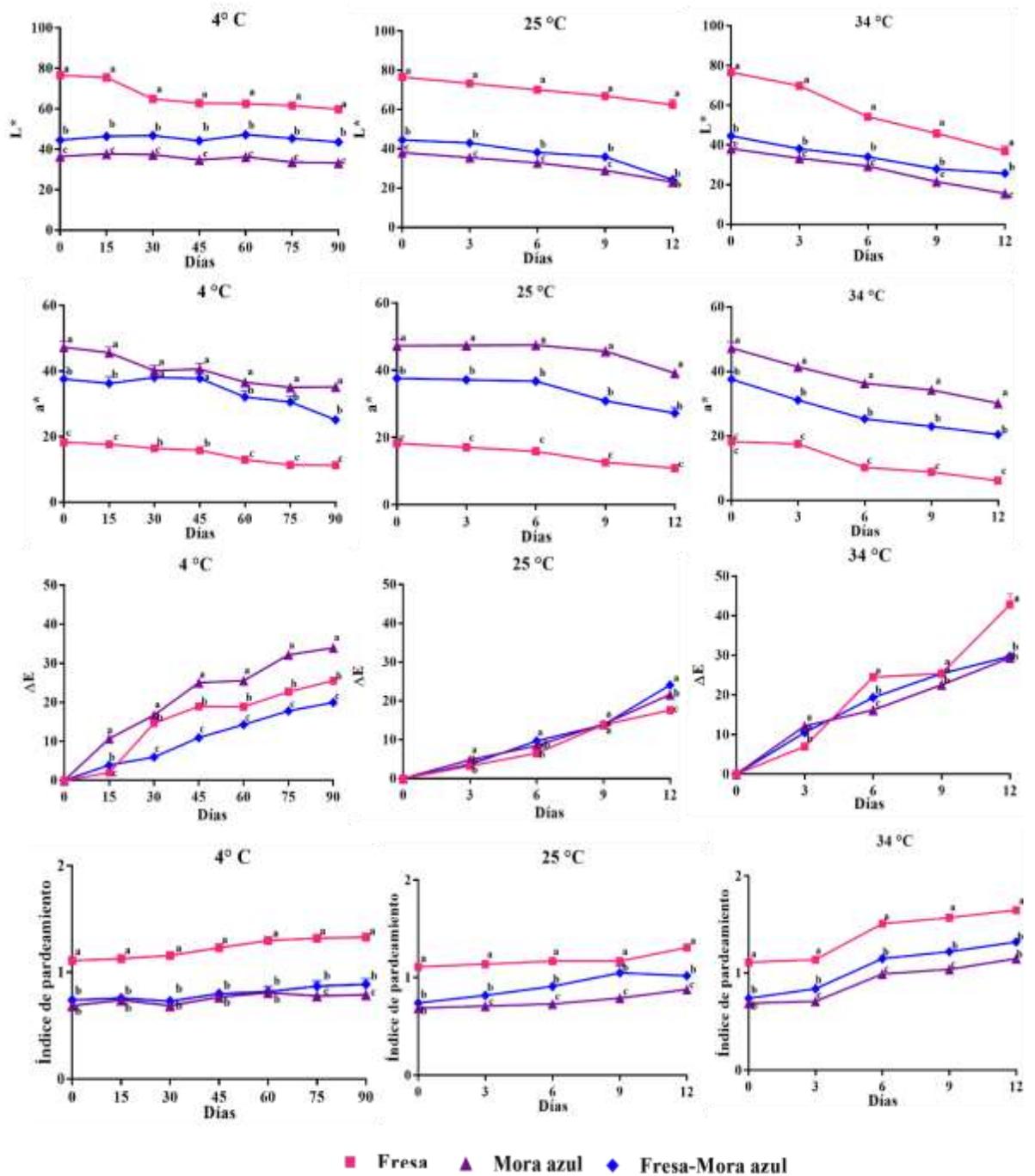
#### a) Color

La BF presentó la mayor luminosidad ( $L^*$ ) de todas las bebidas (76.6), seguida de la BFM (44.5) y la BM (36.4). La luminosidad fue el parámetro de color que logró mayor retención después de los 90 días de almacenamiento a 4 °C en la BFM (97.9 %) y la BM (91.2 %) (**Figura 4**).

La BM presentó el valor más alto de  $a^*$  hasta 47.3, mientras que el de la BF fue de 18.3. La combinación de ambas decocciones en BFM logró un valor de  $a^*$ = 37.6, que fue 2 veces mayor que BF. De forma interesante, a pesar de que la BM presentó menor estabilidad de luminosidad en el almacenamiento, logró una mayor retención de su color rojo en todas las temperaturas de almacenamiento, desde un 63.8 % a 82.8 %. Por otro lado, BF presentó valores más bajos (33.9 %-61.6 %). La combinación de la decocción de fresa y mora azul (BFM) mostró una retención de 54.5 % a 72.3 % para un valor de  $a^*$ , lo que sugiere un efecto de protección sinérgica sobre las antocianinas de BF.

Grobelna y colaboradores, (2019) sugieren que la combinación de antocianinas de diferentes frutas mejora la estabilidad del color rojo en los jugos. Por ejemplo, una mezcla del 10 % y 30 % de jugo de bayas de madreselva, ricos en antocianinas, con jugo de manzana mantuvo el 95.13 % del valor inicial de  $a^*$  y el 92.64% de  $b^*$  después de 4 meses de almacenamiento a 20 °C, en comparación con el jugo de manzana (71.4 %) y el jugo de bayas de madreselva (82.7 %).

El  $\Delta E$  es un parámetro que permitió evaluar los cambios de color durante el almacenamiento de las bebidas comparado con sus valores iniciales. Si este valor es  $>3.0$  la diferencia de color debería ser visible para los consumidores (Cserhalmi *et al.*, 2006). Las bebidas de frutos rojos mostraron valores  $\Delta E > 3.0$  después de tres días de almacenamiento a 25 y 34 °C, mientras que a 4 °C este valor se observó a partir de los quince días de almacenamiento (**Figura 4**).



**Figura 4.** Cambios de color e índice de pardeamiento de las bebidas de decocción de frutos rojos en el almacenamiento. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en cada día son estadísticamente significativas por prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).  $\Delta E$ : cambio de color total.

Se han reportado diferentes resultados con cambios de color para jugos de fresa sometidos a un tratamiento térmico y almacenados a 4 °C; observando valores de  $\Delta E > 3.0$  después de 35 días (Aaby et al., 2018). Mientras que, para un jugo de arándanos, este valor se presentó después de 25 días (Zhu et al., 2018).

#### **b) Índice de pardeamiento**

En general, el pardeamiento aumentó a todas las temperaturas durante el almacenamiento de las bebidas (**Figura 4**). De manera importante, la BFM mostró el mayor incremento del índice de pardeamiento en todas las condiciones. Por lo tanto, los efectos beneficiosos de la combinación de estas frutas en cuanto a su perfil de polifenoles y preservación del color rojo, no impidieron las reacciones de pardeamiento durante el almacenamiento.

El índice de pardeamiento estima la degradación de antocianinas, dando como resultado los complejos de antocianina-tanino polimerizados de color marrón. Por lo tanto, la estabilidad de las antocianinas en la bebida de decocción de frutos rojos, principalmente fresa, podría verse limitada en estas condiciones de almacenamiento. Además, una menor concentración de estos compuestos podría reducir los efectos beneficiosos para la salud.

#### **c) Compuestos polifenólicos extraíbles**

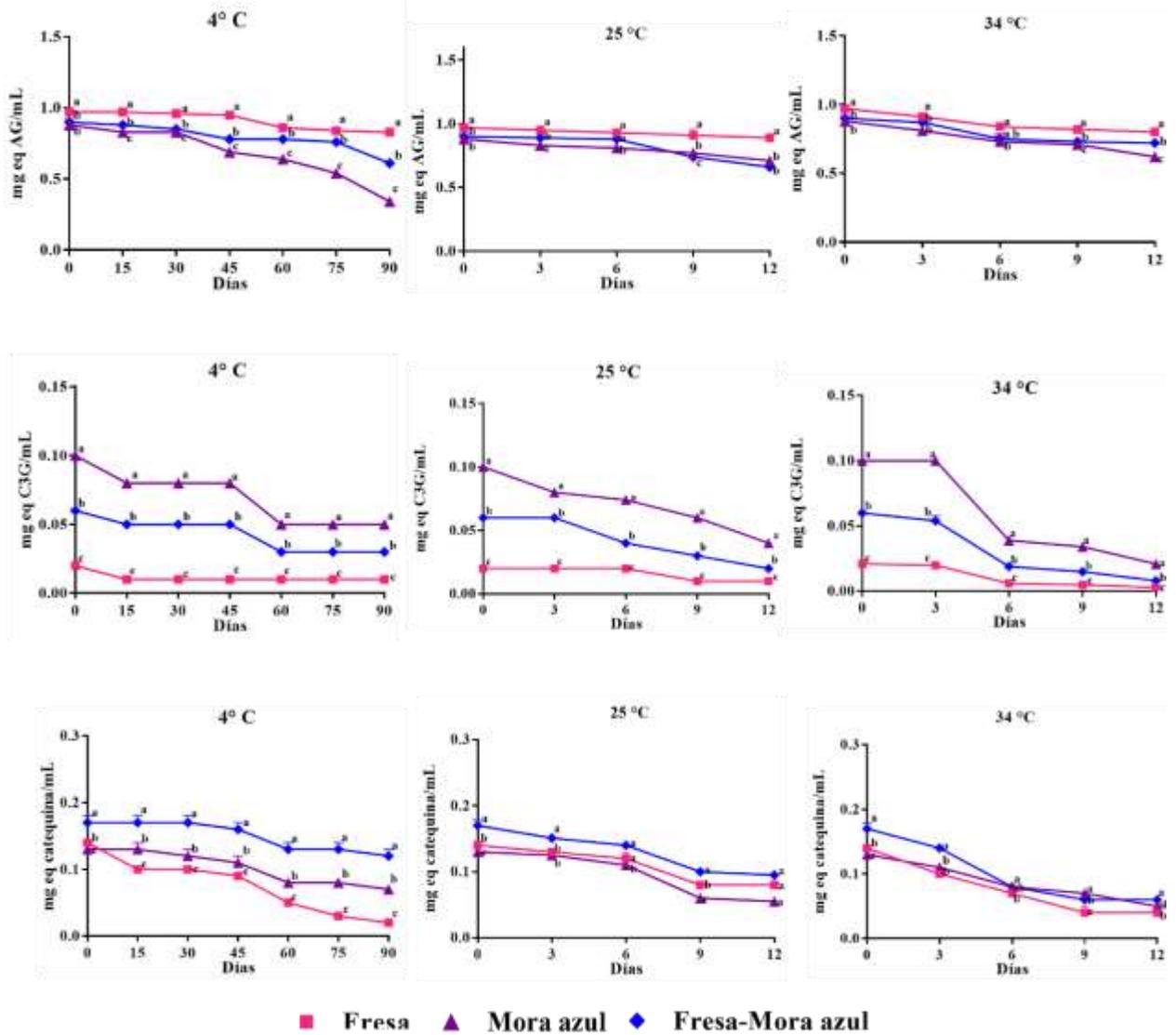
Los compuestos fenólicos de los frutos rojos como la fresa y la mora azul, aportan diferentes beneficios a la salud. Dichos beneficios asociados con estos polifenoles se basan en sus propiedades antioxidantes, que consisten en proteger un sistema biológico contra el efecto potencialmente dañino de procesos que involucran a EROS o ERN (Cervantes et al., 2020).

No obstante, los compuestos polifenólicos, especialmente las antocianinas, son sensibles a altas temperaturas, como ocurre en procesos como la decocción de los frutos o la pasteurización de las bebidas. Adicionalmente, el almacenamiento prolongado y el tiempo de conservación que a menudo se aplican a los jugos y bebidas de frutos rojos, alteran aún más la composición de polifenoles (Mäkilä et al., 2017).

De acuerdo con el contenido de compuestos fenólicos totales, la BF mostró la mayor concentración de estos y de proantocianidinas totales. Por otro lado, la BM contenía 5 veces más antocianinas totales que la BF, mientras que en la BFM su contenido fue 3 veces mayor que la BF. Comparado con lo reportado para bebidas de té comerciales (Moldovan et al., 2015), las bebidas de este estudio mostraron una mayor concentración de polifenoles, correspondiente a 77.5 % más de compuestos fenólicos totales y 19.4 % más de antocianinas totales.

Un estudio realizado en jugos de fresa clarificados y oscuros de diferentes variedades reportó un contenido promedio de proantocianidinas de 0.32-0.45 mg/mL (Oszmiański y Wojdyło, 2009), que fue 2.5 veces mayor que el encontrado para la BF (0.14 mg/mL). Por otro lado, Rodríguez-Daza y colaboradores, (2020) reportaron que jugos de mora azul presentaron 32.9-36.4 mg/mL de proantocianidinas totales. Estas diferencias podrían atribuirse a las diferentes variedades de frutos rojos y al proceso de extracción (jugo versus decocción), ya que la interacción con la cáscara y las membranas podría enriquecer estas proantocianidinas en el jugo en comparación con el proceso de decocción.

La cuantificación de compuestos fenólicos totales, antocianinas y proantocianidinas totales durante el almacenamiento a diferentes temperaturas y tiempos se muestra en la **Figura 5**. La BF mostró una retención significativa de compuestos fenólicos totales en todas las temperaturas de almacenamiento (82.6 %-91 %). Por el contrario, la retención de la BFM fue 29.8 % mayor que la BM después de 90 días de almacenamiento a 4 °C, y un 9.6 % después de 12 días a 34 °C.



**Figura 5.** Cinéticas de degradación del contenido de compuestos polifenólicos extraíbles de las bebidas de frutos rojos control en el almacenamiento. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en cada día son estadísticamente significativas por prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). AG: ácido gálico; C3G: Cianidina-3-O-glucósido.

Para las BF y BFM se observó una menor degradación de los compuestos fenólicos totales, lo cual podría estar asociado con su contenido en elagitaninos. Además, estos compuestos han demostrado una baja degradación en condiciones ácidas (pH 2 y 4) durante pruebas realizadas en soluciones acuosas de elagitaninos de frambuesa (Sójka et al., 2019).

En cuanto a las antocianinas totales, la BF mostró solo un 32.4 % de retención de estos pigmentos a 4 °C. En contraste, las BM y BFM mostraron un 83.3 % y un 85.7 %, respectivamente, demostrando que las antocianinas de mora azul son más estables a la degradación durante el almacenamiento que las de fresa. Además, las BM y BFM demostraron una retención de antocianinas similar a 25 °C (38.6 % y 36.2 %, respectivamente), mientras que esta retención disminuyó a un 20.2 % y 13.4 %, respectivamente, cuando las bebidas se almacenaron a 34 °C. Estos resultados podrían explicar el índice de pardeamiento aumentado que se encuentra en la BFM, lo que sugiere que, aunque la mora azul es rica en antocianinas, estas son muy susceptibles a la degradación térmica durante el almacenamiento.

Finalmente, se observó que las proantocianidinas totales de la BF fueron altamente susceptibles a degradación durante su almacenamiento a 4 °C, logrando una retención de solo un 16.1 %. En contraste, la BM conservó el 56.3 % de sus proantocianidinas totales en las mismas condiciones. De manera interesante, la BFM conservó el 70.3 % de estos compuestos a 4 °C, 14.6% a 25 °C y 7.1% a 34 °C, comparado con la BM.

Existen pocos reportes sobre la estabilidad de las proantocianidinas de frutos rojos. Sin embargo, un estudio realizado por Oszmiański y Wojdyło (2009) comparó el contenido de proantocianidinas de jugos de fresa almacenados a 4 °C y 30 °C durante 6 meses. Ellos observaron una degradación menor a bajas temperaturas (8.2-40.3 %) y altas temperaturas (25.2-56 %), en comparación con nuestros resultados. Estos comportamientos podrían estar asociados con el contenido de pectina en los jugos, la cual ejerce un efecto protector frente a la

degradación de los compuestos polifenólicos, ya que estas pectinas no se extraen durante el proceso de decocción.

El conocimiento de los parámetros cinéticos es fundamental para predecir el cambio en la calidad nutricional y nutracéutica durante el almacenamiento de los alimentos. La degradación de compuestos fenólicos totales en todas las bebidas siguió un modelo cinético de reacción de primer orden, el cual fue determinado por su coeficiente de correlación ( $R^2 > 0.82$ ) (**Cuadro 9**). Los valores de  $k$  aumentaron en todas las bebidas almacenadas a medida que aumentaba la temperatura.

La BF almacenada a 4 °C mostró la vida media de anaquel más prolongada ( $t_{1/2}$ ) de 396 días (13 meses), mientras que a 25 °C fue de 143 días (5 meses). Se ha reportado que algunos compuestos fenólicos, como el ácido *p*-cumárico de las fresas, incrementan el  $t_{1/2}$  de jugos de fresa concentrados durante el almacenamiento a 20 °C durante 120 días (Menevseoglu et al., 2020). Este ácido se encontró en la BF (1.32 µg/mL) y estuvo ausente en la BM, por lo que esto podría explicar en parte la menor tasa de degradación de compuestos fenólicos totales en esta bebida. La BFM mostró a 4 °C un  $t_{1/2}$  más largo de 190 días en comparación con la BM, que fue de 74.2 días. Sin embargo, se observó un comportamiento similar entre las BFM y BM a 25 °C y 34 °C.

El  $t_{1/2}$  de las antocianinas totales de la BM fue equivalente a 7 meses a 4 °C en almacenamiento, mientras que para la BFM fue de 4.2 meses, y para la BF se observó de solo 2 meses (**Cuadro 9**). Por lo tanto, la decocción de mora azul le confirió mayor estabilidad a la BFM. Además, todas las bebidas disminuyeron la estabilidad de dichos compuestos a 25 °C y 34 °C, con un intervalo de 3.9 a 9 días. Finalmente, todas las bebidas mostraron los valores más bajos de  $k$  a 4 °C para la cinética de degradación de las proantocianidinas totales, obteniendo el valor más alto con un  $t_{1/2}$  de 114 días para BFM. Aunque todas las bebidas fueron estadísticamente similares en  $t_{1/2}$ , variando entre 5 y 13 días a 25 °C y 34 °C, a 4 °C se observó una mayor estabilidad de estos compuestos poliméricos.

**Cuadro 9.** Cinética de degradación de primer orden para la estabilidad de compuestos polifenólicos de bebidas de frutos rojos durante el almacenamiento\*

Bebida	T	Compuestos fenólicos totales			Antocianinas totales			Proantocianidinas totales		
		K <sup>1</sup>	t <sub>1/2</sub> <sup>2</sup>	R	K <sup>3</sup>	t <sub>1/2</sub> <sup>2</sup>	R	K <sup>4</sup>	t <sub>1/2</sub> <sup>2</sup>	R
<b>Fresa</b>	4 °C	1.7E-3 ± 0.0 <sup>f</sup>	396.4 ± 16.0 <sup>a</sup>	0.82	1.0E-2 ± 0.0 <sup>f</sup>	68.9 ± 0.4 <sup>c</sup>	0.72	2.1E-2 ± 0.0 <sup>e</sup>	32.2 ± 0.4 <sup>c</sup>	0.92
	25 °C	4.8E-3 ± 0.0 <sup>e</sup>	143.0 ± 6.2 <sup>c</sup>	0.92	1.0E-1 ± 0.0 <sup>c</sup>	6.9 ± 0.1 <sup>de</sup>	0.93	5.3E-2 ± 0.0 <sup>d</sup>	13.1 ± 0.7 <sup>d</sup>	0.88
	34 °C	1.7E-2 ± 0.0 <sup>c</sup>	38.8 ± 2.7 <sup>e</sup>	0.94	1.7E-1 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.0 <sup>e</sup>	0.94	1.3E-1 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.7 <sup>d</sup>	0.95
<b>Mora azul</b>	4 °C	9.3E-3 ± 0.0 <sup>d</sup>	74.2 ± 5.1 <sup>d</sup>	0.84	3.3E-3 ± 0.0 <sup>g</sup>	210.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.8	7.0E-3 ± 0.0 <sup>e</sup>	98.9 ± 7.9 <sup>b</sup>	0.91
	25 °C	1.7E-2 ± 0.0 <sup>c</sup>	39.5 ± 1.7 <sup>e</sup>	0.97	7.6E-2 ± 0.0 <sup>e</sup>	9.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	0.96	7.6E-2 ± 0.0 <sup>c</sup>	9.0 ± 0.4 <sup>d</sup>	0.84
	34 °C	2.6E-2 ± 0.0 <sup>a</sup>	26.5 ± 1.0 <sup>c</sup>	0.91	1.3E-1 ± 0.0 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.4 <sup>de</sup>	0.96	6.4E-2 ± 0.0 <sup>cd</sup>	10.7 ± 0.6 <sup>d</sup>	0.95
<b>Fresa- Mora azul</b>	4 °C	3.6E-3 ± 0.0 <sup>e</sup>	190.2 ± 11.0 <sup>b</sup>	0.82	5.4E-3 ± 0.0 <sup>f,g</sup>	128.5 ± 6.7 <sup>b</sup>	0.93	6.1E-3 ± 0.0 <sup>e</sup>	114.1 ± 10.5 <sup>a</sup>	0.95
	25 °C	2.4E-2 ± 0.0 <sup>a</sup>	28.0 ± 0.6 <sup>e</sup>	0.83	8.9E-2 ± 0.0 <sup>d</sup>	7.7 ± 0.1 <sup>de</sup>	0.96	5.1E-2 ± 0.0 <sup>d</sup>	13.6 ± 0.3 <sup>d</sup>	0.91
	34 °C	2.0E-2 ± 0.0 <sup>b</sup>	33.7 ± 1.2 <sup>e</sup>	0.92	1.7E-1 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.1 <sup>e</sup>	0.94	1.1E-1 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.2 ± 0.4 <sup>d</sup>	0.96

\*Los datos se muestran como la media ± desviación estándar de tres repeticiones. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05) entre muestras. T: temperatura. <sup>1</sup>mg de ácido gálico eq/mL; <sup>2</sup>días; <sup>3</sup>mg de cianidina-3-O-glucósido eq/mL; <sup>4</sup>mg eq de catequina/mL.

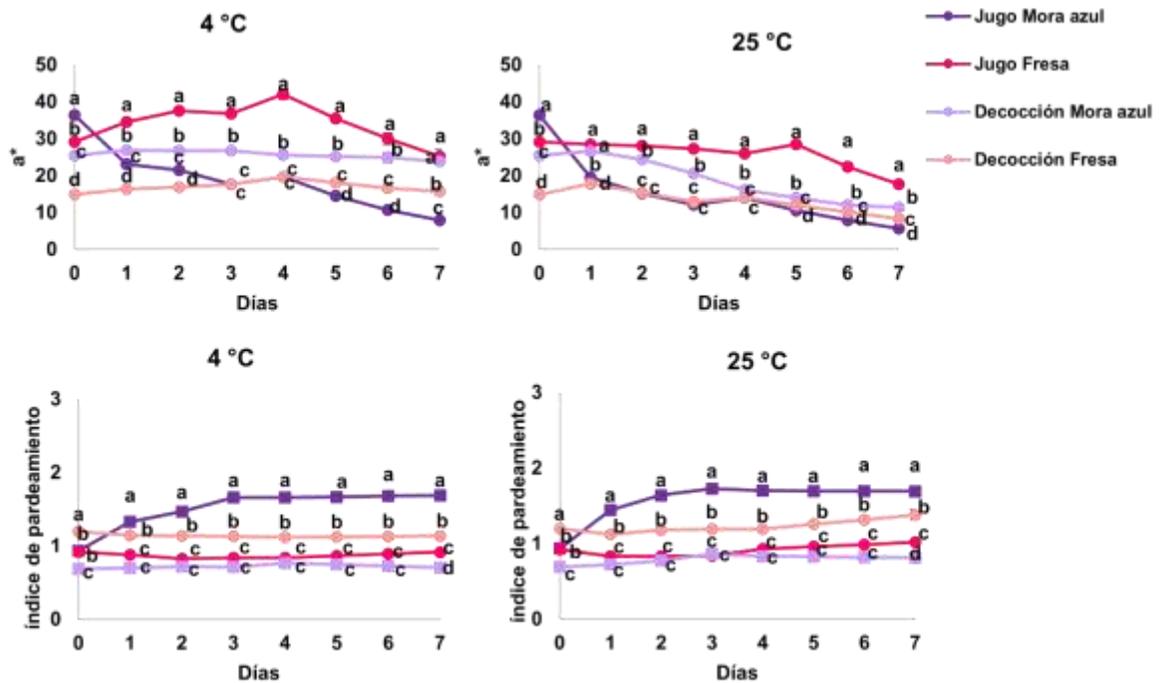
Los resultados obtenidos del análisis sensorial, la estabilidad de las propiedades fisicoquímicas y el contenido de compuestos polifenólicos permiten concluir que las tres bebidas elaboradas a base de decocción de frutos secos presentan un alto índice de aceptabilidad, principalmente debido a su aceptabilidad en el color. Sin embargo, los análisis reflejan un menor contenido en compuestos polifenólicos que han demostrado ejercer beneficios sobre la salud cardiovascular. Esto es debido a la pérdida de estos compuestos debido a las temperaturas aplicadas durante su proceso de elaboración, que se ve agravada durante su almacenamiento, si bien su estabilidad durante el almacenamiento es altamente dependiente de la temperatura del mismo.

Por lo que, a partir de los resultados, se decidió elaborar estas bebidas a partir de jugos de frutas y se determinó si su estabilidad en almacenamiento era mayor con respecto a las decocciones.

## **6.2 Estabilidad del color en decocciones y jugos de frutos rojos**

Se prepararon decocciones de fresa y mora azul, así como sus respectivos jugos con ayuda de una despulpadora para realizar la comparación de la estabilidad de color tanto a refrigeración como a temperatura ambiente y con ello poder elegir la más estable para la elaboración de las bebidas finales.

Los parámetros de color se encuentran muy correlacionados con la variación en el contenido de antocianinas, lo cual nos indica que las mediciones en el color pueden ser empleadas para una estimación del contenido de antocianinas (Gonçalves et al., 2007). Por lo que se realizó una comparación de la estabilidad del parámetro  $a^*$  de color y el incremento del índice de pardeamiento de decocciones y jugos de frutos rojos almacenados a 4 y 25 °C durante 7 días (**Figura 6**).



