



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"Efecto de un ingrediente a base de subproductos de cacao (*Theobroma cacao L.*) sobre el metabolismo colónico *in vitro* de niños autistas"

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LCN. SAYRA KASSANDRA DUARTE FLORES

DIRECTOR: DRA. ROCIO CAMPOS VEGA

Santiago de Querétaro, 2023

CENTRO UNIVERSITARIO, QUERÉTARO, QRO. OCTUBRE DE 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



"Efecto de un ingrediente a base de subproductos de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el metabolismo colónico in vitro de niños autistas"

por

Saya Kassandra Duarte Flores

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-309124



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química

Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Tesis

“Efecto de un ingrediente a base de subproductos de cacao (*Theobroma cacao L.*) sobre el metabolismo colónico *in vitro* de niños autistas”

Como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta

LCN. Sayra Cassandra Duarte Flores

Dirigido por

Dra. Rocío Campos Vega

Director

Firma

Dr. Abraham Wall Medrano

Co-Director

Firma

Dra. Marcela Gaytán Martínez

Sinodal

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Sinodal

Firma

M en C Dafne Velásquez Jiménez

Sinodal

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Directora de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia

Directora de Investigación y posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Septiembre de 2023

RESUMEN

Los trastornos del espectro autista (TEA) son un grupo heterogéneo de padecimientos del neurodesarrollo que afectan la interacción social de quien los sufre. Los niños con TEA manifiestan más síntomas gastrointestinales debido a una desregulación de la microbiota intestinal (MI); el consumo regular de alimentos ricos en fibra dietética y antioxidantes (e.g. polifenoles) ayuda a normalizar la MI. Los subproductos agroindustriales del cacao como la vaina y la cáscara, son considerados fuentes de fibra dietética y antioxidantes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las características químicas (perfil bromatológico c/fibra dietaria), perfil antioxidante (compuestos fenólicos, CF), digestibilidad [bioaccesibilidad (BIA) y absorción aparente (*Paap*) *in vitro* de compuestos fenólicos] y efecto funcional-nutraceútico [fermentación *ex vivo* con inóculo fecal de niños con TEA y neurotípicos (NTO)] de un ingrediente (ING) a base de vaina fermentada (VF) y cascarilla (CA) de cacao. Como resultados se encontró que el ING es rica en carbohidratos (~67% w/w), fibra dietética (~47% w/w), CF (~2.4 mgEAG.g⁻¹) y flavonoides (4.5 gE rutina. g⁻¹) totales y capacidad antioxidante [DPPH (3.3 g), ABTS (5.7g) equivalentes de Trolox.g⁻¹]. Los CF y flavonoides de ING mostraron alta BIA y una parte importante de estos (particularmente catequina y epicatequina podría llegar intacta a colon) para al ser liberados en un 30% adicional, también se encontró que independientemente del inóculo fecal usado (TEA, NTO), estos inóculos difirieron en su actividad de ureasa (144% vs. 58%). El ING podría ser útil para la formulación de alimentos sólidos para personas con TEA, debido a que sus bioactivos antioxidantes podrían ser potencialmente beneficios para la salud colónica.

Palabras claves: subproductos del cacao, trastorno del espectro autista, digestión gastrointestinal *in vitro*, fermentación colónica, microbiota intestinal.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex heterogeneous group of disorders. Autism spectrum disorders (ASD) are a heterogeneous group of neurodevelopmental conditions that affect the social interaction of those who suffer from them. Children with ASD manifest more gastrointestinal symptoms due to a dysregulation of the intestinal microbiota (IM); Regular consumption of foods rich in dietary fiber and antioxidants (e.g. polyphenols) helps to normalize IM. The agro-industrial byproducts of cocoa, such as the pod and shell, are considered sources of dietary fiber and antioxidants. The objective of the present work was to evaluate the chemical characteristics (bromatological profile w/dietary fiber), antioxidant profile (phenolic compounds, CF), digestibility [bioaccessibility (BIA) and apparent absorption (*Paap*) *in vitro* of phenolic compounds for their nutraceutical function using a model [*ex vivo* fermentation with fecal inoculum from children with ASD and neurotypicals (NTO)] of one ingredient (ING) based on fermented pod (VF) and cocoa husk (CA). As results, it was found that ING is rich in carbohydrates (~67% w/w), dietary fiber (~47% w/w), CF (~2.4 mgEAG.g⁻¹) and flavonoids (4.5 gE rutin. g⁻¹) total and antioxidant capacity [DPPH (3.3 g), ABTS (5.7g) Trolox equivalents. g⁻¹]. The CF and flavonoids of ING showed high BIA and an important part of these (particularly catechin and epicatechin could reach the colon intact) to be released by an additional 30%, it was also found that regardless of the fecal inoculum used (TEA, NTO), these inocula differed in their urease activity (144% vs. 58%). ING could be useful for the formulation of solid foods for people with ASD, because its antioxidant bioactives could potentially be beneficial for colonic health.

Keywords: cocoa by-products, autism spectrum disorder, *in vitro* gastrointestinal digestion, colonic fermentation, intestinal microbiota.

DEDICATORIA

*A mi madre Brenda Verónica Duarte Flores y a
mi abuela María Eva Flores Rangel, a mis
hermanos Michel Duarte y Daniel Duarte, a mis
tios Jesús y Berenice, y al amor de mi vida, mi
amor y gratitud .*

En memoria de: Jesús Duarte Rubiano

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios por darme la mayor bendición de mi vida, mi familia, a mi hermano Daniel por estar ahí siempre, a mi hermana Fernanda que todo el tiempo me estuvo animando.

Dra. Rocio, de verdad aprendí tanto gracias a usted, gracias por haberme abierto las puertas y confiar en mí, su calidez humana es algo que llevare conmigo, así

como sus enseñanzas y su dedicación, sin duda alguna le agradezco desde el fondo de mi corazón su apoyo en todo este tiempo.

A Enoe por haber sido mi apoyo incondicional durante todo este tiempo, te agradezco más por los días difíciles en los que me apoyaste y escuchabas, sin duda alguna tienes toda mi gratitud. Al igual que tu familia, gracias por abrirme siempre las puertas de su casa.

A mi comité de tesis por siempre apoyarme en los proyectos y en mis presentaciones, gracias a cada uno cada conocimiento aportado Dr. Abraham, Dra. Marcela, Dra. Monsterrat y Maestra Dafne.

A mis compañeras, gracias, Karen por apoyarme tanto y explicarme una y otra vez, sin duda alguna fuiste parte muy importante. Lady, Yessica, Flor, Vanessa por siempre ser pacientes conmigo, enseñarme cuando estaba perdida, explicarme como usar un laboratorio, gracias por los días de café y pan, las llevare siempre en mi corazón así como sus enseñanzas. A Dafne mi agradecimiento especial por haberme apoyado en todo el proceso, no lo hubiera logrado sin ti. A mis amigos que estuvieron tanto tiempo a veces escuchando mis quejas, a la distancia conté siempre con ustedes y en resolver dudas que tenía, desde Sonora sentir su presencia. Karen

A Carmelita por ser un excelente ser humano, gracias por ayudarnos en todo el proceso y tramites, gracias por haberme permitido mantener la esperanza de terminar la maestría y Arlette por ayudarme siempre en mis tramites y dudas, gracias por todo.

A la universidad Autónoma de Querétaro por brindarme el apoyo. Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los financiamientos durante el desarrollo de esta investigación.

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I INTRODUCCIÓN.....	1
II ANTECEDENTES.....	3
2.1 Trastorno del espectro autista.....	3
2.1.1 Epidemiología y fisiología.....	3
2.1.2 Trastornos conductuales y neurológicos.....	3
2.1.3 Alteraciones gastrointestinales.....	5
2.1.4 Eje intestino cerebro en TEA.....	6
2.1.5 Alteraciones nutricionales.....	7
2.2 Alimentos, macromoléculas y compuestos bioactivos alimentarios de interés en TEA.....	9
2.2.1 Antioxidantes.....	10
2.2.2 Fibra dietaria.....	10
2.3 Alimentos nutraceuticos y funcionales.....	12
2.3.1 Definición nutraceuticos, clasificación y ejemplos.....	12
2.3.2 Definición alimentos funcionales, clasificación y ejemplos.....	13
2.4 El cacao.....	15
2.4.1 Producción.....	16
2.4.2 Proceso de granos de cacao.....	17
2.4.3 Subproductos de la industria del cacao.....	19

2.4.4 Vaina.....	19
2.4.5 Producción.....	19
2.4.6 Composición química.....	19
2.4.7 Composición nutracéutica.....	20
2.4.8 Cascarilla.....	21
2.5 Prebióticos.....	22
2.5.1 Definición y generalidades.....	22
2.6 Bacterias benéficas.....	24
2.6.1 Lactobacillus.....	24
2.6.2 Bifidobacterias.....	24
2.6.3 Bacterias productoras de Ureasa.....	25
2.7 Efectos benéficos del consumo de prebióticos en TEA.....	26
2.7.1 Métodos para la estimación de efectos fisiológicos de los alimentos.....	27
2.8 Digestión gastrointestinal.....	28
2.8.1 Proceso de digestión gastrointestinal.....	28
2.9 Bioaccesibilidad.....	30
2.10 Fermentación colónica.....	31
2.10.1 Proceso de fermentación colónica.....	31
2.11 Ingrediente a base de subproductos del cacao.....	32
III JUSTIFICACIÓN.....	33
IV OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo General.....	34
4.2 Objetivos específicos.....	34
V METODOLOGÍA.....	35

5.1 Materia Prima	35
5.1.1 Material vegetal	35
5.1.2 Reactivos	36
5.2 Composición química del ingrediente de cacao	37
5.3 Composición nutracéutica	39
5.3.1 Fibra dietaria total (AOAC 991.43).....	39
5.3.2 Fibra dietaria insoluble (AOAC 991.43)	39
5.3.3 Fibra soluble (AOAC 991.43).....	40
5.3.4 Extracción de solvente.....	41
5.3.4 Determinación de fenoles totales.....	41
5.3.5 Flavonoides totales.....	41
5.4 Capacidad antioxidante	42
5.4.1 DPPH.....	42
5.4.2 ABTS	43
5.5 Digestión gastrointestinal in vitro	43
5.5.1 Fase oral.....	44
5.5.2 Fase gástrica	44
5.5.3 Fase intestinal.....	44
5.6 Fermentación colónica in vitro	45
5.7 Análisis por cromatografía de alta resolución (HPLC-DAD)	46
5.8. Actividad enzimática de Ureasa	47
5.9. Manejo de residuos biológicos (RPBI).....	47
5.9 Análisis estadísticos	47
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48

6.1 Composición proximal	48
6.2 composición nutracéutica	54
6.3 Bioaccesibilidad in vitro de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante durante la digestión gastrointestinal	58
6.3.1 Permeabilidad de los compuestos fenólicos y flavonoides de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	64
6.4 Fermentación in vitro de la fracción no digerible en niños autistas y neurotípicos	65
6.5 Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y flavonoides durante la fermentación colónica <i>in vitro</i>	67
6.7 Capacidad antioxidante del ingrediente durante la fermentación colónica in vitro	72
6.7.1 Perfil fenólico durante la fermentación colónica por HPLC	76
6.8 Actividad de la ureasa en las muestras de la fermentación colónica in vitro	78
VII.CONCLUSIONES	84
REFERENCIAS	Error! Bookmark not defined.
Anexo 1	134

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto del árbol de cacao A). Aspecto de la fruta de árbol de cacao. B). C) Aspecto de la fruta de cacao.....	16
Figura 2. Diferentes variedades de granos de cacao: a) Criollo, b) Forastero, c) Trinitario.....	17
Figura 3. Procesamiento de los granos de cacao	18
Figura 4. Funciones de los prebióticos.....	23
Figura 5. Bioaccesibilidad de fenoles durante la fermentación colónica in vitro del ingrediente.	69
Figura 6. Bioaccesibilidad de flavonoides del ingrediente durante la fermentación colónica <i>in vitro</i>	71
Figura 7. Capacidad Antioxidante por ABTS durante la fermentación colónica in vitro.....	74
Figura 8. Capacidad Antioxidante por DPPH durante la fermentación colónica in vitro.....	75
Figura 9. Actividad enzimática de la ureasa en muestras de la fermentación colónica <i>in vitro</i>	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Signos y síntomas del trastorno del espectro autista	4
Tabla 2. Deficiencias y consideraciones de nutrientes en TEA.....	9
Tabla 3. Tipos de nutracéuticos y su clasificación.....	13
Tabla 4. Composición de fitoquímicos, compuestos activos, fuente de alimentos y sus efectos fisiológicos	14
Tabla 5. Composición química y nutracéutica de la vaina y cascarilla de cacao...20	
Tabla 6. Composición química de la cascarilla, vaina e ingrediente de cacao	53

Tabla 7. Composición nutracéutica y capacidad antioxidante de la cascarilla, vaina e ingrediente CV 2:1	54
Tabla 8. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante del ingrediente durante la digestión gastrointestinal in vitro del ingrediente	60
Tabla 9. Perfil fenólico del ingrediente (CV 2:1) y su biaccesibilidad durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal in vitro.....	61
Tabla 10. Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de fenoles y flavonoides del Ingrediente (CV 2:1).....	64
Tabla 11. Efecto de la fermentación colónica in vitro del ingrediente de subproductos de cacao sobre el pH colónico en muestras de niños con TEA y NTO	65
Tabla 12. Perfil fenólico durante la fermentación colónica in vitro de la fracción no digerible del ingrediente de subproductos de cacao incubado con muestras colónicas de niños con TEA.....	78

RESUMEN

Los trastornos del espectro autista (TEA) son un grupo heterogéneo de padecimientos del neurodesarrollo que afectan la interacción social de quien los sufre. Los niños con TEA manifiestan más síntomas gastrointestinales debido a una desregulación de la microbiota intestinal (MI); el consumo regular de alimentos ricos en fibra dietética y antioxidantes (e.g. polifenoles) ayuda a normalizar la MI. Los subproductos agroindustriales del cacao como la vaina y la cáscara, son considerados fuentes de fibra dietética y antioxidantes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las características químicas (perfil bromatológico c/fibra dietaria), perfil antioxidante (compuestos fenólicos, CF), digestibilidad [bioaccesibilidad (BIA) y absorción aparente (*Paap*) *in vitro* de compuestos fenólicos] y efecto funcional-nutraceutico [fermentación *ex vivo* con inóculo fecal de niños con TEA y neurotípicos (NTO)] de un ingrediente (ING) a base de vaina fermentada (VF) y cascarilla (CA) de cacao. Como resultados se encontró que el ING es rica en carbohidratos (~67% w/w), fibra dietética (~47% w/w), CF (~2.4 mgEAG.g⁻¹) y flavonoides (4.5 gE rutina. g⁻¹) totales y capacidad antioxidante [DPPH (3.3 g), ABTS (5.7g) equivalentes de Trolox.g⁻¹]. Los CF y flavonoides de ING mostraron alta BIA y una parte importante de estos (particularmente catequina y epicatequina podría llegar intacta a colon) para al ser liberados en un 30% adicional, también se encontró que independientemente del inóculo fecal usado (TEA, NTO), estos inóculos difirieron en su actividad de ureasa (144% vs. 58%). El ING podría ser útil para la formulación de alimentos sólidos para personas con TEA, debido a que sus bioactivos antioxidantes podrían ser potencialmente beneficios para la salud colónica.

Palabras claves: subproductos del cacao, trastorno del espectro autista, digestión gastrointestinal *in vitro*, fermentación colónica, microbiota intestinal.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex heterogeneous group of disorders. Autism spectrum disorders (ASD) are a heterogeneous group of neurodevelopmental conditions that affect the social interaction of those who suffer from them. Children with ASD manifest more gastrointestinal symptoms due to a dysregulation of the intestinal microbiota (IM); Regular consumption of foods rich in dietary fiber and antioxidants (e.g. polyphenols) helps to normalize IM. The agro-industrial byproducts of cocoa, such as the pod and shell, are considered sources of dietary fiber and antioxidants. The objective of the present work was to evaluate the chemical characteristics (bromatological profile w/dietary fiber), antioxidant profile (phenolic compounds, CF), digestibility [bioaccessibility (BIA) and apparent absorption (*Paap*) *in vitro* of phenolic compounds for their nutraceutical function using a model [*ex vivo* fermentation with fecal inoculum from children with ASD and neurotypicals (NTO)] of one ingredient (ING) based on fermented pod (VF) and cocoa husk (CA). As results, it was found that ING is rich in carbohydrates (~67% w/w), dietary fiber (~47% w/w), CF (~2.4 mgEAG.g⁻¹) and flavonoids (4.5 gE rutin. g⁻¹) total and antioxidant capacity [DPPH (3.3 g), ABTS (5.7g) Trolox equivalents.g⁻¹]. The CF and flavonoids of ING showed high BIA and an important part of these (particularly catechin and epicatechin could reach the colon intact) to be released by an additional 30%, it was also found that regardless of the fecal inoculum used (TEA, NTO) , these inocula differed in their urease activity (144% vs. 58%). ING could be useful for the formulation of solid foods for people with ASD, because its antioxidant bioactives could potentially be beneficial for colonic health.

Keywords: cocoa by-products, autism spectrum disorder, *in vitro* gastrointestinal digestion, colonic fermentation, intestinal microbiota.

I INTRODUCCIÓN

El trastorno del espectro autista (TEA) son un conjunto de problemas del neurodesarrollo, caracterizados por problemas de comunicación verbal e interacción social. Esto conlleva a que puedan tener diferentes formas de aprender, moverse o prestar atención, aunque es importante mencionar que no todas las personas con estos síntomas padecen TEA (CDC, 2022). Se desconocen aún las causas de los TEA, pero se sabe que diversos determinantes genéticos, dificultades en el desarrollo del tubo neuronal durante el embarazo, deficiencias nutricionales, así como disfunciones del sistema inmune y alergias, están relacionados con su desarrollo. Cabe señalar que, un alto porcentaje de personas con TEA presentan síntomas disfuncionales gastrointestinal (GI) particularmente hábitos intestinales alterados y dolor abdominal crónico (Leader *et al.* 2022).

Estudios recientes han demostrado cambios en la microbiota colónica de niños con TEA. Se cree que los síntomas GI pueden ser una manifestación de procesos inflamatorios y que el microbioma (microbiota + sus productos metabólicos) juegan un papel crucial en el eje intestino-cerebro (Fattorusso *et al.*, 2019). Las intervenciones primarias psicológicas para niños en edad preescolar con TEA se centran en terapias de desarrollo y conductuales y cuando estos pacientes presentan problemas gastrointestinales (GI) se recomienda el consumo de suplementos vitamínicos/minerales así como de incluir ácidos grasos esenciales, enzimas digestivas y una dieta sin gluten, caseína y soya (Adams *et al.* 2018; Lord *et al.* 2020). De igual modo, estudios recientes se han enfocado en evaluar el efecto de consumir prebióticos como la fibra y los galacto-oligosacaridos, los cuales sugieren que éstos tienen un efecto en regular la microbiota y los síntomas GI, pero no existe evidencia para tales enfoques dietarios, especialmente para el uso de prebióticos (Grimaldi *et al.* 2017; Ng *et al.* 2019).

El cacao y sus derivados son productos de gran importancia debido a sus propiedades benéficas a la salud, ya que diversos estudios han demostrado que su consumo se relaciona con la reducción de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, problemas neurológicos e incluso disminuir los síntomas de depresión y ansiedad (Kontogianni et al., 2020). Los compuestos relacionados con estos beneficios son polifenoles los cuales tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias; en relación a estos los compuestos como los flavonoles, también se les atribuye tener un efecto a nivel neuronal al regular síntesis de lípidos, en especial del colesterol y las lipoproteínas que juegan un papel importante la protección del cerebro al formar parte de las mielinas (las cuales son encargadas de impulsos eléctricos y transmisión de información entre neuronas) también incrementan la neurogénesis y el crecimiento de la conexión sináptica y la viabilidad neuronal (Mahley 2016; García-Cordero et al., 2021).

Los subproductos del cacao contienen cantidades importantes de fibra, polifenoles y antioxidantes; esto los hace una buena opción como ingrediente para la formulación o adición a algún alimento nutraceútico que pueda tener efectos en la salud (Soares & Oliveira, 2022). Por una parte, los ensayos clínicos en población con autismo están limitados por el costo, el tiempo, los efectos del placebo, por lo que el empleo de modelos *in vitro* resulta de gran interés. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la bioaccesibilidad los compuestos bioactivos del ingrediente (fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante) por medio de una digestión gastrointestinal *in vitro* y utilizando la fermentación *in vitro* en muestras fecales de niños autistas y neurotípicos, así como de ensayo del porcentaje de actividad de ureasa en cada tiempo de incubación.

II ANTECEDENTES

2.1 Trastorno del espectro autista

Los trastornos del espectro autista (TEA) se definen como un grupo de padecimientos neurológicos caracterizados por ciertos comportamientos aberrantes tales como la disminución en la interacción social, deficiencia en el lenguaje verbal y no verbal, y la repetitividad comportamientos (Alcalá et al., 2022).. Las causas son predominantemente hereditarias, pero también existen factores externos ambientales, hábitos de vida de la madre que conllevan alteraciones neuroquímicas, neuroanatómicas y del neurodesarrollo, entre otras (Torres et al., 2018).

Las destrezas de aprendizaje, pensamiento y resolución de problemas de las personas con TEA pueden variar; hay personas con altos niveles de capacidad (dotadas) y personas que presentan dificultades. Actualmente, el diagnóstico de TEA incluye afecciones que solían diagnosticarse por separado; el trastorno del espectro autista, el trastorno generalizado del desarrollo (no especificado de otra manera) y el síndrome de Asperger (Crowell et al., 2019).

2.1.1 Epidemiología y fisiología

Se estima que 1% de todos los niños a nivel mundial son diagnosticados con TEA ; estas estimaciones han ido aumentando con el tiempo y varían dentro y entre los grupos sociodemográficos (Zeidan *et al.* 2022). Hace pocos años, en el perfil epidemiológico de Salud Mental en México, se estima que alrededor del 60.5 de la población pueda desarrollar TEA por factores genéticos y cada año se atienden hasta 305 casos en hospitales (Secretaría de salud, 2021). El estudio realizado en Guanajuato, México en el 2016, indicaron que 1 de cada 115 niños de 8 años presentan esta condición (Fombonne et al., 2016).

2.1.2 Trastornos conductuales y neurológicos

Los primeros signos y síntomas de TEA aparecen entre los dos o tres años de edad de años de edad. Sin embargo, en algunos casos el desarrollo puede incluso llegar a manifestarse antes, pero se pueden diagnosticar a la temprana de edad de 18 meses. Los signos más comunes que se pueden detectar en los niños

con TEA son el no responder cuando se le llama, no mirar a los objetos ni eventos que estén señalando a los padres, no mantiene contacto visual o establece muy poco contacto visual (**Tabla 1**) (CDC, 2022). Es importante saber que cada niño con es único y puede presentar alguno o varios signos. Los estudios enfocados en el campo de neurobiología (rama encargada de estudiar los cambios anatómicos y fisiológicos del sistema nervioso central), señalan que el problema comienza en el desarrollo neural. Este campo se puede dividir en cuatro perspectivas principales; 1) la perspectiva neuroanatómica, 2) la perspectiva neuro-social, 3) la perspectiva genética y 4) la perspectiva neuroquímica (Sanz-Cortes et al.,2014).

Tabla 1. Signos y síntomas del trastorno del espectro autista

Habilidades de interacción y comunicación social	Comportamientos o conductas repetitivas	Otras características
A la edad de 9 meses no muestra expresiones faciales (felicidad, tristeza, enojo).	Molestia y enojo cuando un orden es cambiado (juguetes, objetos).	Atraso en las habilidades de lenguaje.
No responde a su nombre a los 9 meses de edad.	Repetición de palabras (llamado ecolalia).	Atraso en habilidades de movimiento.
Evita contacto visual.	Mantener un comportamiento igual (jugar con los juguetes de la misma manera siempre).	Atraso en aprender o tener una habilidad.
Utiliza poco o ningún gesto a los 12 meses de edad.	irritación o enojo por cambios pequeños.	Hiperactividad, impulsividad.
A la edad de 18 meses no señala algún interés.	Tiene intereses obsesivos.	Problemas para dormir.
A los 60 meses de edad no canta, baila o actúa.	Tiene reacciones inusuales a como las cosas suena, huelen, saben, ven o se sienten.	Problemas gastrointestinales (constipación).

Adaptado: CDC, (2022)

2.1.3 Alteraciones gastrointestinales

Las alteraciones gastrointestinales (GI) son diferentes en niños diagnosticados con TEA en comparación a niños neurotípicos (NTO). Se ha documentado que los niños con TEA tienen cuatro veces más probabilidades de desarrollar problemas gastrointestinales que los NTO y, además, que el estreñimiento, la diarrea y el dolor abdominal son los más comunes (McElhanon et al., 2014). La dieta tiene un papel importante en la sintomatología de los niños con TEA. Se ha reportado que dietas bajas en gluten o caseína pueden mejorar los síntomas GI (Perrin *et al.* 2012); aunque estas recomendaciones y restricciones deben ser acompañadas de un nutricionista para llevar una balanceada alimentación (Bandini et al., 2010).

Se ha reportado que un gran porcentaje de niños con TEA presentan una disbiosis en la microbiota intestinal respecto a niños neurotípicos, esto debido a que el microbioma forma parte integral de la fisiología del humano como puede ser funciones relacionadas al sistema inmune (Murtaza et al., 2017). Estas alteraciones están relacionadas a una disminución de grupos de bacterias como en la relación *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, las cuales son las más abundantes en el intestino por su parte, *Bacteroidetes* (Gram +) desempeña un papel importante en el control de colonización de bacterias patógenas, en cuanto a *Firmicutes* (Gram -) se ha visto que esta población se encuentra elevada en personas con riesgo de obesidad, hipertensión y problemas cardiovasculares (Durk et al., 2019).

Se ha encontrado también una baja cantidad en los géneros de *Lactobacillus* (probióticos que promueven la salud intestinal) y *Desulfovibrio* la cual es una bacteria reductora de sulfato y está asociada a provocar inflamación intestinal, lo que se correlaciona con la gravedad de síntomas GI del TEA (Tomova *et al.*, 2015). La gravedad del TEA aumenta debido a una reducción de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como son el ácido acético, el ácido propiónico y

el ácido butírico, los cuales son modulados por la microbiota intestinal (Adams *et al.* 2011).

Los géneros bacterianos importantes para la degradación y fermentación de carbohidratos, incluidos *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Coprococcus* y *Veilonellaceae*, se encuentran reducidos en pacientes con TEA (Kang *et al.* 2013). Otros géneros de bacterias tales como los *Bacteroidetes* se han encontrado con un alto porcentaje en muestras de pacientes con TEA, estas bacterias son productores de AGCC, principalmente ácido propiónico el cual se ha reportado que puede impactar en el sistema nervioso central y el comportamiento del autismo a través de la modulación del eje-intestino-cerebro (Sabit *et al.* 2021).

En el estudio de Liu *et al.*, (2019) encontraron niveles bajos de ácido acético y un nivel más alto de ácido valérico en muestras fecales de personas con TEA Cabe resaltar que el único desorden gastrointestinal fue el de estreñimiento, los resultados en las muestras encontradas fueron bacterias como *Fusobacterium*, *Barnesiella*, *Coprobacter* lo cual puede contribuir a la disminución de ácido butírico, el cual ejerce efectos nutricionales y antiinflamatorios en el epitelio intestinal (Manrique Vergara & González Sánchez, 2017). Es por este motivo que la microbiota intestinal contribuye a la producción de ácidos grasos de cadena corta que forman parte de las alteraciones GI en TEA, por lo tanto, la regulación de la microbiota intestinal, especialmente de las bacterias productoras de ácido butírico, podrían ser una estrategia en la búsqueda de alternativas para el tratamiento del trastorno del espectro autista.

2.1.4 Eje intestino cerebro en TEA

La microbiota intestinal interactúa directamente con el sistema nervioso entérico (SNE); este tiene una autonomía considerable en comparación a otras partes del sistema nervioso (SNC) como el sistema nervioso simpático y parasimpático. Todos los componentes del SNC llevan a cabo una interacción funcional con los sistemas endocrino e inmunológico a través de la participación

de citocinas, neuropéptidos y otras moléculas de señalización (Ding et al., 2017). Otro mecanismo por el cual el cerebro interactúa con el intestino es por medio de señales bidireccionales a través del nervio vago. Los compuestos como la serotonina y el ácido γ -aminobutírico tienen efectos directos sobre la liberación de péptidos intestinales con funciones moduladoras de células entero-endocrinas (Borre *et al.* 2014).

Se ha mostrado que el microbioma intestinal está involucrado en la modulación de las funciones GI, así como en la capacidad de afectar la permeabilidad intestinal, la función inmune de la mucosa, motilidad y sensibilidad intestinal. Todos estos factores pueden contribuir a la disfunción cerebral y a la neuro-inflamación, según la vulnerabilidad genética de cada paciente (Wasilewska & Klukowski, 2015). (Ferguson et al., 2017) estudiaron la relación de los síntomas GI en niños con TEA y las respuestas inmunes de estrés y citoquinas. El estudio mostró que los niños con TEA tienen mayores síntomas GI relacionados con niveles más altos de cortisol después del estrés a diferencia de los niños NTO. Otras investigaciones han reportado la relación de problemas GI con problemas de sueño, ansiedad y estrés, posiblemente involucrando el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal y los circuitos basados en la amígdala (Smith & Vale, 2006).

Afortunadamente, existe mucha evidencia que muestra que la ingesta de probióticos, prebióticos, simbióticos, así como cambios en la dieta (e.g. restricción de alimentos y uso de suplementos) que pueden normalizar o mejorar las alteraciones asociadas a estos desordenes fisiológicos (Y. Chen et al., 2021; Chudzik et al., 2021; X. Liu et al., 2015; Peterson, 2020; Yan et al., 2020).

2.1.5 Alteraciones nutricionales

Una buena nutrición y un aporte adecuado de nutrientes a partir de la dieta pueden resultar en efectos benéficos para un desarrollo saludable, especialmente en las primeras etapas de vida. En el caso de TEA, se ha reportado que se presentan deficiencias importantes de nutrientes como son los minerales entre

ellos a destacar como el zinc, hierro, calcio, selenio, yodo, magnesio y cromo, por lo tanto, se recomienda evaluar cada caso para llevar una adecuada alimentación y suplementación (Cekici & Sanlier, 2019). También se ha encontrado en algunos estudios que los niños con TEA, presentan anemia debido a niveles bajos de hemoglobina y hematocritos, así como niveles bajos de vitamina D (Alkaissi & Ghawadra, 2015; Bener et al., 2017). Estas alteraciones nutricionales están relacionadas al comportamiento repetitivo dentro de TEA, lo que conlleva a dietas restrictivas y repetitivas, presencia de comorbilidades, consideraciones de alimentación por parte de los padres las cuales pueden tener un impacto en la calidad y desarrollo del niño (Al-Kindi et al., 2020). Las preferencias de los niños con TEA, ha mostrado tener un impacto en su nutrición, ya que diversos estudios han mostrado en ser muy selectivos con los alimentos o de probar diferentes, por ejemplo, se ha visto una menor preferencia en alimentos como vegetales, pescado, aceite de oliva, así como de frijoles y legumbres (Alareefy et al., 2018).

Se ha visto también que la dieta de los niños con TEA, predomina la ingesta de cereales, pasta, y productos lácteos, en comparación con niños neurotípicos, siendo menos preferencial grupos de alimentos como carne, huevos, y bebidas en general (Plaza-Díaz et al., 2021). Es importante considerar que estas alteraciones también pueden contribuir en aumentar la predisposición de sobrepeso y obesidad durante el crecimiento y desarrollo de niños con TEA (Marí-Bauset et al., 2015).

2.1.5.1 Consideraciones dietarias

Diversos determinantes del estilo de vida de la madre, se han asociado a más casos de niños con TEA. Por ejemplo, los hábitos alimentarios de la madre como el tabaquismo, y consumo de alcohol han demostrado tener efecto negativo en el neurodesarrollo, mientras que una ingesta adecuada de ciertos nutrientes y suplementos durante el embarazo pueden reducir el riesgo de TEA (Lyll et al., 2014). La práctica y duración de la lactancia materna tienen un efecto protector para el desarrollo de TEA (Manohar et al., 2018). Por ello, es importante

mencionar que las deficiencias nutricionales pueden darse si la madre durante el embarazo no lleva una suplementación adecuada de vitaminas importante como la A, D, folato, B12, magnesio, omega- 3 y hierro. Durante el crecimiento y desarrollo estos déficits de nutrición en TEA pueden ser más común, debido a que los niños son muy selectivos al decidir qué comer y prefieren solamente algunos grupos como se mencionó anteriormente, causando así poca variación en su alimentación y por lo tanto de nutrientes (Nogay & Nahikian-Nelms, 2019). La **tabla 2** muestra las consideraciones dietarias junto a las causas de deficiencias.

Tabla 2. Deficiencias y consideraciones de nutrientes en TEA

Nutriente	Consideraciones dietéticas
Vitamina B12	Se ha reportado bajos niveles de metionina, homocisteína y cisteína. Una suplementación con vitamina B12 puede mejorar la capacidad de metilación y mejorar condiciones clínicas en niños con TEA.
Vitamina D	La vitamina D es un agente liposoluble que forma parte de la proliferación y diferenciación de células, participa en la señalización de calcio y actúa como neuro protector. También participa en mecanismo antiinflamatorio en el cerebro y regulación de serotonina.
Omega-3*	Los ácidos grasos en especial los de cadena larga como los omega-3 también tener un papel importante en el desarrollo neuronal e inflamación que pudieran estar relacionado con TEA.
Folato	Participa también en el metabolismo de la homocisteína y glutatión. Naturalmente se encuentra en alimentos como legumbres, espárragos. Una suplementación mejora la comunicación verbal en pacientes con TEA.

Adaptado de: Cekici & Sanlier (2019). * Ácidos grasos

2.2 Alimentos, macromoléculas y compuestos bioactivos alimentarios de interés en TEA

2.2.1 Antioxidantes

Los compuestos antioxidantes desempeñan un papel importante en la prevención del desarrollo de diferentes enfermedades, como desarrollo de cáncer o enfermedades inflamatorias. El estrés oxidativo en TEA ha sido estudiado a nivel de membrana celular y por medio de la cuantificación de productos de peroxidación lipídica (como glutatión) y antioxidantes involucrados en el sistema de defensa contra especies reactivas de oxígeno (ROS), sugiriendo que este incide en el desarrollo y cronicidad del TEA (Manivasagam et al., 2020).

En general, el estrés oxidativo es parte de la patogénesis de TEA. Esto puede deberse al resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales, en la condición de TEA se tiene alta cantidad de radicales libres, por lo que es importante una dieta rica en antioxidantes (Liu et al., 2022). Los antioxidantes de la dieta incluyen Vitamina E, Vitamina C, Betacaroteno, Licopeno, Selenio, Omega-3, Omega-6 y flavonoides. Los polifenoles también forman parte de antioxidantes fitoquímicos ya que estos se encuentran en frutas y vegetales (Pangrazzi et al., 2020).

El cacao es considerado una fuente alta e importante en antioxidantes, en el caso de TEA, se realizó un estudio piloto donde participaron 12 niños de alrededor de 10 años diagnosticado con TEA, los cuales consumieron por 4 semanas chocolate negro (70 % de cacao y 30 % de azúcar orgánica de caña), los resultados al final del estudio fueron mostrados con la Escala de Calificación del Espectro del autismo en Comunicación, que de acuerdo a este criterio los niños mejoraron los comportamientos irregulares así como mejora de comunicación y socialización (Sadek et al., 2018).

2.2.2 Fibra dietaria

La fibra dietaria es un carbohidrato no digerible y complejo que no puede ser digerido por las enzimas del intestino delgado pero si puede llegar al colón y ser

metabolizado por los microorganismos (Intakes, 2001). Se encuentran dentro de los alimentos como granos, cereales integrales, frutas y vegetales. Su consumo se relaciona a efectos benéficos a la salud, en especial para el intestino grueso (Akbar & Shreenath, 2023). La composición de la fibra se divide dependiendo de su solubilidad en el agua, siendo soluble e insoluble y la cantidad varía dependiendo de la fuente del alimento. La fibra soluble consiste en una variedad de oligosacáridos como las pectinas, β -glucanos, y gomas solubles en agua. La fibra insoluble incluye a la celulosa, hemicelulosa insoluble en agua y lignina que se encuentran mayormente en la pared celular de plantas (Prasadi & Joye, 2020).

La fibra soluble es utilizada por la microbiota colónica mejorando así síntomas gastrointestinales como constipación y diarrea. Lo anterior debido a que la fibra soluble retiene agua, produciendo un aumento de la masa fecal, lo cual ayuda a acelerar el tránsito intestinal y protege a la mucosa de otros patógenos (McRorie & McKeown, 2017). Algunas bacterias como *Firmicutes* y *Bacteroidetes* pueden degradar la fibra soluble en colon, debido a que las enzimas digestivas no pueden metabolizarlas en el intestino delgado, aunque si pueden parcialmente digerirla a oligosacáridos o monosacáridos por medio de un sistema de degradación y metabolismo propio de las bacterias (Sabater et al., 2021).

La fibra es metabolizada por ciertos grupos de bacterias. Una mayor ingesta de fibra se ha relacionado a la formación de ácidos grasos de cadena corta producidos por microorganismos, disminuyen el pH intestinal y protege contra bacterias como *Enterobacteriaceae spp.* y *Escherichia coli* (Power et al., 2014). Se ha visto que la suplementación de fibra dietaria durante dos semanas pueden aumentar hasta un 20 % la diversidad de la microbiota (Johnson et al., 2021).

Al incrementar la ingesta de fibra dietaria aumentamos la producción de bacterias que producen AGCC, siendo estos importantes porque tienen un impacto en el sistema nervioso central; estos ácidos son considerados neuroactivos que llevan a una alteración relacionada al sistema inmune, regulación de expresión de genes (Taniya et al., 2022).

Se ha encontrado que otros tipos de fibras como la inulina que se encuentra en una gran variedad de vegetales, frutas y granos pueden tener un efecto en la modulación de la microbiota; además se ha visto que su ingesta se relaciona con más presencia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Shanmugam et al., 2022). Dado lo anterior es posible recomendar la suplementación con fibra a niños con TEA, como una estrategia de modificar la microbiota.

2.3 Alimentos nutraceuticos y funcionales

2.3.1 Definición nutraceuticos, clasificación y ejemplos

Los alimentos nutraceuticos son aquellos alimentos que contienen componentes que tienen un beneficio a la salud, que además previenen diferentes enfermedades (Cotabarrén y Palla 2022). Los nutraceuticos se clasifican por su aplicación en tradicionales, fortificados, fitoquímicos, herbales, funcionales, suplementos dietarios, probióticos y prebióticos (Ruchi et al., 2017). Los nutraceuticos tradicionales son aquellos alimentos naturales que tienen un efecto en la salud, como mejorar el sistema inmune, disminuir el riesgo de enfermedades del corazón y algunos tipos de cáncer. Los tipos de nutraceuticos y sus efectos son resumidos en la **Tabla 3**. En cuanto a relación TEA, en un estudio de revisión Adams et al., (2021) recopilaron la información de ensayos clínicos para conocer la eficacia de las propiedades nutraceuticas de varios alimentos en niños con TEA los resultados mostraron mejoría en cuanto a los síntomas gastrointestinales así como en los comportamientos y problemas de memoria.

Tabla 3. Tipos de nutraceuticos y su clasificación

Clase/tipo de nutraceutico	Ejemplo	Ingrediente Activo	Ventajas
Alimento	Tomate	Licopeno	Actividad anticancerigena
	Salmón	Omega 3	Disminución de riesgo cardiovascular y diabetes
	Soya	Saponinas	Antioxidante, detoxificación, enzimas, respuesta inmune,
	Leche fermentada	<i>L. acidophilus, bifidobacterium spp.</i>	Previene infecciones gastrointestinales, reduce los niveles de colesterol.
Suplementos dietarios	Cúrcuma	Curcumina	Previene defectos en los tubos neuronales, y formación de células rojas
	Vitamina A		Antioxidante, crecimiento, utilizado para tratar enfermedades de la piel.
	Calcio		Hueso, musculo, dientes, salud del nervio, previene osteoporosis.
	Hierro		Llevar oxígeno, producir energía.
Probióticos	Vitamina D		Salud en hueso y dientes, ayuda en la absorción del calcio y en la salud musculoesquelético.
	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium spp.</i>		Salud en el intestino, anticáncer.
Prebióticos	Fructo-oligosacaridos		Promueve el crecimiento de probióticos y de bifidobacteria.
	Inulina		Mejora el sistema inmune, absorción de minerales

Adaptado de: Alali *et al.*, (2021)

2.3.2 Definición alimentos funcionales, clasificación y ejemplos

La actual definición de alimento funcional fue desarrollada por el centro de alimentos funcionales (FFC) en el 2012, en una conferencia en Santa Bárbara California, siendo la siguientes: “Alimentos naturales o procesados que contienen

compuestos biológicamente activos conocidos o desconocidos que, en cantidades definidas, efectivas y no tóxicas, brindan un beneficio para la salud clínicamente probado y documentado para la prevención, el manejo o el tratamiento de enfermedades crónicas” (Gur et al., 2018).

Esta definición recalca la importancia de los compuestos bioactivos, que representan lo efectivo o funcional del alimento. Por ejemplo, el resveratrol en uvas, las zarzamosas ricas en antocianinas, los flavonoides que son una fuente importante de antioxidantes, las nueces ricas en minerales y ácidos grasos como omega-3, en conjunto, todos estos alimentos tienen un impacto importante en la salud (Ali et al., 2022).

Recientemente algunos estudios se han enfocado en evaluar compuestos bioactivos sobre el TEA, debido a sus componentes antiinflamatorios, que pueden reducir el estrés oxidativo y comorbilidades asociadas a este síndrome. La **Tabla 4** muestra algunos flavonoides y sus características. Los flavonoides son fitonutrientes polifenólicos a los cuales se les ha estudiado su efecto antiinflamatorio y propiedades antioxidantes; estos se encuentran en zarzamosas, moras, ajo, arándanos, cebollas, té verde y cacao (Spagnuolo et al., 2018).

Tabla 4. Composición de fitoquímicos, compuestos activos, fuente de alimentos y sus efectos fisiológicos

Fitoquímicos	Compuesto activo	Fuente de alimento	Efecto fisiológico
Antocianinas	Malvidina	Zarzamosa, uvas negras, granadas	Actividad antiinflamatoria

Flavonoles	Hesperetina, naringenina	Frutas cítricas (limones, naranjas) uvas	Antioxidante, antiinflamatorio
Flavavonones	Apigenina, luteolina	Apio, perejil, fresco, aceitunas, orégano, pimientos y romero	Supresión del estrés oxidativo a través de efectos en NF- kB; ofrece apoyo cerebral, protección y aumentos en la memoria
Flavanoles	Epicatequina, catequinas, procianidinas	Té, uvas, lentejas, cacao, duraznos, manzanas cherries, moras, fresas y zarzamoras	Propiedades antioxidantes, captadores de radicales libres.
Isoflavones	Diadzeina	Semilla de uva, productos de soya	Actividades antioxidantes y neuro protectoras.

Adaptado de: Spagnuolo *et al.*, (2018).

2.4 El cacao

El cacao (*Theobroma cacao L.*), es materia prima del chocolate, pertenece a la clase de *Magnoliopsida*, orden Malvales, género *Theobroma* y especie *Cacao* (Kongor *et al.* 2016). El cacao se encuentra en su estado salvaje desde Perú hasta México; algunos botanistas reconocen y creen que el cacao que proviene del río amazónico y este se ha expandido en dos largos grupos: Criollo y Forastero (de Souza *et al.* 2018). En la **Figura 1** se puede observar de derecha a izquierda la planta, fruto en árbol y fruto del cacao.

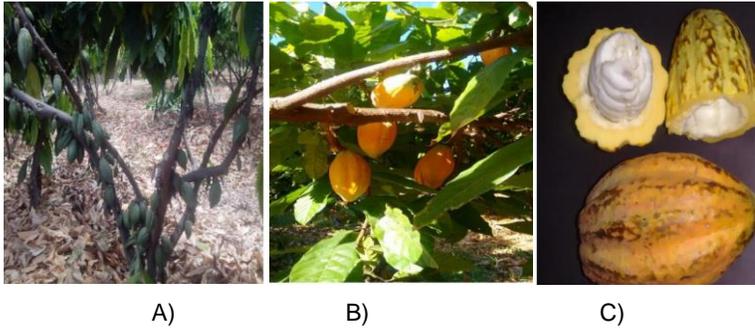


Figura 1. Aspecto del árbol de cacao A). Aspecto de la fruta de árbol de cacao. B). C) Aspecto de la fruta de cacao Adaptado :de Souza *et al.*, (2018).

2.4.1 Producción

La producción mundial de granos de cacao ha llegado a superar los 4 billones de toneladas, en 2022 la mayoría de producción se localiza en el este de África (70%); los siguientes países que le preceden son Brasil, Camerún, República Dominicana, Ecuador, México, Nigeria y Perú (Anón. 2022). El principal producto del procesamiento de la semilla de cacao es el chocolate, pero también utilizado como materia prima para otros productos para elaborar o incorporarse en alimentos.

El aroma y sabor de *Theobroma cacao* es único y no existe otro compuesto o alimento que pueda parecer tener esta característica (Sousa *et al.* 2016). Las variedades de las especies que son más utilizadas comercialmente para realizar chocolate son el Forastero, Criollo y Trinitario, los cuales se distinguen por sus características morfológicas, sabor y zona geográfica (Wahyuni *et al.* 2021). Por una parte, Forastero y Trinitario son considerados de menos calidad, pero suelen crecer más ampliamente a nivel mundial. En cuanto a Criollo, este ha sido considerado como uno de los mejores debido al sabor dulce que tiene en sus

semillas, siendo menos amargo y más aromático que las otras dos variedades **(Figura 2)** (Tezara *et al.* 2016).

La variedad de trinitario es una forma híbrida entre Criollo y Forastero, utilizando de 10 a 15 % en la producción industrial de chocolate. El estado de Tabasco es uno de los principales productores de cacao, en especial de la variedad criollo, constituyendo alrededor del 5% de la producción mundial aparte de ser más costoso debido a su calidad (Agropecuarios, 2018). Mientras tanto Forastero, el cual está clasificado como regular, es el menos costoso, por lo que su uso es alrededor del 80% en industrias donde se producen grandes cantidades de chocolate (Josué *et al.* 2016).

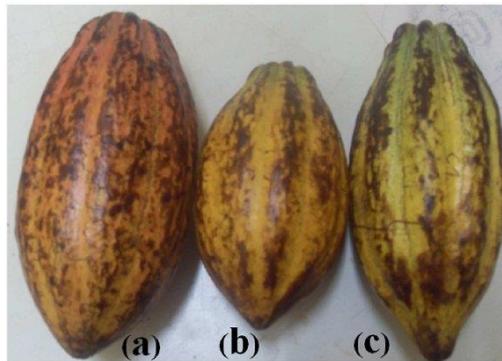


Figura 2. Diferentes variedades de granos de cacao: a) Criollo, b) Forastero, c) Trinitario

Adaptado: Josué *et al.*, (2016).

2.4.2 Proceso de granos de cacao

El procesamiento de los granos de cacao es complejo y altera tanto las funciones químicas como físicas al poder obtener el sabor y textura de la semilla. Los primeros procesos incluyen la fermentación y secado; el proceso secundario incluye convertir los granos del cacao en productos terminados a través de un

proceso de tostado, alcalización y conchado (Figura 3) (Aprotosoie, Luca, y Miron 2016).

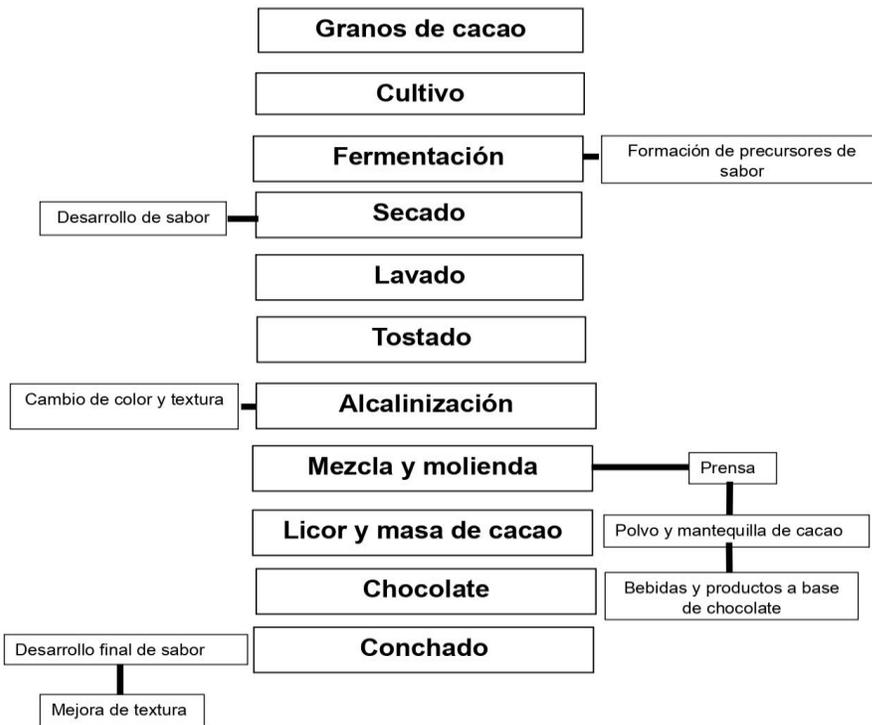


Figura 3.Procesamiento de los granos de cacao

Adaptado: Aprotosoie *et al.*, (2016)

2.4.3 Subproductos de la industria del cacao

2.4.4 Vaina

La vaina de cacao es considerado el mayor residuo de la producción de los granos de cacao, debido a que solo se obtiene un 33% de grano de buena calidad mientras que el 70% es desperdiciado del proceso (Oddoye et al., 2013). La vaina de cacao se considera como recurso subexplotado alimentariamente debido a su contenido alto en fibra dietética, lignina y antioxidantes bioactivos como son los polifenoles. Su recuperación y bioconversión a productos de valor agregados para la elaboración de alimentos pueden tener un gran enfoque en la sostenibilidad y producción de cacao (Yapo et al., 2013).

2.4.5 Producción

Se deriva del procesamiento de cacao y por cada kilogramo de cacao en grano obtenido, se generan hasta más de 10 veces de este producto y anualmente se produce 11 millones de toneladas alrededor del mundo (Okiyama et al., 2017).

2.4.6 Composición química

La vaina de cacao comprende el epicarpio, el mesocarpio, la parte esclerótica y el endocarpio. En cuanto a su composición química, esta puede variar dependiendo de los métodos de extracción, procedencia y métodos. La **Tabla 5** muestra la composición química de la vaina de cacao. Consiste principalmente de materiales fibrosos, que incluye la fibra dietética, que se divide en soluble (FDS) que incluye pectina, β -glucano y oligosacáridos y algo de hemicelulosa; fibra insoluble (FDI), que incluye 19.7-26.1% celulosa, 8.7-12.8%

hemicelulosa, 14-28% lignina y 6.0-12.6 % de pectina. El epicarpio está compuesto principalmente de lignina, mientras que el mesocarpio contiene principalmente (~50%) celulosa y el endocarpio es rico en sustancias pécticas (Lu et al., 2018; Sobamiwa & Longe, 1994).