**Figura 6.** Estabilidad del parámetro de color  $a^*$  e índice de pardeamiento durante el almacenamiento de decocción y jugos de frutos rojos. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en cada día son estadísticamente significativas por prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

De manera general, se observó que, con respecto a la coloración roja inicial, el jugo de fresa presentó un valor de  $a^*$  2 veces mayor que el de la decocción, mientras que el jugo de mora azul fue 1.4 veces superior al de la decocción. En relación con su estabilidad después de 7 días de almacenamiento, el jugo de mora azul mostró mayores pérdidas del valor  $a^*$  con reducciones del 78.3 % y 84.3 % a 4 y 25 °C, respectivamente. Por otro lado, la decocción presentó una pérdida de 6.3 % y 44.5 % a las mismas temperaturas. Estos resultados demuestran la alta sensibilidad de las antocianinas de mora azul en una matriz de jugo, en comparación con una matriz de decocción.

Este fenómeno también se relacionó con el incremento del índice de pardeamiento para el jugo de mora azul, que aumentó un 81 % tanto a 4 °C como a 25 °C después de 7 días de almacenamiento. En contraste, la decocción

mostró un incremento de solo un 2.2 % y 17.9 % a las mismas temperaturas, respectivamente.

Skrede, Wrolstad y Durst, (2000) estudiaron los cambios en el contenido de antocianinas y polifenoles durante el proceso de elaboración de jugo de mora azul, observando que las pérdidas más importantes de antocianinas (68 %) y, por lo tanto, de coloración, ocurrieron durante la molienda de los frutos. Este fenómeno se atribuyó a la posible acción de la enzima endógena polifenol oxidasa. Por otro lado, en el caso de las muestras de jugo de fresa, se identificó una menor pérdida del color rojo a 4 °C (13.8 %) y 25 °C (39.4 %) en comparación con el jugo de mora azul, así como menores incrementos en el índice de pardeamiento de 0.7% y 10.4% a las respectivas temperaturas.

A pesar de que en la decocción de fresa se observaron menores pérdidas de color rojo a 4 °C (5.5 %) con respecto al jugo de fresa (13.8 %), a 25 °C este porcentaje se incrementó a un 43.6 % en la decocción, reafirmando la poca estabilidad de las antocianinas en esta matriz, mientras que en el jugo fue de un 39.4 %. Por lo que a partir de estos resultados, se decidió trabajar con la matriz de jugo de fresa para los siguientes objetivos planteados.

### **6.3 Elaboración y caracterización de las bebidas elaboradas a partir de jugo de fresa**

#### **6.3.1 Enriquecimiento de la bebida de fresa a partir del residuo del procesamiento del jugo**

La fresa es uno de los frutos más populares empleados para la elaboración de jugos, gracias a su agradable sabor y su contenido rico en nutrientes que ofrecen diversos beneficios para la salud, entre los que se incluyen vitaminas, minerales, fibra y, especialmente, compuestos fenólicos (Wan et al., 2018). Además, los subproductos generados durante su procesamiento han sido objeto de creciente interés para el aprovechamiento de sus compuestos bioactivos.

En el **Cuadro 10**, se muestra la cuantificación de los polifenoles extraíbles (PE) y no extraíbles (PNE) presentes en el jugo de fresa y su residuo. Los resultados

muestran que el residuo de fresa contiene una concentración de compuestos fenólicos totales 12.7 veces mayor que el jugo, mientras que el contenido de proantocianidinas totales, como parte de los PE, es 6.8 veces mayor. Por otro lado, las antocianinas totales en el residuo se incrementaron únicamente 1.1 veces en comparación con el jugo.

En el caso de los PNE, su cuantificación se realizó únicamente en el residuo de jugo de fresa, ya que son compuestos de alto peso molecular unidos a los polisacáridos y proteínas de la matriz alimentaria, por lo que solo se encuentran en pieles de frutas, cubiertas de semillas y tallos, y los residuos de diferentes procesos alimentarios industriales son abundantes en dichos compuestos (Ding et al., 2020).

**Cuadro 10.** Contenido total de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles de jugo de fresa y su residuo\*.

Matriz	Polifenoles extraíbles			Polifenoles no extraíbles	
	Fenoles <sup>1</sup>	Antocianinas <sup>2</sup>	PA <sup>3</sup>	PA no extraíbles <sup>4</sup>	PH <sup>1</sup>
<b>Jugo</b>	1.11±0.07	0.06±0.00	0.44±0.02	NA	NA
<b>Residuo</b>	14.15±0.26	0.07±0.01	3.00±0.18	2.86±0.23	1.14±0.03

\*Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. <sup>1</sup>mg eq AG/mL o g, <sup>2</sup>mg eq C3G/mL o g, <sup>3</sup>mg eq catequina/mL o g, <sup>4</sup>mg eq proantocianidinas/g. PA: proantocianinas; PH: polifenoles hidrolizables; NA: no aplica.

Diferentes estudios han reportado concentraciones de compuestos fenólicos totales que varían desde 0.25 hasta 6.05 mg eq ácido gálico/mL de jugo de fresa (Arend et al., 2017; Wan et al., 2018). Estas variaciones podrían atribuirse a factores como el tipo de cultivo, la variedad de fresa, el país de origen, el grado de madurez del fruto e incluso el proceso de extracción del jugo. Por otro lado, el contenido de antocianinas totales del jugo de fresa fue similar a lo reportado previamente por Ertan y colaboradores (2019).

En cuanto a los PE en residuos de fresa, las pocas caracterizaciones disponibles reportan concentraciones que van desde 5.7 hasta 12.8 mg eq AG/g de muestra (Villamil-Galindo et al., 2020), rango en el que se encuentra comprendida la concentración obtenida en esta experimentación.

En relación con los PNE, los residuos de jugo aportan 4 g/g de estos compuestos, representando el 22 % del contenido total de compuestos polifenólicos, siendo las proantocianidinas no extraíbles (PANE) el 71.5 % y los polifenoles hidrolizables (PH) el 28.5 %. Los PNE han sido poco reportados para los frutos rojos y sus subproductos. Previamente, en el grupo de trabajo realizamos la cuantificación de PE y PNE del residuo de decocción de fresa. En este estudio, de manera similar, se encontró que las PANE fueron las mayoritarias de los PNE (92 %). No obstante, estos últimos representaron el 68.1% del total de los polifenoles del residuo (Reynoso-Camacho et al., 2021). Las diferencias podrían estar relacionadas a las diferencias físicas de los residuos obtenidos tanto del jugo como de la decocción.

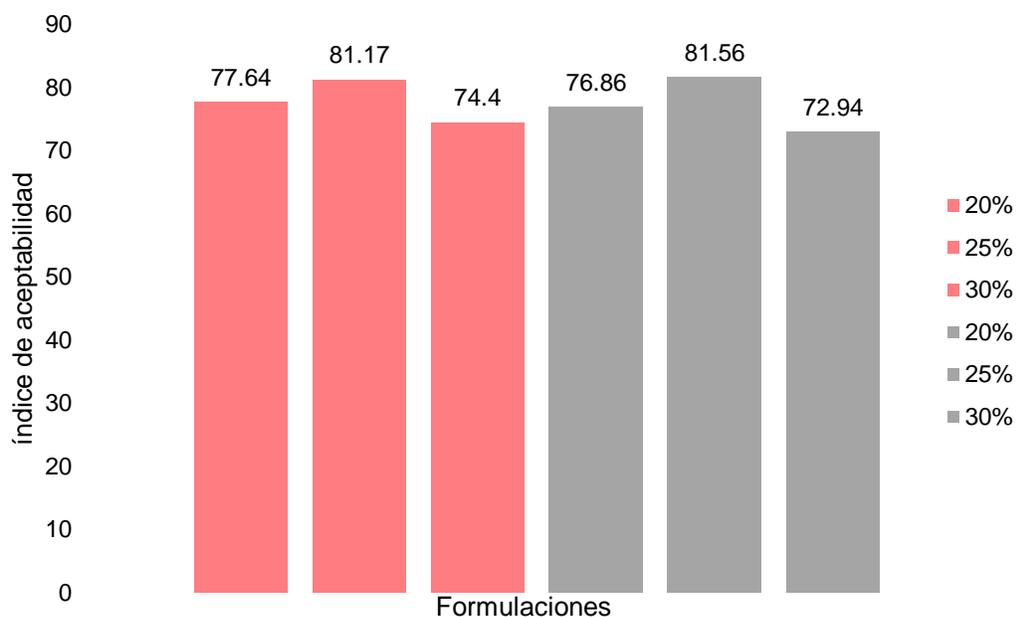
### **6.3.2 Evaluación sensorial para seleccionar el enriquecimiento con residuo de jugo de fresa**

A partir de diferentes pruebas sensoriales realizadas previamente en el grupo de trabajo, se definieron seis formulaciones de bebidas enriquecidas con residuo de decocción para evaluar en el panel sensorial. Estas formulaciones consistieron en adicionar 20 %, 25 % y 30 % de residuo, evaluando 2 diluciones de jugo/agua (30:70 y 35:65). La adición de este porcentaje de residuo generaría bebidas con un contenido de polifenoles de 396-583 mg/100 mL de bebida (**Cuadro 11**), lo cual aportaría el consumo reportado de polifenoles de bebidas no alcohólicas (340.5 mg/día) y el consumo de 445-1240 mg de polifenoles al día en la dieta mexicana (Galvan-Portillo, et al., 2007). Los resultados del índice de aceptabilidad se muestran en la **Figura 7**, donde las barras rosas representan la dilución 30:70 y las barras grises la de 35:65. Ambas diluciones fueron evaluadas con la adición de diferentes concentraciones de residuo (20, 25 y 30 %).

**Cuadro 11.** Contenido de polifenoles extraíbles y no extraíbles de las formulaciones de bebidas de fresa enriquecidas con residuo\*

Formulación	Jugo	Agua	Residuo	PE <sup>1</sup>		PNE <sup>1</sup>	Total
				Jugo	Residuo	Residuo	
1	30	70	20	33	283	80	396
2	30	70	25	33	353.8	100	486.8
3	30	70	30	33	424.5	120	577.5
4	35	65	20	38.5	283	80	401.5
5	35	65	25	38.5	353.8	100	492.3
6	35	65	30	38.5	424.5	120	583

\*Las formulaciones corresponden a 100 mL de bebida. <sup>1</sup>mg eq ácido gálico. PE: polifenoles extraíbles, PNE: polifenoles no extraíbles.



**Figura 7.** Índice de aceptabilidad de formulaciones de bebidas enriquecidas con residuos de fresa. Las barras color rosa representan la dilución 30:70 (jugo de fresa/agua), mientras que las barras grises la dilución 35:65 (jugo de fresa/agua).

Los resultados de la evaluación sensorial demostraron que todas las formulaciones son aceptables para los consumidores, ya que obtuvieron un índice de aceptabilidad >70 %. En este sentido, las formulaciones 2 y 5 (**Cuadro 11**), adicionadas con un 30 % de residuo en ambas diluciones de jugo, alcanzaron un índice de aceptabilidad del 81 %. No obstante, se eligió la formulación 5, debido a su mayor aporte de compuestos polifenólicos totales, que representa la bebida enriquecida.

### 6.3.4 Composición nutrimental de las bebidas de fresa

En el **Cuadro 12** se muestran los resultados de la composición nutrimental de la bebida control (sin residuo), enriquecida (bebida control + residuo) y la bebida comercial.

**Cuadro 12.** Composición nutrimental de las bebidas de fresa\*

<b>Parámetro</b>	<b>Control</b>	<b>Enriquecida</b>	<b>Comercial</b>
Humedad (%)	97.4 ± 0.1a	93.4 ± 0.1a	99.5 ± 0.1a
Cenizas (%)	0.1 ± 0.0a	0.3 ± 0.0a	ND
Carbohidratos (g)	1.9 ± 0.0b	4.6 ± 0.0a	0.5 ± 0.0b
Azúcares (g)	ND	3.2 ± 0.0	ND
Fibra dietaria (g)	0.6 ± 0.1b	1.3 ± 0.3a	ND
Grasas totales (g)	ND	ND	ND
Proteínas (g)	ND	0.5 ± 0.0	ND
Sodio (mg)	5.4 ± 0.1a	5.4 ± 0.1a	5.0 ± 0.1a
Contenido energético (kcal)	7.4 ± 0.0b	20.3 ± 0.0a	2.0 ± 0.0c

\*Datos expresados como la media ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por prueba de Tukey. Resultados expresados por porción de 100 mL. ND: no detectado. Análisis realizado por Laboratorios Becar, Monterrey, Nuevo León.

De manera general, las bebidas evaluadas mostraron un rango de humedad superior al 93 %, siendo la bebida comercial la de mayor valor. En cuanto al contenido de cenizas, este se incrementó 2.3 veces al adicionar el residuo a la bebida control, mientras que en la bebida comercial no se detectaron cenizas.

La mayor concentración de azúcares se identificó en la bebida enriquecida con respecto a la bebida control y a la bebida comercial. Esto se puede relacionar

con el contenido de azúcares simples como glucosa y fructosa, los cuales se han reportado entre un 0.7 a 7 % en residuos de fresa (Sójka et al., 2013), resaltando que ni la bebida control ni la comercial incluyen sacarosa como ingrediente.

El contenido de fibra dietaria en la bebida enriquecida con 25 % de residuo de fresa se incrementó 2 veces con respecto a la bebida control que solo contenía el jugo de fresa. Para comparación, un jugo de naranja enriquecido con fibra de cítricos reportado por Bosch-Sierra y colaboradores (2021) presentó 1.4 g/100 mL, similar a nuestra bebida desarrollada. Por otro lado, un jugo de fresa enriquecido con inulina, oligofructosa y fibra de manzana mostró un contenido de fibra de 3.75 g/100 mL (Cassani et al., 2016), 3 veces mayor a las bebidas de nuestro estudio.

Finalmente, en relación con el contenido calórico, se observa que la bebida enriquecida presentó 13.2 kcal más que la bebida control y 18.8 kcal más que la bebida comercial. Se ha reportado que el subproducto de fresa tiene un alto aporte calórico, el cual puede ser hasta 10 veces mayor que los frutos de fresa, y esto se ha relacionado principalmente con su contenido de azúcares (Sójka et al., 2013). No obstante, estudios recientes han sugerido que el consumo de jugos de 100 % fruta sin azúcares añadidos puede ser una forma práctica de alcanzar las recomendaciones diarias de consumo de frutas (Benton y Young, 2019). Por lo tanto, nuestra bebida es una opción adecuada para contribuir al cumplimiento de dichas recomendaciones.

### **6.3.5 Cuantificación de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles de las bebidas de fresa**

Para conocer el incremento de los compuestos polifenólicos totales en la bebida enriquecida con respecto a la bebida control y comercial, se realizaron las determinaciones correspondientes, cuyos resultados se encuentran en el **Cuadro 13**.

**Cuadro 13.** Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles de las bebidas de fresa.\*

Polifenoles	Subcategoría	Control	Enriquecida	Comercial
<b>Extraíbles</b>	Compuestos fenólicos totales <sup>1</sup>	44.28 ± 2.93b	397.94 ± 4.19a	6.36 ± 0.43c
	Antocianinas <sup>2</sup>	2.24 ± 0.04b	3.93 ± 0.18a	ND
	Proantocianidinas <sup>3</sup>	17.72 ± 0.53b	92.40 ± 3.82a	11.92 ± 0.47c
<b>No extraíbles</b>	Proantocianidinas <sup>4</sup>	NA	71.45 ± 5.70	NA
	Polifenoles hidrolizables <sup>1</sup>	NA	28.52 ± 0.68	NA

\*Datos expresados en 100 mL de bebida. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).<sup>1</sup>mg eq ácido gálico, <sup>2</sup>mg eq cianidina-3-O-glucósido, <sup>3</sup>mg eq catequina, <sup>4</sup>mg eq proantocianidinas. NA: no aplica.

La concentración de compuestos fenólicos totales en la bebida control (44.28 mg eq AG/100 mL) se encontró dentro de los valores reportados de 5 bebidas comerciales de mezclas frutos rojos, que en su composición tienen jugo de fresa, los cuales corresponden desde 31.2 hasta 91.6 mg eq AG/100 mL (de Beer et al., 2012).

Se encontraron diferencias significativas en el contenido de PE en las tres bebidas de fresa, siendo la bebida enriquecida la que presentó una mayor concentración de estos, incrementando 9 veces los compuestos fenólicos totales, 1.8 veces las antocianinas y 5.2 veces las proantocianidinas con respecto a la bebida control.

Con respecto a otros estudios similares cuyo objetivo era incrementar el contenido de polifenoles totales en bebidas, Gironés-Vilaplana y colaboradores (2012) realizaron el enriquecimiento de jugo de limón (62.97 mg eq AG/100 mL) con 2.5 % y 5 % de fruto rojo maqui liofilizado, logrando concentraciones finales de 187.80 mg eq AG/100 mL y 279.84 mg eq AG/100 mL, incrementando, respectivamente, 3 y 4.4 veces la concentración de compuestos fenólicos totales en el jugo de limón. Por lo que estos incrementos reportados fueron menores a los encontrados en nuestro estudio.

El contenido de antocianinas totales también se incrementó significativamente en la bebida enriquecida, con un aumento del 75 % respecto a la bebida control. En contraste, en la bebida comercial, no se detectaron estos compuestos.

Finalmente, la concentración de proantocianidinas extraíbles en la bebida enriquecida con residuo se incrementó 5.2 veces con respecto a la bebida control. Hasta el momento no existen reportes de bebidas enriquecidas con este tipo de polifenoles poliméricos. Sin embargo, se ha demostrado que las fracciones purificadas de proantocianidinas de fresa reducen significativamente las EROS evaluadas *in vitro*, así como disminuyen la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$ ) (Van de Velde et al., 2018). Esto sugiere que el enriquecimiento alcanzado en las bebidas podría incrementar los beneficios esperados con respecto a la bebida control.

En relación con el contenido de las PANE, este también aumentó significativamente con la adición del residuo de jugo de fresa a la bebida control. Los estudios previos enfocados en las PANE han demostrado su efecto antioxidante, su capacidad de modulación de la microbiota colónica, actividades biológicas de sus metabolitos generados en su catabolismo y efectos sinérgicos con la fibra dietaria (Martínez-Meza, Reynoso-Camacho y Pérez-Jiménez, 2020). Esto refuerza el valor funcional de las bebidas enriquecidas.

Finalmente, en la bebida comercial se cuantificaron también compuestos fenólicos totales. Esta bebida no contiene fresa natural o algún otro ingrediente con dicha propiedad, de acuerdo con la etiqueta y listado de ingredientes. No obstante, se conoce que la metodología de Folin-Ciocalteu para la determinación de compuestos fenólicos totales presenta interferencias por otros compuestos como los ácidos orgánicos, azúcares, aminas aromáticas, entre otros, que pueden sobreestimar la cuantificación real de estos compuestos (Lester *et al.*, 2012). De acuerdo con las cuantificaciones anteriormente mencionadas, los azúcares simples no explican estos resultados, ya que estos no fueron

detectados en esa bebida. Posiblemente, los ácidos orgánicos, usados como conservantes o acidulantes, contribuyeron a la sobreestimación.

Finalmente, la bebida comercial de fresa mostró una baja concentración de proantocianidinas extraíbles respecto a las bebidas control y enriquecida, a pesar de que no está elaborada a base de jugo. Sin embargo, estudios han demostrado que el ensayo de vainillina para la determinación de proantocianidinas tiene sustancias interferentes como el ácido ascórbico (Vitamina C) adicionada a este tipo de bebidas comerciales (Sun et al., 1998) que sobreestiman la concentración de proantocianidinas en las determinaciones, lo cual explicaría el resultado observado.

### **6.3.6 Evaluación microbiológica de las bebidas de fresa**

La fresa representa un fruto altamente perecedero y delicado, que presenta una vida útil muy baja, ya que tiene alta susceptibilidad a los ataques de hongos y pérdidas de textura, lo cual ocasiona hasta un 50 % de pérdida (Gani et al., 2016). Por lo tanto, su calidad microbiológica debe ser monitoreada constantemente, no solo en el fruto, sino también en sus productos derivados. Para garantizar la calidad microbiológica de las bebidas después de su elaboración, se realizó la cuantificación de los microorganismos que establece la NOM-218-SSA1-2011 para bebidas saborizadas no alcohólicas.

Las bebidas presentaron una inocuidad adecuada para su consumo (**Cuadro 14**), ya que los valores detectados fueron menores a los límites máximos, siendo de 50 UFC/mL para bacterias mesófilas aerobias, de 10 NMP/mL para coliformes totales y ausencia de coliformes fecales. Además, los resultados con respecto a hongos y levaduras también mostraron <1 UFC.

**Cuadro 14.** Determinación de la calidad microbiológica de las bebidas de fresa. \*

Bebida	Bacterias mesófilas aerobias (UFC/mL)	Coliformes totales (NMP/mL)	Coliformes fecales (NMP/mL)	Hongos (UFC/mL)	Levaduras (UFC/mL)
Control	4	<0.3	<0.3	<1	<1
Enriquecida	1	<0.3	<0.3	<1	<1
Comercial	1	<0.3	<0.3	<1	<1

\*UFC: unidades formadoras de colonia, NPM: número más probable. Análisis microbiológicos realizados por la Unidad de Servicios Clínicos y Diagnóstico Molecular. Facultad de Química. UAQ.

### 6.3.7 Evaluación sensorial hedónica de las bebidas de fresa

De manera general, las características sensoriales evaluadas no mostraron diferencias significativas entre las tres bebidas de fresa (**Cuadro 15**). No obstante, con respecto al color, la bebida control mostró ligeramente mayor valor en comparación a la bebida enriquecida y comercial. En relación con el olor, sabor y contenido de sólidos, el enriquecimiento con el residuo incrementó ligeramente el promedio de la evaluación de dichos parámetros con respecto a la bebida control y comercial. El índice de aceptabilidad fue similar en la bebida control y enriquecida, lo que indica que la adición del residuo de jugo de fresa no afecta la preferencia sensorial de esta bebida. Además, el uso de jugo natural de fresa aumentó el índice de aceptabilidad un 9 % con respecto a la bebida comercial.

De acuerdo con los valores de oblicuidad negativos, todas las bebidas presentaron una asimetría positiva en todos los parámetros sensoriales evaluados, lo que se reflejó en las puntuaciones, las cuales fueron superiores a 5 por parte de los participantes. De manera interesante, todos los parámetros de la bebida comercial fueron inferiores en comparación con las bebidas control y enriquecida, lo que sugiere una mayor preferencia por las bebidas naturales.

**Cuadro 15.** Evaluación sensorial hedónica de bebidas de fresa.\*

Características sensoriales	Bebidas de fresa		
	Control	Enriquecida	Comercial
<b>Color</b>			
Promedio ± DE	7.9 ± 1.0a	7.8 ± 0.9a	7.7 ± 1.2a
Oblicuidad	-0.7	-0.7	-0.3
Curtosis	-0.4	0.2	-1.5
<b>Olor</b>			
Promedio ± DE	7.8 ± 1.1a	7.9 ± 1.1a	7.4 ± 1.4a
Oblicuidad	-0.3	-0.5	-0.2
Curtosis	-1.3	-0.8	-1.4
<b>Sabor</b>			
Promedio ± DE	7.6 ± 2.1a	7.9 ± 1.0a	7.1 ± 1.4a
Oblicuidad	-2.5	-0.3	-0.3
Curtosis	7.3	-1.3	-1.3
<b>Contenido de sólidos</b>			
Promedio ± DE	7.5 ± 1.4a	7.6 ± 1.5a	7.4 ± 1.3a
Oblicuidad	-0.7	-0.7	-0.3
Curtosis	-0.5	-1.0	-0.9
<b>Aceptabilidad general</b>			
Promedio ± DE	8.1 ± 0.9a	8.1 ± 0.7a	7.4 ± 1.2a
Oblicuidad	-0.2	-0.2	-0.1
Curtosis	-1.9	-1.0	-1.6
<b>Índice de aceptabilidad</b>	90	90	82

\*Los datos se muestran como la media ± desviación estándar (DE). Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre bebidas.

En la evaluación sensorial de la bebida de fresa enriquecida con el residuo de jugo, se observó que el 60 % de los participantes calificaron con 8 y 9 el sabor y el contenido de residuos; un 64 % de los participantes calificaron de manera similar a la bebida control y un 50 % de los participantes a la bebida comercial. Esto demuestra que existe preferencia por parte de los consumidores para estas bebidas funcionales a pesar de la adición del residuo rico en sólidos y fibra.

### 6.3.8 Perfil de compuestos polifenólicos de las bebidas de fresa

Los resultados del perfil identificado de compuestos polifenólicos en las bebidas control, enriquecida y comercial se muestran en el **Cuadro 16**. En relación con la bebida comercial, ningún compuesto fenólico fue detectado, lo cual confirma la sobreestimación de estos compuestos por la interferencia de otras moléculas en la cuantificación espectrofotométrica mostrada en el apartado 6.7.

La adición del residuo de jugo de fresa incrementó significativamente los compuestos polifenólicos extraíbles como las antocianinas (48.8 veces), los flavonoides como flavanoles (3.4 veces), flavanonas (6.7 veces) y flavonoles (24.1 veces) con respecto a la bebida control. Además, se identificó la presencia de algunos polifenoles extraíbles en la bebida enriquecida que no se encontraban en la bebida control, principalmente, la antocianina cianidina hexósido y el flavonol (iso)-ramnetina hexósido.

Con respecto a los polifenoles no extraíbles, se observó un incremento en la concentración de elagitaninos en la bebida enriquecida, alcanzando hasta 10.7 veces el valor encontrado en la bebida control, donde la peduncalagina fue la mayoritaria. Por otro lado, se incrementó significativamente la concentración de los polifenoles hidrolizables, tales como, los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, aumentando 7.4 veces y 7.8 veces respectivamente, con respecto a la bebida control. Entre los principales ácidos encontrados, los más abundantes fueron el ácido hidroxibenzoico hexósido isómero I y II, ácido cumárico hexósido y ácido elágico.