2.4.7 Composición nutracéutica

Otros componentes importantes son los compuestos fenólicos, ya que estos varían entre 2.1 a 57 mg/g equivalente a ácido gálico, pero estos pueden variar dependiendo de la región, origen, variedad, genotipo de la planta, tiempo de cosecha, el estrés en el árbol de cacao, así como el solvente para la extracción (Soares & Oliveira, 2022).

Tabla 5. Composición química y nutracéutica de la vaina y cascarilla de cacao

Componentes (g/100g)	Vaina	Cascarilla
Humedad	1.08-14.1	1.9-13.3
Cenizas	7.30-13.0	5.9-11.42
Proteína	4.85-9.1	10.30-27.40
Lípidos	0.77-4-7	1.50-15.1
Carbohidratos totales (de los cuales):	17.50-49.7	7.85-70.25
Fibra total	18.59-37.4	39.25-66.33
Fibra dietaria soluble	27	7.03-16.91
Fibra dietaria insoluble	9.6	28.34-50.42
Pectina	12.6	7.62-15.59
Contenido total fenólico (g ácido gálico/100 g)	4.6	3.12-94.95

Adaptado: (Vriesmann et al.,2011; Campos-Vega et al., 2018; Rojo-Poveda et al.,2020; Delgado-Ospina, et al., 2021; Rebollo-Hernanz et al.,2021)

Formatted: Normal

2.4.8 Cascarilla

2.4.8.1 Producción

La cascarilla de cacao es el principal subproducto que se forma en el proceso de tostado. La cascarilla representa alrededor del 12- 20% de la semilla del cacao, estos se encuentran recubriendo exteriormente el grano. Se estima que la producción de este subproducto se encuentra alrededor de 900 mil toneladas; por lo cual es utilizado por algunas industrias como un producto en el mercado (Grillo *et al.* 2019).

2.4.8.2 Composición química

La composición de la cascarilla del cacao puede variar por su origen y su procesamiento. En relación con el contenido de proteínas (mayoritarios) sus contenidos alrededor de un 15 g/100 a comparación de la vaina y el mucilago. Los carbohidratos son el principal componente, en el mucilago es la parte donde más se concentra estos, la **Tabla 5** muestra la composición química de la cascarilla (Campos-Vega *et al.*, 2020).

2.4.8.3 Composición nutracéutica y antioxidante

Respecto a su composición nutracéutica y antioxidante de la cascarilla de cacao contiene varios compuestos bioactivos como fibra dietética, polifenoles (quercetina, quercetina-3-O-glucósido, catequina y epicatequina), metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) y ácidos grasos como ácido oleico y ácido linoleico (Rojo-Poveda *et al.*, 2020). Debido a estos compuestos bioactivos, sus extractos pueden ser utilizados para la formulación de nuevos productos o para

propósitos nutracéuticos (Hernández-Hernández et al., 2019). La **Tabla 5**, muestra la composición nutraceútica de la cascarilla de cacao.

2.5 Prebióticos

2.5.1 Definición y generalidades

La declaración de consenso de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) actualmente define a los prebióticos como un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del hospedero confiere un beneficio para la salud. Aunado a esta definición, los prebióticos deben utilizarse de forma selectiva y tener evidencia adecuada de su beneficio para la salud del hospedero objetivo; en cuanto a los prebióticos dietéticos estos no deben ser degradados por las enzimas del hospedero objetivo (Gibson et al., 2017).

Los prebióticos pueden estimular el crecimiento de bacterias como *Coseburia spp.*, *Eubacterium spp.*, *Akkermansia spp.*, *Christensensella spp.*, *Propionibacterium spp.*, y *Faecalibacterium spp* a través de una alimentación variada incluyendo especialmente los grupos de vegetales y cereales integrales que contienen fibra. Esto beneficia a su vez la generación de AGCC que regulan la función de la barrera epitelial, mucosa intestinal, inmunidad, inflamación así como los niveles de la glucosa y lípidos (Blaak et al., 2020).

Los prebióticos se encuentran en pequeñas cantidades en alimentos como el esparrago, ajo, cebolla, frijoles, leche de vaca, tomate entre otros. Debido a esto las industrias se han dedicado a producirlos utilizando lactosa, sucralosa y almidón como materia prima (Khangwal & Shukla, 2019). También se consideran prebióticos aquellas sustancias a base de carbohidratos derivadas de plantas como inulina (oligosacáridos, glucanos) así como de fuentes que no son carbohidratos, como polifenoles, ácidos grasos, otros micronutrientes. En el caso de los polifenoles en plantas, vegetales y frutas, la mayoría de estos compuestos

pueden llegar intactos al colon para ser utilizados por los microorganismos residentes (Cardona *et al.* 2013).

Los oligosacáridos por ejemplo, promueven el crecimiento de microorganismos benéficos para la microbiota como *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*, estimulando también el crecimiento de *Enterobacteria*, *Bacteroidetes*, y *Firmicutes* (Louis *et al.*, 2016). Los prebióticos son utilizados por estas bacterias benéficas pueden mejorar síntomas gastrointestinales, mejorar el sistema inmune, prevenir el cáncer del colon y enfermedades neurodegenerativas. La **Figura 4** muestra un resumen de los efectos principales de los prebióticos.

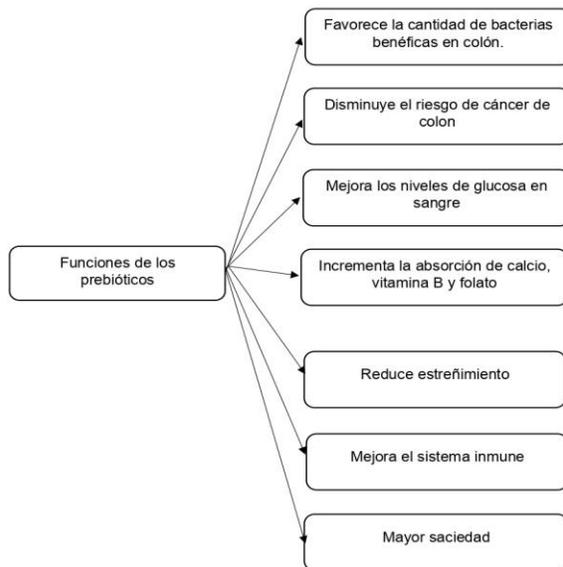


Figura 4.Funciones de los prebióticos.

Adaptado: Rolim, (2015)

2.6 Bacterias benéficas

2.6.1 Lactobacillus

El género *Lactobacillus*, forma parte de las bacterias ácido-lácticas (BAL), caracterizadas por producir ácido láctico, siendo este un producto del metabolismo de carbohidratos. Sus características morfológicas se muestran como bacilos o cocobacilos, Gram positivos, no formadoras de esporas, necesitan de un gran requerimiento de nutrientes utilizando carbohidratos fermentativamente y generan ácido láctico como un producto final principal, su morfología colonial puede variar de colonias grises pequeñas a medianas que generalmente exhiben alfa hemólisis en agar sangre (De Angelis & Gobbetti, 2016). Los medios selectivos más utilizados para el crecimiento de los lactobacilos son agar MRS, siendo el color blanco un distintivo de ellas, se encuentran mayormente en alimentos fermentados, así como en frutas y verduras. (Goldstein et al., 2015).

Además, los lactobacilos son un importante componente de la microbiota de humanos y otros mamíferos que están presentes en el tracto respiratorio, y gastrointestinal. Aunque es relativamente fácil cultivar lactobacilos en heces de sujetos sanos, la proporción de la microbiota cultivable que comprenden los lactobacilos es típicamente baja de 10^6 a 10^8 por gramo en heces o de 0.01 a 1% (O'Callaghan & O'Toole, 2013).

2.6.2 Bifidobacterias

La familia de *Bifidobacteraceae* se encuentra formada por los géneros *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Aeriscardovia*, *Parascardovia*, *Scardovia*, donde al momento se han reconocido 94 especies. Son considerados microorganismos probióticos, se encuentran en diferentes partes del intestino y promueven la salud intestinal al mejorar la digestión de la lactosa, previenen la diarrea aguda causada

por infecciones alimentarias así como ayudar en el tratamiento contra rotavirus (Ghoddusi & Tamime, 2014).

Las Bifidobacteria son predominantes en niños y en lactantes, ya que estos se encuentran en grandes cantidades dentro de la leche materna. Además, las especies *Bifidobacterium adolescenciais*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum* son las que más se encuentran en el intestino humano; estas bacterias están comprobadas y verificadas como de uso seguro en la suplementación de alimentos (Saturio et al., 2021).

Este aumento de urea se considera parte de la disbiosis de la microbiota al ser parte del metabolismo de los microorganismos, por un parte Shen et al , 2015 realizaron un estudio, donde utilizaron 8 bacterias con mínima actividad de ureasa (genes) en la microbiota intestinal. Sus resultados mostraron disminuir la actividad de ureasa lo cual contribuye a la hiperamonemia asociada a la neurotoxicidad encefalopatías. Otro estudio, utilizó *Bifidobacterium longum* con fructooligosacáridos en paciente con un mínimo nivel de encefalopatía hepática. Los resultados mostraron que la actividad de esta bacteria disminuyo la actividad de ureasa y también mejor la función cognitiva de estos pacientes (Collins et al., 2022). Dado lo anterior, es importante considerar a los probióticos como una alternativa a modular la microbiota intestinal, ya que tiene un potencial efecto en poder reducir la actividad de ureasa, por lo que sería benéfico en los niños con TEA, y con esto mejorar los síntomas.

2.6.3 Bacterias productoras de Ureasa

Es importante incluir que no solo las bacterias probióticas que aportan algún beneficio gastrointestinal se encuentran en el tracto intestinal. Esto es de interés pues se ha encontrado que los niños con TEA presentan niveles altos de amonio por diversos factores que puede ser por errores innatos del metabolismo, factores ambientales y también de las bacterias productoras de ureasa (Wang et al., 2012).

La ureasa es una enzima catalizadora que participa en la hidrólisis de la conversión de urea el cual es producto tóxico que se expulsa de orina y sudor después de la degradación de compuestos nitrogenados, y al actuar esta enzima se produce amoníaco y dióxido de carbono (Burne & Chen, 2000). La actividad de la ureasa se encuentra dentro de las células procariotas, en especial de ciertas bacterias ureolíticas como son de ejemplo *Bifidobacterium*, *Bacteroides* sp., *Lactobacillus* sp., *Fusobacterium* sp. *Fusobacterium* sp y *Prevotella*, su actividad puede ser afectada por la concentración de urea, amoníaco, el pH del medio y el nitrógeno de la dieta (Patra y Aschenbach., 2018)

2.7 Efectos benéficos del consumo de prebióticos en TEA

Se utiliza el término de niños neurotípicos (NTO) para aquellos niños que no encuentran diagnosticados dentro del espectro autista. Los niños con TEA presentan una diversidad de microbiota diferente respecto a los niños NTO. Se ha una mayor porcentaje de patógenos como *Clostridium* en niños TEA en comparación de niños sanos en desarrollo; este grupo de microorganismo se relaciona en empeorar los síntomas de TEA (Kandeel et al., 2020).

También se ha reportado que los niños con TEA consumen menos del 50% de las recomendaciones diarias de fibra, lo cual puede deberse a la textura y sabor de los alimentos. Por lo que es importante tener alternativas en su dieta que puedan ser aceptadas por ellos (Lockner et al., 2008). Se ha estudiado *in vitro* que *Bifidobacterium infantis* mejora la barrera intestinal y reduce la expresión de genes inflamatorios en células epiteliales del intestino, por lo tanto se recomienda su suplementación como probiótico o bien una alimentación alta en prebióticos que favorezcan su crecimiento (Wickramasinghe et al., 2015).

Así mismo, un estudio piloto evaluó el efecto de suplementación de prebióticos y probióticos en 24 niños con TEA y problemas gastrointestinales por 12 semanas, seguidas 5 semanas de solamente suplementación de prebióticos. El

estudio mostró que los niños mejoraron los síntomas GI, mejoraron comportamientos relacionados y disminuyeron específicamente IL-13 y TNF- α (dos interleucinas relacionadas a regular las respuestas inmunitarias) (Sanctuary et al., 2019).

Un estudio evaluó el efecto del prebiótico galactooligosacarido sobre la microbiota intestinal y la función metabólica, utilizando muestras fecales de niños con TEA y neurotípicos en un sistema SHIME, el cual es un modelo dinámico *in vitro* que simula la fermentación colónica, consta de cinco compartimentos que incluyen el estómago, el intestino delgado, el colon ascendente, transversal y descendente. El modelo de los niños con TEA contenía una mayor colonización de *Clostridium spp.* y una menor concentración de bacterias Bifidobacterias en comparación con los niños neurotípicos. La administración de este prebiótico aumentó significativamente las poblaciones de Bifidobacterias en cada compartimento de los modelos, tanto con muestras derivadas de autistas como de no autistas, y Lactobacilos en el recipiente final de los modelos no autistas (Grimaldi et al., 2017).

Un estudio *in vivo* utilizó una dosis de suplementación de 1 billón de unidades formadoras de colonias que incluían *Lactobacillus Plantarum*, *Lactobacillus Casei*, *Lactobacillus Acidophilus*, *Lactobacillus Bulgaricus*, utilizando como modelo, a ratas embarazadas a las cuales se simularon condiciones similares al autismo a través ácido valproico (400mg/kg). Los resultados mostraron a través una de una histopatología, que en el cerebelo la apoptosis y la degeneración de células fue revertida con el tratamiento de *Lactobacillus* en las ratas nacidas (Sunand, et al., 2020).

2.7.1 Métodos para la estimación de efectos fisiológicos de los alimentos

Ciertamente la utilización de modelos *in vitro* e *in vivo* en las investigaciones en prebióticos son benéficos, en especial porque permiten estudiar su efecto y su interacción con la microbiota en ambiente controlados. Por una

parte, los modelos animales son costosos, necesitan más trabajo, y no representan el metabolismo fisiológico del intestino humano. Los modelos *in vitro* tienen la ventaja de ser efectivos para estudiar la microbiota humana en un ambiente controlado, en resumen, la fermentación *in vitro*, son más reproducibles, y en algunos casos no requieren aprobación ética, se necesita menos tiempo y reproduce la fisiología del intestino humano (Mota de Carvalho et al., 2021).

Los modelos de fermentación *in vitro* se pueden dividir en diferentes grupos: 1) Modelos de fermentación en lotes, 2) modelo dinámico de fermentación, 3) modelo de inoculación del intestino, 4) Interacción-hospedero-microbiota intestinal (Verhoeckx et al., 2015). El método de fermentación inóculo humano (con aprobación de comité de ética) ha sido utilizado previamente para poder evaluar el efecto de productos que no pueden ser digeridos por las enzimas del intestino, pero si por el colon. Por ejemplo, los ensayos realizados (Campos-Vega et al., 2015), simula las condiciones controladas de la digestión gastrointestinal y la fase colónica, permitiendo el análisis de metabolitos.

2.8 Digestión gastrointestinal

2.8.1 Proceso de digestión gastrointestinal

El sistema digestivo es el encargado de procesar, transportar, secretar jugos digestivos y absorber nutrientes provenientes de la dieta; se comprende del tracto gastrointestinal que incluyen la cavidad oral, la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso; los órganos que se consideran accesorios incluyen los diente, la lengua, las glándulas salivales, hígado, vesícula biliar y páncreas (Sensoy, 2021).El sistema digestivo funciona para procesar, digerir y absorber los nutrientes de la dieta para después desechar los productos que no abosrba el organismo mediante la ayuda de estos órganos accesorios (Ogobuiro et al., 2022).

2.8.1.1 Boca

La digestión comienza con la mucosa oral, juega un papel importante en la digestión, la lengua permite que los alimentos se compriman contra los paladares formando así a lo que se llama bolo alimenticio, el cual pasa por el esófago y posteriormente llega al estómago (Kamrani & Sadiq, 2023). También la boca se compone de glándulas salivales las cuales producen de 1.0 a 1.5 litros de saliva cada 0,25 y 0,35 ml/mn. la cual contiene 99.4% de agua y el resto consiste en electrolitos, tampones, glicoproteínas, anticuerpos, enzimas que sirven para facilitar el proceso de deglución e iniciación de la digestión de los nutrientes (Chojnowska et al., 2018; Ogbuuro et al., 2022).

2.8.1.2 Estómago

El esófago es el encargado de llevar los alimentos hacia el estómago a través de ondas de contracción conocido como peristaltismo. Una vez que llega al estómago, el bolo alimenticio puede llegar a conservarse y posteriormente puede degradarse química y mecánicamente por la acción de los ácidos y enzimas propias del estómago. El ácido clorhídrico es entonces producido por las células parietales (pH 1.5- 2.0), lo cual también evita que los microorganismos provenientes de los alimentos puedan provocar un daño, además desnaturaliza las proteínas, rompe la pared celular de las plantas y, contiene pepsinógeno, el cual activa la función de enzimas digestivas como la pepsina (digerir proteínas) (Mahadevan, 2017).

2.8.1.3 Intestino delgado

El intestino delgado es el encargado de absorber el 90% de los compuestos digeridos en el estómago. El intestino delgado se compone de 3 segmentos, duodeno, yeyuno e íleon. En el duodeno llega el bolo alimenticio al

cual ahora se le llama quimo formado del estómago y otros compuestos a digerir del páncreas y el hígado. Tanto el yeyuno como el íleon terminan de digerir el material alimenticio. Las enzimas que son producidas por el intestino delgado incluyen lipasa, peptidasas, maltasa, sucralasa y lactasa (Collins et al., 2022).

2.8.1.3 Intestino grueso

El intestino grueso es el lugar donde llega todo lo que no fue absorbido y digerido previamente, siendo considerado como heces. El intestino grueso mide alrededor de 150 cm, comenzando con el ciego, seguido del colon ascendente, el colon transversal, el descendente y el colon sigmoide. Es el encargado de absorber algunas vitaminas como la K (metabolizada por las bacterias) así mismo alrededor de 100 mL de agua se absorben y se desechan con las heces. Habitan billones de microorganismos que degradan el material alimenticio no digerido, además que ayudan a producir la vitamina K. Los movimientos peristálticos en el intestino grueso ayudan a relajar el esfínter interno para el proceso de defecación, terminando así la digestión (Ogobuiro et al., 2022).

2.9 Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad se refiere a la fracción de un nutriente o alimento que está disponible para la absorción a través de la capa epitelial (TGI); para que estos sean disponibles deben ser liberados de la matriz alimenticia y transportados hacia los diferentes tejidos (Rodrigues et al., 2022). Los ensayos *in vitro* permiten realizar una simulación de los cuatro sectores del TGI que son: boca, estómago, intestino delgado y colon. La bioaccesibilidad es expresada como porcentaje y se calcula la relación entre la cantidad del componente solubilizado en cada etapa (Dima *et al.* 2020).

Los modelos *in vitro* permiten conocer la cantidad de bioactivos que estarían disponibles para ser absorbidos y así conocer en qué condiciones pueden ser utilizados. Estos métodos permiten simular condiciones fisiológicas GII (temperatura, agitación, pH, enzima y composición química). Estas técnicas son las más simples y fácilmente reproducibles ya que incluyen dos o tres etapas de la digestión que son oral, gástrica e intestinal. Las ventajas de los modelos *in vitro* son que permiten un mejor control de las variables experimentales que los estudios en animales o humanos, siempre que estén adecuadamente validados y estandarizados, con el uso de material de referencia si es necesario. En general, son métodos rápidos y sencillos, ya que solo necesitan materiales que están disponibles de forma rutinaria en el laboratorio, por lo que son relativamente económicos y rentables (Alegría et al., 2015).

2.10 Fermentación colónica

2.10.1 Proceso de fermentación colónica

Los carbohidratos no digeribles (alimentos altos en fibra) son uno de los compuestos más importantes considerados como prebióticos. Estos son utilizados por los microorganismos de la microbiota intestinal, los cuales aumentan la capacidad de producir compuestos benéficos para la salud. El proceso de fermentación en el colon comienza cuando se ingiere el alimento y se originan los gases: hidrógeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4), también se producen AGCC y lactato (Macfarlane & Macfarlane, 2012). La microbiota es capaz de metabolizar proteínas y generar ácido sulfhídrico (H_2S), y ácidos grasos de cadena ramificada (AGCIR) como isobutirato e isovalerato, se produce también amoníaco (NH_3), tioles, aminas y fenoles que pueden dañar la mucosa intestinal (Corzo *et al.*, 2015).

La fibra forma parte de los carbohidratos que no pueden ser digeridos por las enzimas del intestino delgado, es utilizado selectivamente por los

microorganismos del colon que tiene propiedades benéficas para la salud. La fibra dietaria se compone de varios tipos de carbohidratos, por ejemplo, almidón resistente (parte no digerible del almidón) y polisacáridos/oligosacáridos (Palafox-Carlos et al., 2011) Otros componentes y metabolitos de la fermentación colónica son los AGCC que son absorbidos en las células epiteliales del colon y metabolizadas por células de diferente tejido, aun así solo del 5-10% se excreta en heces, se ha estudiado que el butirato es una fuente principal de energía para los coloncitos, lo que previene el cáncer de colon (Sun & Zhu, 2018).

A partir de los sustratos de la dieta como de proteínas y carbohidratos, estos pueden ser metabolizados a productos más sencillos, por ejemplo, a partir de estos se produce al final por la fermentación lactato, succinato, etanol, CO₂ y, NH₂, aminas, fenoles/indoles y AGCC (Corzo et al., 2015)

2.11 Ingrediente a base de subproductos del cacao

Anteriormente se ha trabajado con la vaina de cacao como el proyecto desarrollado por Mendoza., (2022) cuyo trabajo fue evaluar las características nutritivas, nutraceúticas y funcionales de la vaina de cacao mediante un proceso de extrusión el cual posteriormente fue sometida a fermentación sólida tipo Tempeh con *Rhizopus oligosporus*. Los resultados obtenidos mostraron que, debido a estos procesos, los taninos y polifenoles, así como de la capacidad antioxidante de la vaina de cacao incrementó, debido a su mayor accesibilidad. Así mismo la fermentación tipo Tempeh mejoró la bioaccesibilidad y permeabilidad de compuestos fenólicos como el ácido gálico y ácido elágico; también se encontró un aumento en la síntesis de AGCC especialmente propiónico y butírico, sugiriendo así que este proceso puede ser utilizado para que la vaina de cacao tenga un efecto benéfico a la salud. Se desarrolló un ingrediente en el equipo de trabajo utilizando la cascarilla de cacao y la vaina fermentada siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado para la vaina (Velásquez-Jiménez et al.,

2023) reporta una alta cantidad de carbohidratos (fibra dietaria) y compuestos antioxidantes, siendo mayormente epicatequina, catequina y ácido gálico.

III JUSTIFICACIÓN

Los trastornos del especto autista (TEA) son un grupo de afecciones relacionadas con el desarrollo del cerebro que afecta la manera en la que una persona percibe o socializa, lo que le dificulta tener una interacción social y de comunicación. Los TEA comienzan en los primeros años de la infancia, el cual puede llegar a desenvolverse en la edad adulta ocasionando también problemas sociales, en la vida diaria y en las tareas cotidianas.

Se desconoce la causa de este grupo de trastornos, pero se cree que es multifactorial relacionado a factores tanto ambientales como genéticos. Los niños con TEA suelen presentar problemas GI frecuentes como diarrea, constipación e inflamación que, de acuerdo con reportado en las investigaciones, está relacionado con ciertos comportamientos de actitud, como estrés, irritabilidad, problema en el manejo de emociones entre otros.

Los estudios realizados en niños con TEA demuestran que estos síntomas pueden disminuir con un tratamiento nutricional, este mismo enfocado y a específicamente a la microbiota intestinal, debido a su papel importante en la regulación y salud intestinal. Estudios previos han encontrado que los alimentos altos en fibra y polifenoles pueden regular el microbiota intestinal tratando y mejorando así síntomas (GI) y conductuales. Esta situación impulsa el desarrollo de alimentos que puedan ayudar en el tratamiento de esta condición.

Debido al potencial de los compuestos anteriormente mencionados de la cascarilla y vaina fermentada, al utilizarse estos dos subproductos juntos, se puede potenciar su valor bioactivo en cuanto a la cantidad de antioxidantes y contenido de fibra, los cuales podrían llegar al colon y producir compuestos benéficos para la salud, en especial, para los niños con TEA.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* de compuestos fenólicos de un ingrediente a base de subproductos de cacao (*Theobroma cacao L*) y su efecto sobre el metabolismo colónico *in vitro* de niños con TEA.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la composición química, nutracéutica y capacidad antioxidante de la vaina, cascarilla y mezcla del ingrediente a base de subproductos de cacao.
- Evaluar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos del ingrediente y su capacidad antioxidante utilizando un modelo gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*.
- Evaluar *in vitro* el efecto del ingrediente sobre el metabolismo colónico de niños autistas.

V METODOLOGÍA

5.1 Materia Prima

5.1.1 Material vegetal

5.1.1.1 Vaina de cacao fermentada

Las vainas del fruto de cacao variedad criollo (*Theobroma cacao*) fueron obtenidas de Jalpan de Méndez, Tabasco. Se lavaron y se cortaron en mitades, se retiraron los granos, y se desinfectaron con cloro al 2%, después las vainas se hirvieron por 10 minutos en diferentes tandas (Delgado-Ospina et al., 2021). Posterior se dejaron secar a temperatura ambiente por 15-20 minutos, después fueron sometidas a un molido utilizando un molino de masa. La masa de vaina se puso en un deshidratador para secarlas completamente. La pasta que se obtuvo fue extrudida por un extrusor fabricado en CICATA-IPN Querétaro (Patente MX/a/2007/016262) con las siguientes características: tornillo de 45 cm, diámetro de 2.54 cm con dos zonas de calentamiento de 15 y 10 cm; 15 rpm y 1.1 mm diámetro del dado, la primera zona de calentamiento se ajustó 60°C y la segunda a 120°C.