Investigaciones previas, tanto *in vivo* como clínicas, respaldan el efecto protector de las antocianinas presentes en frutos rojos, especialmente en lo que concierne a la obesidad, la resistencia a la insulina y los niveles de lípidos en sangre (Riordan y Solverson, 2022). De acuerdo con Bhaswant y colaboradores (2015), la suplementación con cianidina 3-O-glucósido, antocianina mayoritaria de nuestras bebidas, mejora el síndrome metabólico en un modelo inducido con una dieta alta en grasa y azúcares. Además, se ha reportado el efecto beneficioso de los elagitaninos extraídos de las fresas en el control del aumento de peso corporal, la acumulación de grasa hepática, los niveles de triglicéridos y el glutatión oxidado en un modelo animal alimentado con una dieta alta en grasas (Żary-Sikorska et al., 2020).

En relación con los polifenoles hidrolizables, los ácidos fenólicos han demostrado en estudios preclínicos su efectividad en la mejora del perfil lipídico

en suero, la disminución de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y mejora de la esteatosis hepática. Además, se han observado mejoras en la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en modelos de animales diabéticos, así como sus efectos hipoglucémicos al modular la glucogénesis y gluconeogénesis en condiciones de resistencia a la insulina (Alam et al., 2016). El ácido *p*-cumárico, identificado en las bebidas de fresa de este estudio, ha mostrado un efecto antiobesogénico al disminuir el peso de tejido adiposo blanco y el tamaño de sus adipocitos, los niveles de lípidos y glucosa sérica en ayunas, así como el índice HOMA-IR en ratones obesogénicos suplementados con 10 mg de este ácido por kg de peso corporal al día durante 16 semanas (Yoon et al., 2021).

No obstante, el efecto de estos polifenoles no extraíbles en estudios clínicos ha sido poco estudiado, por lo que es necesario verificar estos efectos potenciales sobre la salud que han sido reportados previamente.

A partir de estos resultados, se demostró que el enriquecimiento de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles a partir del residuo de jugo adicionado a la bebida de fresa, mejora el perfil de compuestos polifenólicos, por lo que en el siguiente objetivo se planteó evaluar si dicho enriquecimiento tiene efectos benéficos en la prevención del riesgo cardiovascular de adultos jóvenes.

**Cuadro 16.** Identificación de compuestos polifenólicos en las bebidas de fresa por UPLC-ESI-Q-ToF-MS<sup>E</sup>.

Compuestos	TR (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	Masa observada (Da)	Error de masa (ppm)	Aductos	Control	Bebidas Enriquecida	Comercial
<u>Antocianinas</u>									
Cianidina hexósido	4.26	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> O <sub>11</sub>	449.1084	449.1128	9.8463	[M] <sup>+</sup>	ND	7.10±0.00	ND
Pelargonidina rutínosido	5.3	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>	579.1714	579.1706	-1.3725	[M] <sup>+</sup>	0.19±0.01	2.18±0.02*	ND
Total							0.19±0.02	9.27±0.02*	ND
<u>Elagitaninos</u>									
Pedunculagina	3.35	C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> O <sub>22</sub>	784.0759	784.0765	0.7633	[M-H] <sup>-</sup>	1.71±0.48	26.45±4.65*	ND
Castalina	4.12	C <sub>27</sub> H <sub>20</sub> O <sub>18</sub>	632.065	632.0652	0.4467	[M-H] <sup>-</sup>	0.65±0.16	5.02±0.13*	ND
Estrictina	4.59	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>18</sub>	634.0806	634.081	0.5489	[M-H] <sup>-</sup>	1.90±0.45	12.90±1.75*	ND
Castalagina	10.9	C <sub>41</sub> H <sub>26</sub> O <sub>26</sub>	934.0712	934.0692	-2.1904	[M-H] <sup>-</sup>	ND	1.02±0.18	ND
Total							4.26±1.09	45.38±6.35*	ND
<u>Flavonoles</u>									
Procianidina trímero	3.22	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	866.2058	866.2063	0.5259	[M-H] <sup>-</sup>	0.66±0.23	2.65±0.61*	ND
(Epi)-catequina hexósido isó	3.47	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	452.1319	452.1325	1.3492	[M-H] <sup>-</sup>	0.11±0.02	0.38±0.33	ND
Procianidina dímero	3.98	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	578.1424	578.1426	0.3853	[M-H] <sup>-</sup>	2.87±0.69	10.24±0.24*	ND
(+)-Catequina <sup>+</sup>	4.5	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.079	290.0792	0.5308	[M-H] <sup>-</sup>	5.32±0.66	17.06±1.33*	ND
(-)-Epicatequina	5.73	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.079	290.0792	0.4992	[M-H] <sup>-</sup>	0.12±0.02	0.33±0.02*	ND
Total							9.08±1.61	30.65±0.16*	ND
<u>Flavanonas</u>									
Eriocitrina	5.79	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	596.1741	596.1743	0.2378	[M-H] <sup>-</sup>	0.45±0.08	3.24±0.09*	ND
Naringenina <sup>+</sup>	7.79	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	272.0685	272.0688	1.1648	[M-H] <sup>-</sup>	0.10±0.01	0.58±0.01*	ND
Eriodictiol	11.13	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	288.0634	288.0625	-2.948	[M-H] <sup>-</sup>	0.12±0.01	0.53±0.03*	ND
Hesperidina <sup>+</sup>	11.37	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	610.1898	610.189	-1.223	[M-H] <sup>-</sup>	0.07±0.02	0.58±0.07*	ND
Total							0.74±0.13	4.93±0.01*	ND

<b>Flavonoides</b>									
Kaempferol pentosil-hexósido	3.63	C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> O <sub>15</sub>	580.1428	580.1436	1.4257	[M-H] <sup>-</sup>	0.08±0.01	0.63±0.05*	ND
Kaempferol hexósido	4.56	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	448.1006	448.1011	1.1076	[M-H] <sup>-</sup>	0.38±0.06	2.96±0.06*	ND
Kaempferol hexósido-ramnó	4.86	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594.1585	594.1568	-2.8901	[M-H] <sup>-</sup>	ND	0.16±0.07	ND
Quercetina hexósido	5.18	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	464.0955	464.0964	2.0046	[M-H] <sup>-</sup>	0.06±0.01	0.28±0.01*	ND
Kaempferol rutínosido	5.69	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594.1585	594.1573	-2.0293	[M-H] <sup>-</sup>	0.28±0.06	0.92±0.73	ND
Kaempferol hexosil-ramnosil	5.78	C <sub>33</sub> H <sub>46</sub> O <sub>20</sub>	756.2113	756.2119	0.8473	[M-H] <sup>-</sup>	0.07±0.01	0.40±0.01*	ND
Quercetina acetil-hexósido-r	8.67	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	652.1639	652.1627	-1.9493	[M-H] <sup>-</sup>	ND	0.52±0.07	ND
Quercetina rutínosido*	9.59	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610.1534	610.1528	-0.8915	[M-H] <sup>-</sup>	ND	1.00±0.04	ND
(iso)-ramnetina hexósido	9.86	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	478.0747	478.0744	-0.799	[M-H] <sup>-</sup>	ND	33.62±0.94	ND
Miricetina ramnósido	9.87	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	464.0955	464.0952	-0.7	[M-H] <sup>-</sup>	0.58±0.10	3.36±0.02*	ND
Kaempferol*	11.04	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	286.0477	286.0471	-2.1078	[M-H] <sup>-</sup>	0.12±0.01	0.86±0.04*	ND
Quercetina ramnósido	11.05	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	448.1006	448.0999	-1.4292	[M-H] <sup>-</sup>	0.62±0.12	7.49±0.81*	ND
Total							2.16±0.39	52.16±1.01*	ND
<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>									
Ácido galoliqu	2.23	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	344.0743	344.0742	-0.5248	[M-H] <sup>-</sup>	ND	0.76±0.03	ND
Ácido galoliquínico isómero I	3.14	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	344.0743	344.0748	1.3594	[M-H] <sup>-</sup>	0.97±0.09	9.30±1.70*	ND
Ácido gálico hexósido	3.17	C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	332.0743	332.0747	1.1637	[M-H] <sup>-</sup>	1.56±0.18	9.94±1.11*	ND
Ácido dihidroxibenzoico hexó	3.3	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	316.0794	316.0797	0.8071	[M-H] <sup>-</sup>	1.34±0.19	8.30±1.44*	ND
Ácido vanílico*	3.32	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	168.0423	168.042	-1.4665	[M-H] <sup>-</sup>	0.16±0.01	1.30±0.12*	ND
Ácido gálico*	3.34	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	170.0215	170.0208	-4.301	[M-H] <sup>-</sup>	0.15±0.00	0.79±0.13*	ND
Ácido hidroxibenzoico hexósi	3.47	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	300.0845	300.0847	0.6619	[M-H] <sup>-</sup>	7.70±0.67	51.36±8.78*	ND
Ácido hidroxibenzoico hexósi	4.07	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	300.0845	300.0846	0.4004	[M-H] <sup>-</sup>	3.54±0.45	45.79±2.96*	ND
ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico	4.08	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	138.0317	138.0317	0.2165	[M-H] <sup>-</sup>	2.52±0.15	28.69±0.60*	ND
Ácido dihidroxibenzoico isóm	5.29	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154.0266	154.0267	0.6244	[M-H] <sup>-</sup>	1.71±0.09	9.44±1.61	ND
Ácido dihidroxibenzoico isóm	6.22	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154.0266	154.0266	-0.2517	[M-H] <sup>-</sup>	0.43±0.02	1.91±0.27*	ND
Ácido hidroxibenzoico isóme	9.44	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	138.0317	138.0316	-0.6021	[M-H] <sup>-</sup>	5.64±0.33	26.14±2.14*	ND
Ácido metilgálico	9.93	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	184.0372	184.0368	-2.2401	[M-H] <sup>-</sup>	0.59±0.04	1.52±0.03*	ND
Total							26.27±2.22	195.20±12.9	ND
<b>Ácidos hidroxicármicos</b>									
Ácido cateico hexósido	3.8	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	342.0951	342.0955	1.0822	[M-H] <sup>-</sup>	0.95±0.10	9.46±0.33*	ND
Ácido cumárico hexósido	4.61	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	326.1002	326.1004	0.8625	[M-H] <sup>-</sup>	9.36±1.17	86.53±8.62*	ND
Ácido ferúlico hexósido	5.17	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	356.1107	356.1111	1.0371	[M-H] <sup>-</sup>	0.34±0.05	2.01±0.19*	ND
Ácido elálgico hexósido	6.67	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	464.0591	464.0589	-0.4094	[M-H] <sup>-</sup>	0.71±0.12	5.36±0.02*	ND
Ácido p-cumárico*	6.91	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164.0473	164.0472	-0.7883	[M-H] <sup>-</sup>	0.18±0.01	1.62±0.05*	ND
Ácido sinápico hexósido	7.03	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>10</sub>	386.1213	386.121	-0.6642	[M-H] <sup>-</sup>	0.12±0.03	0.87±0.05	ND
Ácido cinámico hexósido	7.1	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	310.1053	310.105	-0.9564	[M-H] <sup>-</sup>	0.32±0.04	2.12±0.82*	ND
Ácido elálgico pentósido	8.67	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>12</sub>	434.0485	434.0484	-0.3691	[M-H] <sup>-</sup>	0.10±0.02	2.46±0.06*	ND
Ácido elálgico*	9.22	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	302.0063	302.0058	-1.4014	[M-H] <sup>-</sup>	5.90±0.66	30.04±1.94*	ND
Total							17.96±2.20	140.43±8.10*	ND

\*Los datos se muestran como la media ± desviación estándar de dos réplicas. Los resultados son expresados como mg/125 mL. \*Indica diferencias significativas entre muestras (p<0.05).  
+Identificación confirmada con estándares comerciales. TR: tiempo de retención. ND: no detectado

## 6.4 Evaluación de la bebida de fresa enriquecida sobre los factores de riesgo cardiovascular en un estudio clínico

### 6.4.1 Características basales de los participantes del estudio clínico

En la **Figura 8** se muestra el diseño del estudio triple ciego aleatorizado, considerando desde el reclutamiento de participantes, su aleatorización para cada tratamiento y las razones por las que fueron eliminados. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de datos por protocolo, que permitió medir el efecto del tratamiento en los participantes que tuvieron adherencia al protocolo de estudio.



**Figura 8.** Diseño del estudio triple ciego aleatorizado

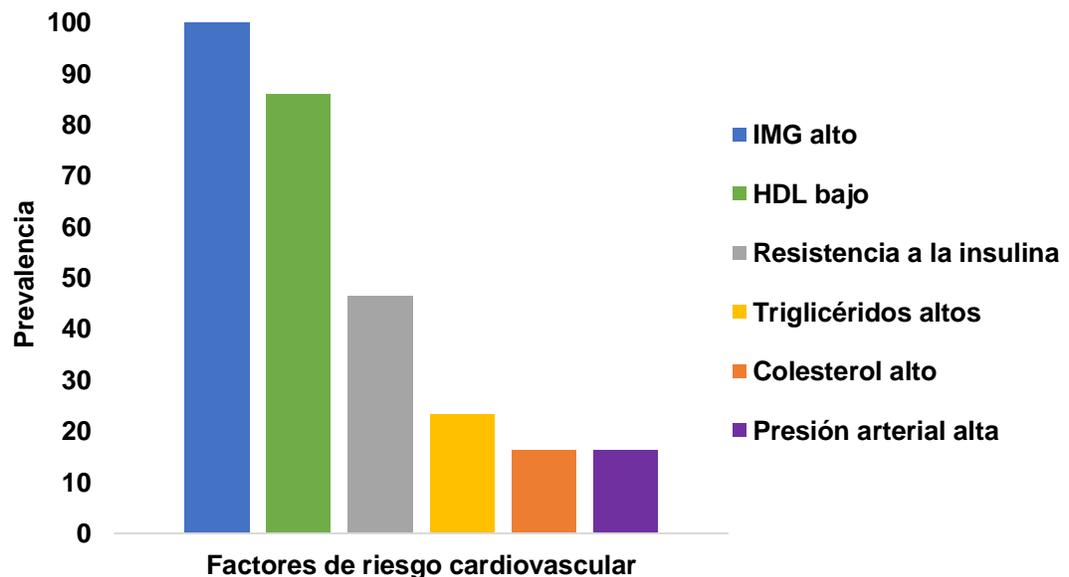
En el **Cuadro 17** se muestran las características iniciales de los participantes reclutados con respecto a su antropometría, composición corporal y perfil bioquímico. Como se puede observar, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales para ninguno de los parámetros evaluados, lo que garantiza homogeneidad entre los grupos al iniciar el estudio.

**Cuadro 17.** Características basales de los participantes del estudio.\*

Parámetro	Control	Enriquecida	Comercial	p valor
Edad	25.1 ± 5.7	25.4 ± 5.4	23.5 ± 2.5	0.9
Peso (kg)	84.9 ± 11.7	82.8 ± 16.1	86.5 ± 18.5	0.8
Estatura (cm)	166.7 ± 9.2	163.2 ± 8.5	166.3 ± 11.3	0.6
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30.6 ± 3.8	30.9 ± 3.9	31.0 ± 4.4	0.9
Masa grasa (%)	38 ± 8.8	41.5 ± 5.7	41.8 ± 4.7	0.6
IMG (kg/m <sup>2</sup> )	11.8 ± 3.8	12.9 ± 2.9	13.1 ± 3.0	0.5
Masa libre de grasa (%)	52.6 ± 10.5	48.5 ± 10.6	51.8 ± 10.9	0.5
IMLG (kg/m <sup>2</sup> )	18.8 ± 2.2	18 ± 2.4	18 ± 2.1	0.6
Tejido adiposo visceral (kg)	2.6 ± 0.9	2.7 ± 1.2	2.9 ± 1.5	0.8
Masa muscular esquelética (kg)	26 ± 6	23.6 ± 6.3	24.4 ± 6.4	0.6
CC (cm)	93.6 ± 8.1	92 ± 10.2	94.8 ± 13	0.8
CCad (cm)	111.1 ± 9.3	109.4 ± 8.3	111.1 ± 10.6	0.8
ICC	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9
Presión arterial sistólica (mmHg)	117.5 ± 12.4	111 ± 11.9	113.3 ± 11.2	0.3
Presión arterial diastólica (mmHg)	73.7 ± 9.0	73.6 ± 9.8	74.8 ± 11.2	0.9
Glucosa (mg/dL)	84.9 ± 11.9	89.3 ± 7.6	83.8 ± 7.4	0.2
Insulina (uUI/mL)	18.2 ± 8.4	18.8 ± 10.5	20.1 ± 5.6	0.8
HOMA-IR (UA)	3.8 ± 2	4.2 ± 2.4	4.2 ± 1.3	0.8
Triglicéridos (mg/dL)	133.2 ± 58	127.2 ± 28.8	120.5 ± 43.2	0.7
Colesterol total (mg/dL)	160.5 ± 37.5	154 ± 37.9	151 ± 42.2	0.8
Colesterol HDL (mg/dL)	38.3 ± 9.3	36.7 ± 6.8	38.8 ± 10.4	0.8

\*Los datos se muestran como la media ± error estándar. P valor >0.05 indica diferencias significativas entre grupos en el mismo parámetro por la prueba de Tukey o Kruskal Wallis. IMC: índice de masa corporal; IMG: índice de masa grasa; IMLG: índice de masa libre de grasa; CC; circunferencia de cintura; CCad: circunferencia de cadera; ICC: índice de cintura-cadera.

De acuerdo con los criterios de inclusión establecidos, se determinaron los principales factores de riesgo cardiovascular en la población en estudio, los cuales se observan en la **Figura 9**. Todos los participantes presentaron IMG elevado, según los valores de corte establecidos para hombres y mujeres. Previamente, se ha reportado que el IMC es el indicador más empleado para evaluar la presencia de sobrepeso y obesidad. No obstante, este indicador ha sido cuestionado porque no refleja la grasa corporal real y puede sobreestimar o subestimar el estado de sobrepeso u obesidad. Algunos reportes han demostrado que el IMG es un mejor indicador de estos padecimientos, considerando además el porcentaje de grasa (Liu et al., 2013).



**Figura 9.** Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular de los participantes. IMG: índice de masa grasa.

El colesterol HDL constituyó el segundo factor de prevalencia en los participantes (86 %), seguido de la resistencia a la insulina (47 %) y posteriormente la concentración de triglicéridos elevados (23 %) y colesterol elevado (16 %). Además, los resultados mostraron que el 44 % de los participantes presentaron un factor de riesgo cardiovascular, el 30 % presentó

2, el 19 % tuvo 3 y el 7 % tuvo 4 factores de riesgo. La concentración elevada de glucosa en sangre como factor de riesgo, no se identificó en los participantes. Estudios como el de Flores-Viveros y colaboradores (2019) muestran que la población mexicana tiene predisposición genética relacionada con factores de riesgo cardiovascular, siendo los bajos niveles de colesterol HDL los de mayor prevalencia en la población de jóvenes evaluada (30 %), seguidos por la resistencia a la insulina (19 %) y altos niveles de triglicéridos (15 %).

#### **6.4.2 Adherencia al tratamiento de los participantes en estudio**

Con respecto a la adherencia al tratamiento, se observa en el **Cuadro 18** que los participantes en todos los grupos mostraron una ligera falta de adherencia a su respectiva bebida. No obstante, estas no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) para cada grupo durante las 4 semanas de estudio.

#### **6.4.3 Cambios en la presión arterial y en mediciones antropométricas de los participantes por el tratamiento con bebidas de fresa**

La presión sistólica y diastólica de los participantes del estudio no presentó ningún cambio significativo después de los 28 días de tratamiento con cada una de las bebidas, así como en las mediciones de CC y CCad, reflejadas también en el ICC (**Anexo 2**). La suplementación de 25 g de fresa liofilizada, equivalente a 1 porción de fresa fresca diaria durante 6 semanas en mujeres adultas con diabetes tipo 2, disminuyó la presión arterial sistólica significativamente de los valores basales (Amani et al., 2014). No obstante, la menor duración de nuestro estudio (4 semanas), podría explicar la falta de efecto observado.

Los estudios reportados sobre el consumo de fresa en el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones no manifestaron cambios en las mediciones antropométricas de los participantes, a pesar de los reportes que indican que el consumo de alimentos ricos en fitoquímicos, tales como las fresas, está asociado con una disminución de mediciones antropométricas como el peso corporal y la circunferencia de cintura (Carnauba et al., 2017).

**Cuadro 18. Adherencia al tratamiento de los participantes en cada grupo por semana\*.**

GRUPO DE BEBIDA CONTROL												
Semanas	¿Con qué frecuencia olvida tomar la bebida proporcionada?		¿Con qué frecuencia decide no tomar la bebida?		¿Con qué frecuencia decide la porción de la bebida?		¿Con qué frecuencia se salta un día de la bebida?		¿Con qué frecuencia deja de tomar la bebida por descuido?		¿Con qué frecuencia toma menos de la bebida proporcionada?	
	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces
1	15	0	15	0	14	1	15	0	14	1	14	1
2	14	1	15	0	15	0	14	1	13	2	15	0
3	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0
4	12	3	13	2	15	0	13	2	13	2	15	0
p-valor=0.093												
p-valor=0.102												
p-valor=0.384												
p-valor=0.277												
p-valor=0.494												
p-valor=0.384												

GRUPO DE BEBIDA ENRIQUECIDA												
Semanas	¿Con qué frecuencia olvida tomar la bebida proporcionada?		¿Con qué frecuencia decide no tomar la bebida?		¿Con qué frecuencia decide la porción de la bebida?		¿Con qué frecuencia se salta un día de la bebida?		¿Con qué frecuencia deja de tomar la bebida por descuido?		¿Con qué frecuencia toma menos de la bebida proporcionada?	
	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces
1	13	2	0	0	15	0	15	0	13	2	15	15
2	13	2	0	0	15	0	14	1	13	2	15	15
3	14	1	0	0	14	1	14	1	14	1	15	15
4	13	1	1	2	15	0	14	1	14	1	15	15
p-valor=0.714												
p-valor=0.102												
p-valor=0.384												
p-valor=0.789												
p-valor=0.684												

GRUPO DE BEBIDA COMERCIAL												
Semanas	¿Con qué frecuencia olvida tomar la bebida proporcionada?		¿Con qué frecuencia decide no tomar la bebida?		¿Con qué frecuencia decide la porción de la bebida?		¿Con qué frecuencia se salta un día de la bebida?		¿Con qué frecuencia deja de tomar la bebida por descuido?		¿Con qué frecuencia toma menos de la bebida proporcionada?	
	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces	Nunca	Algunas veces
1	12	1	13	0	13	0	13	1	12	1	11	1
2	11	2	13	1	12	1	13	2	11	2	12	1
3	13	0	13	1	12	1	13	0	13	0	12	1
4	12	1	13	0	13	0	13	1	12	1	13	0
p-valor=0.539												
p-valor=0.556												
p-valor=0.539												
p-valor=0.654												

\*Datos expresados como frecuencia. Valor de  $p < 0.05$  se considera significativo al comparar entre las semanas de experimentación en cada grupo bajo la escala Likert con la prueba de chi-cuadrada.

Estos efectos se atribuyen al bajo aporte calórico de estos alimentos y a la disminución del estrés oxidativo e inflamación inducido por los fitoquímicos. Sin embargo, se requieren más estudios que expliquen los mecanismos de acción de estos polifenoles de fresa en relación con las mejoras observadas en la obesidad y sus complicaciones.

#### **6.4.4 Cambios en la composición corporal de los participantes suplementados con las bebidas de fresa**

De forma general, no se lograron cambios estadísticamente significativos durante los 28 días de consumo de las bebidas de fresa (**Anexo 3**). Estos resultados son similares a lo reportado en otro estudio en el que la suplementación de frutos rojos como fresa, arándanos o moras azules no indujo cambios en el peso o composición corporal de pacientes con síndrome metabólico (Amiot, Riva y Vinet, 2016). Por el contrario, en un modelo *in vivo* de ratas Wistar suplementado con 6 % de un polvo de fresa-mora azul (5:1) previno significativamente el aumento de peso corporal y la acumulación de adiposidad visceral en animales alimentados con una dieta alta en grasa (Aranaz et al., 2017), comparado con animales control. Estos resultados demostraron que la suplementación con fresa produjo un efecto preventivo.

#### **6.4.5 Valoración de los parámetros bioquímicos en sangre de los participantes en estudio**

Los principales efectos benéficos observados en estudios clínicos por la suplementación de fresa en la dieta se relacionan con la disminución de lípidos en suero (triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL), disminución de la respuesta de insulina postprandial y normalización de la concentración de glucosa postprandial en sangre (Afrin et al, 2016).

Como se muestra en el **Cuadro 19**, el consumo de la bebida control disminuyó significativamente la concentración de insulina en un 32.2 % después de 28 días de tratamiento, lo que también se reflejó en una disminución del 28.2 % en el índice HOMA-IR. Por el contrario, en la bebida enriquecida no se observaron

diferencias significativas en los parámetros bioquímicos en relación con las características basales.

**Cuadro 19.** Cambios en los parámetros bioquímicos en sangre de los grupos tratados con bebidas de fresa.\*

Parámetros	Control		Enriquecida		Comercial	
	Día 0	Día 28	Día 0	Día 28	Día 0	Día 28
Glucosa (mg/dL)	84.8 ± 3.0	84.5 ± 1.1	89.3 ± 2	87.5 ± 2	83.7 ± 2	86.8 ± 1.8
Insulina (mg/dL)	18.2 ± 2.2	12.3 ± 1.3*	16.6 ± 1.6	13 ± 1.2	19.3 ± 1.3	13.6 ± 1.2*
Índice HOMA-IR	3.4 ± 0.3	2.4 ± 0.2*	3.7 ± 0.4	2.8 ± 0.3	4.2 ± 0.4	2.9 ± 0.3*
Triglicéridos (mg/dL)	133.2 ± 15	110.7 ± 7.3	127.2 ± 7.4	130.5 ± 9.6	115 ± 11.1	105 ± 14.9
Colesterol total (mg/dL)	160.5 ± 9.7	159 ± 8.8	154 ± 9.8	161 ± 8.4	151.4 ± 11.3	143 ± 10.5
Colesterol HDL (mg/dL)	38.3 ± 2.4	37.5 ± 1.7	36.7 ± 1.7	36.3 ± 1.4	38.4 ± 2.8	38.5 ± 2.5

\*Datos expresados como la media ± error estándar. HOMA-IR: evaluación del modelo de homeostasis de la resistencia a la insulina. \*Indica diferencias significativas entre el día 0 y día 28 de cada grupo por prueba t de Student o prueba de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ).