Posteriormente se llevó a cabo una fermentación con *Rhizopus oligosporus* adaptando el método de preparación de TEMPEH MX ® y las condiciones de Lateef et al., (2008). Para ello, la muestra extruida fue hidratada por 2 horas hasta obtener un porcentaje de humedad del 80 % v/v y se colocó en autoclave por 15 min a 121 °C, se dejó enfriar a temperatura de 30 a 35 °C y se inoculó con el cultivo iniciador (1 g cultivo iniciador/200 g de muestra). Se incubó a 30-34°C en bolsas de plástico con varios orificios y se dejó durante 24 h en ausencia de luz. Posterior a esto se verificó la formación del micelio y la cobertura de este sobre la vaina para proceder a secar la muestra a 40 °C en un horno por 24 h para la inactivación del hongo y se procedió a molerla y tamizarla en con una malla de 419 µm.

5.1.1.2 Cascarilla de cacao

Esta se obtuvo del municipio de Jalpan de Méndez, Tabasco por el mismo proveedor. Se realizó un proceso de molido y para la obtención de la harina se utilizó un tamizado (417 μm) con una malla de número 40; las harinas obtenidas fueron almacenadas en bolsas y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso y posterior evaluación.

5.1.1.3 Formulación del ingrediente a base de vaina y cascarilla de cacao

La formulación del ingrediente fue una mezcla proporción de la cascarilla (2) y vaina (1), acuerdo con resultados previos encontrados en el grupo de trabajo (Velásquez-Jiménez et al., 2023), en el cual se realizaron 3 mezclas de estos dos subproductos, el cual se utilizaron diferentes proporciones respectivamente para cascarilla y vaina (50 % y 50 %), (70 % y 30 %) y (100 % y 100 %) presentado de la siguiente manera: [Cascarilla (C) y Vaina (V): C:1 V:1, C:2 V1, C:2 V:2]. El ingrediente se eligió por la que presentó el mayor contenido de polifenoles, siendo la mezcla con la proporción de CV 2:1, la cual se le denomina ingrediente para el presente trabajo.

5.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico de las marcas Sigma-Aldrich, Roche, Merck y J. T. Baker. Para la determinación antioxidante se utilizó el reactivo DPPH+ (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil); para la reacción de ABTS se utilizó 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) y se utilizó Trolox para la curva estándar. Para las pruebas de flavonoides y fenoles se utilizaron los siguientes reactivos: rutina, metanol, etanol, acetona, para fenoles se utilizó folin ciocalteu.

5.2 Composición química del ingrediente de cacao

5.2.1.1 Determinación de humedad (925.23 AOAC)

El contenido de humedad fue determinado por el método 925.23 de la AOAC (2005). Las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados como porcentaje en base seca. Se utilizó una termobalanza para el cálculo de humedad, se registraron los pesos iniciales y finales de las muestras, así como el porcentaje.

5.2.1.2 Determinación de cenizas (920.085 AOAC)

La cantidad de ceniza se obtuvo por medio del método oficial de AOAC (2005). Se utilizaron crisoles que fueron puestos a peso constante en horno durante 1 h a 80°C, a los cuales se les colocó alrededor de 2 g de muestra y se registraron los pesos iniciales. Estas fueron incineradas a 300°C alrededor de 1-2 horas. Después se llevaron a la mufla durante 12 h a 550°C hasta tener un color gris o blanco. Las muestras se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente en un desecador. El contenido de cenizas en base seca se calculó de la siguiente manera:

Cenizas en base seca: $\text{Peso crisol antes} - \text{Peso crisol después} / \text{Peso muestra}$

5.2.1.3 Determinación de proteínas (920.105 AOAC)

Para la determinación de proteína se utilizó el método 920.105 de la AOAC (2002). El método consistió en tres etapas: digestión, destilación y titulación. El análisis se realizó por triplicado y se reportó el promedio de las tres mediciones como porcentaje incluyéndose un blanco.

Digestión

Se pesaron para cada tubo 2 g de muestra del ingrediente colocados en 9 pedazos de papel filtro. A cada tubo se le agregó un catalizador y 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y fueron colocados en el equipo digestor, los tubos de digestión se llevaron a calentar por 1 h para iniciar el proceso y posteriormente se dejaron alrededor de 3 h obtener un color verde en cada uno, se dejaron enfriar y se les adicióno 100 mL de agua destilada.

Destilación

Los tubos se colocaron en el destilador adicionado con hidróxido de sodio al 32%. Se utilizó un matraz de Erlen Meyer de 250 ml adicionado con 50 ml de ácido bórico (4%) teniendo como indicadores rojo metilo y verde de bromocresol.

Titulación

La titulación se realizó con ácido clorhídrico 0.1 N, hasta observarse el cambio de color verde a rosa. Para la determinación de nitrógeno (N) total se realizaron los siguientes cálculos:

$$\% N = \frac{A * B * C}{D} * 100$$

D

A= ml HCL utilizado en la titulación de muestra

B= Concentración del ácido clorhídrico utilizado

C= meq N₂ 0.014

D= peso de muestra

5.2.1.4 Determinación de lípidos (996.06)

Para la determinación de lípidos se siguió el método oficial de la AOAC (2002). Se utilizó éter de petróleo como extractor en un equipo Goldfish. Se emplearon vasos de precipitado a peso constante y se registraron los pesos. Las muestras se colocaron en tubos Goldfish, ajustando la temperatura. A los vasos de precipitado se les agregó aproximadamente 20 mL de éter de petróleo. La extracción duró aproximadamente 4 h, posterior a esto se retiraron los tubos y los vasos se dejaron enfriar en desecador por 1 h, registrándose el peso de cada uno. Para determinar el porcentaje de lípidos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ lípidos} = \text{peso muestra} / \text{diferencia de peso antes y después}$$

5.2.1.5 Composición de carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos se calculó por diferencia de peso de los porcentajes de las caracterizaciones anteriores de un total de 100%.

5.3 Composición nutracéutica

5.3.1 Fibra dietaria total (AOAC 991.43)

La fibra dietaria total se calculó por la suma de las fracciones obtenidas de fibra insoluble e insoluble, se tomó como porcentaje de fibra total dietaria con el siguiente cálculo:

Fibra total dietaria total (FDT) = Fibra dietaria insoluble + fibra dietaria soluble.

5.3.2 Fibra dietaria insoluble (AOAC 991.43)

Para la determinación de fibra insoluble se utilizó el método de la AOAC (2002) en donde se utilizó 1 g de muestra seca y desgrasada. Se empleó una solución de buffer de fosfato (1.4 g de sodio de fosfato dibásico y 9.68 g de sodio fosfato monobásico), para ajustar el pH a 6. Las muestras fueron colocadas en vasos de vidrio, a los cuales se les adicionó 50 mL de buffer y 100 μ L de α -amilasa. Estas se incubaron a baño maría a 95°C por 30 min con agitación, para proceder a ajustar el pH a 7.5 con NaOH a la muestra atemperada. Se adicionó 100 μ L de proteasa (50 mg disueltos en 1 ml de buffer) y se incubó a baño maría a 60°C por 30 minutos con agitación continúa, al finalizar, se dejó enfriar para ajustar a pH 4 con HCl. Se agregaron 100 μ L de amiloglucosidasa a cada muestra y se incubaron a 30 minutos a 60°C con agitación continua. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se filtraron al vacío en papel Whatman no.4 previamente tarado a peso constante. Se realizaron 2 lavados con 15 mL de agua destilada a 60 °C y 2 lavados con 15 mL de etanol al 95%. Cada filtro fue secado anteriormente para obtener un peso constante, los cuales después de ser filtrados fueron pesados para la obtener la diferencia de peso

El cálculo se realizó en base seca y de acuerdo con el porcentaje de carbohidratos de la muestra:

$$\text{Cálculo de la fracción insoluble (\%)} = x = \frac{\text{Pesopapel con muestra} - \text{Pesopapel solo}}{\text{P muestra}} \times 100$$

5.3.3 Fibra soluble (AOAC 991.43)

Al filtrado anterior, se le añadió un volumen igual de etanol al 96%, y se dejó reposar por 24 h. Al término del tiempo de reposo, se filtró en papel filtro Whatman No.4 previamente pesado y puesto a peso constante; se realizaron 2 lavados con 20 mL de etanol al 96% y 2 con 20 mL de acetona. El papel se dejó secar por 12 h a 40 °C. El cálculo se realizó mediante la diferencia del peso de los filtros antes y después de ser filtrados como se muestra:

$$\text{Cálculo de la fracción soluble (\%)} = x = \frac{\text{Peso papel con muestra} - \text{Peso papel solo}}{\text{Pesomuestra}} \times 100$$

5.3.4 Extracción de solvente

Los extractos para la cuantificación de polifenoles se basaron en el método de Rebollo-Hernandez et al., (2021). Brevemente se pesó materia seca (0,3 g de muestra). Se añadieron ml de metanol:H₂O (80:20). Fueron sónicas durante 20 minutos (Branson, CPX3800H, Dambury, EE. UU.) y las muestras se centrifugaron (8000 g, 4 °C, 10 min) (Hermle 323 K, Wehingen, Alemania). El segundo lavado consistió en una solución de acetona: agua (70:30) y se repitió el proceso anterior. Los sobrenadantes fueron recogidos en viales individuales y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.3.4 Determinación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo por el método de Singleton et al., (1999) se realizó una curva de calibración para la determinación de fenoles utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu el cual detecta grupos de fenoles y polifenoles así como de algunas proteínas en el extracto. En una placa de 96 pocillos, se agregaron 30 µL de extracto de la solución de muestra, 150 µL de reactivo de Folin diluido en H₂O (1:9), 120 µL de Na₂CO₃ al 7.5% en cada pozo. Se dejó reposar por 30 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Multiskan Go Serie 1510-02959, Thermo Scientific) a 765 nm. La curva estándar fue de 0.1 a 1 mg de ácido gálico/mL. Los resultados se realizaron por triplicado y se expresaron como mg de ácido equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g de muestra).

5.3.5 Flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se determinó por medio del método sugerido y adaptado a microplaca por Oomah et al., (2005). Se agregó 50 µL de extracto de la muestra y de 20 µL de 2-aminoetildifenilborato en una placa de 96 pocillos. Se utilizó una solución stock de rutina la cual contenía 0.025 g de rutina y 10 mL de metanol. Para la curva estándar se agregaron 50 µL de cada concentración, se adiciono 180 µL de solvente y 20 µL de 2 -aminoetildifenilborato al 1% de metanol. Para la medición de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro a 404 nm (Multiskan Go Serie 1510-02959, Thermo Scientific). La absorción del extracto se comparó con la de un estándar de rutina en concentraciones que van de 0 a 50 µg y el contenido de flavonoides se expresó en mg equivalente rutina/g por muestra.

5.4 Capacidad antioxidante

5.4.1 DPPH

La capacidad antioxidante del ingrediente se midió empleando la metodología de Fukumoto & Mazza, (2000). A una placa de 96 pozos se le añadió 20 µl de extracto y 200 µL de solución de DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) y se comparó con una curva estándar de Trolox. Las muestras fueron leídas a 0, 10, 30, 60, 90 minutos con un espectrofotómetro a 520 nm. La siguiente ecuación se utilizó para medir actividad antirradical y se expresó como porcentaje de inhibición de DPPH:

$$\% \text{inhibición} = \left(100 - \frac{\text{Muestra}}{\text{Control}} \right)$$

Donde:

A_{muestra} = la absorbancia de la muestra a 520 nm

A_{control} = la absorbancia de control (ausencia de antioxidante)

5.4.2 ABTS

Se utilizó la metodología de Nenadis *et al.*, (2004), para determinar la capacidad de antioxidante con el ensayo de ABTS, en el cual se utilizó 2,2'-azino bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico). Se prepararon 5 ml de solución acuosa de ABTS 7mM y 88 µL de una solución de persulfato de potasio K₂S₂O₈ 140 mM, las cuales se mezclaron. Esta solución se conservó en un lugar obscuro durante 12 horas. Después, a 500 µL de la solución se le agregaron 20-25 ml de etanol. La absorbancia se midió a 734 nm. El extracto de la muestra (20 µL) se adiciona a una microplaca de 96 pozos más 230 µL de solución etanólica de ABTS. Se utilizó el espectrofotómetro (Multiskan Go Serie 1510-02959, Thermo Scientific) a 734 en la muestra.

Para obtener el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación

$$\% \text{inhibición} = \left(100 - \frac{\text{muestra}}{\text{control}} \right)$$

Donde:

A_{muestra}= la absorbancia de la muestra a 720 nm

A_{control}= la absorbancia de control a 734 nm

Se utilizó una curva de calibración de trolox y los resultados se expresaron como µmol equivalentes de trolox/g de muestra.

5.5 Digestión gastrointestinal in vitro

Se utilizó un modelo de digestión *in vitro* de tres etapas: boca, estómago e intestino delgado para simular las condiciones de la digestión humana, utilizando la metodología reportada por (Campos-Vega et al., 2015).

5.5.1 Fase oral

Se reclutaron 4 participantes voluntarios, los cuales no consumieron antibióticos, no tenían problemas bucales y se encontraban en ayuno 90 minutos previos al ensayo. Se tomaron 16 vasos a los cuales se les lleno con 5 mL de agua destilada. Se les pidió a los participantes enjuagar la boca con 5 mL de agua por 15 segundos, 4 veces en vasos diferentes, depositaron en un vaso de precipitado en donde se añadieron 8 g de muestra del ingrediente, posterior a esto se colocaron en bolsa de plástico y se utilizó un Stomacher (BagMixer® P & BagMixer® 400 W Lab Banders) homogenizar las muestras durante 2 minutos. Se tomaron 2 alícuotas para posteriores análisis y se prosiguió a la siguiente fase.

5.5.2 Fase gástrica

Las muestras de la fase oral fueron homogenizadas y se acidificaron con HCl 2N hasta llegar a un pH de 2. Se adicionaron 0.055 g de pepsina disuelta en 0.94 ml de HCl 20 mM. La mezcla resultante fue el extracto estomacal las cuales fueron incubadas en agitación durante 2 horas a 37 °C y se obtuvieron las 2 alícuotas de la fase de estómago.

5.5.3 Fase intestinal

Se preparó el extracto intestinal utilizando una dilución de 3 mg de hiel de buey añadiendo 2.6 mg de pancreatina que fueron disueltos en 5 mL de una solución amortiguador -preparada 30 minutos antes- de Krebs-Ringer con la siguiente composición: 118mM NaCl, 4.7 mM KCl, 12 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM 55 NaHCO₃, 11mM glucosa y 2.5 mM CaCl₂, pH 6.8. Esta solución (5 ml) fue añadida a cada tubo, en los cuales se introdujo un saco de 4cm de longitud, formado por una membrana de nitrocelulosa de 33 mm (Dialysis

tubing cellulose membrane, D9652-100FT (SIGMA-ALDRICH). Se incubaron en agitación durante 2 horas a 37 °C y se tomaron 2 alícuotas al tiempo 0, 15, 30 y 60 tomando la fracción digerible (FD- dentro del saco de nitrocelulosa) y la fracción no digerible (FND- fuera del saco de nitrocelulosa). Al terminar el proceso se recuperó la fracción sólida (FND) que fue llevada a la etapa colónica.

5.6 Fermentación colónica in vitro

Se utilizó el método establecido por Campos-Vega *et al.*, (2009). Se emplearon 100 mg de inulina como control positivo de carbohidrato fermentable, mientras que, como control negativo se consideró el blanco del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mencionado anteriormente, sin carbohidrato para ser fermentado. El inóculo fecal humano, empleado como fuente de microbiota representativa del colon, se obtuvo de niños, en edad escolar y con diagnóstico de TEA con diferente grado de autismo siendo leve, moderado y severo; así mismo se emplearon muestras fecales de tres niños neurotípicos (NTO) refiriéndose a los niños que no presentan autismo. Los participantes, no debieron haber consumido antibióticos preferentemente, 3 meses previos a la toma de muestra. A los tutores se les explicó detalladamente el procedimiento del ensayo y se les solicitó posteriormente a estos últimos que firmaron el consentimiento informado. Las muestras que se utilizaron en este trabajo fueron recolectadas en un estudio previo realizado en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, cumpliendo con los requisitos de la declaración de Helsinki para la participación de personas y con la aprobación del comité de ética de esa Institución (**Anexo 1**).

Se utilizaron tubos estériles con 9 ml de medio de cultivo basal, el cual estaba compuesto por: peptona de caseína 2.0, extracto de levadura 2.0, NaCl 0.1, K₂HPO₄ 0.04, MgSO₄ 7 H₂O 0.01, CaCl₂ 2 H₂O 0.01, Na₂CO₃ 2.0, cisteína,

HCl 0.5, sales biliares 0.5, Tween-80 2 ml y hematina 0.2 g (previamente diluida en 5 ml de NaOH). Los tubos se sellaron y se mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia usando una mezcla de gases (H₂-CO₂-N₂: 10:10:80, volumen) durante 30 min. El inóculo fecal (3 g de materia fresca) se homogenizó con 27 ml de solución de fosfato de sodio 1 M a pH 7.0, esto se realizó para las muestras de niños con TEA y niños neurotípicos de manera separada. A Los tubos se les añadió 1 ml de homogeneizado fecal; además se le adicionó la FND proveniente de la muestra (125 mg del precipitado sólido y 125 ml del sobrenadante líquido), esta cantidad se utilizó debido al número de muestras y a la cantidad de FND que se obtuvo de la fermentación. Para el blanco se utilizó (500 µL), o inulina (100 mg); se incluyeron tubos separados para inulina con mezcla de inóculos de niños con TEA y NTO, así como con el control. Los tubos se agitaron en vortex durante 30 s y se incubaron en baño maría a 37°C bajo un flujo de mezcla de gases durante 6, 12 y 24 h; tomando el pH a las 0, 6, 12 y 24 h. Al finalizar, los extractos de la fermentación colónica se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

5.7 Análisis por cromatografía de alta resolución (HPLC-DAD)

El perfil fenólico por HPLC se realizó de acuerdo con la metodología establecida por Sánchez-Quezada *et al.*, (2023). Se obtuvo el extracto con el método anteriormente mencionado del ingrediente, el cual se filtró por medio de jeringas y acrodiscos de 0.2 µm PVDF (Unifio WHATMAN) para las muestras de digestión y fermentación se realizó el mismo proceso de filtrados. Fueron inyectados 20 µL de las muestras, por triplicado, el equipo utilizado fue un cromatógrafo líquido de alta resolución ((Agilent Serie 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) con las siguientes condiciones: La fase móvil consistió en agua acidificada con 1% ácido fórmico (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B). Se midieron a 280 nm con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y se utilizó una columna Zorbax Eclipse (Agilent Technologies, 4.6 x 250 mm, 5.0 micras), la cuantificación se llevó a cabo mediante estándares comerciales de fenoles.

5.8. Actividad enzimática de Ureasa

El ensayo de la actividad de la ureasa se realizó de acuerdo con An et al., (2011)_consistió en una mezcla de reacción de 0,5 ml (urea 4 mM en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0) donde 0,1 ml de la solución de fermentación fue añadido. La reacción se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente, la reacción se neutralizó [0,1 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 N, reactivo de fenol nitroprusiato (1 ml)], se añadió reactivo de hipoclorito alcalino (NaClO , 1 ml) y la mezcla se incubó (20 min a 65 °C) para detener la reacción. La mezcla de reacción se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. La actividad enzimática se midió controlando la absorbancia a 603 nm.

5.9. Manejo de residuos biológicos (RPBI)

El manejo de residuos biológicos se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (Fernandez, 2003) la cual especifica las clasificaciones y especificaciones de manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos, así como las especificaciones para su manejo. Los residuos biológicos fueron envasados en bolsas de polietileno con la etiqueta de residuos peligrosos con calibre mínimo de 300, impermeable y con contenido de metales pesados no más de una parte por millón y libres de cloro, además fueron marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos. Las bolsas fueron selladas sin llenar a no más del 80% de su capacidad. Después de ello, se pasaron e indicaron su peso en la bolsa. Se guardaron en congelación hasta que se programe la recolección con el proveedor autorizado.

5.9 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos a partir de los resultados se analizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA). Para los análisis proximales y nutracéuticos entre la cascarilla, la vaina fermentada y el ingrediente siendo estos los factores de variaciones y los resultados las variables, para la digestión gastrointestinal se realizó el mismo análisis, siendo las etapas de digestión los factores y las variables, el porcentaje de bioaccesibilidad de los compuestos. Para la fermentación, las muestras se consideraron como los factores de variación, el pH de cada tiempo de fermentación se consideró variable respuesta. Para la actividad enzimática se realizó una prueba de Tukey($\alpha=0.05$) de los grupos siendo el grupo NTO control, teniendo como variable respuesta el porcentaje de actividad de ureasa. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar seguido de una comparación de medias por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) con el programa estadístico Mini Tab 16 Software.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Composición proximal

En la **Tabla 6** se presenta la composición de proteínas, cenizas, humedad, carbohidratos, así como la fibra dietaria total dividida en soluble e insoluble de las muestras de cascarilla, vaina fermentada e ingrediente. Los carbohidratos son los componentes principales en las muestras evaluadas, siendo la cantidad de éstos significativamente más alta en la vaina fermentada ($p<0.05$). Para la cascarilla los carbohidratos totales fueron 77.55 g/100. Los carbohidratos contienen fibra soluble e insoluble, siendo esta última uno de los mayores componentes dentro de éstos. La insoluble mostró ser la de mayor aporte para cascarilla con 36.23 g/100 mientras que la soluble mostró menor cantidad 5.19 g/100 y en total fibra dietaria 36.23 g/100. Estos resultados son comparables respecto a lo encontrado por otros autores, que para carbohidratos se reporta 70.25 g/100, para fibra dietaria se

reporta una cantidad de entre 39.25-66.33 g/100 de la cual se incluye la fibra soluble 7.03-16.91 g/100 y la insoluble 28.34-50.42 g/100 (Rojo-Poveda et al., 2020).

Dentro de los carbohidratos se encuentran 17 %, galactosa 3 %, manosa 3 %, xylosa 1.2 % y arabinosa 1.7 %, aparte que estos compuestos son los encargados de sabor durante la fermentación y tostado de la cascarilla (Sánchez-Quezada et al., 2023). En cuanto a los resultados encontrados estos pueden variar debido al proceso aplicado (molido o tamizaje), el tiempo de tostado y secado, así como del origen y cultivo proveniente (Żyżelewicz et al. 2016).

El contenido proteína para cascarilla significativamente alta respecto a las demás muestras analizadas ($p < 0.05$), y se encuentra dentro del rango reportado en la literatura 12.7–19.7 % (Younes et al., 2023). La proteína de la cascarilla de cacao se encuentra solamente con 1 % de fracción libre mientras que el 90 % se encuentra en los polifenoles oxidados por parte de la cascara (Sánchez et al., 2023).

Otro componente importante fue el del contenido alto de lípidos en cascarilla 10.90 g/100 siendo significativamente más alto en comparación de la vaina fermentada y el ingrediente. Sánchez et al. (2023) reporta valores de 2.3–6.5 g/100 más bajos de los encontrado en este trabajo; sin embargo el estudio Agus et al., (2018) mostró que la composición proximal de la cascarilla de cacao tostado varía respecto a lo no tostada, siendo esta última mayor 1.87 %.

Los principales lípidos encontrados en cascarilla son similares a los que se encuentra en la mantequilla de cacao siendo su parte saponificable formada por oleico, caproico, palmítico y esteárico (Rojo-Poveda et al., 2020). Debido a la composición de la cascarilla alta en fibra, proteína y lípidos (que puede ser utilizada para sustituir otro tipo de grasa), aparte de aportar aroma de chocolate, lo hacen un buen sustituto o un ingrediente potencialmente útil para añadirse a otros alimentos (Ospina et al., 2021).

En referente a la vaina de cacao sin fermentar, se ha reportado que los principales carbohidratos son glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, ramnosa,

manosa, fucosa y celulosa, así como diferentes componentes de la fibra soluble: pectina, gomas, tipos de fructanos como la inulina y algunas hemicelulosas (Barrios-Rodríguez et al., 2022).

De esos componentes la pectina es considerada un prebiótico, debido a su fermentación por las bacterias colónicas, produciendo AGCC, asociados a diferentes beneficios a la salud. En el caso de TEA, los ensayos clínicos no han mostrado resultados concluyentes atribuidos al uso de prebióticos. Otros resultados relevantes fueron el contenido de fibra dietaria total, (48.38 g/100); los cuales se dividen también en fibra soluble (6.42g/100) e insoluble (41.96 g/100). Esto es una propiedad importante dentro del uso y potencial uso de fibra en subproductos del cacao, por ejemplo se ha utilizado la vaina de cacao como un sustituyente del almidón para la elaboración de salchichas frankfurters, las cuales son un alimento que no contiene fibra (Delgado-Ospina et al., 2021).

La fibra presente en la vaina sin fermentar de cacao no puede ser tan fácilmente digerida, por lo tanto, en el trabajo realizado por (Mendoza, 2022), la vaina de cacao fue procesada por métodos de secado/extrusión y fermentada con *Rhizopus oryzae* a diferentes tiempos. Este proceso mostró cambios en la vaina ahora llamada fermentada al aumentar su contenido nutricional, especialmente de carbohidratos, utilizando diversas fuentes de carbono pueda producir ácidos orgánicos y enzimas (celulasas, pectinasas, amilasas) por lo que un aumento en este trabajo era esperado (Freitas *et al.* 2014).

Debido a su aporte nutricional solamente de la vaina de cacao, distintos trabajos se han enfocado en aprovechar este subproducto en la industria alimentaria, por ejemplo Güemes-Vera et al., (2020), elaboraron una harina de vaina de cacao, siendo para fibra un porcentaje de 26.75% de g de peso seco, por lo que los autores concluyeron que la vaina puede ser utilizada como ingrediente adicional o sustituto de alimentos para aumentar la fibra.

En general el uso de vaina de cacao en alimentos es limitada o escasa, algunos alimentos que se han probado son en pan o panecillos, utilizando la fibra de cacao para reemplazar el contenido de grasa (Martínez-Cervera et al., 2011).

Además de esto, los pre-tratamientos enzimáticos aplicados a la vaina pueden enriquecer el contenido de la fibra soluble, aun así quien se encuentra con mayor porcentaje en la vaina es la fibra insoluble 52-74 % que aunque este tipo de fibra pueda absorber y retener agua, no forma una solución viscosa, por lo que lo hace más difícil aplicarse a diferentes matrices alimenticias (Lu et al., 2018). Debido a esto, es importante considerar alternativas y pre-tratamientos en la vaina para poder aumentar la fibra soluble, las cuales podrían ser aplicando hidrolisis con diferente solventes, como ácidos combinados con agua que pudieran aumentar la solubilidad de ácidos urónicos con la fibra insoluble y así aumentar la cantidad de la fibra soluble (Kosseva, 2013).

Debido a la relevancia del trabajo, los siguientes resultados se describirán y discutirán en cuanto al Ingrediente (CV 2:1). Un ingrediente se define de acuerdo al Codex Alimentario, como cualquier sustancia que se emplee en la preparación o fabricación de un alimento y que este se encuentre aun modificado al final del producto. Los componentes mayoritarios encontrado fueron los carbohidratos (66.56 g/100), en el cual se encuentra la fibra dietaria total 46.48 g/100 siendo la mayoritaria la insoluble 40.84 g/100 y en menor cantidad la soluble 5.64 g/100.

Tanto la fibra insoluble y la soluble tienen efectos diferentes en el metabolismo. La insoluble por su parte está formada por lignina, celulosas y hemicelulosas, las cuales son pocas fermentadas por las bacterias del colon, en cambio la soluble contiene pectina, la cual es altamente fermentable por las bacterias del colon, y en general se estima que la mayor fibra en los alimentos es insoluble (Lattimer & Haub, 2010).

Anteriormente se evaluó la composición nutricional de un producto tipo harina a base de fibra a partir del grano y cascarilla, obteniendo hasta un 60 % en base seca de fibra total, 10.09 % para fibra soluble y un 50.43 % para insoluble (Lecumberri et al., 2007), siendo más alto que nuestro ingrediente. Esto puede ser debido a que fue molido hasta obtener un tamaño de partícula de 75 μm , en comparación de la nuestra <40 μm , por lo que una alternativa para aumentar el contenido de fibra puede ser utilizar diferentes tamizados.

Uno de los retos en la elaboración de productos altos en fibra está relacionado en como aumentar la fibra, aunque actualmente existen enfoques para mejorar también la calidad, mediante el uso de enzimas o aditivos y/o mediante el uso de técnicas de bioprocesos como puede ser la extrusión y la fermentación (Ktenioudaki & Gallagher, 2012). Por ejemplo, las fermentaciones tipo Tempe con *Rhizopus Oryzae* y *Rhizopus Oligosporus* son métodos utilizados para incrementar el valor bioactivo y nutricional en ciertas matrices alimentarias. En salvado al aplicar esta fermentación se encontró un porcentaje de 60 % y 40 % de fibra insoluble y soluble respectivamente_(Starzyńska-Janiszewska et al., 2021).

Entendiendo que nuestro ingrediente es una mezcla de vaina fermentada y cascarilla de cacao, estos dos subproductos han sido utilizados como ingredientes adicionados a alimentos con el fin de aumentar el potencial nutricional y valor biológico del producto final; por ejemplo se han elaborado galletas dulces con alto contenido de fibra a base de cascarilla de cacao (Danae-Perez et al., 2018). Adicional a esto, la cascarilla tiene propiedades de sabor y olor a chocolate, mientras que la vaina fermentada proporciona una viscosidad para alimentos más sólidos, por lo que el ingrediente obtenido a partir de estos dos subproductos puede ser utilizados en un alimento solido que contenga un alto valor nutricional (Martuscelli, et al., 2021;Souza et al.,2022). Se ha encontrado que los niños con trastorno autista tienden a tener un consumo menor de fibra insoluble y soluble en comparación con niños neurotípicos, por lo que las opciones de consumir alimentos altos en este nutriente deben ser considerada (Berding y Donovan., 2018).

Para el contenido de proteína este fue de 11.1 g/100, el cual es más bajo que otros alimentos como la soja 13 g/100, frijol 23 g/100 y garbanzo 21 g/100 (Singh et al., 2022). Las fuentes de proteínas vegetales son menos digeribles que las de animales, por lo que actualmente se estas utilizando tecnologías para mejorar la digestibilidad como pueden ser procesos de extrusión y fermentaciones (Zwinkels et al., 2023). En relación con nuestros resultados se esperaría un aumento de digestibilidad debido a que se utilizó *Rhizopus Oligospuros* en este trabajo, por lo

que una prueba de digestibilidad de proteínas sería adecuada para fines de investigación.

En cuanto el contenido de proteína es de importancia ya que se ha encontrado que debido a los desórdenes gastrointestinales asociados en TEA, la digestión de proteínas se ve disminuida debido a una baja permeabilidad del intestino causada por la inflamación mediada por interleucinas, lo que causaría también una menor expresión de disacaridasas y peptidasas, incrementando el contenido de azúcares simples y sustratos de proteínas, los cuales podrían aumentar los metabolitos de bacterias que produzcan amonio y sulfatos (Sanctuary et al., 2018). Como se mencionan antecedentes, la dieta en niños autistas es baja en proteínas proveniente de alimentos de origen animal (carne y pollo) lo cual podría estar relacionada a la baja tolerancia de estos, por lo que se han sugerido estrategias para integrarlas y otras fuentes de proteína dentro de su plan de alimentación (Mathew et al. 2022).

Tabla 6. Composición química de la cascarilla, vaina e ingrediente de cacao

Parámetro	(C)	(V)	CV 2:1
Lípidos	10.9 ± 1.6 ^a	0.2 ± 0.2 ^b	9.2 ± 1.5 ^a
Proteínas	14.4 ± 0.9 ^a	8.2 ± 1.6 ^b	11.1 ± 1.1 ^b
Cenizas	6.9 ± 0.8 ^a	8.2 ± 0.4 ^a	8.1 ± 1.2 ^a
Humedad	5.3 ± 0.2 ^a	5.9 ± 0.1 ^b	5.1 ± 0.1 ^a
Carbohidratos	62.7 ± 2.3 ^b	77.5 ± 1.3 ^a	66.5 ± 2.5 ^b
Fibra dietaria total	36.2 ± 0.7 ^c	48.3 ± 4.1 ^a	46.8 ± 2.2 ^b
Fibra Insoluble	24.9 ± 0.7 ^c	41.9 ± 1.8 ^b	40.8 ± 3.2 ^b
Fibra Soluble	5.19 ± 0.0 ^a	4.5 ± 2.3 ^a	5.6 ± 1.0 ^b

Cascarilla (C), vaina fermentada (V), ingrediente (CV, 2:1); Cada valor representa la media ± la desviación de tres experimentos independientes por triplicado. Los resultados se muestran como porcentaje de muestra en base seca. Letras diferentes por renglón indican diferencia significativa entre muestras (Tukey, α 0.05)

6.2 composición nutraceútica

En la **Tabla 7** se presenta la composición de contenido total de fenoles y de los flavonoides, así como de la capacidad antioxidante. La cascarilla obtuvo mayor contenido de fenoles totales 2.49 mgEq de ácido gálico/g respecto a la vaina fermentada y el ingrediente ($p < 0.05$).

Tabla 7. Composición nutraceútica y capacidad antioxidante de la cascarilla, vaina e ingrediente CV 2:1

Componente	(C)	(V)	CV 2:1
Fenoles totales ¹	2.5 ± 0.1 ^a	2.2 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.0 ^{ab}
Flavonoides totales ²	905.6 ± 0.7 ^a	319.7 ± 2.0 ^c	431.6 ± 0.7 ^b
ABTS ³	2846.5 ± 1.7 ^a	2791.2 ± 7.5 ^b	2790.7 ± 5.2 ^b
DPPH ³	2152.7 ± 1.6 ^b	2152.6 ± 3.1 ^b	2167.0 ± 5.5 ^a

Cascarilla (C), vaina fermentada (V), ingrediente (CV, 2:1); Cada valor representa la media ± la desviación de tres experimentos independientes por triplicado. ¹ mgEq de ácido gálico para fenoles/g de muestra. ² µg equivalentes de rutina/g muestra. ³ mgET/g de muestra. Letras diferentes por renglón indican diferencia significativa entre las tres muestras (Tukey, α 0.05).

Los flavonoides son uno de los compuestos importantes en la cascarilla siendo unos de los principales catequinas, epicatequinas y quercetinas. Estos bioactivos dentro de esta matriz alimentarias son responsables de las actividades biológicas y su consumo tiene efectos benéficos en la salud, actuando como antioxidantes por medio de la eliminación de radicales libres por lo que ayudan a reducir el estrés oxidativo (Vauzour *et al.*, 2010).

En los fenoles encontrados en vaina fermentada se obtuvo una cantidad de 2195 µg EAG/g, que es menor a la cascarilla. En relación con los resultados

obtenidos Nieto-Figueroa., (2019) reportó para vaina sin fermentar fenoles totales de 2559 g EAG/g utilizando un proceso de secado por microondas. En cuanto a contenido de flavonoides en nuestra muestra de vaina fermentada se encontraron 4500 µg rutina/g, siendo también este mayor a lo reportado por Nieto-Figueroa (1360 µg rutina/g).

Para el caso de la vaina una manera de aumentar la cantidad de fenoles y la capacidad antioxidante es utilizar métodos de secado óptimos. Nguyen *et al.*, (2022) encontró que utilizando microondas (720 W en 0.83 h) puede retener niveles más alto de fenoles totales (12.12 mgEq de ácido gálico/g), lo que contribuirá a obtener una mayor capacidad antioxidante. Este mismo caso ocurre para la cascarilla, ya que al momento de aplicar microondas por 5 min a una temperatura de 97 °C se obtuvo hasta una concentración de 35.9 mg GAE/g, relacionado al aumento de capacidad antioxidante. Es importante considerar que cada matriz alimentaria es única y se pueden encontrar diferentes concentraciones de compuestos que influyan en la capacidad antioxidante; en nuestro trabajo estos resultados varían debido a los métodos de extracción y procedencia de cultivo (Campos-Vega et al., 2018).

Estos resultados pueden ser debidos a la fermentación de la vaina por *Rhizopus Oligosporus*, comentado anteriormente que esta fermentación puede aumentar valores nutricionales, se ha visto que también puede aumentar compuestos polifenólicos. Anteriormente Zamorano-Mendoza., (2021), aplicó la fermentación sólida tipo-tempe para aumentar el valor nutricional de la vaina de cacao utilizando como cultivo iniciador con *Rhizopus Oryzae*, método utilizado en el presente trabajo. El autor menciona que al llegar a las 18 h de fermentación las cantidades de fenoles y flavonoides incrementan debido a la fermentación y metabolismo del hongo; por lo que puede en el transcurso del tiempo, estos se van liberando.

Por su parte Hur et al., (2018), utilizó *Rhizopus Oligosporous* en Quinoa, y con esto logró duplicar la cantidad de fenoles en 5 días (41 mg EAG/kg a 80 mg EAG/kg). Por lo tanto se puede considerar variar las condiciones de fermentación,

como puede ser una variable del tiempo, la cual podría aplicarse para aumentar el contenido de compuestos fenólicos (Gimeno Creus, 2004).

En referente a nuestro ingrediente (CV 2:1), la composición de fenoles fue similar en comparación de las muestras de vaina fermentada y cascarilla. Siendo para fenoles 2400 µg EAG/g. El cacao es un alimento de origen vegetal alto en fenoles, junto a otros como té, café, aceite de oliva. Estos atribuyen propiedades organolépticas a los alimentos actuando como es el aporte de calidad, aceptabilidad y calidad, y más importante como antioxidantes (Creus.,2004). Para el contenido de flavonoides el ingrediente mostro una cantidad de 4500 µg rutina/g. Se debe considerar que estos resultados varían dependiendo del tipo de extracción y método utilizado (Rebollo-Hernanz et al., 2021).

La cantidad de polifenoles también puede variar dependiendo del tipo de cacao, por ejemplo, Criollo puede tener poco o nada de antocianinas, mientras que Forastero puede tener una mayor cantidad de epicatequina, así como el origen geográfico, madurez (puesto que los polifenoles se acumulan en las células; Jean-Marie et al., 2021). En cuanto a su importancia dentro de TEA, los compuestos polifenólicos provenientes de la dieta, pueden regular o bien tener un efecto sobre la composición de la microbiota intestinal del huésped, ya que este puede convertirlos en compuestos bioactivos con peso molecular más pequeños que pudiera regular el metabolismo (Wang et al., 2022).

En la **Tabla 7** también se muestra la capacidad antioxidante evaluado por dos métodos colorimétricos DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) y (ABTS) Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina- bencenosulfónico-6). Para la cascarilla se obtuvo la en una capacidad antioxidante evaluada con DPPH de 3322.15 mgEq Trolox/g y para ABTS se obtuvo 5762.43 mgEq Trolox/g. Estos resultados pueden ser debido a la cantidad de polifenoles que contiene la cascarilla. Otro factor importante es el tamaño de partícula, esto se muestra en el estudio de Botella-Martínez et al., (2021), en el cual se utilizaron diferente tamizajes, encontrando que menor partícula (<417 µm) mismo que se utilizó en el presente trabajo, se encontró

mayor capacidad antioxidante para DPPH y ABTS en comparación de tamizajes tamaño de partículas de ($>701 \mu\text{m}$) e intermediarios ($<417 \mu\text{m}$ a $<701 \mu\text{m}$).

En cuanto a la muestra de vaina fermentada, al evaluarse con el método de DPPH se encontró una capacidad antioxidante de 3316.62 mgEq Trolox/g mientras que con el método de ABTS se encontró mayor capacidad antioxidante (5728.27 mg ET/g). Nieto-Figueroa, (2020) comparó la capacidad antioxidante de vaina de cacao sin fermentar, tratadas con diferentes métodos de secado (microondas, flujo de aire y extrusión), obteniendo una mayor capacidad antioxidante con el método de ABTS en la muestra tratada con secado en microondas (222.7 μM Trolox), por lo que sugiere que los procesos y tratamientos de la vaina tendrían un efecto en la capacidad antioxidante; por lo tanto, podríamos utilizar el método de microondas y de extrusión juntas para aumentar la liberación de polifenoles y por tanto, de la capacidad antioxidante.

Para el caso de la vaina una manera de aumentar la cantidad de fenoles y la capacidad antioxidante es utilizar métodos de secado óptimos. Nguyen *et al.*, (2022) encontró que utilizando microondas (720 W en 0.83 h) puede retener niveles más alto de fenoles totales 12.12 mgEq de ácido gálico/g, lo que contribuirá a obtener una mayor capacidad antioxidante. Este mismo caso ocurre para la cascarilla, ya que al momento de aplicar microondas por 5 min a una temperatura de 97 °C se obtuvo hasta una concentración de 35.9 mg GAE/g, relacionado al aumento de capacidad antioxidante. Es importante considerar que cada matriz alimentaria es única y se pueden encontrar diferentes concentraciones de compuestos que influyan en la capacidad antioxidante; en nuestro trabajo estos resultados varían debido a los métodos de extracción y procedencia de cultivo (Campos-Vega *et al.*, 2018).

En cuanto a la capacidad antioxidante en nuestro ingrediente, no se encontró diferencia significativa en comparación de la vaina fermentada y la cascarilla. Los resultados obtenidos para DPPH fueron 3329.86 mgEq Trolox/g y para ABTS 5744.79 mgEq Trolox/g. Es importante mencionar que los procesos

térmicos y de almacenamiento pueden ser un factor importante en la causa de disminución de algunos compuestos fenólicos (Van de Velde *et al.* 2022)

6.3 Bioaccesibilidad in vitro de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante durante la digestión gastrointestinal

En la **Tabla 8** se muestra la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) del ingrediente durante la simulación gastrointestinal *in vitro*. La bioaccesibilidad se define como la cantidad de compuestos que son liberados de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y están disponibles para ser absorbidos (Dima *et al.* 2020). Respecto al ingrediente los resultados muestran una mayor bioaccesibilidad en la boca y estómago respecto al contenido de fenoles antes de iniciar el proceso de digestión con un 374.50% y 408.61% ($p < 0.05$) respectivamente. Estos resultados pueden ser debido a la liberación del compuesto por el proceso mecánico y de masticación, así como de la enzimas que contiene la saliva principalmente de la α -amilasa la cual comienza con la hidrólisis de carbohidratos (Sensoy *et al.*, 2021).

Durante la etapa del intestino delgado la bioaccesibilidad entre el minuto 15 y 30 vario, siendo de 325.84% y 279.25%, respectivamente ($p < 0.05$). Durante la digestión gastrointestinal algunos de los polifenoles del alimento se liberan en cada etapa, especialmente en el yeyuno y el íleon del intestino delgado aunque realmente solo el 5-10% son absorbidos, el resto puede llegar al colon, ser utilizadas por bacterias y luego ser excretados por las heces (Chen *et al.*, 2018).

Los factores que pueden afectar la bioaccesibilidad de estos compuestos son propiamente del tipo de bioactivos, el tipo de alimento o producto, el estado sólido, la digestibilidad de las enzimas y su absorción hacia los enterocitos (Parada y Aguilera., 2007).

La fracción digerible (FD) se considera aquella fracción de compuestos que son permeables en el intestino delgado (representado en el ensayo con la membrana de nitrocelulosa), por lo que la permeabilidad intestinal implica el transporte de compuestos de la luz intestinal a través de la membrana. Los factores que tiene un mayor impacto en esto incluyen la microbiota intestinal, integridad de la mucosa y las células epiteliales, respuestas inmunes y motilidad intestinal (Gianni, 2019).

Los métodos colorimétricos para la capacidad antioxidante mostraron mayor capacidad con el método de DPPH siendo la etapa del intestino delgado (FND) significativamente más alta en el minuto 15 ($p < 0.05$). Mientras que para ABTS se obtuvo mayor capacidad en las etapas del intestino delgado con (FND) en los minutos 15 y 30 ($p < 0.05$), estos resultados pueden estar relacionados a la cantidad de compuestos polifenólicos durante la digestión.

No existen trabajos previos de la bioaccesibilidad de este ingrediente, pero de si de la vaina de cacao sin fermentar y de la cascarilla de cacao. Por ejemplo, Nieto-Figueroa., (2020) evaluó la vaina sin fermentar utilizando diferentes métodos de secado y sometido a simulación gastrointestinal con el método utilizado en este trabajo, los fenoles totales y flavonoides no fueron detectados en el estómago, pero la mayoría de ellos fueron liberados en el intestino delgado. Rebollo-Hernanz et al., (2021) evaluó la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de la cascarilla de cacao teniendo tanto la harina como el extracto, encontrando para la harina de cascarilla de cacao menor cantidad de polifenoles que se liberaron durante la simulación gastrointestinal, atribuyendo esto a la presencia de fibra en la harina, por lo que existen más compuestos fenólicos ligados a este, el autor recomienda realizar como tratamientos mecánicos, térmicos y de extrusión. Por su parte

Campos-Vega *et al.*, (2018) menciona que en la etapa de intestino delgado se tienen los valores más altos de bioaccesibilidad de compuestos fenólicos.

Los polifenoles son grupos bioactivos que se han estudiado por su capacidad

Etapa	Fenoles ¹	Flavonoides ²	ABTS ³	DPPH ³
Boca	9.80 ± 0.00 ^a	251.41 ± 2.20 ^e	54.15 ± 3.51 ^{cd}	155.35 ± 0.00 ^f
Estómago	9.18 ± 0.70 ^a	266.83 ± 5.58 ^e	55.91 ± 6.43 ^{cd}	169.68 ± 1.47 ^g
Intestino delgado <i>Fracción digerible (FD)</i>				
0	0.73 ± 0.00 ^d	20.96 ± 0.81 ^g	70.42 ± 0.01 ^b	184.40 ± 2.10 ^e
15	0.65 ± 0.00 ^d	1.05 ± 0.13 ^h	73.25 ± 0.58 ^{ab}	184.54 ± 0.66 ^d
30	0.69 ± 0.06 ^d	3.17 ± 0.13 ^{gh}	76.55 ± 0.13 ^a	184.53 ± 0.00 ^d
60	0.67 ± 0.00 ^d	40.77 ± 1.63 ^f	75.41 ± 0.93 ^a	196.22 ± 1.21 ^c
Intestino delgado <i>Fracción no digerible (FND)</i>				
0	5.00 ± 0.10 ^c	750.77 ± 11.42 ^d	57.36 ± 3.12 ^c	199.26 ± 0.04 ^{abc}
15	7.82 ± 0.10 ^c	635.53 ± 6.46 ^c	52.48 ± 0.00 ^d	202.07 ± 1.37 ^a
30	6.54 ± 0.05 ^c	1049.45 ± 0.23 ^b	55.91 ± 5.60 ^c	200.62 ± 1.34 ^{ab}
60	4.84 ± 2.57 ^c	1661.10 ± 0.86 ^a	56.35 ± 0.17 ^{cd}	197.59 ± 2.89 ^{bc}

para poder prevenir enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes y cáncer; así como también tienen un efecto en modular la microbiota intestinal ya que modulan las bacterias a través de un efecto prebiótico, actividad antimicrobiana y actuar contra bacterias patógenas (Cardona *et al.* 2013). Esto es de gran importancia en TEA, dada la disbiosis colónica que presente en este espectro.

Tabla 8. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante del ingrediente durante la digestión gastrointestinal *in vitro* del ingrediente

Cada valor representa la media de dos ensayos independientes por triplicado ± DE. mgEq de ácido gálico/g de muestra¹. µgEq de rutina/g². Se muestra el porcentaje (%) respecto al contenido de compuesto bioactivo antes de la digestión. mM Eq Trolox/g de muestra³. Letras diferentes en cada columna expresan diferencia estadística. (α=0,05, prueba de Tukey

En la **Tabla 9** se muestra el contenido de compuestos fenólicos por HPLC del ingrediente (CV 2:1) y las etapas de simulación gastrointestinal *in vitro*. Los fenoles mayoritarios principales del ingrediente fueron teobromina, hidroxifenilacético catequina, epicatequina, rutina y ácido cúmarico. Rojo-Poveda *et al.*, (2020) reporta que la teobromina es la principal metilxantina encontrada en cascarilla, con 0.39 a 1.83 mg/100 g, resultados similares a los reportados en nuestro trabajo.

Tabla 9. Perfil fenólico del ingrediente (CV 2:1) y su bioaccesibilidad durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

MUESTRA	Hidroxifenilacético	Ác. Sinápico	Ác. gálico	Teobromina	Dihidroxilbenzoico	Cafeína	Catequina	Epicatequina	Rutina
CV 2:1	1708.2±3.02 ^a	62.29± 0.4 ^a	ND	115.77 ± 0.00 ^a	45.52 ± 0.00 ^a	0.082 ± 0.16	648.16± 0.28 ^f	874.17± 0.09 ^a	319.53 ± 0.02
Boca	356.63±0.07 ^b	ND	183.35±1.96 ^b	25.71 ± 9.49 ^d	ND	ND	66.03 ± 0.14 ^h	ND	ND
Estómago	625.77± 0.49 ^c	0.81± 0.02 ^b	71.12±0.31 ^e	42.14 ± 2.02 ^b	16.12 ± 0.03 ^c	ND	285.38 ± 0.35 ^d	5.90 ± 0.00 ^e	ND
<i>Intestino delgado FND</i>									
0	260.04 ± 0.00 ^d	0.05 ± 0.06 ^{de}	110.84 ± 0.36 ^d	18.04 ± 3.07 ^f	18.91 ± 0.03 ^b	ND	315.71 ± 0.25 ^b	16.47 ± 1.33 ^b	ND
15	417.41 ± 1.27 ^e	0.33 ± 0.00 ^{cd}	124.05 ± 0.05 ^c	28.53 ± 4.14 ^c	11.44 ± 0.03 ^d	ND	308.69 ± 0.21 ^c	8.84 ± 0.06 ^d	ND
30	328.50 ± 0.09 ^f	0.05 ± 0.14 ^e	118.34 ± 0.02 ^c	22.78 ± 0.24 ^e	10.50 ± 0.02 ^e	ND	310.76 ± 0.67 ^{bc}	11.81 ^c	ND
60	205.06 ± 0.95 ^g	ND	118.34 ± 0.02 ^c	14.40 ± 2.76 ^g	ND	ND	222.64 ± 1.09 ^e	ND	ND
<i>Intestino delgado FD</i>									
0	0.56 ± 0.0 ^k	2.46±0.15 ^b	0.24±1.44 ^j	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	2.28 ± 33.6 ^j	308.89± 1.08 ^a	6.89±0.0 ^g	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	4.11 ± 7.38 ^h	ND	2.75±0.0 ⁱ	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Cada valor representa la media ± la desviación de dos experimentos independientes por duplicado. Los resultados se muestran como µg/g. Letras diferentes por renglón indican diferencia significativa entre muestras (Tukey, α 0.05). ND= No detectable.