Resultados similares fueron reportados en el estudio de Basu y colaboradores (2021), donde adultos obesos fueron suplementados con 32 g de fresa en polvo al día durante 4 semanas, observándose una disminución del 41 % en la concentración de insulina con respecto a su concentración inicial y un 41.6 % en el índice HOMA-IR. Este resultado es interesante, ya que el aporte de 32 g de fresa en polvo equivale a 960 mg polifenoles extraíbles al día, mientras que en nuestro caso, la bebida control, que mostró efectos similares, solamente aportó 55.25 mg de compuestos polifenólicos extraíbles por porción de 125 mL al día.

A pesar de que la bebida enriquecida aportó 497.3 mg de polifenoles extraíbles y 124.9 mg de polifenoles no extraíbles por porción al día, no se observaron diferencias significativas en los parámetros bioquímicos analizados con respecto al día 0 de tratamiento. No obstante, los participantes de este grupo tuvieron una disminución del 21.2 % en la insulina y del 23.9 % en el índice HOMA-IR en comparación con los valores iniciales. De manera interesante, la bebida

comercial disminuyó significativamente la insulina (29.3 %) y el índice HOMA-IR (29.8 %). Esta bebida comercial no contenía polifenoles ni fibra dietaria, a diferencia de la bebida enriquecida y la bebida control, ya que no está elaborada con ingredientes naturales ni adicionada con compuestos bioactivos. Por lo tanto, el efecto observado no puede estar relacionado al contenido de esta bebida.

#### **6.4.6 Análisis de la ingesta dietaria total de macronutrientes de los participantes en estudio**

Para evaluar cambios en la dieta de los participantes a lo largo del estudio, se monitoreó su consumo de macronutrientes de los alimentos y bebidas ingeridos desde la semana 1 hasta la semana 4 (**Cuadro 20**). De manera general, se observó que el grupo suplementado con la bebida enriquecida presentó un mayor consumo de macronutrientes durante las cuatro semanas del estudio, lo que se reflejó en un aumento del consumo energético, que fue desde 1 hasta 1.7 veces mayor en comparación con el grupo que consumió la bebida control, y desde 1.1 hasta 1.7 veces mayor en relación con el grupo de la bebida comercial. Por otro lado, aunque no se observaron diferencias significativas en el consumo de azúcares, el grupo tratado con la bebida enriquecida presentó una ingesta de entre 102 y 119 g al día, lo que representó un incremento de hasta 1.4 veces mayor respecto al consumo de los participantes suplementados con la bebida control y comercial.

En relación con la fibra dietaria, los participantes que consumieron la bebida enriquecida incrementaron significativamente su consumo durante las 4 semanas de tratamiento en comparación con los demás grupos de bebidas. Esto podría explicarse porque, en promedio, el consumo de fibra proveniente de la bebida representó un 28.6 %, mientras que en el grupo de la bebida control fue de un 23.6 %. No obstante, es importante resaltar que el aporte de fibra de la dieta de los participantes que consumieron la bebida control fue, en promedio, ligeramente mayor (76.3 %) que el de la bebida enriquecida (71.5 %).

Al comparar la semana inicial con la semana final, se observaron diferencias importantes en el consumo total de macronutrientes. El grupo que consumió la bebida control disminuyó su ingesta de alimentos, lo que se reflejó en una diferencia de 227.3 kcal menos en la semana 4 en comparación con la semana 1. Por otro lado, se observó que el grupo que consumió la bebida enriquecida aumentó su consumo de energía en 785.2 kcal, y la ingesta de proteínas se incrementó en un 39.8 %, los lípidos en un 42.8 %, mientras que la fibra disminuyó un 19.2 % en comparación con la semana 1. Finalmente, los participantes que consumieron la bebida comercial redujeron su ingesta en 366.8 kcal, lo que se reflejó en una disminución del 14.4 % en lípidos, 17.5 % en carbohidratos y 11.6 % en azúcares.

Los resultados contradictorios en nuestro estudio, en el cual la bebida con una alta concentración de polifenoles no influyó en la salud cardiovascular, podrían estar relacionados con el consumo de macronutrientes por parte de los participantes, ya que aquellos que consumieron la bebida enriquecida mostraron un mayor consumo de energía, lípidos y azúcares, tanto al inicio como al final del estudio, en comparación con el grupo que consumió la bebida control. Esto podría haber atenuado el impacto de los polifenoles en la salud cardiovascular de los participantes. Sin embargo, es importante destacar que, a pesar del significativo aumento en el consumo de energía de este grupo, los factores de riesgo cardiovascular no empeoraron, lo que sugiere que los polifenoles presentes en la bebida podrían haber mitigado el impacto perjudicial de una dieta alta en lípidos y azúcares.

**Cuadro 20.** Consumo promedio de macronutrientes, fibra dietaria y sodio de la dieta y las bebidas de fresa.\*

Variable	Semana 1			Semana 2		
	Control	Enriquecida	Comercial	Control	Enriquecida	Comercial
Energía (kcal)	2194.6 ± 129.7Aa	2560.7 ± 237.9Aa	2316.1 ± 247.9Aa	2336.6 ± 227.1Aa	2392.8 ± 195.7Aa	2130.5 ± 215.8Aa
Proteínas (g)	93.2 ± 8.1Aa	113.8 ± 11.8Aab	107.8 ± 12.8Aa	97.7 ± 8.3Aa	102.9 ± 8.2Aab	104.1 ± 13.4Aa
Lípidos (g)	87.9 ± 8Aa	94.3 ± 9Aa	91.0 ± 11.8Aa	97.0 ± 9.5Aa	91.3 ± 9.5Aa	79.7 ± 6.9Aa
Carbohidratos (g)	255.8 ± 19.9Aa	310.5 ± 30.9Aa	273.1 ± 29.3Aa	271.3 ± 33.4Aa	286.5 ± 24.4Aa	249.6 ± 29.5Aa
Azúcares (g)	81.2 ± 8.8Aa	105.6 ± 7.9Aa	95.5 ± 13.9Aa	78.2 ± 14.3Aa	109.3 ± 14.3Aa	83.6 ± 15.1Aa
Fibra (g)	27.9 ± 2.2Ba	35.9 ± 3.5Aa	24.5 ± 3.0Ba	29.2 ± 2.5Aa	33.9 ± 2.7Aa	19.8 ± 2.5Ba
Sodio (mg)	3290.4 ± 727.1Aa	3223.9 ± 483.0Aa	2651.6 ± 248.0Aa	3041.5 ± 298.5Aa	2750.1 ± 235.6Aa	2623.2 ± 302.0Aa
Variable	Semana 3			Semana 4		
	Control	Enriquecida	Comercial	Control	Enriquecida	Comercial
Energía (kcal)	2312.9 ± 173.3Aa	2738.0 ± 189.3Aa	2190.7 ± 156.7Aa	1967.3 ± 174.4Aa	3345.9 ± 1069.4Aa	1949.3 ± 214.4Aa
Proteínas (g)	97.5 ± 7.4Aa	121.2 ± 9.0Ab	102.4 ± 10.7Aa	92.4 ± 7.0Aa	188.9 ± 100.3Aa	91.8 ± 13.4Aa
Lípidos (g)	93.6 ± 6.8Aa	105.1 ± 9.1Aa	83.3 ± 6.9Aa	71.5 ± 6.0Aa	165.1 ± 72.9Aa	77.9 ± 9.8Aa
Carbohidratos (g)	268.6 ± 26.0Aa	326.9 ± 22.6Aa	251.5 ± 18.5Aa	240.4 ± 28.4Aa	260.3 ± 17Aa	225.3 ± 24.6Aa
Azúcares (g)	89.5 ± 15.7Aa	119.0 ± 14.3Aa	88.0 ± 13.5Aa	70.9 ± 14.0Aa	102.0 ± 12.9Aa	84.4 ± 11.0Aa
Fibra (g)	26.2 ± 1.6Ba	36.1 ± 1.9Aa	19.2 ± 1.7Ca	24.0 ± 2.5ABa	29.0 ± 1.5Aa	18.8 ± 2.0Ba
Sodio (mg)	2956.8 ± 275.5Aa	3611.5 ± 458.4Aa	2626.4 ± 371.1Aa	2814.7 ± 280.1Aa	3266.8 ± 468.4Aa	2659.0 ± 265.1Aa

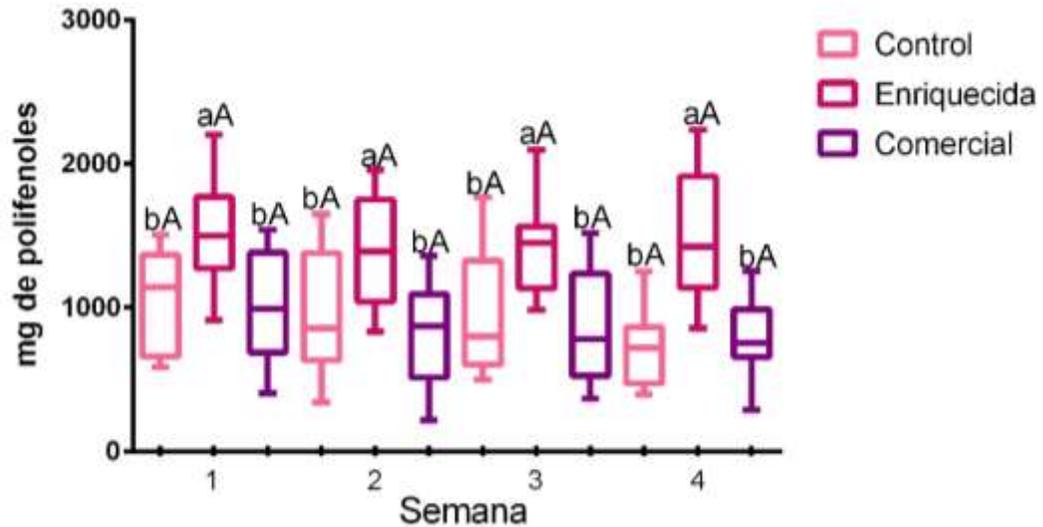
\*Datos expresados como la media ± error estándar correspondientes a un día de consumo. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila en la misma semana indican diferencias significativas entre grupos por prueba de Kruskal-Wallis (p<0.05). Letras minúsculas en la misma fila en todas las semanas indican diferencias significativas en el mismo grupo por prueba de Kruskal-Wallis (p<0.05).

Esto es relevante dado que numerosos ensayos clínicos han demostrado que la restricción calórica, definida como una disminución del aporte de energía (del 25 al 30 %) sin omitir nutrientes esenciales, mejora las alteraciones metabólicas, como la acumulación excesiva de grasa corporal, la dislipidemia y la diabetes mellitus tipo 2, e incluso mejora los mecanismos de defensa antioxidante, tanto enzimáticos como no enzimáticos (Napoleão et al., 2021).

#### **6.4.7 Evaluación del consumo de compuestos polifenólicos de los participantes en estudio**

La dieta mexicana se caracteriza por presentar una alta diversidad de alimentos ricos en compuestos polifenólicos. Por lo tanto, se analizó el consumo promedio diario de compuestos fenólicos totales por participante y, posteriormente, por cada grupo de estudio, considerando la dieta y las bebidas de fresa correspondientes (**Figura 10**). El consumo de compuestos polifenólicos del grupo con la bebida control osciló entre 731-1053.7 mg al día, con la bebida enriquecida entre 1389.8-1530 mg al día y con la bebida comercial entre 786.6-991 mg al día, sin presentar diferencias significativas para las cuatro semanas del estudio en el mismo grupo.

El consumo de compuestos polifenólicos reportado en adultos mexicanos es variable. En un estudio realizado en mujeres mexicanas >25 años, se reportó una ingesta promedio de polifenoles totales de 694 mg/día (Zamora-Ros et al., 2018), mientras que en otro estudio de mujeres mexicanas con obesidad, el consumo osciló entre 445-1240 mg/día (Hervert-Hernández y Goñi, 2012). Esta variabilidad observada en el consumo de polifenoles, que también se reflejó en nuestro estudio, está relacionada con los diversos patrones alimentarios existentes en nuestro país, tales como una dieta rica en verduras, frutas y leguminosas, otra dieta similar a la occidental a base de carnes procesadas y comida rápida, y una dieta mexicana moderna rica en tortillas, chiles y refrescos (Monge et al., 2018). Adicionalmente, la concentración de polifenoles de los alimentos depende de factores como la variedad de la planta, el área geográfica, la madurez y el procesamiento de los mismos (Zamora-Ros et al., 2018).



**Figura 10.** Consumo diario promedio de compuestos polifenólicos promedio de la dieta y de las bebidas de fresa por día en el estudio. Letras minúsculas diferentes en la misma semana indican diferencias significativas entre grupos por prueba de Tukey o Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). Letras mayúsculas en todas las semanas indican diferencias significativas en el mismo grupo por prueba de Tukey o Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, al comparar el consumo de polifenoles entre los grupos en cada semana, se identificó que los participantes que consumieron la bebida enriquecida aumentaron significativamente su ingesta de polifenoles en comparación con los grupos de bebida control y comercial. No obstante, este aumento se debió a que la bebida enriquecida de fresa tuvo aportó entre el 33 y el 36 % de los polifenoles totales consumidos durante las cuatro semanas, a diferencia de la bebida control, que aportó entre el 5 y el 8 %. Es importante mencionar que el consumo de polifenoles a través de la dieta de los participantes que recibieron la bebida control fue 1.4 veces mayor en comparación con los participantes suplementados con la bebida enriquecida, lo cual podría sugerir que el aporte de dichos compuestos en la dieta no puede ser excluido para lograr posibles efectos en la salud.

Se realizó, además, un análisis para identificar las principales fuentes de alimentos que tuvieron el aporte de polifenoles en la dieta de los participantes (**Cuadro 21**). Estos resultados demostraron que los participantes que consumieron la bebida enriquecida tuvieron una mayor ingesta de polifenoles provenientes de frutas y derivados durante las cuatro semanas del estudio, la cual fue significativamente mayor a los grupos alimentados con las bebidas control y comercial ( $p=0.0$ ). Este incremento fue atribuido principalmente a la bebida enriquecida, que aportó entre el 66 y el 76 % de estos compuestos. Este aporte de compuestos polifenólicos por parte de la bebida enriquecida fue mayor comparada con el café, el cual representa la bebida no alcohólica con mayor contribución de dichos compuestos reportado en dietas mexicanas, con un 47.4 % (Zamora-Ros et al., 2018). Además, complementó el consumo de polifenoles derivado de frutas en la dieta de los participantes (24-34 %).

Para el grupo de la bebida control, el consumo de polifenoles provenientes de frutas y derivados de la dieta fue del 73 al 82 %, siendo mucho mayor que el de los participantes que consumieron la bebida enriquecida. Esto pudo explicar el mayor efecto benéfico observado en el control sobre la resistencia a la insulina, previamente reportado (Chen et al., 2022).

Otra de las categorías con mayor aporte de compuestos polifenólicos por parte de la dieta correspondió a cereales y derivados, los cuales representaron entre un 17 y un 28% del total de polifenoles de la dieta por parte de todos los participantes del estudio. No obstante, retomando los resultados con respecto a la calidad de la dieta, la gran mayoría de alimentos de esta categoría fueron elaborados en su mayoría con harinas refinadas, como el pan dulce, y ricas en almidón disponible, como la tortilla de maíz. Por lo tanto, su contribución posiblemente no estuvo relacionada con los efectos benéficos esperados, ya que los ácidos fenólicos y la fibra dietaria, que están presentes en los granos integrales, son los responsables del control de la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (Khan et al., 2022).

**Cuadro 21.** Fuentes de consumo de compuestos polifenólicos en la dieta de los participantes en estudio.\*

Categoría	Semana 1			Semana 2				
	Control	Enriquecida	Comercial	p-valor	Control	Enriquecida	Comercial	p-valor
Aceites y olivas	7.7 ± 2.4	3.2 ± 0.6	3.1 ± 0.5	0.3	10.3 ± 2.3	8.1 ± 3.2	4.0 ± 0.8	0.1
Jugos	21.7 ± 3.5	35.2 ± 10.9	41.8 ± 7.2	0.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	149.0 ± 35.8	
Bebidas alcohólicas	135.2 ± 18.8	207.4 ± 67.9	0 ± 0	1	62.8 ± 10.9	66.2 ± 9.9	18.6 ± 1.8	0.1
Café, chocolate y derivados	106.4 ± 29.9	302.9 ± 101.1	315.8 ± 129.4	0.5	106.7 ± 22.3	425.6* ± 81.4	142.9 ± 57.4	<b>0.01</b>
Cereales y derivados	197.2 ± 26.9	246.8 ± 61.3	179.5 ± 34.5	0.7	188.8 ± 32.1	169.9 ± 28.0	223.2 ± 35.2	0.5
Condimentos	30.8 ± 10.7	62.3 ± 18.3	33.4 ± 19.9	0.2	101.0 ± 39.0	4.6 ± 0.3	27.6 ± 12.9	0.8
Frutas y derivados	304.5 ± 48.3	749.5* ± 59	276.9 ± 56.6	<b>0.0</b>	265.1 ± 38.2	658* ± 31.3	283.4 ± 72.9	<b>0.0</b>
Nueces	0.0 ± 0.0	127.5 ± 8.5	65.9 ± 26	0.8	0.0 ± 0.0	89.5 ± 28.3	0.0 ± 0.0	
Hierbas	25.3 ± 9.5	0.0 ± 0.0	2.4 ± 0.7	0.8	3.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Infusiones	75.7 ± 15	34 ± 13.3	49.4 ± 19.8	0.3	261.9 ± 104.5	165.0 ± 90.6	80.8 ± 21.5	0.7
Leguminosas	156.2 ± 42.1	152.7 ± 25.5	104.5 ± 17.8	0.7	322.9 ± 99.2	75.8* ± 16.0	69.8* ± 4.9	<b>0.02</b>
Soya y derivados	0.0 ± 0.0	14.9 ± 2.3	0.6 ± 0.2	0.1	0.0 ± 0.0	19.6 ± 6.0	0.0 ± 0.0	
Tubérculos	22.4 ± 5.1	17.4 ± 4.0	26.6 ± 7.0	0.7	18.8 ± 4.8	16.7 ± 3.9	22.7 ± 5.6	0.8
Vegetales	103.6 ± 28.8	113.7 ± 24.5	128.5 ± 25.3	0.6	73.3 ± 31.2	95.5 ± 32.2	93.9 ± 22.5	0.4
Procesados	67.9 ± 32.3	113.7 ± 24.5	121.7 ± 34.2	0.4	132.4 ± 27.8	130.9 ± 28.6	129.5 ± 48.7	0.7

Categoría	Semana 3			Semana 4				
	Control	Enriquecida	Comercial	p-valor	Control	Enriquecida	Comercial	p-valor
Aceites y olivas	7.1 ± 1.8	3.0 ± 0.6	4.2 ± 0.5	0.05	4.3 ± 1.2	12.7 ± 4.7	3.9 ± 0.6	0.3
Jugos	67.5 ± 11.1	111.1 ± 34.3	23.8 ± 0.1	0.6	44.5 ± 3.2	0.0 ± 0.0	76.1 ± 13.5	0.3
Bebidas alcohólicas	149.3 ± 23.1	227.0 ± 50.7	49.4 ± 6.5	0.1	0.0 ± 0.0	225.6 ± 75.5	68.3 ± 17.0	0.4
Café, chocolate y derivados	128.7 ± 50.3	332.4 ± 137.3	244.5 ± 58.0	0.4	134.8 ± 43.5	399.1 ± 107.6	234.6 ± 76.0	0.3
Cereales y derivados	186.9 ± 25.6	219.0 ± 40.7	144.6 ± 19.2	0.3	182.6 ± 31.8	180.3 ± 38.4	207.4 ± 34.7	0.8
Condimentos	44.8 ± 15.5	9.6 ± 2.8	1.5 ± 0.5	0.05	9.9 ± 0.2	9.1 ± 2.3	8.5 ± 3.2	0.7
Frutas y derivados	204.6 ± 30.6	713.2* ± 41.5	237.0 ± 44.8	<b>0.0</b>	223.1 ± 41.6	651* ± 37.7	154.4 ± 32.9	<b>0.0</b>
Nueces	57.1 ± 11.3	53.4 ± 16.6	10.5 ± 0.7	0.4	24.4 ± 7.5	18.9 ± 2.8	17.3 ± 2.2	0.9
Hierbas	67.6 ± 33.8	13.2 ± 4.0	0.0 ± 0.0	0.8	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.6	10.0 ± 2.2	0.3
Infusiones	106.2 ± 21.7	139.9 ± 41.6	41.9 ± 11.1	0.5	84.5 ± 27.4	117.9 ± 39.9	40.4 ± 16.8	0.7
Leguminosas	123.8 ± 36.6	123.9 ± 15.7	107.4 ± 16.1	0.7	108.9 ± 26.4	105.6 ± 21.3	136.2 ± 22.3	0.5
Soya y derivados	0.0 ± 0.0	17.1 ± 7.3	2.1 ± 0.7	0.2	0.0 ± 0.0	8.9 ± 4.1	0.0 ± 0.0	
Tubérculos	29.7 ± 7.9	16.9 ± 2.2	21.0 ± 5.6	0.9	30.7 ± 9.0	19.4 ± 2.9	19.3 ± 21.0	0.8
Vegetales	126.1 ± 46.4	57.5 ± 9.3	80.8 ± 26.4	0.7	94.1 ± 47.3	54.5 ± 9.0	96.6 ± 20.9	0.3
Procesados	143.9 ± 53.8	134.8 ± 28.5	185.4 ± 90.1	0.8	96.9 ± 18.6	131.3 ± 26.4	109.2 ± 24.1	0.7

\*Datos expresados en mg/día mostrados como la media ± error estándar. P valores <0.05 indican diferencias significativas entre grupos por cada variable por la prueba de Tukey o Kruskal-Wallis (p<0.05). \*Indican diferencias significativas con el grupo control por prueba t de student o Wilcoxon (p<0.05).

#### 6.4.8 Análisis de actividad física de los participantes en estudio

El análisis de actividad física se realizó a partir de los datos obtenidos de los tres cuestionarios de frecuencia semanal de actividad física, basados en los minutos que los participantes dedican a realizar diversas actividades cada día, con el fin de cuantificar el gasto energético total por semana en cada grupo. En el **Cuadro 22** se muestra que el gasto energético total en todos los grupos no presentó diferencias significativas durante las cuatro semanas del estudio clínico, tanto entre los diferentes grupos como en el mismo grupo por semana.

**Cuadro 22.** Gasto energético total y equivalente metabólico por semana de los grupos en estudio.\*

Tratamiento	GET (kcal/día)	METS/día	%t<3METS	%t<3-6METS	%t>6METS
			<b>Semana 1</b>		
Control	3511.0 ± 191.4 Aa	41 ± 2 Aa	92.3 ± 1.5	7.3 ± 1.4	0.4 ± 0.2
Enriquecida	3287.7 ± 211.5 Aa	39 ± 1 Aa	93.2 ± 1.5	6.8 ± 1.5	0.0 ± 0.0
Comercial	3549.0 ± 253.7 Aa	41 ± 2 Aa	90.3 ± 3.4	9.5 ± 3.4	0.1 ± 0.1
			<b>Semana 2</b>		
Control	3347.0 ± 221.6 Aa	39 ± 2 Aa	93.2 ± 1.4	6.6 ± 1.4	0.2 ± 0.1
Enriquecida	3314.3 ± 204.7 Aa	40 ± 1 Aa	93.2 ± 1.7	6.7 ± 1.7	0.1 ± 0.1
Comercial	3438.3 ± 227.4 Aa	39 ± 1 Aa	92.9 ± 1.5	6.2 ± 1.5	0.9 ± 0.6
			<b>Semana 3</b>		
Control	3333.8 ± 171.8 Aa	39 ± 1 Aa	94.4 ± 1.2	5.5 ± 1.2	0.0 ± 0.0
Enriquecida	3209.1 ± 188.0 Aa	39 ± 1 Aa	94.0 ± 1.6	6.0 ± 1.6	0.0 ± 0.0
Comercial	3232.9 ± 146.3 Aa	39 ± 2 Aa	93.2 ± 1.9	6.7 ± 0.5	0.1 ± 0.1
			<b>Semana 4</b>		
Control	3293.3 ± 185.5 Aa	39 ± 1 Aa	94.4 ± 0.3	5.5 ± 0.3	0.1 ± 0.1
Enriquecida	3276.1 ± 201.8 Aa	39 ± 1 Aa	94.1 ± 0.3	5.7 ± 0.3	0.1 ± 0.1
Comercial	3447.8 ± 215.6 Aa	40 ± 1 Aa	94.3 ± 1.0	5.7 ± 0.2	0.0 ± 0.0

\*Datos expresados como la media ± error estándar. Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre grupos en cada semana de cada parámetro, mientras que letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas en el mismo grupo para cada parámetro en todas las semanas por prueba de Tukey o prueba Friedman ( $p < 0.05$ ). GET: gasto energético total; MET: equivalente metabólico.

Para poder determinar la intensidad de la actividad física de los participantes, se estimó una puntuación de equivalente metabólico (MET) para cada una de las actividades, donde 1 MET representa la tasa metabólica en reposo equivalente a un consumo de oxígeno de 3.5 ml/kg/h. Para una actividad física ligera, se establece una puntuación <3 MET, para una actividad moderada, de 3-6 MET y para una actividad vigorosa, >6 MET (Gallo et al., 2020).

De igual manera, no se observaron cambios significativos de los MET evaluados en cada intensidad de actividad física, tanto entre grupos como dentro del mismo grupo. Cabe resaltar que en todos los grupos se identificó que del 90.3 al 94.4 % del tiempo fue empleado para actividades de baja intensidad, representando un promedio de 22.5 min por día (157 min por semana) en los participantes con la bebida control y enriquecida, y 22.2 min por día (156 min por semana) para los suplementados con la bebida comercial. Para las actividades de intensidad moderada se identificó un tiempo promedio de 1.5 min por día (11 min por semana) para el grupo con bebida control y enriquecida, y 1.7 min por día (12 min por semana) para el grupo con bebida comercial.