En cuanto a la digestión gastrointestinal, el ácido hidroxifenilacético mostró un contenido mayor en la etapa de la boca ($p<0.05$), seguido del intestino delgado al minuto 0, también se detectó ácido gálico, el cual debido a la masticación en boca pudiera liberar una parte de este compuesto (Aloo et al., 2023). En la etapa intestinal la catequina obtuvo una mayor concentración en el tiempo 0 y 15 ($p<0.05$). Se ha reportado la máxima absorción de catequina a los 30 y 60 minutos después del consumir 500 mL de té verde observándose, que después de esto la concentración comienza a disminuir (Kivits et al., 2009). El ácido gálico mostró tener una mayor concentración en la etapa bucal ($p<0.05$), y en mayor cantidad al minuto 15 de la etapa intestinal.

Para la fracción digerible (permeabilidad), el compuesto fenólico absorbido en mayor concentración fue el ácido gálico ($p<0.05$) en el minuto 30 de la etapa intestinal. En tanto a las funciones del ácido gálico, este ha mostrado tener efectos benéficos para regular la disbiosis de la microbiota, actuando como antimicrobiano contra bacterias patógenas, responsables de aumentar la severidad de alteraciones gastrointestinales como son la diarrea e inflamación. Las bacterias incluyen *Escherichia. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus mutans*, *Chromobacterium violaceum*, *Campylobacter jejuni*, y *Listeria monocytogenes* (Shao et al., 2015; Sorrentino et al., 2018). Relacionado a esto, el estudio Edalatmanesh et al., (2018), se enfocó en ver los efectos del ácido gálico en un modelo de autismo en ratas durante el embarazo; los resultados mostraron una mejoría en el aprendizaje motor y también en el equilibrio, por lo que sugieren el uso de este compuesto para aliviar síntomas relacionados al autismo.

En cuanto a la teobromina, se encontró mayor porcentaje en el estómago, mientras que en la etapa intestinal su concentración disminuyó en el minuto 60. Se ha propuesto que la teobromina tiene efectos benéficos hacia la salud cognitiva, protegiendo células nerviosas así como de actividades antiinflamatorias (Carbajal-Valenzuela et al., 2022).

Los flavonoides se absorben selectivamente en el tracto gastrointestinal después de la administración oral. Las catequinas se absorben desde el intestino delgado y aún en exceso pasan al colon, en el intestino delgado, se conjugan con ácido glucurónico, sulfato o por metilación (Koirala et al., 2016). Algunos de ellos siguen un proceso de recirculación enterohepática (deben pasar por el hígado) después pasan al colon y son degradados en diferentes anillos de flavonoides por los microorganismos presentes (Chu *et al.*, 2018). La epicatequina fue uno de los principales compuestos del ingrediente, pero al pasar por la digestión, este solo llegó a ser detectado al minuto 30 del intestino delgado de la fracción no digerible. La epicatequina es el principal monómero flava-3-ol en los granos de cacao, se metaboliza después de la absorción a glucurónidos, sulfatos y formas O-metiladas por enzimas de fase II durante la transferencia a través del intestino delgado y el hígado (Rodríguez-Mateos *et al.*, 2014)

Los polifenoles naturales tienen algunos efectos benéficos con las enfermedades o trastornos neurodegenerativo debido a su capacidad antioxidante, incluso se ha reportado recientemente que pueden tener un posible efecto en el eje intestino- microbiota-cerebro, siendo estos enfocados en controlar los síntomas gastrointestinales y por lo tanto de comportamiento (Wong *et al.*, 2021). Algunos de los flavonoides como quercetina y luteolina, han mostrado que tienen capacidad antioxidante y propiedades antiinflamatorias; aunque es importante mencionar que no todos estos compuestos pueden atravesar la barrera hematoencefálica, pero están presente en grandes cantidades en el lumen del intestino, hasta el día de hoy existe poca evidencia de los potenciales beneficios de los polifenoles y su efecto en TEA (Pangrazzi et al., 2020).

6.3.1 Permeabilidad de los compuestos fenólicos y flavonoides de la digestión gastrointestinal *in vitro*

La **Tabla 10** muestra la permeabilidad durante la simulación gastrointestinal. En este trabajo utilizamos una membrana de nitrocelulosa (permeabilidad aparente) en lugar del intestino delgado invertido (medida *ex vivo*). Considerando el lado basolateral como FD y el apical como FND. Artursson, Palm y Luthman (2001), consideran el coeficiente de $P_{app} < 1 \times 10^{-7}$ cm/s y $P_{app} > 1 \times 10^{-6}$ cm/s para alta y baja permeabilidad, respectivamente. De acuerdo con nuestros resultados para fenoles totales se tiene una alta permeabilidad en el tiempo 60 desde el transporte apical hacia basolateral (A a B) y basolateral hacia apical (B a A); también la tabla muestra la permeabilidad de los flavonoides, con alta permeabilidad de A a B pero con baja permeabilidad de B a A. Ocampo-Luzardo *et al.*, (2017) determinaron previamente la P_{app} de compuestos fenólicos a partir de hojuelas de maíz y frijol, mostrando un alto coeficiente de P_{app} , similar a este trabajo.

Tabla 10. Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de fenoles y flavonoides del Ingrediente (CV 2:1)

Componente	t (min)	P_{app} A a B ($\times 10^{-3}$)	P_{app} B a A ($\times 10^{-3}$)	P_{appnet} ($\times 10^{-3}$)
Fenoles totales	15	0.43 ± 0.05^a	5.14 ± 0.08^a	5.57 ± 0.13^a
	30	0.22 ± 0.00^b	2.08 ± 0.14^b	2.30 ± 0.14^b
	60	0.11 ± 0.00^b	1.11 ± 0.00^c	1.11 ± 0.00^c
Flavonoides totales	15	0.02 ± 0.00^b	14.65 ± 0.32^a	14.67 ± 0.30^a
	30	0.04 ± 0.00^b	11.84 ± 0.03^b	11.88 ± 0.01^a
	60	0.21 ± 0.01^a	9.72 ± 0.00^c	9.93 ± 1.30^b

P_{app} se expresa como la media ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1} \times 10^{-3}$) \pm desviación estándar de al menos dos experimentos independientes. Transporte de P_{app} apical (A a B) basolateral y al lado opuesto (P_{app} B a A). Las diferencias estadísticas entre tiempos están representadas por letras diferentes ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

6.4 Fermentación *in vitro* de la fracción no digerible en niños autistas y neurotípicos

En la **Tabla 11** se muestran los diferentes pH de la fermentación colónica *in vitro* tomadas durante 24 h, para esto se utilizaron 6 diferentes muestras, se incubó la FND de la digestión *in vitro* con las muestras fecales de niños diagnosticados con TEA así como de niños neurotípicos (NTO). Se consideraron a la saliva de la digestión como blanco negativo y como control positivo se utilizó inulina, ya que se ha reportado que este carbohidrato es fermentable a nivel colónico y es considerado un prebiótico (Teferra, 2021).

Para los resultados con el ingrediente en ambas muestras tanto NTO y TEA, se observó una leve disminución en el pH sin ser diferente significativamente después de las 6 h, aunque estos volvieron a aumentar ligeramente sin diferencia significativa al pasar a 12 y 24 horas. Las diferencias se muestran por renglón en los diferentes tiempos de fermentación y por columna la diferencia entre los grupos bajo las mismas condiciones. Para las muestras para control positivo NTO y TEA, solo se observó disminución del pH a las 6 h ($p < 0.05$), contrario para TEA los valores no mostraron diferencias.

Para el caso de los controles negativos, se observó una disminución en todos los tiempos de incubaciones obteniendo. En el caso del ingrediente se obtuvo un pH más bajo en las 6 y 12 h solo con la mezcla de inóculo TEA ($p < 0.05$); para la muestra de NTO con inulina se observa esto, solamente después de las 6 horas. En cuanto a la diferencia de columnas las muestras con inulina en ambos casos (TEA y NTO) fueron diferentes (con pH más bajo), después de las horas 6, 12 y 24 h ($p < 0.05$).

Tabla 11. Efecto de la fermentación colónica *in vitro* sobre el pH en muestras fecales provenientes de niños TEA y NTO

Muestra	0 h	6 h	12 h	24 h
NTO (Control -)	7.19 ± 0.08 ^{Aa}	6.87 ± 0.01 ^{Ca}	7.22 ± 0.00 ^{Aa}	7.14 ± 0.00 ^{Ba}
NTO (Control +)	7.17 ± 0.01 ^{Aa}	6.25 ± 0.00 ^{Cb}	4.96 ± 0.00 ^{Cb}	4.01 ± 0.00 ^{Db}
NTO +ING	7.26 ± 0.00 ^{Aa}	6.88 ± 0.00 ^{Ba}	7.11 ± 0.01 ^{Aa}	7.29 ± 0.01 ^{Aa}
TEA (Control +)	7.38 ± 0.00 ^{Aa}	7.03 ± 0.02 ^{Aa}	7.44 ± 0.43 ^{Aa}	7.26 ± 0.01 ^{Aa}
TEA (Control -)	7.19 ± 0.00 ^{Aa}	5.86 ± 1.45 ^{Db}	4.68 ± 0.26 ^{ABb}	4.14 ± 0.01 ^{Bb}
TEA + ING	7.25 ± 0.05 ^{Aa}	6.93 ± 0.00 ^{Ba}	7.00 ± 0.01 ^{Ba}	7.20 ± 0.00 ^{Aa}

Cada valor representa la media de dos experimentos por duplicado ± DE. Letras mayúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fermentación por muestra ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey). Letras minúsculas diferentes por columnas expresan diferencia significativa entre grupos bajo las mismas condiciones ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey). NTO= Neurotípico. TEA= Trastorno Espectro Autista.

Los cambios del pH en las muestras con el ingrediente pueden ser debido a la utilización de sustrato por parte de las bacterias en las primeras horas, explicando que esto sucede durante el crecimiento de bacterias cuando son agregadas a un nuevo medio y por lo tanto necesitan tiempo para adaptarse. Este proceso se le conoce como fase del retraso del crecimiento donde durante la fase logarítmica (log) exponencial donde las bacterias crecerán y se dividirán con un tiempo de duplicación (2^n), al pasar el tiempo las bacterias dejan de crecer por falta de metabolitos, entrando así a la fase estacionaria para dejar de dividirse (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020; Murray, 2019)

El pH es un indicador de la fermentación, ya que influye sobre el crecimiento de los microorganismos, siendo que algunas bacterias tienen preferencia en desarrollarse a un pH alrededor de (>5), mientras que otras se desarrollan a pH más bajos (1.0), aunque se considera un pH óptimo de crecimiento dentro de un rango de 6.0 a 8.5, por lo que el colón es un ambiente favorable para el crecimiento de microorganismos, ya que el pH para colón es de alrededor de 8.0 (Ukuku *et al.*, 2015; Vásquez *et al.*, 2012). Las bacterias que se encuentran en el colon utilizan los carbohidratos para producir AGCC y otros compuestos que influyen en el pH, por lo que el pH obtenido durante fermentación podría estar relacionado con la producción de estos compuestos (Annunziata *et al.*, 2020).

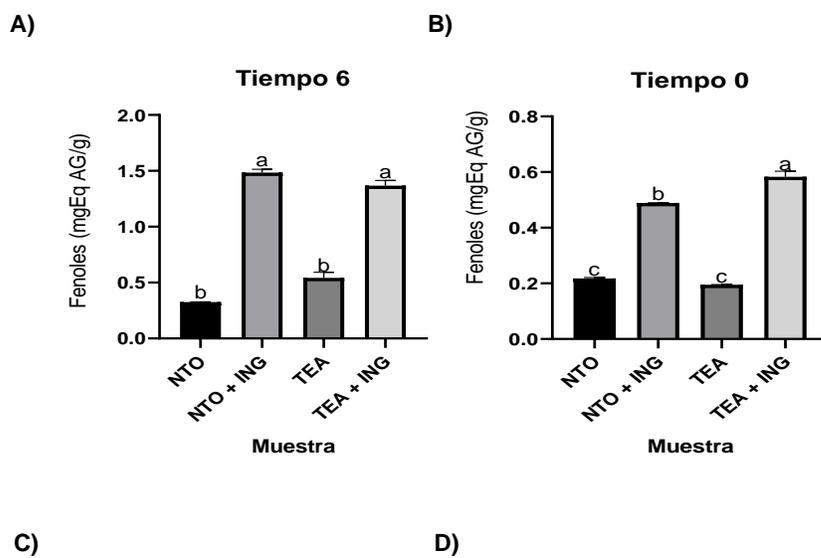
La poca disminución de pH por parte del ingrediente en ambas muestras puede deberse a que el ingrediente no es altamente fermentable al contener mayor cantidad de fibra insoluble y menor soluble. La muestra TEA + ING presenta una disminución significativa ($p < 0.05$) después del tiempo 6 y 12 h; mientras que, la muestra NTO + ING se observa una baja de pH con diferencia estadística solo en después del tiempo 6 h, lo que podría estar relacionado con la microbiota colónica de cada muestras. Era de esperar que, para las muestras con inulina, ambas obtuvieran una disminución similar de hasta 2 unidades de pH hasta llegar al tiempo 12 h, por lo que el tipo de fibra a fermentar debe ser considerado.

La inulina es un carbohidrato altamente fermentable en colon, además produce una proporción molar más alto de ácido butírico/acético. En cuanto a microorganismos, la inulina disminuye a *Bacteroides* e incrementa familias de bacterias como *Bifidobacterium* (Le Bastard et al., 2020). Otro factor importante para considerar es que debido a que la fermentación *in vitro* se considera como todo proceso y no de las partes de él, esto tiene relación producción AGCC, donde se reporta que la mayor producción es en la parte proximal con hasta 40% (Wang et al., 2019).

6.5 Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y flavonoides durante la fermentación colonica *in vitro*

La **Figura 5** muestra la bioaccesibilidad de fenoles durante los tiempos de fermentación. Cabe menciona que las muestras con inulina no son incluidas dado que esta muestra no contiene este tipo de compuestos y dado que las técnicas pueden reaccionar con compuestos diferentes a los de naturaleza fenólica, los resultados serían no confiables. En la **(Fig. 5A)** tiempo 0 h, corresponde a la bioaccesibilidad de fenoles (mgEq de ácido gálico/g muestra) reportado en la etapa intestinal. Al finalizar la fermentación, el contenido de fenoles disminuyó en las muestras TEA+ING hasta un 48.93% ($p < 0.05$) respecto la etapa previa de digestión. En el tiempo 6 h se muestra que tanto NTO+ING como TEA+ING

aumenta la bioaccesibilidad hasta un 45.14% (**Fig.5B**). En los tiempos 12 y 24 h se observa que los compuestos fenólicos disminuyen alrededor de 22% en ambas muestras TEA y NTO (**Fig.5C y Fig.5D**).



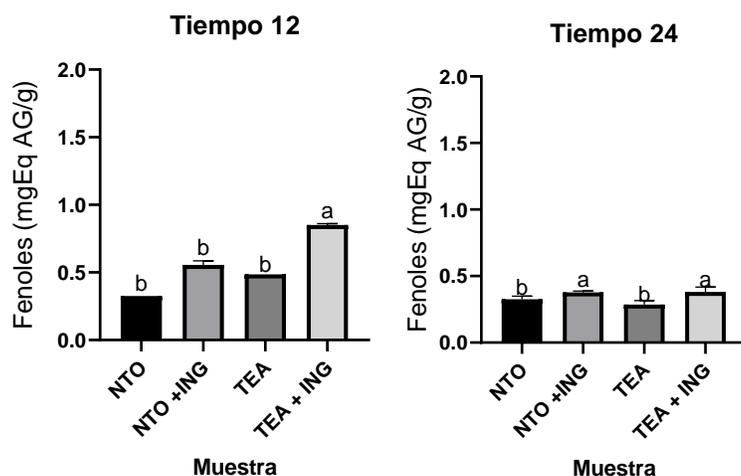
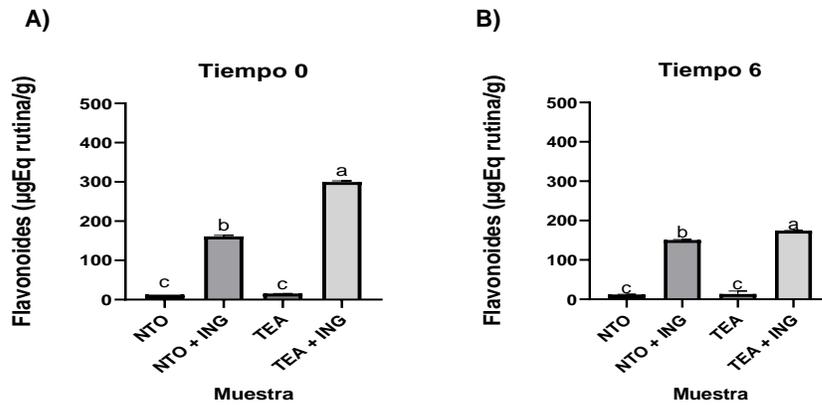


Figura 5. Bioaccesibilidad de fenoles durante la fermentación colónica *in vitro* del ingrediente. Cada valor representa la media de dos experimentos por triplicado \pm DE. Letras diferentes por barra expresan diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fermentación por muestra los resultados se muestran como mgEq de ácido gálico/g de muestra ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey). A):Tiempo 0, B): Tiempo 6 C): Tiempo 12, D): Tiempo 24.

La cantidad de fenoles no liberados de la matriz, en especial aquellos que están unidos por enlaces covalentes a las matrices del alimento, no son liberados o bien transformados por las enzimas digestiva, pero si logran llegar al colon en menor cantidad, donde llegan y son metabolizados por las enzimas presentes (Wojtunik-Kulesza *et al.* 2020). Estos resultados son similares a los reportados por Zhang *et al.*, (2023) quién encontró que durante la fermentación colónica del salvado de trigo, la cantidad de fenoles disminuyó de las 3 h a las 6 h , del 25 al 19.22 %, y obteniendo la menor cantidad a las 24 h. Otro estudio utilizó granos de café tostados, en donde se encontró que la mayor cantidad de compuestos fenólicos se encontraban en la etapa gástrica, mientras que para la parte colónica estos apenas fueron identificados, posiblemente por que fueron metabolizados por la microbiota (Wu *et al.* 2022).

Para la bioaccesibilidad de flavonoides, en la **Figura 6** se observa que en el tiempo 0 h, (**Fig.6A**) se presenta una mayor bioaccesibilidad en la muestra TEA+ING (69.41%) ($p < 0.05$), seguido de NTO+ING (33.37%). Similar que, para el contenido de fenoles, los flavonoides disminuyeron conforme el paso de la fermentación. A partir de las 6 h (**Fig.6B**) la bioaccesibilidad en TEA + ING disminuyo (17.22%). En cuanto a las muestras con NTO + ING estos aumentaron en las horas 6,12 y 24 (**Fig.6B,6C,6D**) con un porcentaje de hasta 34.93%.



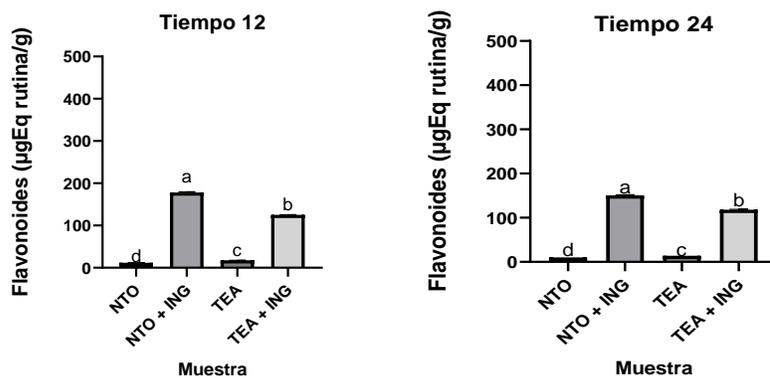


Figura 6. Bioaccesibilidad de flavonoides del ingrediente durante la fermentación colónica *in vitro*. Cada valor representa la media de dos experimentos por duplicado \pm DE. Letras mayúsculas diferentes por barra expresan diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fermentación por muestra los resultados se muestran y μg de rutina eq./g de muestra ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey). A): Tiempo 0, B): Tiempo 6 C): Tiempo 12, D): Tiempo 24.

Los flavonoides son hidrolizados por las enzimas que se encuentran en el colon, ya que eliminan los glucósidos que se encuentran unidos, y finalmente son utilizados de esta forma por el organismo (Ishaq *et al.*, 2021). El metabolismo de los compuestos fenólicos en el colon está regulado también por los microorganismos presentes, ya que son encargados de producir las enzimas y metabolizar muchos de los compuestos fenólicos (Cardona *et al.*, 2013).

Por ejemplo, *Clostridium* and *Eubacterium* están involucradas en el metabolismo de isoflavononas, flavonoles como la quercetina de flavan-3-oles como a la catequina y la epicatequina. Para el caso de *Firmicutes*, este grupo contiene menor cantidad de enzimas degradadoras de glicanos en comparación con *Bacterioides*, por lo que se puede sugerir que la diferente ingesta de ciertos polifenoles puede modular la microbiota, por lo que el contenido de estos en nuestro ingrediente pueden tener un efecto modulador (Mahowald *et al.*, 2009; Selma *et al.*, 2009).

Bifidobacteria y *Lactobacillus* que son considerados probióticos, promueven la producción de los catabolitos de los flavonoides para que estén más biodisponibles. En el proceso de transformación de los flavonoides, el rompimiento o bien la hidrólisis de estos compuestos, se incluyen los procesos de desmetilación y deshidroxilación, como se mencionó anteriormente la acción de la producción de enzimas de estas bacterias, mejoraría la absorción de los flavonoides (Naeem et al., 2022).

La Importancia de que los flavonoides se encuentren más biodisponibles, es debido a su efecto para disminuir alteraciones gastrointestinales, siendo la inflamación una de los principales factores para desarrollarlas, la mayoría de los flavonoides tienen la capacidad de inhibir la inflamación (Yan et al., 2020). La quercetina por ejemplo, puede inhibir interleucinas asociadas a la inflamación (TNF - α - dependiente a la NF- κ B), con el objetivo de disminuir la incidencia de tumores gastrointestinales (Hosseinzadeh & Nassiri-Asl, 2014). En general la interacción de los flavonoides con la microbiota es de gran importancia, ya que esto podría regular una disbiosis y además promover el crecimiento de bacterias probióticas (Yan et al., 2020).

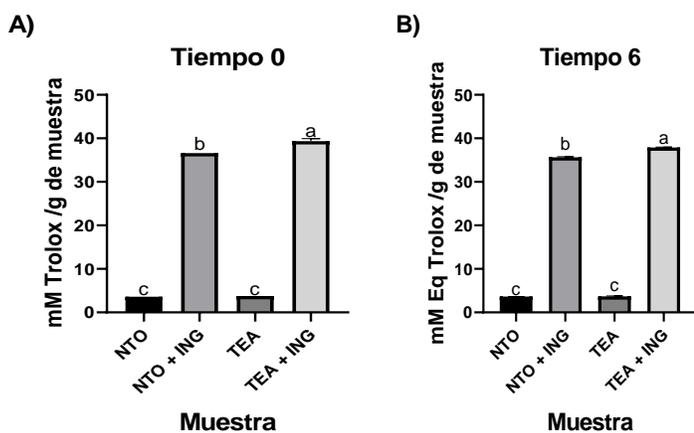
6.7 Capacidad antioxidante del ingrediente durante la fermentación colónica in vitro

La **Figura 7 y 8** muestran la capacidad antioxidante, evaluada por medio de las dos técnicas ABTS y DPPH, durante la fermentación colónica *in vitro*. La capacidad antioxidante aumenta a través del tiempo, posiblemente debido al contenido de compuestos fenólicos que llegan al colón y su liberación por las enzimas bacterianas.

El método de ABTS (**Fig.7**) mostró los resultados mayores de capacidad antioxidante con las muestras incubadas del ingrediente respecto a las muestras con el control negativo ($p < 0.05$). En tanto, en todos los tiempos de incubación, se observó una tendencia similar al no encontrar variación entre estos. Algo

interesante fue el resultado de comparar a las muestras de niños neurotípicos y a los niños autistas con el ingrediente, ya que, en todas las horas, la capacidad antioxidante en las muestras de los niños autistas fue mayores respecto a los neurotípicos.

El método con la técnica de DPPH (**Fig.8**) mostro una mayor capacidad antioxidante después del tiempo 0 h (**Fig. 98**), de igual manera, las muestras con TEA+ING, fueron mayores estadísticamente respecto a NTO + ING ($p<0.05$). A las 6 h (**Fig. 8B**) la muestra de niños neurotípicos, disminuyo estadísticamente respecto a los autistas con ingrediente ($p<0.05$). Después del tiempo 12 h (**Fig. 8C**) las muestras mostraron un comportamiento diferente, al aumentar NTO+ING respecto al TEA+ING. Para el tiempo 24 h (**Fig. 8D**) ambas muestras con ingrediente mostraron no tener diferencia significativa entre ellas.



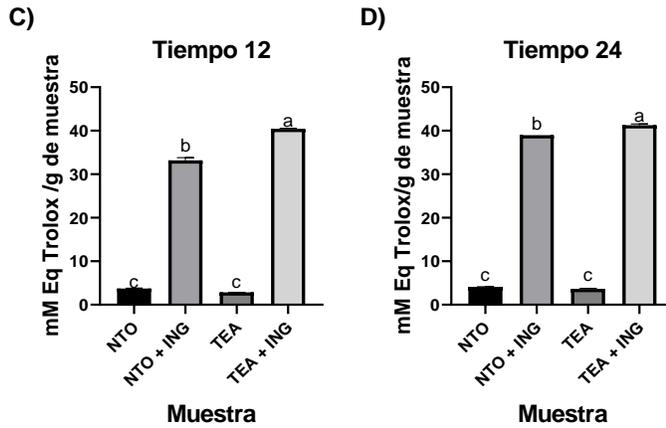
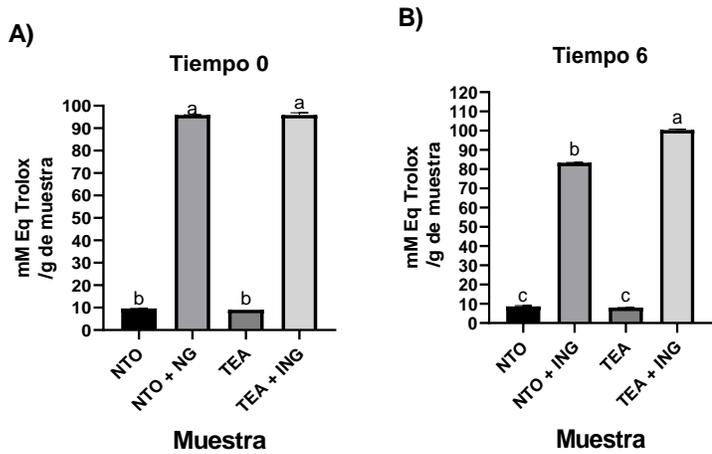


Figura 7. Capacidad Antioxidante por ABTS durante la fermentación colónica *in vitro*

Cada valor representa la media de dos experimentos por triplicado \pm DE. Letras mayúsculas diferentes por barra expresan diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fermentación por muestra los resultados se muestran como mM Equivalente de Trolox/g de muestra ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey). A): Tiempo 0, B): Tiempo 6 C): Tiempo 12, D): Tiempo 24



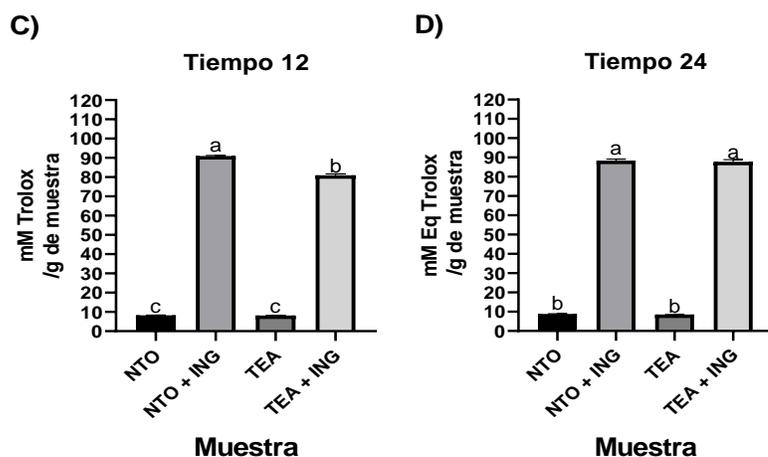


Figura 8. Capacidad Antioxidante por DPPH durante la fermentación colónica *in vitro*

Cada valor representa la media de dos experimentos por triplicado \pm DE. Letras mayúsculas diferentes por barra expresan diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fermentación por muestra los resultados se muestran como mM Eq Trolox /g de muestra ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey). A): Tiempo 0, B): Tiempo 6 C): Tiempo 12, D): Tiempo 24

Los polifenoles se encuentran unidos a la fibra dietaria y no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas, pero si ser metabolizados por las enzimas de las bacterias colónicas. Algunos estudios sugieren que las bacterias del colon pueden transformar los compuestos fenólicos en otros compuestos fenólicos que contengan menor capacidad antioxidante (Vaz et al., 2022). Similar a los resultados reportados a este trabajo, se evaluó la bioaccesibilidad y la capacidad antioxidante de café en grano tostado, la mayor capacidad antioxidante fue durante la etapa del intestino delgado, mientras que, al llegar a la etapa del colon, la capacidad antioxidante disminuyó. El autor menciona que estos resultados son debido a las interacciones entre metabolitos y residuos en las muestras de fermentación (Wu et al., 2022).

La composición de la microbiota y su interacción con los antioxidantes, juegan un papel importante en la regulación y homeostasis de la microbiota colónica, para así tener una diversidad de microorganismo que puedan aumentar la producción de metabolitos a través del colon (Naliyadhara et al., 2023).

Cada individuo posee una diferente microbiota, por lo tanto, contiene diferentes familias de bacterias, la liberación y la concentración de compuestos antioxidantes sería variado, nuestros resultados muestran que el ingrediente en la microbiota de los niños autistas tuvieron una mayor capacidad antioxidante durante la fermentación, específicamente después del tiempo 6h, por lo que podría significar que el contenido de compuestos antioxidantes de nuestro ingrediente está siendo utilizado por los microorganismos que se encuentran en su microbiota colónica, teniendo así un posible efecto para regular la disbiosis.

6.7.1 Perfil fenólico durante la fermentación colónica por HPLC

En la **Tabla 12** se muestran los compuestos fenólicos que llegaron al colon después de la digestión *in vitro* siendo los principales la catequina con mayor concentración después del tiempo 6 h de la incubación ($p < 0.05$). Se detectó también la presencia del ácido gálico, aunque con menor concentración respecto a la digestión gastrointestinal ($p < 0.05$).

Es importante mencionar que los datos son la muestra incubada de la muestra fecal solamente con TEA. Para comparar resultados, ya que no se encuentra otro trabajo con la misma matriz alimenticia de nuestro trabajo, se comparará con los subproductos del cacao. Para la cascarilla de cacao, por ejemplo, Cañas et al., (2022), evaluó que le sucedía a los compuestos fenólicos

durante la simulación gastrointestinal y colónica, utilizando como muestra la harina de cascarilla de cacao. Se encontró que la harina obtuvo un mayor porcentaje de bioaccesibilidad de metilxantinas (compuestos mayoritarios de la cascarilla) a nivel colónico, mientras que los flavonoides tendieron a ser más bioaccesibles (mayor porcentaje) en las etapas de digestión GI, especialmente en la fase oral y gástrica. Debido a estos resultados los autores sugieren que la matriz alimentaria toma un papel importante al proteger los compuestos fenólicos durante la digestión.

Otro de los factores que afectan la bioaccesibilidad de los compuestos es su unión con la fibra dietaria, lo cual puede afectar la liberación de estos en el intestino delgado, pero a la vez puede ayudar a que los compuestos fenólicos lleguen a ciertas partes del colon, donde se metabolizan y absorben a través de los enterocitos. Por lo tanto el tamaño de partícula y tipo de fibra pueden tener un impacto en aumentar o disminuir la bioaccesibilidad (Rocchetti et al., 2022).

La absorción total de los polifenoles es del (5-10%) en comparación con otros nutrientes; el restante (90-95%) de los polifenoles pueden pasar a la luz intestinal del colon y acumularse, desde ahí pueden conjugarse con otros compuestos, ser excretados por la bilis y ser metabolizados por las enzimas de la microbiota intestinal (Faria *et al.* 2014). Estas interacciones pueden proteger la salud del colon como combatir desordenes gastrointestinales y proteger del efectos de patógenos, procesar nutrientes, aumentar la respuesta inmune a través de las citoquinas, y no solo eso, sino que la microbiota puede utilizar los polifenoles a metabolitos que puedan tener una mayor actividad biológica (Selma *et al.* 2009).

En relación con la epicatequina, este es un flavonol presente en los polifenoles de la dieta, encontrándose mayormente en frutas, te, vino y chocolate. Estos se metabolizan a varios compuestos O-sulfatados, O-glucuronizados y O-metilados. Para que puedan ser absorbidos es necesario pasar de la epicatequina a catequina, para que las bacterias del colon puedan utilizarlos y así producir conjugados con el ácido propiónico (Meselhy et al., 1997; Ozdal et al., 2016).

La mayoría de las catequinas son degradadas por la microbiota, por lo que una dieta rica en catequinas puede aumentar las bacterias benéficas, también puede mejorar las deficiencias cognitivas, reducir estrés oxidante mediante la eliminación de radicales, prevenir el daño del ADN y disminuir el deterioro cognitivo (Baba *et al.* 2020).

Tabla 12. Perfil fenólico durante la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del ingrediente de subproductos de cacao incubado con muestras colónicas de niños con TEA.

Compuesto	Tiempo de fermentación colónica (horas)			
	F0	F6	F12	F24
Ác. Sinápico	0.01±0.07 ^b	ND	0.14±0.09 ^b	0.50±0.43 ^a
Ác. gálico	25.32±0.05 ^a	4.77±0.12 ^d	12.60±0.00 ^c	18.60±0.06 ^b
Catequina	67.40±0.13 ^c	439.60±0.02 ^a	153.82±0.07 ^b	29.77±1.09 ^d
Epicatequina	0.64 ± 0.01 ^c	ND	82.55±0.02 ^a	68.07±0.04 ^b
Epigalocatequina galato	ND	0.16 ± 0.00	ND	ND
Ác. Siringico	ND	ND	ND	ND
Ác. Cumárico	0.27±0.00	ND	ND	ND

Cada valor representa la media ± la desviación de dos experimentos independientes por duplicado. Los resultados se muestran como µg/g. Letras diferentes por renglón indican diferencia significativa entre muestras (Tukey, α 0.05). ND= No detectable.

6.8 Actividad de la ureasa en las muestras de la fermentación colónica *in vitro*

La **Figura 9** muestra el porcentaje de actividad de ureasa en las muestras de fermentación colónica, en donde se tomó como 100% de actividad a las muestras de NTO. En la **(Fig.9A)** se muestra la actividad de ureasa en las muestras TEA y NTO en ausencia de muestra fermentable. Se observa que en todas las horas TEA muestra una mayor actividad de la enzima, respecto a la

muestra de NTO ($p < 0.05$). Los resultados sugieren que la enzima ureasa esta activa en ambas muestras, siendo mayor en TEA. Esta enzima lleva a cabo la hidrólisis de la urea en dos moléculas de NH_4^+ (amonio) y CO_2 (dióxido de carbono) (Gleich, 2013). Se ha reportado que el amonio se encuentra en mayores concentraciones en muestras fecales en niños autistas que niños neurotípicos ($p < 0.05$), esto nos puede dar una idea del porque la actividad de ureasa se está mostrando con alto porcentaje en el grupo con TEA.

Existen numerosas razones que pudieran elevar el amonio, pero una de las causas en niños con TEA, es la disbiosis gastrointestinal presente, refiriéndose a un desbalance entre las bacterias benéficas y las bacterias patógenas, además de las alteraciones en su alimentación, mencionado anteriormente en antecedentes (Vanwong et al., 2017). El exceso de amonio se asocia con problemas a nivel neurológicos, ya que este compuesto tóxico puede pasar la barrera hematoencefálica, agravando así los síntomas del autismo (Mussap et al., 2020).

Además de que esto tiene relación con las bacterias intestinales que están presentes, algunos síntomas y la gravedad de estos están asociados a un sobrecrecimiento de *Clostridia* spp; la presencia de esta bacteria es mayor en niños con TEA que en NTO. Entre las bacterias productoras de ureasa se encuentran mayormente las bacterias gran-negativas como *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Clostridium Perfringens*, encontrándose con alto índice en niños con TEA (Vanwong et al. 2017)

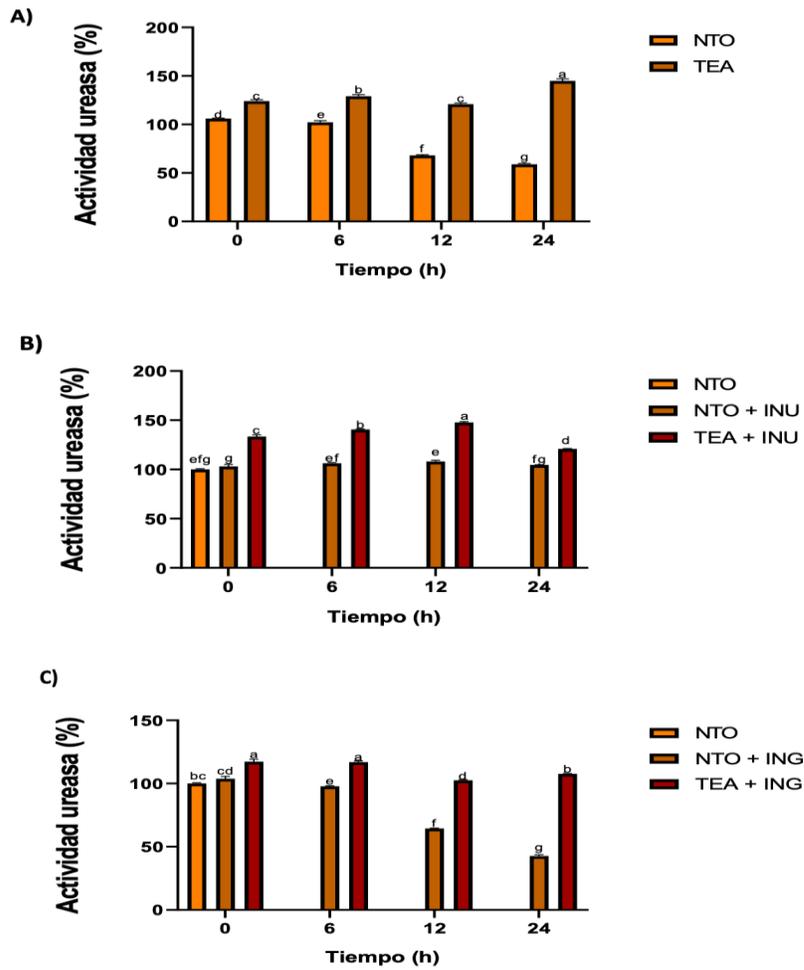


Figura 9. Actividad enzimática de la ureasa en muestras de la fermentación colónica *in vitro*. A) Muestras de niños neurotípico y autistas sin ING. B) Muestras de niños autista y neurotípicos con INU (inulina). C) Muestras de niños neurotípicos y autistas con ING. Los resultados se expresan como porcentaje (%) de actividad y son la media de 2 experimentos independientes por triplicado \pm DE. Letras diferentes por barra significan diferencia estadística entre muestras ($p < 0.05$) prueba de Tukey. NTO= Neurotípico. TEA= Trastorno Espectro Autista.

Los resultados para el efecto de inulina sobre la actividad de ureasa se muestran en la **(Fig.9B)**, comparando el control (NTO), las muestras TEA y NTO con inulina. Se observa que la adición de inulina incrementó la actividad de ureasa en las muestras de niños con TEA en todas las horas, con un mayor porcentaje al tiempo 12 h ($p < 0.05$). Mientras que, en las muestras NTO+INU, no se observaron cambios respecto al control en todas las horas.

Como se observa la inulina tuvo poco efecto en inhibir la actividad de ureasa, resultados similares fueron reportados por de Cosío-Barrón et al., (2020), quien utilizó la prueba de ureasa en muestras fecales de sujetos con peso normal y sobrepeso, utilizando la inulina como control positivo, encontró que la inulina tenía poco efecto en inhibir a la ureasa en ambas muestras. Otro estudio utilizó leche fermentada adicionada con inulina en sujetos sanos con peso normal, no encontraron algún efecto con la inulina en cuanto a la actividad de ureasa (Sairanen et al., 2007). Hasta el momento no se ha encontrado información que explique la elevación de la actividad de ureasa al colocar como sustrato inulina.

También se ha evaluado el efecto de inulina en la actividad de ureasa en muestras fecales de ratas alimentadas con diferentes tipos de fibra; la de salvado de centeno (insoluble) y la inulina (soluble). Ambas fibras aumentaron a la actividad de ureasa, sin diferencia ($p > 0.05$); los autores concluyen que la solubilidad de las fibras no obtuvo un impacto en la actividad metabólica de esta enzima (Gråsten *et al.* 2002).

Los estudios sugieren el uso de probióticos, prebióticos y simbióticos (combinación de ambos) en niños con TEA, puesto que tienen un impacto positivo en regular la microbiota; además de tener un impacto en disminuir las concentraciones de amonio, con lo que estaría relacionado al incremento de

bacterias benéficas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Duque et al., 2021). Como conclusión, el efecto de la inulina en la actividad de ureasa ha sido poco investigado, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, por lo que se recomienda realizar estudios posteriores para conocer este efecto, así como de los factores que pudieran influir.

El efecto del ingrediente sobre la actividad de ureasa se muestra en la **(Fig. 9C)**. En cuanto a las muestras con NTO+ING, este logró disminuir la actividad de ureasa respecto al control en todos los tiempos (recordando que el control es NTO). Mientras que para las muestras TEA+ING, se presentó una actividad de ureasa similar a la del control (NTO), por lo que se sugiere que el ingrediente tiene un efecto benéfico al reducir la producción de ureasa y posiblemente de amonio en muestras fecales de niños con TEA.

Regresando a las consideraciones dietarias de los niños con TEA, presentan alteraciones en la digestión de proteínas, causadas por diversos factores (como la inflamación intestinal, el tipo de bacterias que habitan o la poca producción de enzimas que digieren a las proteínas en el intestino). Un factor muy importante es que bacterias como *Clostridia*, *Desulfovibrio* y *Bacteroidetes* que se encuentran presentes en niños con TEA, digieren proteínas y generan metabolitos por un proceso llamado putrefacción, en donde se genera amoníaco, fenoles, sulfuros y aminos biogénicas que son perjudiciales para la salud intestinal (Sanctuary et al., 2018).

Se ha sugerido que los niños con TEA presentan desregulaciones del metabolismo de purinas; esto en relación que las bacterias intestinales tienen un papel en el metabolismo de las purinas y el ácido úrico (Dai et al., 2023). La hiperuricemia además se ha correlacionado con efectos adversos, como hipertensión, enfermedad cardiovascular, diabetes y también con síntomas de trastornos clínicos (Sukasem, 2017).

La urea es utilizado como metabolitos de bacterias en el colon, las cuales tienen ureasas para degradarlo, este último es utilizado para síntesis de proteínas, se reabsorbe por el huésped, y es incorporado a nitrógeno por el metabolismo

hepático y excretado en heces (Shen et al., 2015). El amoníaco es el principal producto de la fermentación de aminoácidos en el intestino, mencionado en los resultados de composición proximal, nuestro ingrediente contiene un alto porcentaje de proteínas. El exceso de fermentación de proteínas pueden llevar a aumentar este compuesto (Romero-Gómez et al., 2009). Sin embargo, esto puede ser regulado si existen suficientes carbohidratos y bacterias sacarolíticas que puedan reducir la cantidad de este metabolito (Macfarlane et al., 2012).

Por lo que, a pesar de los efectos benéfico sobre ureasa, se recomendaría realizar posteriormente un perfil de proteínas y aminoácidos a nuestro ingrediente, así como la producción de amoníaco. Es interesante mencionar que es ingrediente, a pesar de su contenido de proteínas, logró disminuir la actividad de ureasa. Esto puede deberse en gran medida, a que el ingrediente presentó contener una alta cantidad de carbohidratos, fibra y compuestos fenólicos que pudieran estar regulando la microbiota colónica, y que esto mismo pudieran ya tener efectos mayores de salud, como disminuir bacterias que estén relacionadas a la producción de enzimas ureasas y por tanto, de amonio.

VII. CONCLUSIONES

El ingrediente a base de subproductos de cacao y cascarilla mostró tener una alta cantidad de carbohidratos y fibra dietaria en especial de la fibra insoluble. Los compuestos polifenólicos del ingrediente a base de vaina fermentada con *Rhizopus oligosporus* y cascarilla de cacao, mostraron durante la digestión y fermentación colonica *in vitro*, ser bioaccesibles. En etapa de colon, los compuestos importantes que fueron liberados fueron la catequina y epicatequina, por lo que podría tener un efecto potencialmente benéfico a la salud de la microbiota colónica.

Uno de los resultados más importantes fue el de nuestro ingrediente y su efecto en disminuir la actividad de ureasa (hasta llegar a tener un porcentaje similar al de un niño neurotípico), por lo que además de tener antioxidantes que lleguen al colon, también lo tendría en poder disminuir las concentraciones altas de actividad de ureasa y por tanto de amonio, por lo que esto podría indicar crecimiento de bacterias benéficas.

Hoy en día las terapias nutricionales dentro el TEA incluyen tener en la alimentación alimentos altos en fibra, prebióticos y probióticos, así como de compuestos antioxidantes. El ingrediente puede ser añadido a una formulación de un alimento sólido completo que los niños con TEA que puedan incluir en su alimentación, tomando en consideración las preferencias de alimentos, como son la tolerancia, el olor, la textura y el sabor.

A pesar de los resultados presentados, es recomendable realizar futuras investigaciones, como ampliar el perfil de compuestos fenólicos del ingrediente, así como de ensayos específicos para comprobar su posible efecto prebiótico en el microbiota de niños autistas.

REFERENCIAS

- A. Vaz, A., Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., & Martín-Belloso, O. (2022). Physicochemical properties and bioaccessibility of phenolic compounds of dietary fibre concentrates from Vegetable By-Products. *Foods*, 11(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/foods11172578>
- Adams, J. B., Audhya, T., Geis, E., Gehn, E., Fimbres, V., Pollard, E. L., Mitchell, J., Ingram, J., Hellmers, R., Laake, D., Matthews, J. S., Li, K., Naviaux, J. C., Naviaux, R. K., Adams, R. L., Coleman, D. M., & Quig, D. W. (2018). Comprehensive nutritional and dietary intervention for autism spectrum disorder—a randomized, controlled 12-month trial. *Nutrients*, 10(3), E369. <https://doi.org/10.3390/nu10030369>
- Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D., & Rubin, R. A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterology*, 11, 22. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-22>
- Agropecuarios, A. de S. a la C. y D. de M. (s/f). “Cacao Grijalva” del Estado de Tabasco. gob.mx. Recuperado el 6 de agosto de 2023, de

<http://www.gob.mx/aserca/articulos/sabiasque-el-cacao-de-tabasco-tiene-denominacion-de-origen?idiom=es>

- Agus, B. A. P., Mohamad, N. N., & Hussain, N. (2018). Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malaysia. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2581–2589. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9875-4>
- Akbar, A., & Shreenath, A. P. (2023). High fiber diet. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559033/>
- Alali, M., Alqubaisy, M., Aljaafari, M. N., Alali, A. O., Baqais, L., Molouki, A., Abushelaibi, A., Lai, K. S., & Lim, S. H. E. (2021). Nutraceuticals: Transformation of conventional foods into health promoters/disease preventers and safety considerations. *Molecules*, 26(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules26092540>
- Alareefy, A. A. E. H. (2018). Assessment of nutritional risk factors predisposing to autism among Saudi children. *International Journal on Nutraceuticals, Functional Foods and Novel Foods*. <https://www.nutrafoods.eu/index.php/nutra/article/view/66>
- Alcalá, G. C., Ochoa Madrigal, M. G., Alcalá, G. C., & Ochoa Madrigal, M. G. (2022). Trastorno del espectro autista (TEA). *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 65(1), 7–20. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2022.65.1.02>
- Alegría, A., Garcia-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static Digestion Models: General Introduction. En K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland,

- T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models*. Springer.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500174/>
- Ali, A., Riaz, S., Sameen, A., Naumovski, N., Iqbal, M. W., Rehman, A., Mehany, T., Zeng, X.-A., & Manzoor, M. F. (2022). The disposition of bioactive compounds from fruit waste, their extraction, and analysis using novel technologies: a review. *Processes*, *10*(10), Article 10.
<https://doi.org/10.3390/pr10102014>
- AL-Ishaq, R. K., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2021). Enzymatic metabolism of flavonoids by gut microbiota and its impact on gastrointestinal cancer. *Cancers*, *13*(16), 3934. <https://doi.org/10.3390/cancers13163934>
- Alkaissi, A., & Ghawadra, S. (2015). Association between autism spectrum disorder and iron deficiency in children diagnosed autism spectrum disorder in the Northern west bank. *Journal of Health, Medicine and Nursing*, *Vol.16*, 1–10.
- Al-Kindi, N. M., Al-Farsi, Y. M., Al-Bulushi, B., Ali, A., Rizvi, S. G. A., & Essa, M. M. (2020). Food selection and preferences of omani autistic children. *Advances in Neurobiology*, *24*, 505–523. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30402-7_16
- Aloo, S.-O., Ofosu, F. K., Kim, N.-H., Kilonzi, S. M., & Oh, D.-H. (2023). Insights on dietary polyphenols as Agents against metabolic disorders: obesity as a Target Disease. *Antioxidants*, *12*(2), 416.
<https://doi.org/10.3390/antiox12020416>

- An, H. M., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, J. R., Cha, M. K., Lee, S. W., Lim, H. T., Kim, K. J., & Ha, N. J. (2011). Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. In high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*, *10*(1), 116. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-116>
- Aprotosoie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *15*(1), 73–91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>.
- AOAC (2002) Official method of analysis. 16th edition, association of official analytical, Washington DC.
- AOAC (2005) Official method of analysis. 18th edition, association of officiating analytical chemists, Washington DC, Method 920.085, 920.105, 925.23 and 996.01
- Baba, Y., Inagaki, S., Nakagawa, S., Kaneko, T., Kobayashi, M., & Takihara, T. (2020). Effect of daily intake of green tea catechins on cognitive function in middle-aged and older subjects: a randomized, placebo-controlled study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(18), 4265. <https://doi.org/10.3390/molecules25184265>
- Bandini, L. G., Anderson, S. E., Curtin, C., Cermak, S., Evans, E. W., Scampini, R., Maslin, M., & Must, A. (2010). Food selectivity in children with autism spectrum disorders and typically developing children. *The Journal of Pediatrics*, *157*(2), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.02.013>