En un estudio de cohorte realizado por Wu y colaboradores (2016) en adultos mexicanos-americanos, cuya actividad física fue equivalente a 150 min por semana ( $\geq 600$  MET) en actividades moderadas y vigorosas, se observó una disminución del 36 % del riesgo de padecer síndrome metabólico. En nuestro estudio, los participantes de todos los grupos tuvieron un gasto promedio de 273 a 287 MET por semana durante el tratamiento, sin que se observaran cambios en su actividad física, lo que sugiere que esta no estuvo relacionada con la disminución del riesgo cardiovascular evaluado.

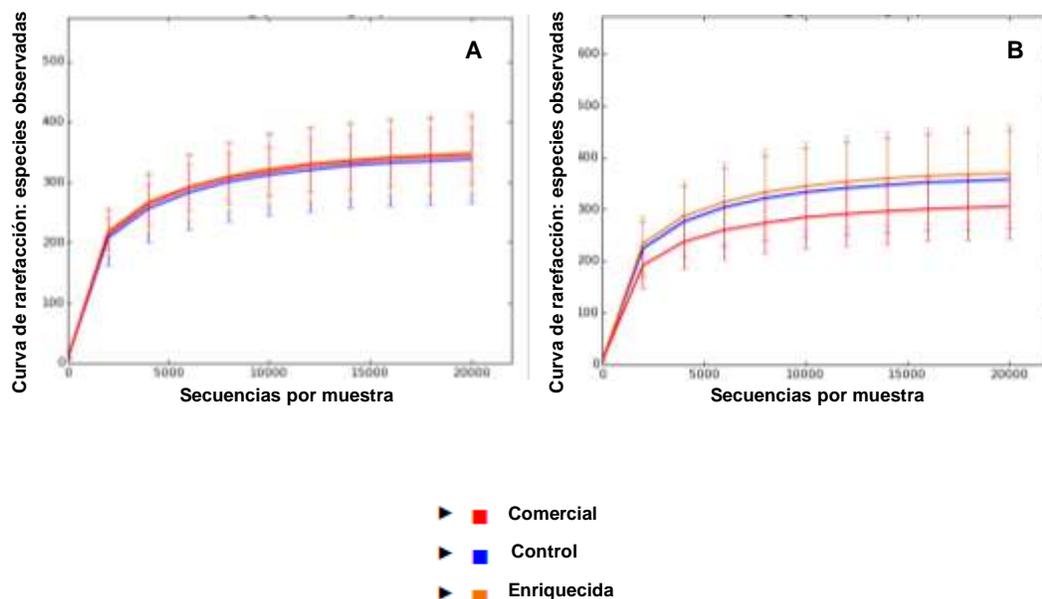
### **6.5 Evaluación de la bebida de fresa enriquecida sobre la regulación de la diversidad microbiana fecal**

La microbiota intestinal comprende el conjunto de bacterias, hongos, virus, y arqueobacterias presentes en el tracto intestinal. Una dieta rica en carbohidratos, grasas y proteínas de origen animal, y baja en fibra, puede disminuir la presencia de microorganismos benéficos e incrementar la abundancia de aquellos patógenos, ocasionando un desequilibrio en el ecosistema conocido como disbiosis. Este desequilibrio se ha relacionado con diversas enfermedades metabólicas, como la obesidad y sus complicaciones (Pap et al., 2021).

Siendo la dieta un factor determinante en la composición de la microbiota intestinal, se evaluó el efecto del consumo de la bebida enriquecida,

particularmente debido a la presencia de los compuestos polifenólicos y la fibra dietaria del residuo, sobre el perfil de microorganismos benéficos en el intestino.

Primeramente, se obtuvieron las curvas de rarefacción al día 0 (A) y 28 (B) del estudio clínico (**Figura 11**). Estas gráficas se utilizan como control de calidad del número promedio de secuencias obtenidas por grupo en relación con el número de especies observadas, de acuerdo con el número de ASV (variante de secuencia de amplicón) en las muestras. Estas curvas alcanzaron una meseta, lo cual indicó una profundidad adecuada de la secuenciación.



**Figura 11.** Curvas de rarefacción de especies bacterianas observadas en heces de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 (A) y 28 (B).

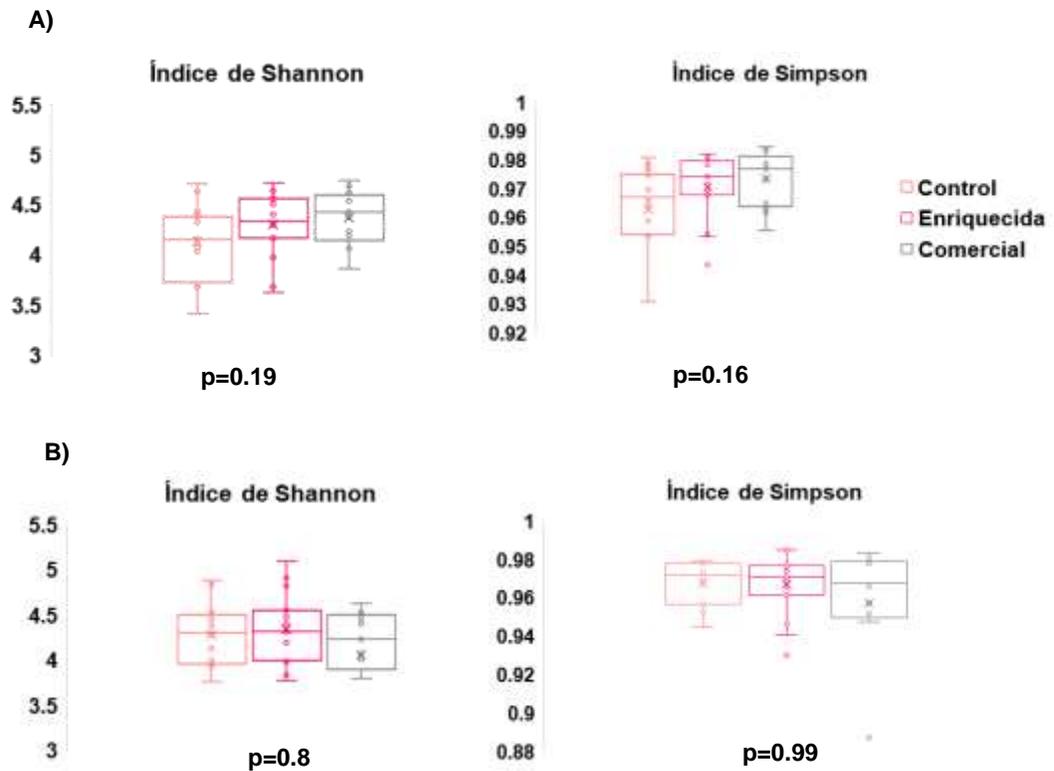
Por otro lado, en la curva correspondiente al día 0, se identificó una homogeneidad de especies observadas en los 3 grupos de estudio, presentando la bebida control un promedio de 275 especies, la enriquecida, de 284 y la comercial, de 281. De manera interesante, en la curva correspondiente al día 28, se observó un aumento en el número de las especies observadas en la bebida control correspondiente a 293 y en la bebida enriquecida de 303, mientras que

en la comercial disminuyó a 250, siendo clara la separación en la curva de rarefacción correspondiente en las bebidas con jugo de fresa.

Recientemente, la comprensión de la diversidad microbiana ha adquirido importancia en la investigación de la composición y función de la microbiota intestinal y su relación con las enfermedades metabólicas. Para cuantificar la diversidad de especies microbianas en una comunidad, se han desarrollado algunos índices matemáticos. Los índices de Simpson y Shannon son de los más empleados y permiten estimar la riqueza y uniformidad de las especies, conocidos como alfa diversidad. El índice de Simpson otorga mayor peso a la uniformidad, mientras que el índice de Shannon pone énfasis en la riqueza (Kim y col., 2017).

De acuerdo con la **Figura 12**, tanto el índice de Shannon como el de Simpson, calculados para el día 0 y el día 28, no mostraron diferencias significativas en los grupos suplementados con las bebidas de fresa ( $p>0.05$ ), indicando que la concentración de polifenoles y fibra dietaria consumida durante 4 semanas no fue suficiente para lograr cambios en la diversidad de las poblaciones microbianas intestinales de los participantes.

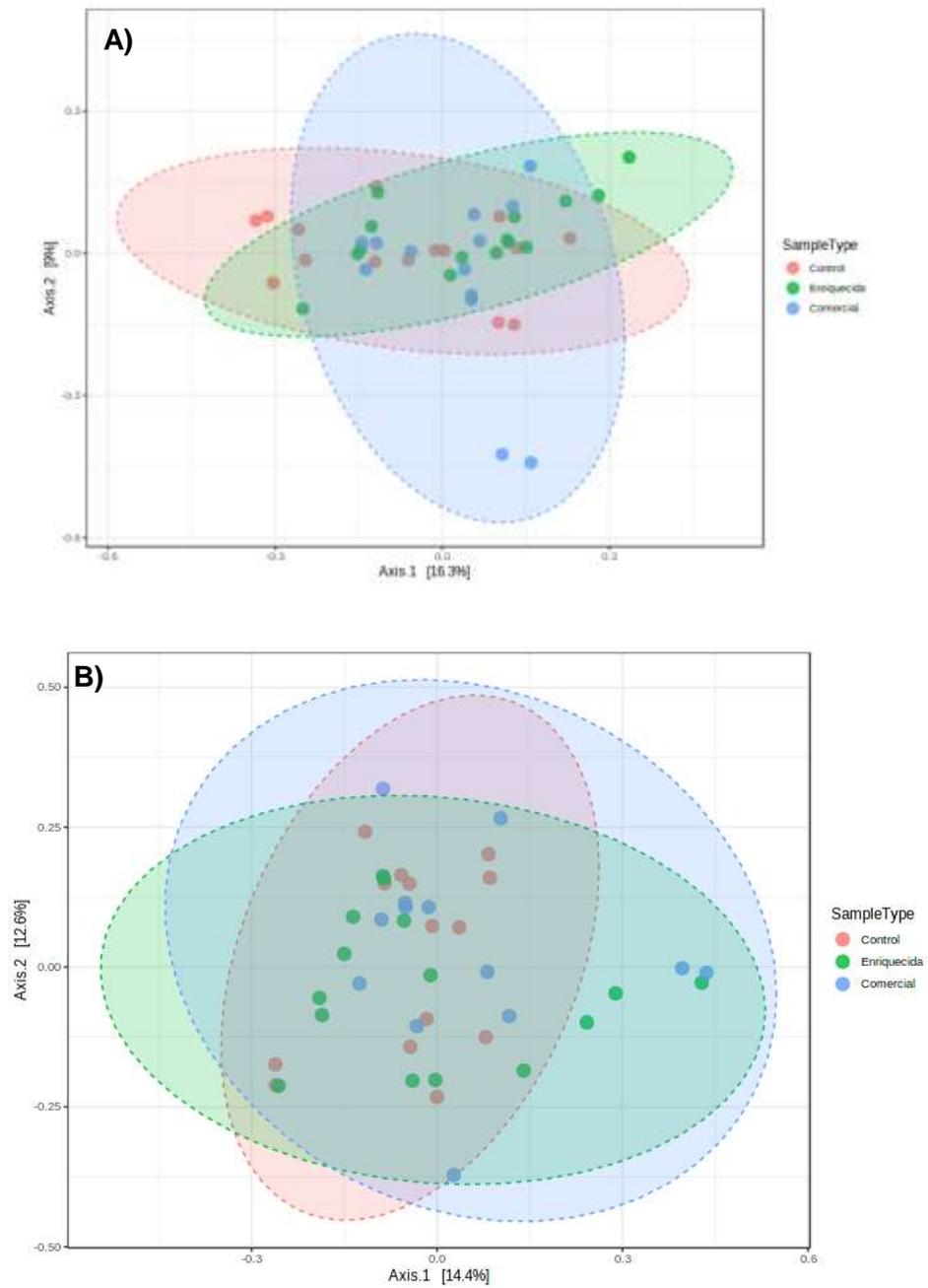
Se ha reportado que una menor diversidad microbiana está asociada con una alteración de las funciones metabólicas intestinales (disbiosis), ocasionadas por la obesidad y el alto consumo de dietas ricas en grasas y azúcares (Turnbaugh et al., 2006). Resultados contrastantes con esta investigación reportan incrementos significativos en la diversidad microbiana, medida por los índices de Shannon y Simpson, tras la suplementación con polifenoles de mora azul y arándano durante 8 semanas en ratones alimentados con una dieta alta en grasa y azúcar (Rodríguez-Daza et al., 2020), así como el aumento del índice de Shannon tras la suplementación con un 4 y 8 % de residuo fermentado de mora azul durante 5 semanas en ratones obesos (Cheng et al., 2020).



**Figura 12.** Índices de alfa diversidad de Shannon y Simpson de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 (A) y 28 (B). Los valores  $p < 0.05$  indican diferencias significativas por la prueba de Kruskal-Wallis.

La diversidad beta es una medida de las diferencias entre las muestras de los diferentes grupos, que permite identificar la composición y estructura general de la comunidad. Esta se puede medir por diferentes métodos estadísticos y bioinformáticos, como la disimilitud de Bray-Curtis, que muestra la abundancia de microorganismos compartidos entre dos muestras (Samuthpongton et al., 2021).

Se realizó el análisis de la diversidad beta tanto para el día 0 y día 28 en todos los grupos de estudio, cuyos resultados se observan en la **Figura 13**. Para ambos tiempos, los componentes 1 y 2 explican solo un 25 % y un 27 % de la variación observada, lo que refleja la escasa discriminación entre tratamientos con las bebidas de fresa.

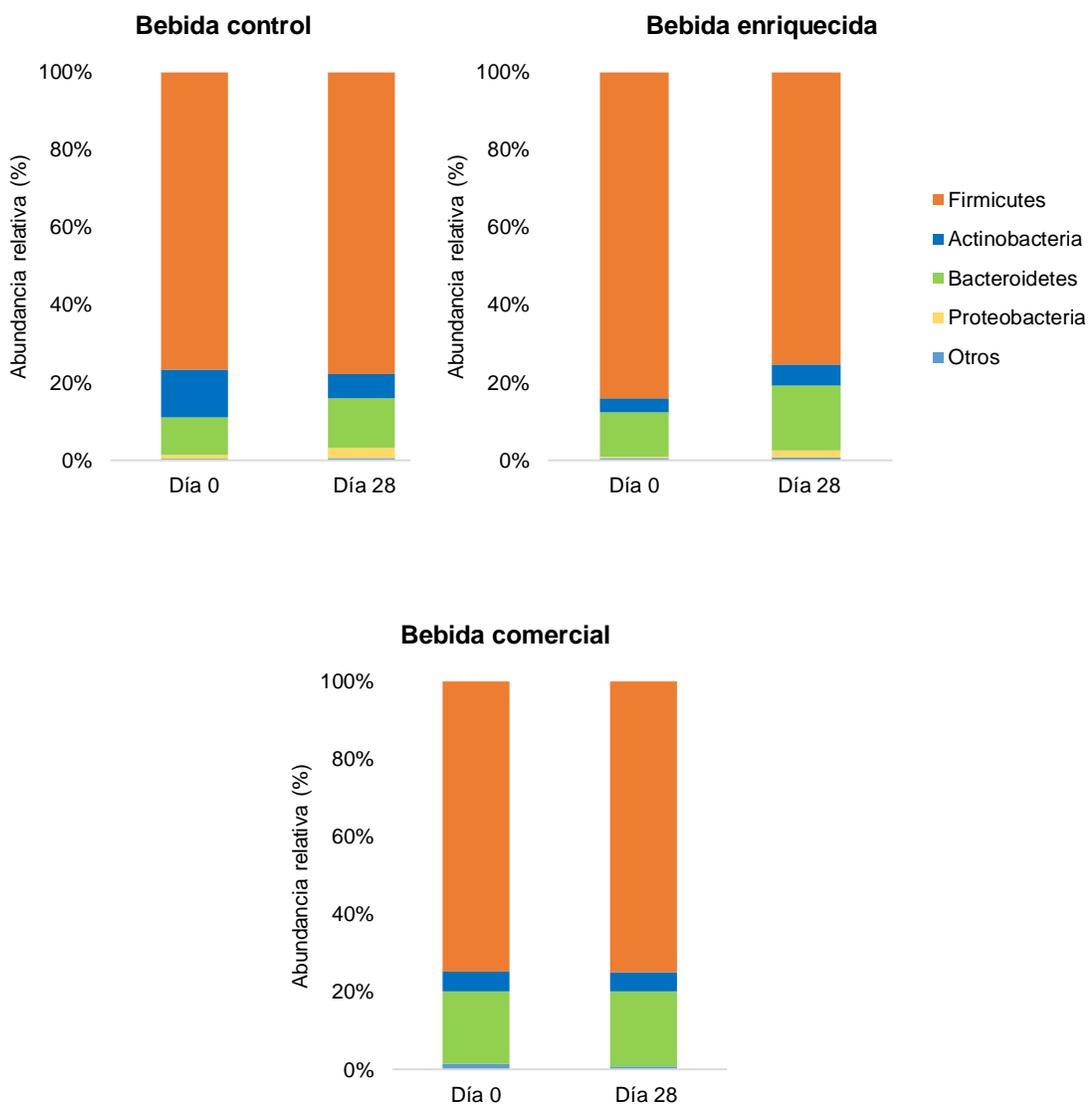


**Figura 13.** Análisis de componentes principales (PCA) de la beta diversidad por las distancias de Bray-Curtis de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 (A) y 28 (B).

De manera similar, en un estudio realizado por Ezzat-Zadeh y colaboradores (2020), adultos sanos fueron alimentados durante 4 semanas con una dieta baja en polifenoles y suplementada con 26 g de fresa liofilizada. Posteriormente, se cesó la suplementación con la fresa, manteniendo únicamente la dieta baja en polifenoles durante 2 semanas más. Al evaluar los cambios en la microbiota intestinal, no se observaron cambios significativos en la alfa y beta diversidad en las semanas 0, 4 y 6 del estudio. No obstante, se identificaron otros cambios importantes en la abundancia a nivel filo y familia de ciertos microorganismos intestinales.

Las bacterias intestinales están representadas por más de 1000 especies que pertenecen a seis filos dominantes: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*, siendo los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* los que representan el 90 % de la microbiota intestinal (Stonjanov et al., 2020). Con respecto al nivel taxonómico filo identificado en los participantes de este estudio, se realizó una comparación al inicio y al final de cada uno de los grupos, cuyos gráficos se presentan en la **Figura 14**.

A nivel filo, se identificó que *Firmicutes* representó más del 74 % de la abundancia relativa en todos los tratamientos, seguido de *Bacteroidetes* con más del 9 % y, finalmente, *Actinobacteria* con al menos un 5 %. Además, se identificó al filo *Proteobacteria*, que experimentó un incremento significativo de 2.8 y 6.7 veces a los 28 días de tratamiento con la bebida control ( $p=0.03$ ) y enriquecida ( $p=0.001$ ), mientras que en la bebida comercial se obtuvo una disminución de 2.3 veces de este filo, aunque sin ser significativa ( $p=0.53$ ).



**Figura 14.** Abundancia relativa a nivel filo de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 y 28. Los resultados muestran taxones con abundancia relativa promedio >1%. La categoría Otros incluye taxones con abundancia relativa promedio <1 %.

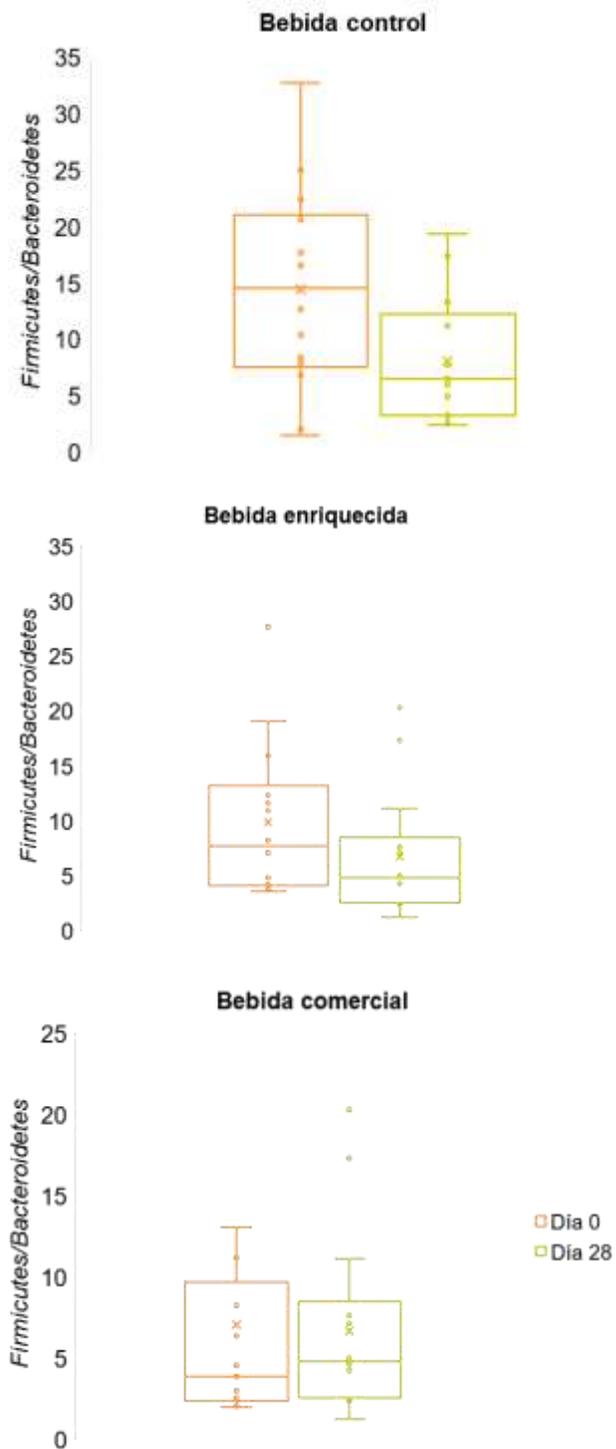
La literatura aún no ha esclarecido completamente el rol benéfico o patógeno de este filo, debido a las variaciones experimentales en los modelos estudiados. Algunos estudios han asociado este filo con condiciones de salud deterioradas, mientras que otros lo han vinculado con una mejora de las mismas. Por ejemplo, la suplementación durante 12 semanas con un extracto de mora azul en ratones alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa incrementó significativamente el filo *Proteobacteria* (Jiao et al., 2018). Un efecto similar se observó en ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasa por 7 semanas que fueron suplementados con un extracto de semilla de uva rico en proantocianidinas (Liu et al., 2017). Por el contrario, otros estudios reportan la prevalencia de estas especies como potencial diagnóstico de disbiosis intestinal o colitis (Shin, Whon y Bae, 2015), así como un incremento en su abundancia por el consumo de dietas altas en sales (8 % NaCl) (Gomes et al., 2019). Por lo tanto, nuestros resultados son poco concluyentes, ya que, además del incremento en el consumo de compuestos polifenólicos en la dieta, también se observó un alto consumo de sal (>2500 mg/día) en la dieta de los participantes de los tres grupos suplementados con las bebidas de fresa.

Las investigaciones han centrado sus esfuerzos en identificar taxones bacterianos implicados en el desarrollo de la obesidad, donde se ha demostrado que los filos dominantes *Firmicutes* y *Bacteroidetes* pueden ser indicadores de esta patología. Estudios realizados en modelos animales y en humanos con obesidad han demostrado que el filo *Firmicutes* es más eficiente en la extracción de energía de los alimentos que *Bacteroidetes*, promoviendo la mayor absorción de calorías y el aumento de peso (Magne et al., 2020). Además, la implementación de una restricción calórica en la dieta ha mostrado un incremento en la abundancia de *Bacteroidetes* y la normalización del índice de ambos filos, por lo que este último ha sido establecido como posible marcador de la disbiosis intestinal en la obesidad (Stojanov, Berlec y Štrikelj, 2020).

El índice *Firmicutes/Bacteroidetes* fue calculado para cada uno de los grupos suplementados con las bebidas de fresa al inicio y final del estudio (**Figura 15**). Los resultados muestran una disminución significativa del 45 % de este índice en el grupo suplementado con la bebida control en comparación con el día 0, mientras que el grupo suplementado con la bebida enriquecida presentó una reducción del 32 %, aunque esta no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, el grupo suplementado con la bebida comercial mostró solo una reducción del 2 %. De acuerdo a la revisión realizada, este estudio es el primero en reportar disminuciones del índice *Firmicutes/Bacteroidetes* asociado al consumo de frutos de fresa.

En investigaciones previas, se ha demostrado que ratones alimentados con una dieta alta en grasa y suplementados con un 10 % de mora azul liofilizada durante 8 semanas (Lee et al., 2018) resultó en un perfil de microbiota caracterizado por un alto predominio de *Gammaproteobacteria*. Estos cambios se asociaron con aumentos en la altura de las vellosidades intestinales, la proliferación de células caliciformes y la expresión génica de *Muc2* y *Defb2* en el íleon, lo que sugirió una mejora en la integridad de la barrera intestinal.

Además, la suplementación con un 4 y 8 % de residuo fermentado de mora azul durante 5 semanas (Cheng et al., 2020) mejoró la producción de la inmunoglobulina A secretora intestinal en ratones alimentados con una dieta alta en grasa, la cual es importante para proteger la barrera intestinal y prevenir la invasión de patógenos, así como incrementó de las familias benéficas *Akkermansia* y *Lactobacillus*



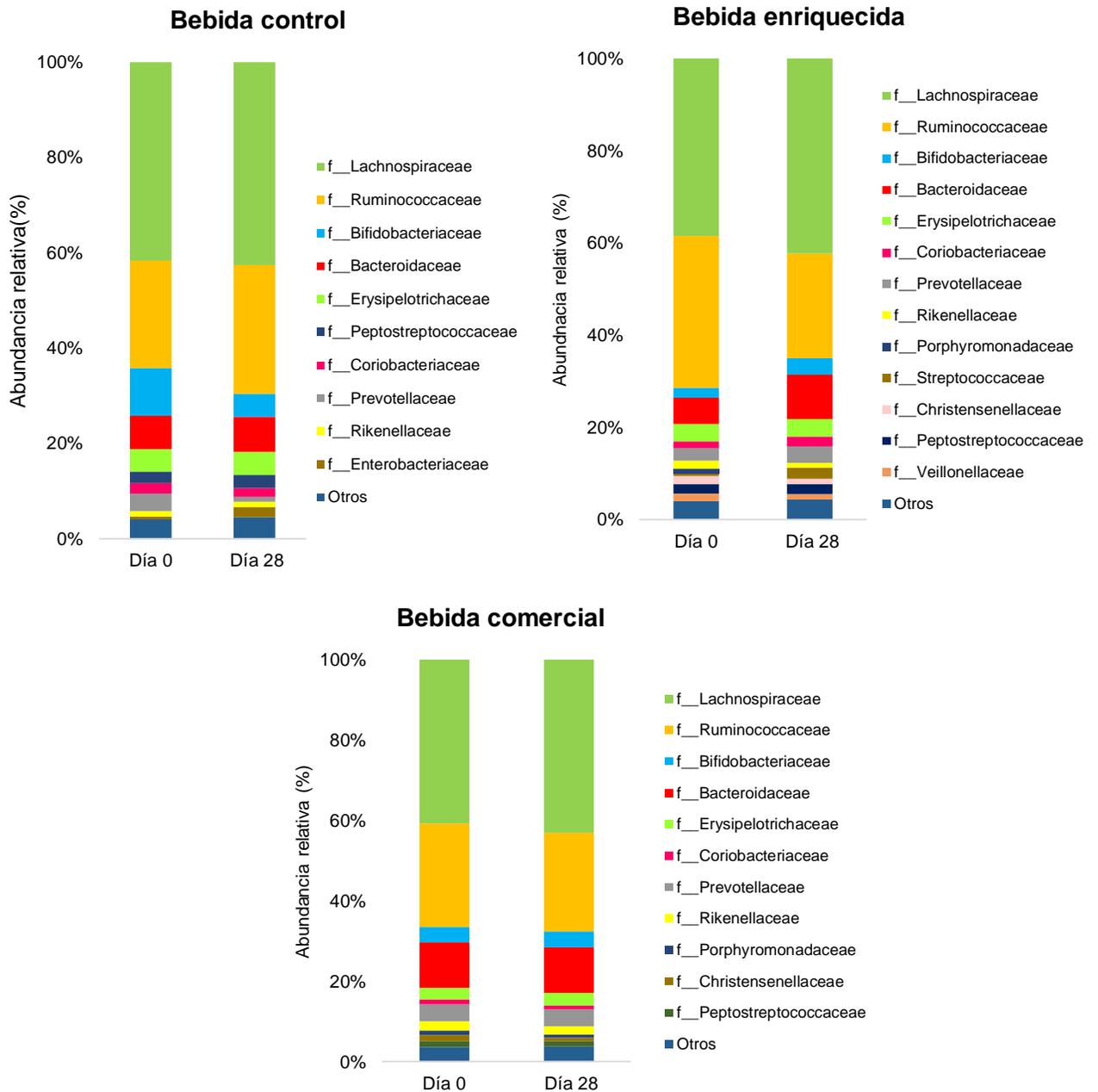
**Figura 15.** Índice *Firmicutes/Bacteroidetes* de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 y 28. \*Indica diferencias significativas con respecto al día 0 por la prueba de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ).

Finalmente, se analizó la abundancia relativa de las familias de la microbiota fecal al inicio y final del tratamiento con las bebidas de fresa, el cual se observa en la **Figura 16**. Para el caso del grupo suplementado con la bebida control, la familia más abundante fue *Lachnospiraceae*, seguida de *Ruminococcaceae* y *Bifidobacteriaceae* en ambos días, sin cambios significativos. Sin embargo, se observó una disminución significativa de 4.3 veces ( $p=0.028$ ) en la familia *Prevotellaceae* en el día 28 en comparación con el día 0.

En el grupo que consumió la bebida enriquecida con residuo de fresa, la familia más abundante fue *Lachnospiraceae*, seguida de *Ruminococcaceae* y *Bacteroidaceae*. Se observaron disminuciones significativas de 1.8 veces en las familias *Rikenellaceae* ( $p=0.04$ ) y *Ruminococcaceae* ( $p=0.04$ ) después de 28 días de suplementación con la bebida enriquecida. Además, se observó un aumento significativo de 1.6 veces en la abundancia relativa de la familia *Bacteroidaceae* al final del tratamiento. Para la bebida comercial, no se observaron cambios significativos en estas familias identificadas.

Reportes sobre el consumo de fresa y su relación con la mejora de la microbiota intestinal han mostrado un incremento de bacterias benéficas como *Christensenellaceae*, *Mogibacteriaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, y una disminución de la abundancia de *Alcaligenaceae*, asociado con una mejora del peso corporal y disminución del síndrome metabólico (Ezzat-Zadeh et al., 2020). Nuestro estudio es el primero en demostrar que el consumo de bebidas de fresa disminuyó la abundancia de la familia *Prevotellaceae*, asociada con obesidad y diabetes, la cual se ha visto disminuida con la suplementación de polifenoles de té verde (Zhang et al., 2018).

La disminución de *Rikenellaceae* y *Ruminococcaceae*, asociada con dietas altas en grasa y azúcares simples, observada en nuestro estudio, fue similar a lo reportado por el consumo de antocianinas de mora azul y arándano, así como por polifenoles de extractos de té verde (Liu et al., 2021; Pérez-Burillo et al., 2021).



**Figura 16.** Abundancia relativa a nivel familia de la microbiota fecal de participantes suplementados con las bebidas de fresa al día 0 y 28. Los resultados muestran taxones con abundancia relativa promedio >1%. La categoría Otros incluye taxones con abundancia relativa promedio <1 %.

En relación con el papel que tienen los compuestos polifenólicos en los cambios a nivel microbiano, las antocianinas, que constituyen los compuestos mayoritarios en frutos rojos como fresa, y también están presentes en la bebida control del estudio, muestran diversos mecanismos de acción asociados con la mejora de la disbiosis intestinal. La mayoría de estas antocianinas no se absorben en el tracto gastrointestinal superior, por lo que llegan al colon, donde son metabolizadas principalmente por especies como *Bifidobacterium* spp y *Lactobacillus* spp. Estas especies, con efectos probióticos, producen sustancias antimicrobianas como ácidos fenólicos y orgánicos, además de competir con patógenos por la adhesión al epitelio intestinal. Asimismo, estas bacterias poseen enzimas, como la  $\beta$ -glucosidasa, que son necesarias para liberar a la glucosa del aglicón y proporcionar energía para que otras bacterias crezcan.

Por otro lado, se ha demostrado que la suplementación con antocianinas incrementa la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), los cuales estimulan la proliferación de células intestinales, reducen el pH intraluminal, lo que limita la proliferación de bacterias patógenas, y contribuyen con ello al mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal. Por otro lado, se ha demostrado que las antocianinas están relacionadas con una mejora de la función de absorción en el intestino, al aumentar la longitud de las vellosidades y mejora la relación entre la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas, y el espesor de la mucosa intestinal (Verediano et al., 2021).

En relación a los compuestos polifenólicos no extraíbles, algunos de los mecanismos principales de las proantocianidinas no extraíbles mencionan que estas mantienen el balance en la abundancia de bacterias probióticas y patógenas, al unirse con la membrana celular del epitelio, logrando internalizarse en las bicapas lipídicas y ocupando la superficie de los receptores, lo cual disminuye la unión de endotoxinas a los mismos y previene la entrada de lipopolisacárido y microbiota patógena, además de evitar la degradación de las

uniones estrechas. También estos polifenoles tienen la capacidad de unirse con ciertas endotoxinas contribuyendo a la preservación de la barrera intestinal, así como la inhibición de la señalización de las vías NF- $\kappa$ B, MAPK y MLCK, que desencadenan la liberación de citocinas proinflamatorias. Finalmente, se ha reportado que las proantocianidinas promueven las uniones estrechas funcionales, disminuyendo la entrada de toxinas bacterianas, lo que evita la infiltración de células inmunitarias y la liberación de macrófagos por la señalización de TNF- $\alpha$  (Das et al., 2023).

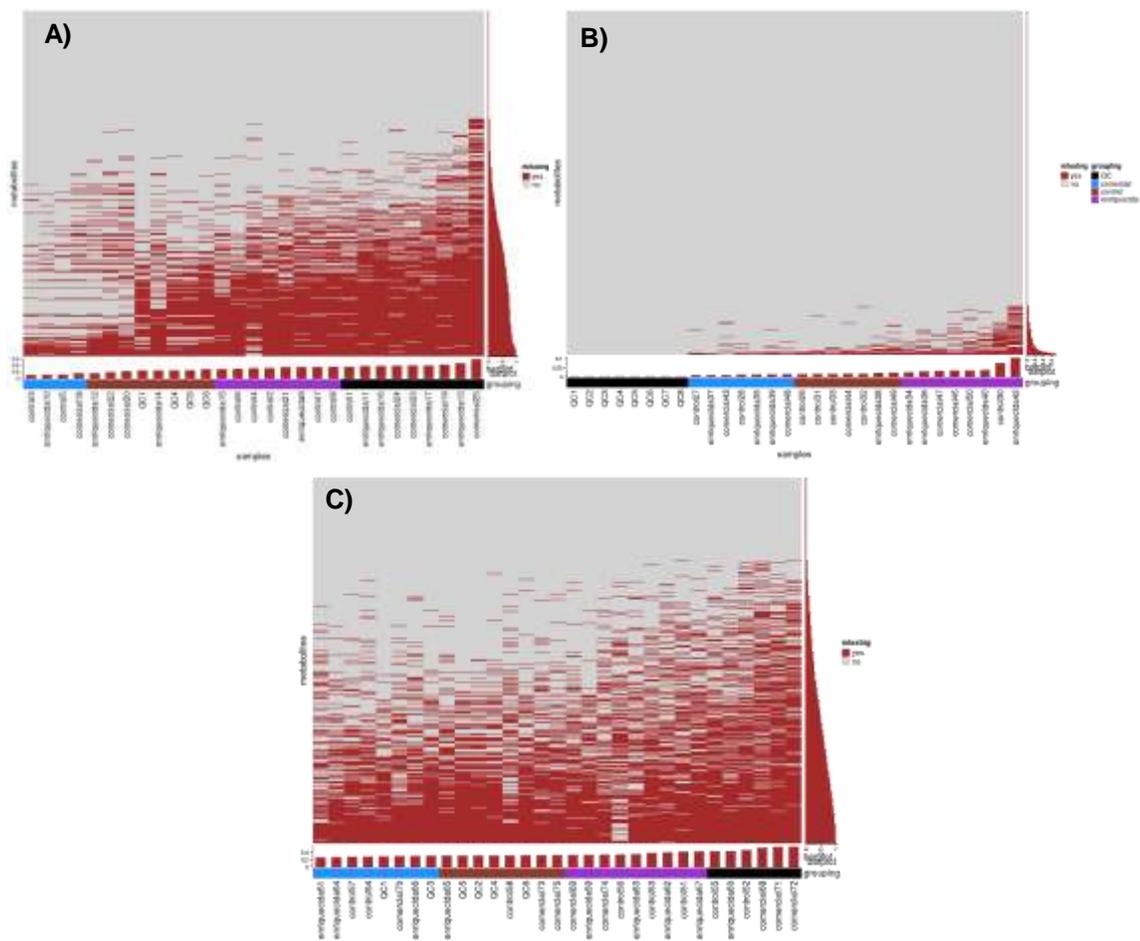
Adicionalmente, en este estudio se plantó determinar el efecto de los polifenoles, tanto extraíbles como no extraíbles, sobre la regulación de los metabolitos endógenos, con el objetivo de identificar posibles blancos terapéuticos y los mecanismos de acción asociados al consumo de estas bebidas.

#### **6.6 Evaluación de la bebida de fresa enriquecida sobre el perfil metabolómico de suero, orina y heces de los participantes**

Se llevó a cabo un análisis metabolómico multicompartimental, el cual comprendió la elaboración de un análisis metabolómico no dirigido en tres muestras biológicas: suero, orina y heces; con esta información se podrían dilucidar los posibles metabolitos discriminantes de cada tratamiento y su relación con la disminución de la resistencia a la insulina, el principal efecto benéfico observado en este estudio.

El análisis de datos utilizándose realizó utilizando un enfoque no dirigido, que consiste en la elaboración de perfiles globales del metaboloma, obteniéndose con ello una gran cantidad de datos para poder identificar posibles biomarcadores. En este protocolo, el procedimiento implicó identificar iones con cambios estadísticamente significativos entre los diferentes conjuntos de muestras, de acuerdo con señales específicas de los mismos, requiriendo con ello un conocimiento *a priori* de los metabolitos de interés, por medio de espectros de masas disponibles en la literatura (Vinayavekhin y Saghatelian, 2010).

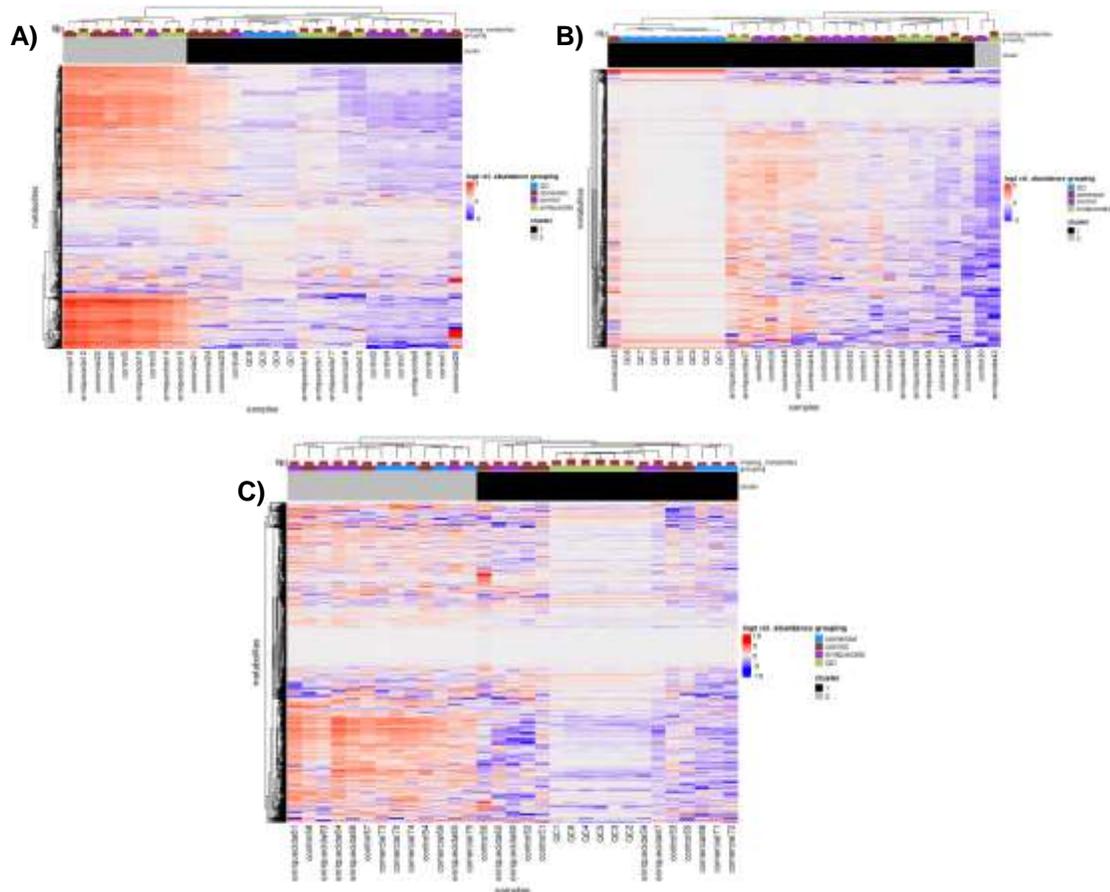
En la **Figura 17** se muestran los mapas de calor ('heatmap') para la visualización de datos faltantes en el metaboloma de suero, orina y heces. La imputación de los datos faltantes ('missing values') se realizó mediante el método del vecino más cercano (KNN), con el fin de minimizar los efectos sobre la normalidad y la varianza de los datos. Se observa que los datos faltantes superan el 40 %, límite recomendado por el protocolo descrito por Mock (2020), lo que sugiere una baja calidad del análisis metabolómico no dirigido en los tres biofluidos.



**Figura 17.** Heatmap para la visualización de las mediciones de datos faltantes ("missing values") del metaboloma de suero (A), orina (B) y heces (C).

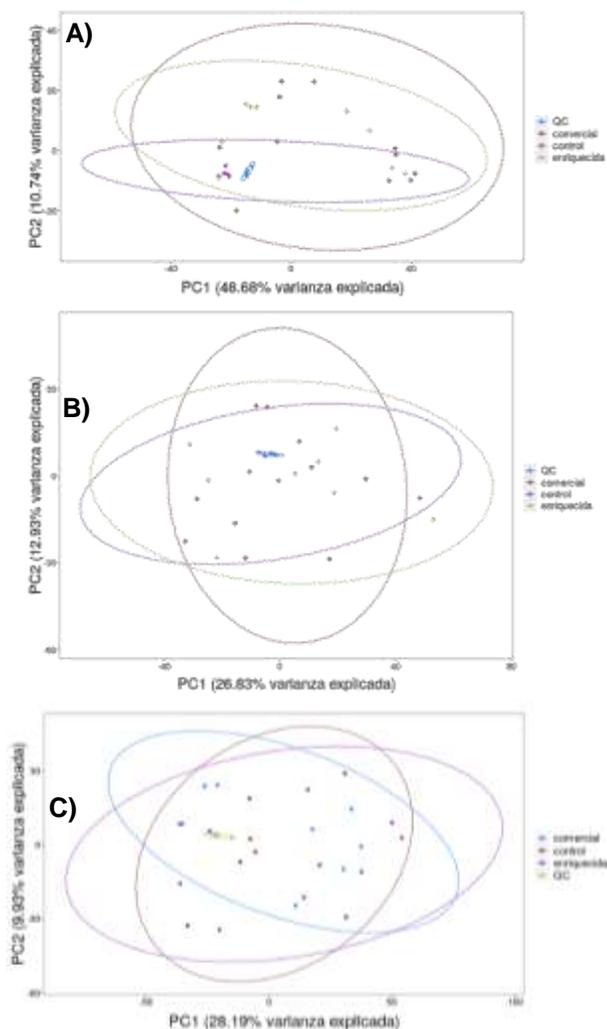
Método del vecino más cercano (KNN). QC: control de calidad.

Posteriormente, continuando con el protocolo de análisis, en la **Figura 18** se muestran los heatmap para la agrupación de los individuos según el perfil metabolómico no dirigido en suero, orina y heces, en donde se puede observar que los participantes no fueron agrupados con base en el grupo experimental, lo que indica alta variabilidad en los perfiles metabolómicos de cada grupo de estudio. Se llevó a cabo la imputación de los datos mediante el método KNN del vecino más cercano y la normalización por estabilización de varianza, lo que garantiza que la varianza permanezca casi constante en el espectro de medición, facilitando la comparación del metaboloma entre los individuos de estudio (**Anexo 4**).

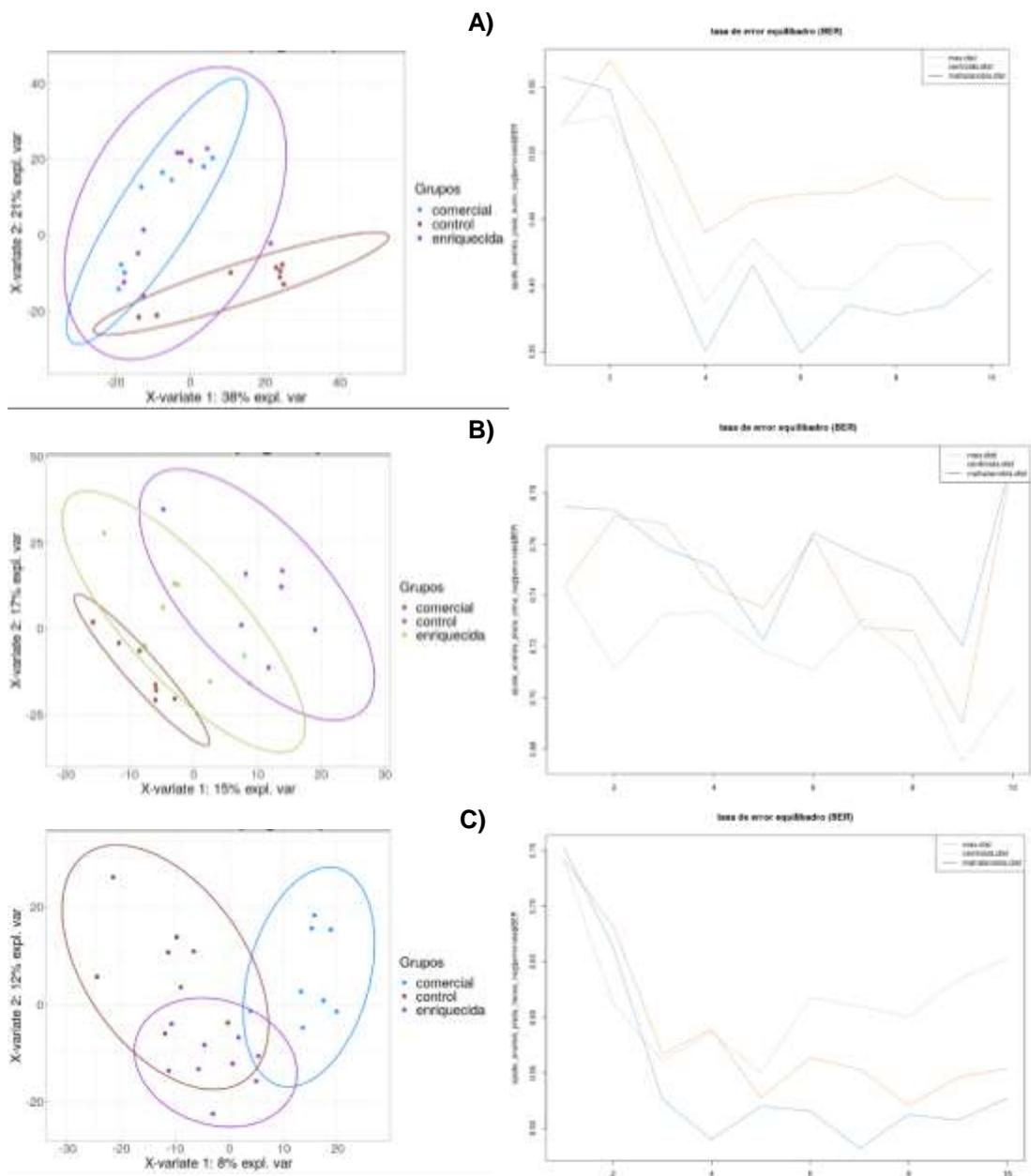


**Figura 18.** Heatmap para la agrupación de las muestras con base en el perfil metabolómico no dirigido en suero (A), orina (B) y heces (C). Datos agrupados con base en K-medias, aplicando un punto de corte para dos aglomeraciones. QC: control de calidad.

En la **Figura 19** se muestra el modelo de PCA del metaboloma no dirigido en los tres biofluidos de los participantes del estudio. Para el caso del suero (A), el diagrama explica una varianza total del 59.42 %, para la orina (B) una varianza total del 39.76% y para heces (C) del 38.12%. En todos los casos, no se observó una discriminación clara entre los grupos de estudio. Debido a esto, se realizó un análisis multivariado supervisado (PLS-DA) con el objetivo de lograr una mejor clasificación de cada uno de los tratamientos probados (**Figura 20**).



**Figura 19.** Análisis de Componentes Principales del perfil metabólico no dirigido en suero (A), orina (B) y heces (C) de jóvenes tras el consumo de bebidas de fresa. PC: componente principal. QC: control de calidad.



**Figura 20.** Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados parciales del perfil metabólico no dirigido en suero (A), orina (B) y heces (C) de jóvenes tras el consumo de bebidas de fresa. Validación cruzada para evaluar el rendimiento de clasificación del PLS-DA para cada tipo de distancia de predicción. PC: Componente principal; QC: control de calidad.

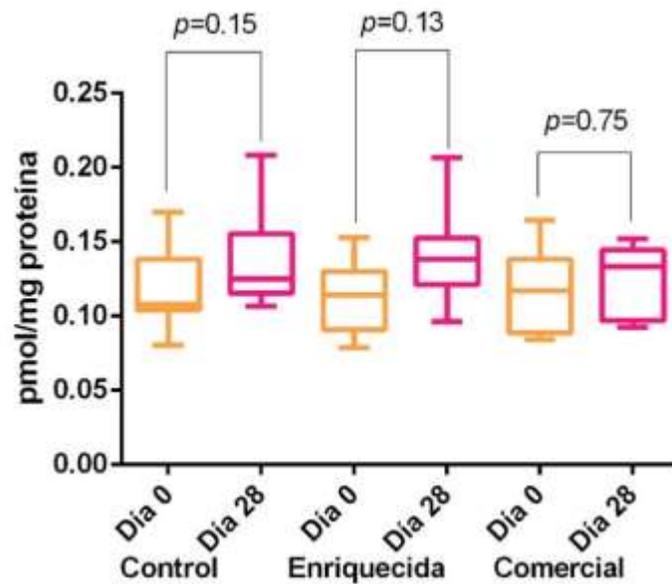
En el caso de las muestras de suero, se observó una ligera discriminación del grupo suplementado con la bebida de fresa control, con una varianza total explicada del 59%. Sin embargo, el ajuste del número de componentes en el PLS-DA indicó que no había componentes adecuados para explicar la clasificación, ya que el error para cada métrica no presenta una disminución constante y considerable (<20 %, Khan et al., 2001), lo que también se observó en las muestras de orina y heces.

Por lo tanto, con los metabolomas obtenidos no fue posible continuar con el procesamiento de la información para la identificación de redes metabólicas, lo que puede ser consecuencia de la alta variabilidad en las respuestas biológicas de cada individuo ante la suplementación con las bebidas de estudio.

### **6.7 Evaluación de la bebida de fresa enriquecida sobre la carbonilación de proteínas en suero y su asociación con el riesgo cardiovascular**

La carbonilación es una modificación postraducciona irreversible que consiste en la formación y/o introducción de grupos carbonilo en las proteínas, favoreciéndose esta reacción en un entorno prooxidativo y como resultado del estrés oxidativo. Por lo tanto, dichos carbonilos proteicos se han establecido como marcadores generales de oxidación en células y tejidos (Estévez, Díaz-Velasco y Martínez, 2022).

De acuerdo con los resultados obtenidos, que se presentan en la **Figura 21**, la medición de la carbonilación antes (día 0) y después del tratamiento (día 28), mostró un incremento de 1.2 veces en los grupos suplementados con la bebida control y la bebida enriquecida, mientras que en el grupo de la bebida comercial el incremento fue de 1.1 veces. No obstante, dichos incrementos no fueron significativos, lo que impide concluir sobre un efecto negativo de las bebidas en el control de la oxidación proteica.



**Figura 21.** Concentración de proteínas de suero carboniladas por el consumo de las bebidas de fresa por 28 días de tratamiento.

Tanto los miocitos como los adipocitos son vulnerables al daño oxidativo de las proteínas en estados patológicos como la utilización prolongada de la capacidad muscular o la sobrenutrición que provoca la obesidad. Las proteínas importantes para la función mitocondrial son atacadas en ambos tejidos ocasionando disfunción mitocondrial por dicho estrés (Frohnert et al., 2013). Por lo tanto, se realizó una correlación de los niveles de carbonilación observada con respecto a los parámetros de IMC, MG, TAV y HOMA-IR, tanto al inicio como al final del periodo experimental.

En el **Cuadro 23** se presentan los coeficientes de correlación de Pearson entre la carbonilación de proteínas séricas y diferentes parámetros metabólicos, tanto al inicio como al final del estudio, en los tres tratamientos de bebidas de fresa. De manera interesante, se muestra que en el inicio del estudio el grupo tratado con la bebida control mostró una correlación positiva moderada con el IMC, MG y TAV de los participantes, así como una correlación negativa moderada en el HOMA-IR, lo que indicó que una mayor carbonilación de proteínas está relacionada con una menor resistencia a la insulina. Después de los 28 días de

tratamiento, este grupo mostró una correlación positiva fuerte entre IMC y la carbonilación (0.61), así como del HOMA-IR (0.574). No obstante, ninguna correlación fue significativa, por lo tanto, no fue posible asociar la carbonilación con el aumento de estos parámetros metabólicos después de este tratamiento.

**Cuadro 23.** Coeficientes de correlación de Pearson entre la carbonilación de proteínas séricas y parámetros de composición corporal y resistencia a la insulina de los participantes en estudio.\*

Tratamiento	Día 0				Día 28			
	IMC	MG	TAV	HOMA-IR	IMC	MG	TAV	RI
<b>Control</b>	0.084	0.205	0.258	-0.422	0.61	0.497	-0.15	0.574
<b>Enriquecida</b>	-0.05	-0.54	0.554	-0.587	-0.31	0.145	-0.49	-0.1
<b>Comercial</b>	-0.32	-0.42	-0.42	-0.452	<b>-0.88</b>	-0.69	-0.71	-0.49

\*Letras en negrita y cursiva indican significancia de  $p < 0.01$ . Letras en negrita indican una significancia de  $p < 0.05$ .

Con respecto a los participantes que consumieron la bebida enriquecida, al inicio del estudio se observó una alta correlación positiva fuerte entre el TAV y la carbonilación, y una alta correlación negativa con el HOMA-IR, la cual disminuye ligeramente después de los 28 días de consumo, lo cual podría sugerir una tendencia a la mejora de este parámetro a pesar del aumento de la carbonilación de este grupo.

En el grupo suplementado con la bebida comercial, se identificaron correlaciones negativas del HOMA-IR, MG y TAV, indicando que una mayor carbonilación se asocia con menores valores de estas variables al inicio del estudio. No obstante, tras los 28 días de consumo de esta bebida, se logró una correlación negativa significativa del IMC con la carbonilación, lo que sugiere que, a pesar de las mejoras en la composición corporal, no hay cambios benéficos en la oxidación de proteínas.

## 7. CONCLUSIONES

El presente estudio ha demostrado el potencial de las bebidas de fresa enriquecidas con polifenoles extraíbles y no extraíbles como una intervención nutricional para mejorar la salud metabólica sobre factores de riesgo cardiovascular. La formulación de estas bebidas, a base de jugo de fresa y residuos de su procesamiento, garantizó una estabilidad adecuada de los compuestos bioactivos durante el almacenamiento en condiciones comerciales, lo cual es fundamental para asegurar el efecto positivo a la salud.

Los análisis clínicos mostraron mejoras significativas sobre la resistencia a la insulina, las cuales se reflejaron en una disminución de los niveles de insulina en ayunas, así como del índice HOMA-IR. No obstante, dichas mejoras se identificaron en mayor forma en la bebida de fresa control comparado con la bebida enriquecida con el subproducto, siendo los cambios en la alimentación de los participantes un posible factor coadyuvante del efecto.

Además, el consumo de estas bebidas reflejó cambios significativos en la composición de la microbiota intestinal, tanto en la disminución significativa del índice *Firmicutes/Bacteroidetes*, como en las modificaciones específicas en la abundancia de diversas familias bacterianas, destacando a *Rikenellaceae* y *Ruminococcaceae* en el grupo suplementado con la bebida enriquecida, sugiriendo que los polifenoles presentes en el residuo de la fruta modularon selectivamente la microbiota intestinal.

En relación con el estrés oxidativo, los resultados del presente estudio sugieren que el consumo de bebidas de fresa enriquecidas con polifenoles no ejerce un efecto positivo en la disminución de la carbonilación de proteínas, un marcador del estrés oxidativo.

Si bien los resultados obtenidos en este estudio son prometedores y sugieren un efecto benéfico de las bebidas de fresa control y enriquecida con polifenoles en

la salud cardiovascular, algunas de las limitaciones de este estudio fue el tamaño de la muestra, así como la duración corta del estudio, lo cual podría limitar la proyección de estos resultados a una población más amplia y a un efecto a largo plazo. Además, estas limitantes pudieron ser causa de la falta de cambios importantes a nivel metabólico y en la disminución del estrés oxidativo, lo que delimitó el estudio de los mecanismos de acción como parte del objetivo general del proyecto.

A pesar de estas limitaciones, los resultados del estudio abren nuevas perspectivas para futuras investigaciones, como explorar los mecanismos moleculares en la modulación de la microbiota intestinal y el metabolismo, realizando estudios adicionales con mayor duración, controlando además la disciplina de los participantes en relación con sus hábitos alimenticios.

## 8. REFERENCIAS

- Aaby K., Grimsbo I. H., Hovda M. B., Rode T. M. (2018) Effect of high pressure and thermal processing on shelf life and quality of strawberry purée and juice. *Food Chem.* 260: 115-123.
- Afrin S., Gasparrini M., Forbes-Hernandez T. Y., Reboredo-Rodriguez P., Mezzetti B., Varela-López A., Giampieri F., Battino M. (2016). Promising health benefits of the strawberry: a focus on clinical studies. *J Agric Food Chem.* 64: 4435-4449.
- Akagawa M. (2020). Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radic Res.* DOI: 10.1080/10715762.2020.1851027.
- Alam M. A., Subhan N., Hossain H., Hossain M., Reza H. M., Rahman M. M., Ullah M. O. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr & Metab.* 13: 1-13.
- Amani R., Moazen S., Shahbazian H., Ahmadi K., Jalali M. T. (2014). Flavonoid-rich beverage effects on lipid profile and blood pressure in diabetic patients. *World J Diabetes.* 5: 962-968.
- American Heart Association (2019). How to Manage Blood Sugar. Understand Blood Glucose. Disponible en: <https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-lifestyle/my-life-check--lifes-simple-7/ls7-blood-sugar-infographic#:~:text=Lower%20than%20100%20mg%2Fdl,of%20heart%20disease%20or%20stroke>. Fecha de consulta: 20/04/2021.
- Amin H. P., Czank C., Raheem S., Zhang Q., Botting N. P., Cassidy A., Kay C. D. (2015). Anthocyanins and their physiologically relevant metabolites alter the expression of IL-6 and VCAM-1 in CD40L and oxidized LDL challenged vascular endothelial cells. *Mol Nutr Food Res.* 59:1095-1106.
- Amiot M. J., Riva C., Vinet A. (2016). Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obes Rev.* 17: 573-586.
- Amorim J. C., Piccoli R. H., Duarte W. F. (2018). Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Res Int.* 107: 518-527.
- Aranaz P., Romo-Hualde A., Zabala M., Navarro-Herrera D., de Galarreta M. R., Gil A. G., Martinez J. A., Milagro F. I., González-Navarro C. J. (2017). Freeze-dried strawberry and blueberry attenuates diet-induced obesity and insulin resistance in rats by inhibiting adipogenesis and lipogenesis. *Food & Funct.* 8(11): 3999-4013.

- Arend G. D., Adorno W. T., Rezzadori K., Di Luccio M., Chaves V. C., Reginatto F. H., Petrus J. C. C. (2017). Concentration of phenolic compounds from strawberry (*Fragaria X ananassa Duch*) juice by nanofiltration membrane. *J Food Eng.* 201: 36-41.
- Basu A., Betts N. M., Nguyen A., Newman E. D., Fu D., Lyons T. J. (2014). Freeze-dried strawberries lower serum cholesterol and lipid peroxidation in adults with abdominal adiposity and elevated serum lipids. *J Nutr.* 144: 830-837.
- Basu A., Du M., Leyva M. J., Sanchez K., Betts N. M., Wu M., Aston C. E., Lyons T. J. (2010). Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. *J Nutr.* 140: 1582-1587.
- Basu A., Fu D. X., Wilkinson M., Simmons B., Wu M., Betts N. M., Du M., Lyons T. J. (2010). Strawberries decrease atherosclerotic markers in subjects with metabolic syndrome. *Nutr Res.* 30: 462-469.
- Basu A., Izuora K., Betts N. M., Kinney J. W., Salazar A. M., Ebersole J. L., Scofield R. H. (2021). Dietary Strawberries Improve Cardiometabolic Risks in Adults with Obesity and Elevated Serum LDL Cholesterol in a Randomized Controlled Crossover Trial. *Nutrients.* 13: 1421.
- Basu A., Wilkinson M., Penugonda K., Simmons B., Betts N. M., Lyons T. J. (2009). Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutr. J.* 8: 1-7.
- Benton D., Young H. A. (2019). Role of fruit juice in achieving the 5-a-day recommendation for fruit and vegetable intake. *Nutr Rev.* 77: 829-843.
- Bhaswant M., Fanning K., Netzel M., Mathai M. L., Panchal S. K., Brown L. (2015). Cyanidin 3-glucoside improves diet-induced metabolic syndrome in rats. *Pharmacological Research.* 102: 208-217.
- Bosch-Sierra N., Marqués-Cardete R., Gurrea-Martínez A., Grau-Del Valle C., Talens C., Alvarez-Sabatel S., Bald C., Morillas C., Hernández-Mijares A., Bañuls C. (2019). Effect of fibre-enriched orange juice on postprandial glycaemic response and satiety in healthy individuals: An acute, randomised, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Nutrients.* 11: 3014
- Bouchard C., Tremblay A., Leblanc C., Lortie G., Savard R., Thériault G. (1983). A method to assess energy expenditure in children and adults. *Am J Clin Nutr.* 37(3): 461-467.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7: 72:248-54.

- Burton-Freeman B., Linares A., Hyson D., Kappagoda T. (2010). Strawberry modulates LDL oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women. *J Am Coll Nutr.* 29: 46-54.
- Caimi G., Hopps E., Noto D., Canino B., Montana M., Lucido D., Lo Presti R., Averna M. R. (2013). Protein oxidation in a group of subjects with metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 7: 38-41.
- Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J., Holmes S. P. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 13: 581-3.
- Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 7: 335-336.
- Canfora E. E., Meex R. C., Venema K., Blaak E. E. (2019). Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol.* 15: 261-273.
- Capuano E. (2017). The behavior of dietary fiber in the gastrointestinal tract determines its physiological effect. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57: 3543-3564.
- Carnauba R. A., Chaves D. F., Baptistella A. B., Paschoal V., Naves A., Buehler A. M. (2017). Association between high consumption of phytochemical-rich foods and anthropometric measures: a systematic review. *Int J Food Sci.* 68: 158-166.
- Cassani L., Tomadoni B., Viacava G., Ponce A., Moreira M. R. (2016). Enhancing quality attributes of fiber-enriched strawberry juice by application of vanillin or geraniol. *LWT. Food Sci Tech.* 72: 90-98.
- Cervantes L., Martínez-Ferri E., Soria C., Ariza M. T. (2020). Bioavailability of phenolic compounds in strawberry, raspberry and blueberry: Insights for breeding programs. *Food Biosci.* 37: 100680.
- Chen L., Pu Y., Xu Y., He X., Cao J., Ma Y., Jiang W. (2022). Anti-diabetic and anti-obesity: Efficacy evaluation and exploitation of polyphenols in fruits and vegetables. *Food Research International.* 157: 111202.
- Cheng Y., Tang S., Huang Y., Liang F., Fang Y., Pan S., Xu X. (2020). *Lactobacillus casei*-fermented blueberry pomace augments sIgA production in high-fat diet mice by improving intestinal microbiota. *Food & function.* 11(7), 6552-6564.
- Cserhalmi Z. S., Sass-Kiss Á., Tóth-Markus M., Lechner N. (2006). Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 7: 49–54.

- Das T., Chatterjee N., Capanoglu E., Lorenzo J. M., Das A. K., Dhar P. (2023). The synergistic ramification of insoluble dietary fiber and associated non-extractable polyphenols on gut microbial population escorting alleviation of lifestyle diseases. *Food Chemistry: X* 18, 100697.
- De Beer D., Steyn N., Joubert E., Muller N. (2012). Enhancing the polyphenol content of a red-fleshed Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) nectar by incorporating a polyphenol-rich extract from the skins. *J Sci Food Agric.* 92: 2741-2750.
- De Santiago E., Domínguez-Fernández M., Cid C., De Peña M. P. (2018). Impact of cooking process on nutritional composition and antioxidants of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem.* 240: 1055-1062
- Díaz-García M. C., Obón J. M., Castellar M. R., Collado J., Alacid M. (2013). Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chem.* 138: 938-949.
- Dilucia F., Lacivita V., Conte A., Del Nobile M. A. (2020). Sustainable use of fruit and vegetable by-products to enhance food packaging performance. *Foods.* 9(7), 857.
- Ding Y., Morozova K., Scampicchio M., Ferrentino G. (2020). Non-extractable polyphenols from food by-products: current knowledge on recovery, characterization, and potential applications. *Processes*, 8: 925.
- Eichholz I., Huyskens-Keil S., Rohn S. (2015). Blueberry Phenolic Compounds: Fruit Maturation, Ripening and Post-Harvest Effects. En: Preedy V. (Ed.) *Processing and impact on active components in food.* pp. 173-180. Academic Press. United Kingdom.
- Campos-Nonato I., Galván-Valencia O., Hernández-Barrera L., Oviedo-Solís C., Barquera S. (2023). Prevalence of obesity and associated risk factors in Mexican adults: results of the Ensanut 2022.
- Ertan K., Türkyilmaz M., Özkan M. (2019). Color and stability of anthocyanins in strawberry nectars containing various co-pigment sources and sweeteners. *Food Chem.* 310: 125856.
- Esparza I., Cimminelli M. J., Moler J. A., Jiménez-Moreno N., Ancín-Azpilicueta C. (2020). Stability of Phenolic Compounds in Grape Stem Extracts. *Antioxidants.* 9: 720.
- Estévez M., Díaz-Velasco S., Martínez R. (2022). Protein carbonylation in food and nutrition: a concise update. *Amino Acids.* 54(4): 559-573.
- Flores-Viveros K. L., Aguilar-Galarza B. A., Ordóñez-Sánchez M. L., Anaya-Loyola M. A., Moreno-Celis U., Vázquez-Cárdenas P., García-Gasca T. (2019).

- Contribution of genetic, biochemical and environmental factors on insulin resistance and obesity in Mexican young adults. *Obes Res Clin Pract.* 13: 533-540.
- Fraga C. G., Croft K. D., Kennedy D. O., Tomás-Barberán F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Funct.* 10: 514-528
- Frohnert B. I., Bernlohr D. A. (2013). Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Adv Nutr.* 4: 157-163.
- Furdui C. M., Poole L. B. (2014). Chemical approaches to detect and analyze protein sulfenic acids. *Mass Spectrom. Rev.* 33: 126–146.
- Gallo L. A., Gallo T. F., Young S. L., Moritz K. M., Akison L. K. (2020). The impact of isolation measures due to COVID-19 on energy intake and physical activity levels in Australian university students. *Nutrients.* 12(6): 1865.
- Galvan-Portillo M. V., Wolff M. S., Torres-Sánchez L. E., López-Cervantes M., López-Carrillo L. (2007). Assessing phytochemical intake in a group of Mexican women. *Salud Pública de México.* 49(2): 126-131.
- García-García J. A., Reding-Bernal A., López-Alvarenga J. C. (2013). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en educación médica.* 2(8): 217-224.
- Giampieri F., Forbes-Hernandez T. Y., Gasparrini M., Alvarez-Suarez J. M., Afrin S., Bompadre S., Quiles J. L., Mezzetti B., Battino M. (2015). Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food & Funct.* 6: 1386-1398.
- Giampieri F., Alvarez-Suarez J. M., Gasparrini M., Forbes-Hernandez T. Y., Afrin S., Bompadre S., Rubini C., Zizzi A., Astolfi P., Santos-Buelga C., González-Paramás A. M., Quiles J. L., Mezzetti B., Battino M. (2016). Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. *Food Chem Toxicol.* 94: 128-137.
- Gironés-Vilaplana A., Mena P., García-Viguera C., Moreno D. A. (2012). A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *Lwt,* 47: 279-286.
- Giusti M. M., Wrolstad R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* John Wiley & Sons.
- Gomes A., Oudot C., Macià A., Foito A., Carregosa D., Stewart D., Nunes dos Santos C. (2019). Berry-enriched diet in salt-sensitive hypertensive rats: metabolic fate of (poly) phenols and the role of gut microbiota. *Nutrients.* 11(11): 2634.

- Gonçalves B., Paula Silva A., Moutinho-Pereira J., Bacelar E., Rosa E., Meyer, A. S. (2007). Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of color and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* 103: 976–984.
- Grobelna A., Kalisz S., Kieliszek, M. (2019). The effect of the addition of blue honeysuckle berry juice to apple juice on the selected quality characteristics, anthocyanin stability, and antioxidant properties. *Biomolecules.* 9: 744.
- Hall J. E., do Carmo J. M., da Silva A. A., Wang Z., Hall M. E. (2019). Obesity, kidney dysfunction and hypertension: mechanistic links. *Nat Rev Nephrol.* 15: 367-385.
- Hassan F. A., Ismail A., Hamid A. A., Azlan A., Al-Sheraji S. H. (2011). Characterization of fibre-rich powder and antioxidant capacity of *Mangifera pajang* K. fruit peels. *Food Chem.* 126: 283–288.
- Heymsfield S. B., Wadden T. A. (2017). Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *N Engl J Med.* 376: 254-266.
- Higuera-Hernández M. F., Reyes-Cuapio E., Gutiérrez-Mendoza M., Budde H., Blanco-Centurión C., Veras A. B., Rocha N. B., Yamamoto T., Monteiro D., Zladívar-Rae J., Aldana-Aranda D., Machado S., Murillo-Rodríguez E. (2019). Blueberry intake included in hypocaloric diet decreases weight, glucose, cholesterol, triglycerides, and adenosine levels in obese subjects. *J Funct Foods.* 60: 103409.
- Holt R. R., Zuelch M. L., Charoenwoodhipong P., Al-Dashti Y. A., Hackman R. M., Keen C. L. (2019). Effects of short-term consumption of strawberry powder on select parameters of vascular health in adolescent males. *Food & Funct.* 11: 32-44.
- Hopps E., Caimi G. (2013). Protein oxidation in metabolic syndrome. *Clin Invest Med.* 36: E1-E8.
- Hotchkiss-Jr. A. T., Chau H. K., Strahan G. D., Nuñez A., Simon S., White A. K., Dieng S., Heuberger E. R., Yadav M. P., Hirsch J. (2021). Structure and composition of blueberry fiber pectin and xyloglucan that bind anthocyanins during fruit puree processing. *Food Hydrocoll.* 116: 106572.
- Janssen-Heininger Y. M., Mossman B. T., Heintz N. H., Forman H. J., Kalyanaraman B., Finkel T., Stamler J. S., Rhee S. G., van der Vliet A. (2008). Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med.* 45: 1-17.
- Jaroslawska J., Juskiwicz J., Wroblewska M., Jurgonski A., Krol B., Zdunczyk Z. (2011). Polyphenol-rich strawberry pomace reduces serum and liver lipids

and alters gastrointestinal metabolite formation in fructose-fed rats. *J Nutr.* 141: 1777-1783.

- Jiao X., Wang Y., Lin Y., Lang Y., Li E., Zhang X., Li B. (2019). Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 64: 88-100.
- Johnson S. A., Figueroa A., Navaei N., Wong A., Kalfon R., Ormsbee L. T., Feresin R. G., Elam M. L., Hooshmand S., Payton M. E., Arjmandi B. H. (2015). Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre-and stage 1-hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Acad Nutr Diet.* 115: 369-377.
- Khan J., Wei J. S., Ringner M., Saal L. H., Ladanyi M., Westermann F., Berthold F., Schwab M., Antonescu C. R., Peterson C., Meltzer P. S. (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nature medicine.* 7(6), 673-679.
- Khan, J., Khan, M. Z., Ma, Y., Meng, Y., Mushtaq, A., Shen, Q., & Xue, Y. (2022). Overview of the composition of whole grains' phenolic acids and dietary fibre and their effect on chronic non-communicable diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 19(5), 3042.
- Klafke J. Z., da Silva M. A., Facchini-Panigas T. (2010). Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *J Ethnopharmacol.* 127: 299–305.
- Klop B., Elte J. W., Cabezas M. C. (2013). Dyslipidemia in obesity: Mechanisms and potential targets. *Nutrients.* 5: 1218–1240.
- Koh A., De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F. (2016). From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell.* 165: 1332-1345.
- Lavefve L., Howard L. R., Carbonero F. (2019). Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health. *Food & Funct.* 11: 45-65.
- Lee S., Keirse K. I., Kirkland R., Grunewald Z. I., Fischer J. G., de La Serre C. B. (2018). Blueberry supplementation influences the gut microbiota, inflammation, and insulin resistance in high-fat-diet-fed rats. *The Journal of nutrition.* 148(2): 209-219.
- Lester G. E., Lewers K. S., Medina M. B., Saftner R. A. (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *J Food Compos Anal.* 27: 102-107.

- Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A. G., Bong W. A., Shmuel S., Stadtman E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. En: *Methods in enzymology*. 186, pp. 464-478. Academic Press.
- Ling B., Tang J., Kong F., Mitcham E. J., Wang S. (2015). Kinetics of food quality changes during thermal processing: A review. *Food Bioproc Tech.* 8: 343–358.
- Liu J., Hao W., He Z., Kwek E., Zhu H., Ma N., Chen Z. Y. (2021). Blueberry and cranberry anthocyanin extracts reduce bodyweight and modulate gut microbiota in C57BL/6 J mice fed with a high-fat diet. *European Journal of Nutrition.* 60: 2735-2746.
- Liu P., Ma F., Lou H., Liu Y. (2013). The utility of fat mass index vs. body mass index and percentage of body fat in the screening of metabolic syndrome. *BMC Public Health.* 13: 1-8.
- Liu W., Zhao S., Wang J., Shi J., Sun Y., Wang W., Liu R. (2017). Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates inflammation and adiposity by modulating gut microbiota in high-fat diet mice. *Molecular nutrition & food research.* 61(9): 1601082.
- Loo Y. T., Howell K., Chan M., Zhang P., Ng K. (2020). Modulation of the human gut microbiota by phenolics and phenolic fiber-rich foods. *Compr Rev Food Sci F.* 19: 1268-1298.
- Macagnan F. T., Bender A. B. B., Speroni C. S. (2018). Dietary Fiber and Non-extractable Polyphenols. En: Saura-Calixto F., Pérez-Jiménez J. (Eds.) *Non-extractable Polyphenols and Carotenoids: Importance in Human Nutrition and Health.* pp. 17-36. Royal Society of Chemistry. United Kingdom.
- Mäkilä L., Laaksonen O., Kallio H., Yang B. (2017). Effect of processing technologies and storage conditions on stability of black currant juices with special focus on phenolic compounds and sensory properties. *Food Chem.* 221: 422-430.
- Martínez-Meza Y., Reynoso-Camacho R., Pérez-Jiménez J. (2020). Nonextractable Polyphenols: A Relevant Group with Health Effects. En: Tomás-Barberán F. A., González-Sarrias A., García-Villalba R. (Eds.) *Dietary Polyphenols: Their Metabolism and Health Effects.* pp. 31-83. John Wiley & Sons. UK,
- Martins C. P., Cavalcanti R. N., Cardozo T. S., Couto S. M., Guimarães J. T., Balthazar C. F., Rocha R. S., Pimentel T. C., Freitas M. Q., Raíces R.S L., Silva M. C., Esmerino E. A., Granato D., Cruz A. G. (2021). Effects of microwave heating on the chemical composition and bioactivity of orange juice-milk beverages. *Food Chem.* 345: 128746.

- Méndez L., Ciordia S., Fernández M. S., Juárez S., Ramos A., Pazos M., Gallardo J. M., Torres J. L., Nogués M. R., Medina I. (2017). Changes in liver proteins of rats fed standard and high-fat and sucrose diets induced by fish omega-3 PUFAs and their combination with grape polyphenols according to quantitative proteomics. *J Nutr Biochem.* 41: 84-97.
- Méndez L., Muñoz S., Miralles-Pérez B., Nogués M. R., Ramos-Romero S., Torres J. L., Medina I. (2020). Modulation of the liver protein carbonylome by the combined effect of marine omega-3 PUFAs and grape polyphenols supplementation in rats fed an obesogenic high fat and high sucrose diet. *Mar Drugs.* 18: 34.
- Menevseoglu A., Dıblan S., Türkyılmaz M., Özkan M. (2020). Degradation kinetics of bioactive compounds and antioxidant activity in strawberry juice concentrate stored at high and low temperatures. *J Food Meas Charact.* 14: 2611-2622.
- Moazen S., Amani R., Rad A. H., Shahbazian H., Ahmadi K., Jalali M. T. (2013). Effects of freeze-dried strawberry supplementation on metabolic biomarkers of atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind controlled trial. *Ann Nutr Metab.*, 63: 256-264.
- Mock A. (2020). *MetaboDiff Tutorial*. National Center for Tumor Diseases (NCT), Heidelberg.
- Moldovan B., Hosu A., David L., Cimpoiu C. (2015) Total phenolics, anthocyanins, antioxidant and pro-oxidant activity of some red fruits teas. *Acta Chim Slov.* 63: 213-219.
- Monge A, Lajous M, Ortiz-Panozo E, et al. (2018) Western and modern Mexican dietary patterns are directly associated with incident hypertension in Mexican women: a prospective follow-up study. *Nutr J* 17, 21.
- Napoleão A., Fernandes L., Miranda C., Marum A. P. (2021). Effects of calorie restriction on health span and insulin resistance: Classic calorie restriction diet vs. ketosis-inducing diet. *Nutrients.* 13(4): 1302.
- Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011. Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba. Disponible en: <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4643/salud/salud.htm> Fecha de consulta: 05/05/2021.
- Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012. Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. Disponible en: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5259329&fecha=13/07/20](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5259329&fecha=13/07/20)



- Characterization and quantification oftannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: a comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. *J Food Comp. Anal.* 78: 59–74.
- Qureshi K., Abrams G. A. (2007). Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 13: 3540.
- Reque P. M., Steffens R. S., Jablonski A., Flôres S. H., Rios A. D. O., de Jong E. V. (2014). Cold storage of blueberry (*Vaccinium spp.*) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *J Food Compos Anal.* 33: 111-116.
- Reynoso-Camacho R., Sotelo-González A. M., Patiño-Ortiz P., Rocha-Guzmán N. E., Pérez-Ramírez I. F. (2021). Berry by-products obtained from a decoction process are a rich source of low- and high-molecular weight extractable and non-extractable polyphenols. *Food Bioprod Process.* 127: 371-387.
- Riordan J., Solverson P. (2022). Berry Anthocyanins in Rodent and Human Obesity and Diabetes: A Review of the Evidence. *BioMed.* 2(2): 210-237.
- Riso P., Klimis-Zacas D., Del Bo C., Martini D., Campolo J., Vendrame S., Møller P., Loft S., De María R., Porrini M. (2013). Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *Eur J Nutr.* 52: 949-961.
- Rodríguez-Daza M. C., Daoust L., Boutkrabt L., Pilon G., Varin T., Dudonné S., Levy É., Murette A., Roy D., Desjardins Y. (2020) Wild blueberry proanthocyanidins shape distinct gut microbiota profile and influence glucose homeostasis and intestinal phenotypes in high-fat high-sucrose fed mice. *Sci Rep.* 10: 2217.
- Saltiel A. R., Kahn C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414:799-806.
- Samuthpongton C., Nopsopon T., Pongpirul K. (2021). Gut microbiome diversity measures for metabolic conditions: a systematic scoping review. *medRxiv:* 2021-06.
- Šarić B., Mišan A., Mandić A., Nedeljković N., Pojić M., Pestorić M., Dilas S. (2015). Valorisation of raspberry and blueberry pomace through the formulation of value-added gluten-free cookies. *J Food Sci Technol.* 53: 1140-1150. DOI: 10.1007/s13197-015-2128-1.
- Saura-Calixto F. (2012). Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: The missing dietary polyphenols. *J Agric Food Chem.* 60: 11195-11200.

- Schell J., Scofield R. H., Barrett J. R., Kurien B. T., Betts N., Lyons T. J., Zhao Y. D., Basu A. (2017). Strawberries improve pain and inflammation in obese adults with radiographic evidence of knee osteoarthritis. *Nutrients*. 9: 949.
- Schmidt B. M., Erdman Jr. J. W., Lila M. A. (2006). Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. *Cancer Lett*. 231: 240–246.
- Shin N.R., Whon T. W., Bae J. W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*. 33: 496-503
- Sies H., Jones D.P. (2007). Oxidative stress. 2th ed: *Encyclopedia of Stress*, 3, Elsevier, Amsterdam. 45-48.
- Silva-Cristobal L., Osorio-Díaz P., Tovar J., Bello-Pérez L. A. (2010). Chemical composition, carbohydrate digestibility, and antioxidant capacity of cooked black bean, chickpea, and lentil Mexican varieties. *Cyta–Journal of Food*. 8: 7-14.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela Raventós R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol*. 299: 152-178.
- Skrede G., Wrolstad R. E., Durst R. W. (2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J Food Sci*. 65: 357-364.
- Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *Int J Mol Sci*. 16: 24673-24706.
- Sobolev A. P., Ciampa A., Ingallina C., Mannina L., Capitani D., Ernesti I., Maggi E., Businaro R., Del Ben M., Engel P., Giusti A. M., Donini L. M., Pinto A. (2019). Blueberry-based meals for obese patients with metabolic syndrome: A multidisciplinary metabolomic pilot study. *Metabolites*. 9: 138.
- Sójka M., Klimczak E., Macierzyński J., Kołodziejczyk K. (2013). Nutrient and polyphenolic composition of industrial strawberry press cake. *Eur Food Res Technol*. 237: 995-1007.
- Sójka M., Janowski M., Grzelak-Błaszczak K. (2019) Stability and transformations of raspberry (*Rubus idaeus* L.) ellagitannins in aqueous solutions. *Eur Food Res Technol*. 245: 1113-1122.
- Sójka M., Macierzynski J., Zaweracz W., Buczek M. (2016). Transfer and mass balance of ellagitannins, anthocyanins, flavan-3-ols, and flavonols during the processing of red raspberries (*Rubus idaeus* L.) to juice. *J Agric Food Chem*. 64: 5549–5563.

- Soliman G. A. (2019). Dietary fiber, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Nutrients*. 11: 1155.
- Song Y., Park H. J., Kang S. N., Jang S. H., Lee S. J., Ko Y. G., Kim G. S., Cho J. H. (2013). Blueberry peel extracts inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells and reduce high-fat diet-induced obesity. *Plos One*. 8: e69925.
- Sotelo-González A. M. (2020). Desarrollo de bebidas de frutos rojos y cítricos enriquecidas con polifenoles simples y poliméricos extraíbles y sus beneficios sobre la obesidad. [Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro]. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/2342>
- Stojanov S., Berlec A., Štrukelj B. (2020). The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*. 8(11): 1715.
- Stote K. S., Sweeney M. I., Kean T., Baer D. J., Novotny J. A., Shakerley N. L., Chandrasekaran A., Carrico P. M., Melendez J. A., Gottschall-Pass K. T. (2017). The effects of 100% wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) juice consumption on cardiometabolic biomarkers: a randomized, placebo-controlled, crossover trial in adults with increased risk for type 2 diabetes. *BMC Nutrition*. 3: 1-11.
- Ströher D. J., Escobar Piccoli J. D. C., Güllich A. A. D. C., Pilar B. C., Coelho R. P., Bruno J. B., Faoro D., Manfredini V. (2015). 14 Days of supplementation with blueberry extract shows anti-atherogenic properties and improves oxidative parameters in hypercholesterolemic rats model. *Int J Food Sci Nutr.*, 66: 559-568.
- Stull A. J., Cash K. C., Champagne C. M., Gupta A. K., Boston R., Beyl R. A., Johnson W. D., Cefalu W. T. (2015). Blueberries improve endothelial function, but not blood pressure, in adults with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrients*. 7: 4107-4123.
- Sun B., Ricardo-da-Silva J. M., Spranger I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem*. 46: 4267-4274.
- Tanaka M. (2019). Improving obesity and blood pressure. *Hypertens Res*. 43: 79-89.
- Tang P., Giusti M. M. (2018). Black goji as a potential source of natural color in a wide pH range. *Food Chem*. 269: 419-426.
- Tchkonia T., Thomou T., Zhu Y., Karagiannides I., Pothoulakis C., Jensen M. D., Kirkland J. L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 17: 644-656.

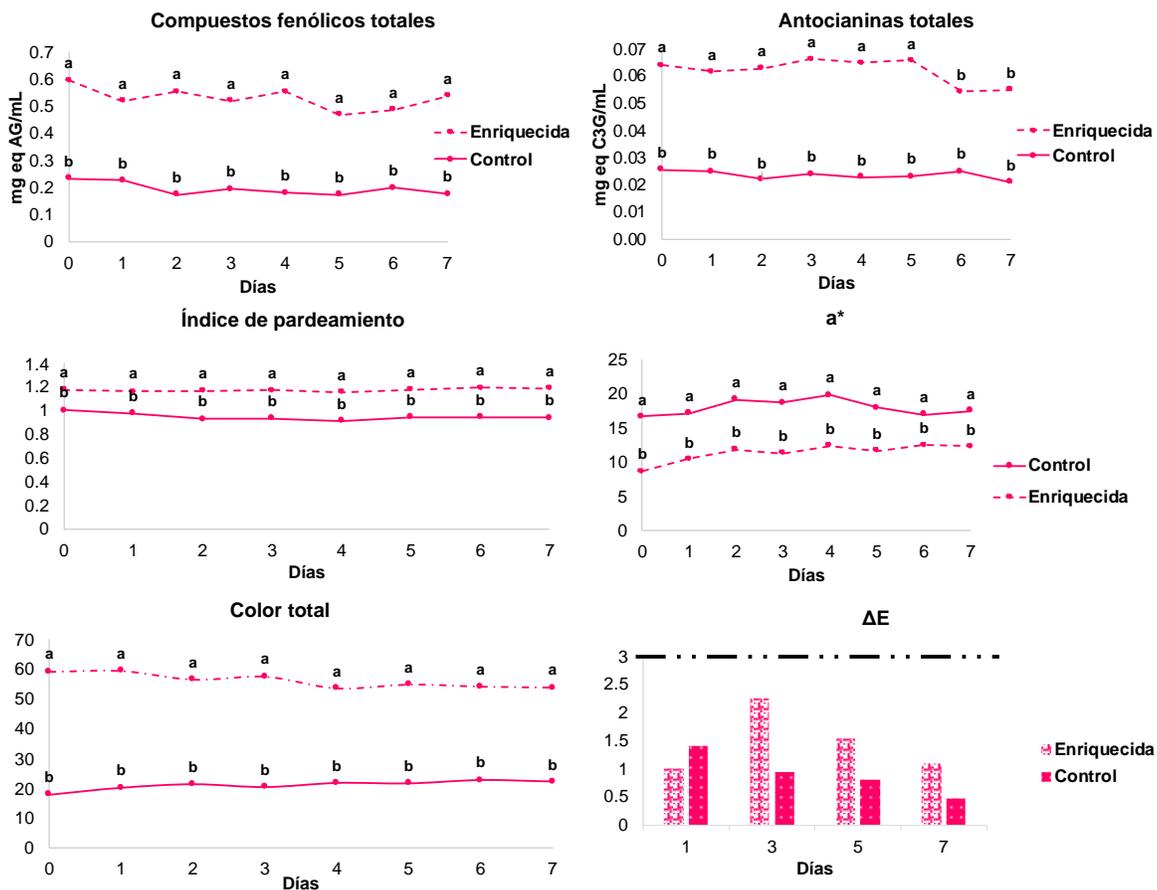
- Teng H., Chen L. (2019). Polyphenols and bioavailability: An update. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 59: 2040-2051.
- Tomás-Barberán F. A., González-Sarriás A., García-Villalba R., Núñez-Sánchez M. A., Selma M. V., García-Conesa M. T., Espín J. C. (2016) Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol Nutr Food Res.* 1-36.
- Turnbaugh P. J., Ley R. E., Mahowald M. A., Magrini V., Mardis E. R., Gordon J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444. 1027–1031.
- USDA (U.S. Department of Agriculture) (2018). Food Composition Database. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/?query=strawberry>  
Fecha de consulta: 25/04/2021.
- Van de Velde F., Esposito D., Grace M. H., Pirovani M. E., Lila M. A. (2018). Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits. *Food Res Int.* 121: 453-462.
- Verediano T. A., Stampini Duarte Martino H., Dias Paes M. C., Tako E. (2021). Effects of anthocyanin on intestinal health: A systematic review. *Nutrients.* 13(4), 1331.
- Villamil-Galindo E., Van de Velde F., Piagentini A. M. (2020). Extracts from strawberry by-products rich in phenolic compounds reduce the activity of apple polyphenol oxidase. *Lwt. Food Scienc Tech.* 133: 110097.
- Vinayavekhin N., Saghatelian, A. (2010). Untargeted metabolomics. *Current protocols in molecular biology.* 90(1): 30-1.
- Vona R., Gambardella L., Cittadini C., Straface E., Pietraforte D. (2019). Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. *Oxid Med Cell Longev.*
- Xie C., Kang J., Chen J. R., Nagarajan S., Badger T. M., Wu X. (2011). Phenolic acids are in vivo atheroprotective compounds appearing in the serum of rats after blueberry consumption. *J. Agric. Food Chem.* 59(18): 10381-10387.
- Xu B., Chang S. K. (2008). Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. *Food Chem.* 110: 1-13.
- Xu Z., Wei L. H., Ge Z. Z., Zhu W., Li C. M. (2015). Comparison of the degradation kinetics of A-type and B-type proanthocyanidins dimers as a function of pH and temperature. *Eur Food Res Technol.* 240: 707-717.

- Wallace T. M., Levy J. C., Matthews D. R. (2004). Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 27: 1487-1495.
- Wu S., Fisher-Hoch S. P., Reiningger B., McCormick J. B. (2016). Recommended levels of physical activity are associated with reduced risk of the metabolic syndrome in Mexican-Americans. *PloS one*. 11(4): e0152896.
- Yde C. C., Clausen M. R., Ditlev D. B., Lillefosse H., Madsen L., Kristiansen K., Liaset B., Bertram H. C. (2014). Multi-block PCA and multi-compartmental study of the metabolic responses to intake of hydrolysed versus intact casein in C57BL/6J mice by NMR-based metabolomics. *Metabolomics*. 10: 938-949.
- Yoon D. S., Cho S. Y., Yoon H. J., Kim S. R., Jung U. J. (2021). Protective effects of p-coumaric acid against high-fat diet-induced metabolic dysregulation in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 142: 111969.
- Zamora-Ros R., Biessy C., Rothwell J. A., Monge A., Lajous M., Scalbert A., López-Ridaura R., Romieu I. (2018). Dietary polyphenol intake and their major food sources in the Mexican Teachers' Cohort. *British Journal of Nutrition*. 120(3): 353-360.
- Żary-Sikorska E., Fotschki B., Jurgoński A., Kosmala M., Milala J., Kołodziejczyk K., Majewski M., Ognik K., Juśkiewicz J. (2020). Protective effects of a strawberry ellagitannin-rich extract against pro-oxidative and pro-inflammatory dysfunctions induced by a high-fat diet in a rat model. *Molecules*. 25(24): 5874.
- Zhang X., Zhang M., Ho C. T., Guo X., Wu Z., Weng P., Cao, J. (2018). Metagenomics analysis of gut microbiota modulatory effect of green tea polyphenols by high fat diet-induced obesity mice model. *Journal of Functional Foods*. 46: 268-277.
- Zhao X., Ding B. W., Qin J. W., He F., Duan C. Q. (2020) Intermolecular copigmentation between five common 3-O-monoglucosidic anthocyanins and three phenolics in red wine model solutions: The influence of substituent pattern of anthocyanin B ring. *Food Chem*. 326: 126960.
- Zhong H., Deng L., Zhao M., Tang J., Liu T., Zhang H., Feng F. (2020). Probiotic-fermented blueberry juice prevents obesity and hyperglycemia in high fat diet-fed mice in association with modulating the gut microbiota. *Food & Funct*. 11: 9192-9207.
- Zhou Y., Zhang N., Arikawa A. Y., Chen C. (2019). Inhibitory effects of green tea polyphenols on microbial metabolism of aromatic amino acids in humans revealed by metabolomic analysis. *Metabolites*. 9: 96.

- Zhu Z., Wang P., Ma S. (2013). Metabolic hypertension: concept and practice. *Front Med.* 7: 201-206.
- Zhu N., Zhu Y., Yu N., Wei Y., Zhang J., Hou Y., Sun A. D. (2018) Evaluation of microbial, physicochemical parameters and flavor of blueberry juice after microchip-pulsed electric field. *Food Chem.* 274: 146-155.
- Zielinski A. A., Haminiuk C. W. (2018). Evaluation of the Phenolics and in vitro Antioxidant Activity of Different Botanical Herbals Used for Tea Infusions in Brazil. *Curr Res Nutr Food Sci.* 15: 345-352.
- Zunino S. J., Parelman M. A., Freytag T. L., Stephensen C. B., Kelley D. S., Mackey B. E., Woodhouse L. R., Bonnel E. L. (2012). Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and inflammatory markers in obese human subjects. *British Br J Nutr.* 108: 900-909.
- Zurita J., Díaz-Rubio M. E., Saura-Calixto F. (2012). Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *Int J Food Sci Nutr.* 63: 936-939.

## 9. ANEXOS

**Anexo 1.** Estabilidad de compuestos polifenólicos totales y color de las bebidas de jugo de fresa control y enriquecida durante el almacenamiento a 4 °C por 7 días.



Los datos mostrados como media y las barras de error representan la desviación estándar. GAE: equivalentes de ácido gálico, C3GE: equivalentes de cianidina 3-O-glucósido. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las muestras por la prueba de Tukey.

**Anexo 2.** Cambios en la presión arterial y en mediciones antropométricas de los participantes por el tratamiento con bebidas de fresa.\*

Parámetro	Control		Enriquecida		Comercial	
	Día 0	Día 28	Día 0	Día 28	Día 0	Día 28
Presión arterial sistólica (mm Hg)	117.4±3.2	112.4±1.8	110.9±3.0	107.5±2.5	113.2±3.1	108.2±2.4
Presión arterial diastólica (mm Hg)	73.7±2.3	72.2±1.9	73.6±2.5	71.6±2.2	74.8±3.0	70.2±2.0
CC (cm)	93.5±2.0	92.3±2.1	92.0±2.6	92.0±3.0	94.8±3.6	94.1±3.5
CCad (cm)	111.0±2.3	109.5±2.5	109.4±2.1	108.9±2.2	111.1±2.9	110.9±2.7
ICC	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0

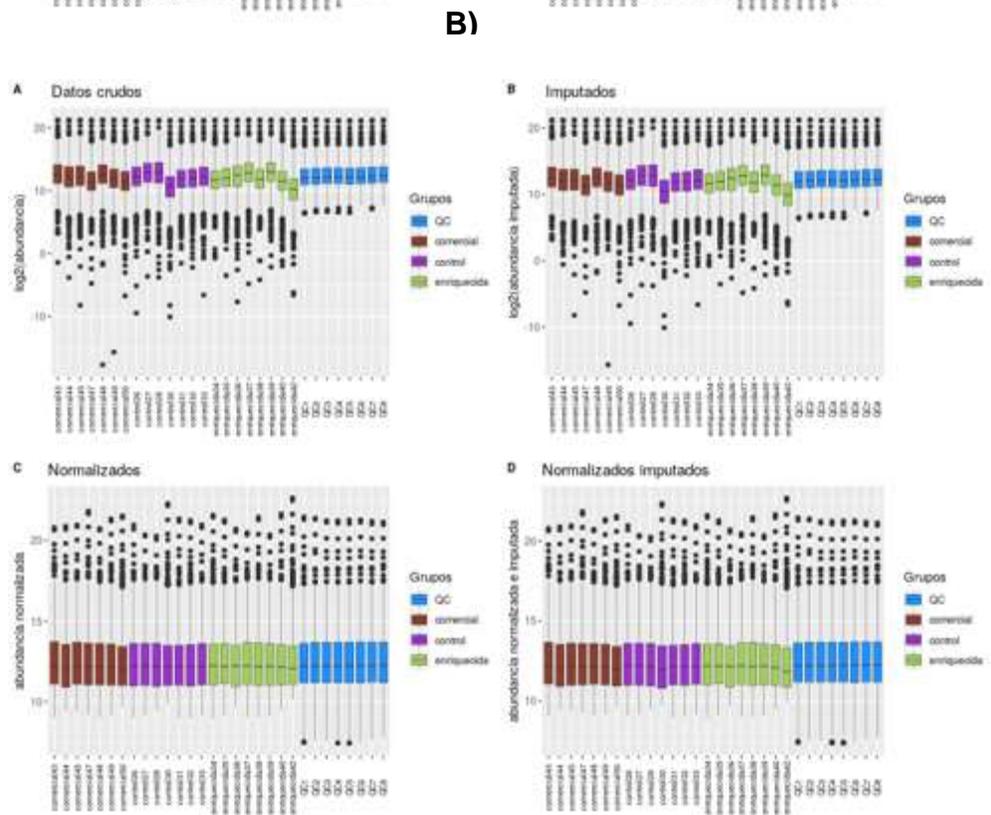
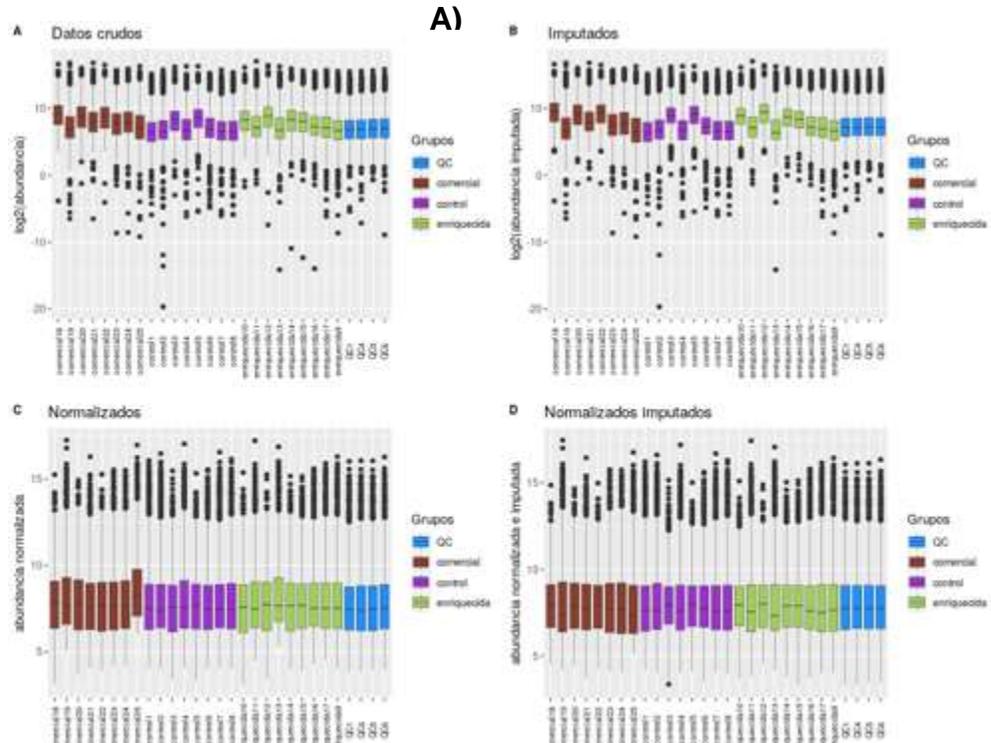
\*Datos expresados como la media ± error estándar. CC; circunferencia de cintura; CCad: circunferencia de cadera; ICC: índice de cintura-cadera.

**Anexo 3.** Cambios en la composición corporal de los participantes suplementados con las bebidas de fresa\*

Parámetro	Control		Enriquecida		Comercial	
	Día 0	Día 28	Día 0	Día 28	Día 0	Día 28
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30.5±0.9	30.0±1.0	30.8±1.0	30.8±1.0	31.0±1.2	30.8±1.2
Masa grasa (%)	38.0±2.2	37.4±2.4	41.4±1.4	41.5±1.5	41.8±1.2	40.9±1.3
IMG (kg/m <sup>2</sup> )	11.7±0.9	11.4±1.0	12.8±0.7	12.8±0.7	13.0±0.8	12.7±0.8
MLG (%)	52.6±2.7	52.1±2.7	48.4±2.7	48.3±2.7	51.7±3.0	50.7±3.2
IMLG (kg/m <sup>2</sup> )	18.7±0.5	18.5±0.5	18.0±0.6	17.9±0.6	17.9±0.5	18.1±0.6
Tejido adiposo visceral (kg)	2.6±0.2	2.5±0.2	2.6±0.3	2.7±0.3	2.8±0.4	2.7±0.4
MME (kg)	26.0 ± 1.5	26.0 ± 1.6	23.6 ± 1.6	23.6 ± 1.6	24.4 ± 1.8	24.7 ± 1.8

\*Datos expresados como la media ± error estándar. IMC: índice de masa corporal; IMG: índice de masa grasa; MLG: masa libre de grasa; IMLG: índice de masa magra; MME: masa muscular esquelética.

**Anexo 4.** Boxplot de la abundancia de los metabolitos en suero (A), orina (B) y heces (C).\*





**Anexo 5.** Dictamen de aprobación de protocolo por el Comité de bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

C.U., Querétaro, septiembre 27, 2021  
No. de oficio. **CBQ21/098**

**Dra. Rosalía Reynoso Camacho**  
**Facultad de Química**  
**Presente**

**At'n. Ana María Sotelo González**

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado "**Evaluación de los mecanismos de acción de una bebida de frutos rojos enriquecida con polifenoles extraíbles, no extraíbles y fibra deitaria sobre factores de riesgo cardiovascular**", del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado** con base en la resolución **CBQ16/0831**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

  
Dra. Minerva Ramos Gómez  
**Secretaria**

  
M.I.M. David Gustavo García Gutiérrez  
**Representante investigador**