- Bener, A., Khattab, A. O., Bhugra, D., & Hoffmann, G. F. (2017). Iron and vitamin D levels among autism spectrum disorders children. *Annals of African Medicine*, 16(4), 186–191. https://doi.org/10.4103/aam.aam_17_17
- Berding, K., & Donovan, S. M. (2018). Diet can impact microbiota composition in children with autism spectrum disorder. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00515>
- Blaak, E. e., Canfora, E. e., Theis, S., Frost, G., Groen, A. k., Mithieux, G., Nauta, A., Scott, K., Stahl, B., van Harselaar, J., van Tol, R., Vaughan, E. e., & Verbeke, K. (2020). Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Beneficial Microbes*, 11(5), 411–455. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>
- Borre, Y. E., O’Keeffe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20(9), 509–518. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.05.002>
- Botella-Martínez, C., Lucas-Gonzalez, R., Ballester-Costa, C., Pérez-Álvarez, J. Á., Fernández-López, J., Delgado-Ospina, J., Chaves-López, C., & Viuda-Martos, M. (2021). Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean shells coproducts: effect of particle size on chemical composition, bioactive compound content and antioxidant activity. *Agronomy*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020401>

- Burne, R. A., & Chen, Y.-Y. M. (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection*, 2(5), 533–542. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00312-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00312-9)
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018a). Cocoa (Theobroma cacao L.) pod husk: renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>
- Campos-Vega, R., Oomah, B. D., & Vergara, H. (2020). *Food Wastes and By-products*. <https://doi.org/10.1002/9781119534167>
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. a., Guzman-Maldonado, S. h., Paredes-Lopez, O., Oomah, B. d., & Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and In vitro polysaccharide fermentation of different beans (Phaseolus vulgaris L.). *Journal of Food Science*, 74(7), T59–T65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x>
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (Coffea arabica L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>
- Cañas, S., Rebollo-Hernanz, M., Braojos, C., Benítez, V., Ferreras-Charro, R., Dueñas, M., Aguilera, Y., & Martín-Cabrejas, M. A. (2022). Gastrointestinal fate of phenolic compounds and amino derivatives from the cocoa shell: An

in vitro and in silico approach. *Food Research International*, 162, 112117.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112117>

- Carbajal-Valenzuela, I. A., Apolonio-Hernandez, N. M., Gutierrez-Chavez, D. V., González-Arias, B., Jimenez-Hernandez, A., torres-Pacheco, I., Rico-García, E., Feregrino-Pérez, A. A., & Guevara-González, R. G. (2022). Chapter 5—Biological macromolecules as nutraceuticals. En A. K. Nayak, A. K. Dhara, & D. Pal (Eds.), *Biological Macromolecules* (pp. 97–138). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85759-8.00001-4>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- CDC. (2022). *Signs & Symptoms | Autism Spectrum Disorder (ASD) | NCBDDD | CDC*. Centers for disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/signs.html>
- Cekici, H., & Sanlier, N. (2019). Current nutritional approaches in managing autism spectrum disorder: a review. *nutritional neuroscience*, 22(3), 145–155. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1358481>
- Chen, L., Cao, H., & Xiao, J. (2018). 2 - Polyphenols: Absorption, bioavailability, and metabolomics. En C. M. Galanakis (Ed.), *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 45–67). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00002-6>

- Chen, Y., Xu, J., & Chen, Y. (2021). Regulation of neurotransmitters by the gut microbiota and effects on cognition in neurological disorders. *Nutrients*, 13(6), 2099. <https://doi.org/10.3390/nu13062099>
- Chojnowska, S., Baran, T., Wilińska, I., Sienicka, P., Cabaj-Wiater, I., & Knaś, M. (2018). Human saliva as a diagnostic material. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.11.002>
- Chudzik, A., Orzyłowska, A., Rola, R., & Stanisiz, G. J. (2021). Probiotics, prebiotics and postbiotics on mitigation of depression symptoms: modulation of the brain–gut–microbiome axis. *Biomolecules*, 11(7), 1000. <https://doi.org/10.3390/biom11071000>
- Collins, J. T., Nguyen, A., & Badireddy, M. (2022). Anatomy, abdomen and pelvis, small intestine. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366/>
- Corzo, N., Alonso, J., Azpiroz, F., Calvo, A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F., Ruas-Madiedo, P., Rupérez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M., & Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutricion hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*, 31, 99. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31sup1.8715>
- Cotabarren, I. M., & Palla, C. A. (2022). Chapter 3 - Development of functional foods by using 3D printing technologies: Application to oxidative stress and inflammation-related affections. En B. Hernández-Ledesma & C. Martínez-Villaluenga (Eds.), *Current Advances for Development of Functional Foods*

- Modulating Inflammation and Oxidative Stress* (pp. 33–55). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823482-2.00009-1>
- Crowell, J. A., Keluskar, J., & Gorecki, A. (2019). Parenting behavior and the development of children with autism spectrum disorder. *Comprehensive Psychiatry*, *90*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2018.11.007>
- Dai, S., Lin, J., Hou, Y., Luo, X., Shen, Y., & Ou, J. (2023). Purine signaling pathway dysfunction in autism spectrum disorders: Evidence from multiple omics data. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *16*, 1089871. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1089871>
- De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2016). Lactobacillus SPP.: General Characteristics. En *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00851-9>
- de Cosío-Barrón, A. C. G., Hernández-Arriaga, A. M., & Campos-Vega, R. (2020). Spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds positively modulate indicators of colonic microbial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *60*, 102286. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102286>
- de Souza, P. A., Moreira, L. F., Sarmiento, D. H. A., & da Costa, F. B. (2018). Cacao—Theobroma cacao. En S. Rodrigues, E. de Oliveira Silva, & E. S. de Brito (Eds.), *Exotic Fruits* (pp. 69–76). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00010-1>
- Delgado-Ospina, J., Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. Á., Martuscelli, M., & Chaves-López, C. (2021). Bioactive compounds and techno-functional properties of high-fiber co-products of the

cacao agro-industrial chain. *Heliyon*, 7(4), e06799.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06799>

Delgado-Ospina, J., Martuscelli, M., Grande-Tovar, C. D., Lucas-González, R.,

Molina-Hernandez, J. B., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-

Álvarez, J. Á., & Chaves-López, C. (2021). Cacao pod husk flour as an

ingredient for reformulating frankfurters: effects on quality properties. *Foods*,

10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/foods10061243>

Dima, C., Assadpour, E., Dima, S., & Jafari, S. M. (2020). Bioavailability and

bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by

in vitro methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*

Safety, 19(6), 2862–2884. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12623>

Ding, H. T., Taur, Y., & Walkup, J. T. (2017). Gut microbiota and autism: key

concepts and findings. *Journal of Autism and Developmental Disorders*,

47(2), 480–489. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2960-9>

Duque, A. L. R. F., Demarqui, F. M., Santoni, M. M., Zanelli, C. F., Adorno, M. A.

T., Milenkovic, D., Mesa, V., & Sivieri, K. (2021). Effect of probiotic,

prebiotic, and synbiotic on the gut microbiota of autistic children using an in

vitro gut microbiome model. *Food Research International*, 149, 110657.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110657>

Durk, R. P., Castillo, E., Márquez-Magaña, L., Grosicki, G. J., Bolter, N. D., Lee, C.

M., & Bagley, J. R. (2019). Gut microbiota composition is related to

cardiorespiratory fitness in healthy young adults. *International journal of*

sport nutrition and exercise metabolism, 29(3), 249–253.

<https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0024>

Edalatmanesh, M. A., & Samimi, P. (2018). The Effect of gallic acid on motor learning and cerebellar level of brain derived neurotrophic factor in a rat model of autism. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*, 6(4), 5–13.

<https://doi.org/10.29252/shefa.6.4.5>

Faria, A., Fernandes, I., Norberto, S., Mateus, N., & Calhau, C. (2014). Interplay between anthocyanins and gut microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6898–6902. <https://doi.org/10.1021/jf501808a>

Fattorusso, A., Di Genova, L., Dell'Isola, G. B., Mencaroni, E., & Esposito, S. (2019). Autism spectrum disorders and the gut microbiota. *Nutrients*, 11(3), 521. <https://doi.org/10.3390/nu11030521>

Ferguson, B. J., Marler, S., Altstein, L. L., Lee, E. B., Akers, J., Sohl, K., McLaughlin, A., Hartnett, K., Kille, B., Mazurek, M., Macklin, E. A., McDonnell, E., Barstow, M., Bauman, M. L., Margolis, K. G., Veenstra-VanderWeele, J., & Beversdorf, D. Q. (2017). Psychophysiological associations with gastrointestinal symptomatology in autism spectrum disorder. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 10(2), 276–288. <https://doi.org/10.1002/aur.1646>

Fernandez, C. L. (2003). *Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental—salud ambientales residuos peligrosos biológico-infecciosos—clasificación y especificaciones de manejo*. 17.

- Fombonne, E., Marcin, C., Manero, A. C., Bruno, R., Diaz, C., Villalobos, M., Ramsay, K., & Nealy, B. (2016). Prevalence of autism spectrum disorders in Guanajuato, Mexico: The Leon survey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(5), 1669–1685. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2696-6>
- Freitas, A., Escaramboni, B., Carvalho, A., Lima, V., & Oliva-Neto, P. (2014). Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *Oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. *Chemical Papers*, 68(4). <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0466-x>
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- García-Cordero, J., Pino, A., Cuevas, C., Puertas-Martín, V., San Román, R., & de Pascual-Teresa, S. (2021). Neurocognitive effects of cocoa and red-berries consumption in healthy adults. *Nutrients*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.3390/nu14010001>
- Ghoddusi, H. B., & Tamime, A. Y. (2014). Microflora of the intestine | Biology of Bifidobacteria. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of food Microbiology (Second Edition)* (pp. 639–645). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00208-1>
- Graziani C, Talocco C, De Sire R, Petito V, Lopetuso LR, Gervasoni J, Persichilli S, Franceschi F, Ojetti V, Gasbarrini A, Scaldaferri F. Intestinal permeability in physiological and pathological conditions: major determinants and

assessment modalities. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Jan;23(2):795-810. doi: 10.26355/eurrev_201901_16894. PMID: 30720188.

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Jimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*, 23(6), 80–84.

Giraldo Torres, L. R., Restrepo de Mejía, F., & Arboleda Sánchez, V. A. (2018). Trastorno del espectro autista, electroencefalografía y neuronas espejo. *Acta Neurológica Colombiana*, 34(3), 215–222. <https://doi.org/10.22379/24224022215>

Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60, undefined-undefined. <https://doi.org/10.1093/cid/civ072>

Gråsten, S. M., Pajari, A.-M., Liukkonen, K.-H., Karpinen, S., & Mykkänen, H. M. (2002). Fibers with different solubility characteristics alter similarly the metabolic activity of intestinal microbiota in rats fed cereal brans and inulin. *Nutrition Research*, 22(12), 1435–1444. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00473-6](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00473-6)

- Grillo, G., Boffa, L., Binello, A., Mantegna, S., Cravotto, G., Chemat, F., Dizhbite, T., Lauberte, L., & Telysheva, G. (2019). Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 115, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.057>
- Grimaldi, R., Cela, D., Swann, J. R., Vulevic, J., Gibson, G. R., Tzortzis, G., & Costabile, A. (2017). In vitro fermentation of B-GOS: Impact on faecal bacterial populations and metabolic activity in autistic and non-autistic children. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(2), Article 2. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw233>
- Güemes-Vera, N., Ríos-Pérez, F., Simental, S. S., Lira, A. Q., & Martini, J. P. (2020). Harina de cáscara de vaina de cacao: Una opción para el aprovechamiento de residuos agroindustriales. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 6(11), Article 11. <https://doi.org/10.29057/icap.v6i11.5322>
- Gur, J., Mawuntu, M., & Martirosyan, D. (2018). FFC's advancement of functional food definition. *Functional foods in health and disease*, 8, 385. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v8i7.531>
- Hernández-Hernández, C., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., Bermúdez-Oria, A., Morales, A. A., & Rodríguez-Gutiérrez, G. (2019). Cocoa bean husk: Industrial source of antioxidant phenolic extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 325–333. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9191>

- Hosseinzadeh, H., & Nassiri-Asl, M. (2014). Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of Endocrinological Investigation*, 37(9), 783–788. <https://doi.org/10.1007/s40618-014-0096-3>
- Hur, J., Nguyen, T. T. H., Park, N., Kim, J., & Kim, D. (2018). Characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) fermented by *Rhizopus oligosporus* and its bioactive properties. *AMB Express*, 8, 143. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0675-3>
- Intakes, I. of M. (US) P. on the D. of D. F. and the S. C. on the S. E. of D. R. (2001). II. DEFINITIONS OF DIETARY FIBER. En *Dietary Reference Intakes Proposed Definition of Dietary Fiber*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK223586/>
- Jean-Marie, E., Bereau, D., & Robinson, J.-C. (2021). Benefits of polyphenols and methylxanthines from cocoa beans on dietary metabolic disorders. *Foods*, 10(9), 2049. <https://doi.org/10.3390/foods10092049>
- Johnson, A., Houtti, M., Saboe, A., Koecher, K., Menon, R., & Knights, D. (2021). Whole wheat and bran cereal affects microbiome stability. *Current developments in nutrition*, 5(Suppl 2), 1162. https://doi.org/10.1093/cdn/nzab054_017
- Josué, D., Nzié, W., Ntamack, G., & Bienvenu, K. (2016). Hertz theory application in modeling and analysis of mechanical rupture force of cocoa pod. *International Journal of Mechanical Engineering and Applications*, 4, 182–188. <https://doi.org/10.11648/j.ijmea.20160405.13>

- Kamrani, P., & Sadiq, N. M. (2023). Anatomy, head and neck, oral cavity (Mouth).
En StatPearls. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545271/>
- Kandeel, W. A., Meguid, N. A., Bjørklund, G., Eid, E. M., Farid, M., Mohamed, S. K., Wakeel, K. E., Chirumbolo, S., Elsaied, A., & Hammad, D. Y. (2020). Impact of Clostridium bacteria in children with autism spectrum disorder and their anthropometric measurements. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 70(6), 897–907. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01482-2>
- Kang, D.-W., Park, J. G., Ilhan, Z. E., Wallstrom, G., LaBaer, J., Adams, J. B., & Krajmalnik-Brown, R. (2013). Reduced Incidence of prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLOS ONE*, 8(7), e68322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068322>
- Khangwal, I., & Shukla, P. (2019). Potential prebiotics and their transmission mechanisms: recent approaches. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(3), 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.02.003>
- Kivits, G., Sman, F., & Tijburg, L. (2009). Analysis of catechins from green and black tea in humans: A specific and sensitive colorimetric assay of total catechins in biological fluids. *Int J Food Sci Nutr*, 48, 387–392. <https://doi.org/10.3109/09637489709028587>
- Koirala, N., Thuan, N. H., Ghimire, G. P., Thang, D. V., & Sohng, J. K. (2016). Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.003>

- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. V., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. *Food Research International*, *82*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kontogianni, M. D., Vijayakumar, A., Rooney, C., Noad, R. L., Appleton, K. M., McCarthy, D., Donnelly, M., Young, I. S., McKinley, M. C., McKeown, P. P., & Woodside, J. V. (2020). A high Polyphenol diet Improves psychological well-being: the polyphenol intervention trial (PPhIT). *Nutrients*, *12*(8), E2445. <https://doi.org/10.3390/nu12082445>
- Kosseva, M. (2013). Functional food and nutraceuticals derived from food industry wastes. *Food Industry Wastes*, 103–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391921-2.00006-8>
- Ktenioudaki, A., & Gallagher, E. (2012). Recent advances in the development of high-fibre baked products. *Trends in Food Science & Technology*, *28*(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.004>
- Lattimer, J. M., & Haub, M. D. (2010). Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*, *2*(12), 1266–1289. <https://doi.org/10.3390/nu2121266>
- Le Bastard, Q., Chapelet, G., Javaudin, F., Lepelletier, D., Batard, E., & Montassier, E. (2020). The effects of inulin on gut microbial composition: A systematic review of evidence from human studies. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *39*(3), 403–413. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03721-w>

- Leader, G., Abberton, C., Cunningham, S., Gilmartin, K., Grudzien, M., Higgins, E., Joshi, L., Whelan, S., & Mannion, A. (2022). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a systematic review. *Nutrients*, *14*(7), 1471. <https://doi.org/10.3390/nu14071471>
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L., & Bravo, L. (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, *104*, 948–954. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.054>
- Liu, S., Li, E., Sun, Z., Fu, D., Duan, G., Jiang, M., Yu, Y., Mei, L., Yang, P., Tang, Y., & Zheng, P. (2019). Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, *9*(1), 287. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36430-z>
- Liu, X., Cao, S., & Zhang, X. (2015). Modulation of gut microbiota-brain axis by probiotics, prebiotics, and diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(36), 7885–7895. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02404>
- Liu, X., Lin, J., Zhang, H., Khan, N. U., Zhang, J., Tang, X., Cao, X., & Shen, L. (2022). Oxidative stress in autism spectrum disorder—current progress of mechanisms and biomarkers. *Frontiers in Psychiatry*, *13*, 813304. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.813304>
- Lockner, D. W., Crowe, T. K., & Skipper, B. J. (2008). Dietary intake and parents' perception of mealtime behaviors in preschool-age children with autism spectrum disorder and in typically developing children. *Journal of the*

American Dietetic Association, 108(8), 1360–1363.

<https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.05.003>

Lord, C., Brugh, T. S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., Jones, E.

J. H., Jones, R. M., Pickles, A., State, M. W., Taylor, J. L., & Veenstra-VanderWeele, J. (2020). Autism spectrum disorder. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0138-4>

Louis, P., Flint, H. J., & Michel, C. (2016). How to manipulate the microbiota: prebiotics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 902, 119–142.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_9

Lu, F., Rodriguez-Garcia, J., Van Damme, I., Westwood, N. J., Shaw, L., Robinson, J. S., Warren, G., Chatzifragkou, A., McQueen Mason, S., Gomez, L., Faas, L., Balcombe, K., Srinivasan, C., Picchioni, F., Hadley, P., & Charalampopoulos, D. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>

Lyll, K., Schmidt, R. J., & Hertz-Picciotto, I. (2014). Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. *International Journal of Epidemiology*, 43(2), 443–464. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt282>

Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International*, 95(1), 50–60. https://doi.org/10.5740/jaoacint.sge_macfarlane

Mahadevan, V. (2017). Anatomy of the stomach. *Surgery (Oxford)*, 35(11), 608–611. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.08.004>

- Mahley, R. W. (2016). Central nervous system lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *36*(7), 1305–1315. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307023>
- Mahowald, M. A., Rey, F. E., Seedorf, H., Turnbaugh, P. J., Fulton, R. S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R. K., Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Crock, L. W., Russell, A., Verberkmoes, N. C., Hettich, R. L., & Gordon, J. I. (2009). Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(14), 5859–5864. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901529106>
- Manivasagam, T., Arunadevi, S., Essa, M. M., SaravanaBabu, C., Borah, A., Thenmozhi, A. J., & Qoronfleh, M. W. (2020). Role of oxidative stress and antioxidants in autism. *Advances in Neurobiology*, *24*, 193–206. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30402-7_7
- Manohar, H., Pravallika, M., Kandasamy, P., Chandrasekaran, V., & Rajkumar, R. P. (2018). Role of exclusive breastfeeding in conferring protection in children at-risk for autism spectrum disorder: Results from a sibling case-control Study. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, *09*(1), 132–136. https://doi.org/10.4103/jnrp.jnrp_331_17
- Manrique Vergara, D., & González Sánchez, M. E. (2017). Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales. *Nutrición Hospitalaria*, *34*, 58–61. <https://doi.org/10.20960/nh.1573>

- Marí-Bauset, S., Zazpe, I., Marí-Sanchis, A., Llopis-González, A., & Suárez-Varela, M. M. (2015). Anthropometric measurements and nutritional assessment in autism spectrum disorders: A systematic review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 9, 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.rasd.2014.08.012>
- Martínez-Cervera, S., Salvador, A., Muguerza, B., Moulay, L., & Fiszman, S. M. (2011). Cocoa fiber and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(3), 729–736. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.035>
- McElhanon, B. O., McCracken, C., Karpen, S., & Sharp, W. G. (2014). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A meta-analysis. *Pediatrics*, 133(5), 872–883. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3995>
- McRorie, J. W., & McKeown, N. M. (2017). Understanding the physics of functional fibers in the gastrointestinal tract: an evidence-based approach to resolving enduring misconceptions about insoluble and soluble fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 117(2), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.09.021>
- Mendoza, S. (2022). *Efecto del procesamiento y fermentación de la vaina de cacao (Theobroma cacao L.) sobre sus características nutritivas, nutracéuticas y funcionales* [Universidad Autónoma de Querétaro]. <https://ri-ng.uaq.mx/jspui/bitstream/123456789/3555/1/FQMAC-290742-0422-422-Jonathan%20Mendoza%20Zamorano%20%20%20-A.pdf>

- Meselhy, M. R., Nakamura, N., & Hattori, M. (1997). Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(5), 888–893. <https://doi.org/10.1248/cpb.45.888>
- Mézes, M., & Erdélyi, M. (2018). [Antioxidant effect of the fibre content of foods]. *Orvosi Hetilap*, 159(18), 709–712. <https://doi.org/10.1556/650.2018.30953>
- Mota de Carvalho, N., Oliveira, D. L., Saleh, M. A. D., Pintado, M. E., & Madureira, A. R. (2021). Importance of gastrointestinal in vitro models for the poultry industry and feed formulations. *Animal Feed Science and Technology*, 271, 114730. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114730>
- Murtaza, N., Ó Cuív, P., & Morrison, M. (2017). Diet and the microbiome. *Gastroenterology clinics of North America*, 46(1), 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.005>
- Naeem, A., Ming, Y., Pengyi, H., Jie, K. Y., Yali, L., Haiyan, Z., Shuai, X., Wenjing, L., Ling, W., Xia, Z. M., Shan, L. S., & Qin, Z. (2022). The fate of flavonoids after oral administration: A comprehensive overview of its bioavailability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22), 6169–6186. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1898333>
- Naliyadhara, N., Kumar, A., Kumar Gangwar, S., Nair Devanarayanan, T., Hegde, M., Alqahtani, M. S., Abbas, M., Sethi, G., & Kunnumakkara, A. (2023). Interplay of dietary antioxidants and gut microbiome in human health: What has been learnt thus far? *Journal of Functional Foods*, 100, 105365. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105365>

- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS(*+) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(15), 4669–4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>
- Ng, Q. X., Loke, W., Venkatanarayanan, N., Lim, D. Y., Soh, A. Y. S., & Yeo, W. S. (2019). A systematic review of the role of prebiotics and probiotics in autism spectrum disorders. *Medicina (Lithuania)*, *55*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/medicina55050129>
- Nguyen, V. T., Tran, T. G., & Tran, N. L. (2022). Phytochemical compound yield and antioxidant activity of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) as influenced by different dehydration conditions. *Drying Technology*, *40*(10), 2021–2033. <https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1913745>
- Nieto-Figueroa. (2020). *Evaluación nutritiva, nutracéutica y funcional in vitro de la vaina de cacao (Theobroma cacao L.)*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Nogay, N., & Nahikian-Nelms, M. (2019). Can we reduce autism-related gastrointestinal and behavior problems by gut microbiota based dietary modulation? A review. *Nutritional Neuroscience*, *24*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1630894>
- Nogueira Soares Souza, F., Rocha Vieira, S., Leopoldina Lamounier Campidelli, M., Abadia Reis Rocha, R., Milani Avelar Rodrigues, L., Henrique Santos, P., de Deus Souza Carneiro, J., Maria de Carvalho Tavares, I., & Patrícia de Oliveira, C. (2022). Impact of using cocoa bean shell powder as a substitute

- for wheat flour on some of chocolate cake properties. *Food Chemistry*, 381, 132215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132215>
- O'Callaghan, J., & O'Toole, P. W. (2013). Lactobacillus: Host-microbe relationships. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 119–154. https://doi.org/10.1007/82_2011_187
- Oddoye, E., M.Phil, C., & Gyedu-Akoto, E. (2013). Cocoa and Its by-products: identification and utilization. En *Chocolate in Health and Nutrition* (pp. 23–37). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_3
- Ogobuiro, I., Gonzales, J., & Tuma, F. (2022). Physiology, gastrointestinal. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537103/>
- Okiyama, D. C., Blandón Navarro, S., & Rodrigues, C. (2017). Cocoa shell and its compounds: applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007>
- Oomah, B. D., & Anaberta, C.-M. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 935–942. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2019>
- Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The Reciprocal Interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 78. <https://doi.org/10.3390/nu8020078>
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable

- antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), R6–R15.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x>
- Pangrazzi, L., Balasco, L., & Bozzi, Y. (2020). Natural Antioxidants: A novel therapeutic approach to autism spectrum disorders? *Antioxidants*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/antiox9121186>
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21–32.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>
- Patra, A. K., & Aschenbach, J. R. (2018). Ureases in the gastrointestinal tracts of ruminant and monogastric animals and their implication in urea-N/ammonia metabolism: A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 39–50.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.02.005>
- Pérez-Sanana, José, Rodríguez-Sánchez, L., Calle, J., Nuñtilde, M., Villavicencio, E. D., Díaz-Ortega, L., & Herrera-Llanes, L. (2018). Utilización de la cascarilla de cacao como fuente de fibra dietética y antioxidantes en la elaboración de galletas dulces /Use of cocoa bean shell as a source of dietetic fiber and antioxidants in the production of sweet cookies. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 28(3), 62–68.
- Perrin, J. M., Coury, D. L., Hyman, S. L., Cole, L., Reynolds, A. M., & Clemons, T. (2012). Complementary and alternative medicine use in a large pediatric autism sample. *Pediatrics*, 130 Suppl 2, S77–82.
<https://doi.org/10.1542/peds.2012-0900E>

- Peterson, C. T. (2020). Dysfunction of the microbiota-gut-brain axis in neurodegenerative disease: the promise of therapeutic modulation with prebiotics, medicinal herbs, probiotics, and synbiotics. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 25, 2515690X20957225. <https://doi.org/10.1177/2515690X20957225>
- Plaza-Diaz, J., Flores-Rojas, K., de la Torre-Aguilar, M. J., Gomez-Fernández, A. R., Martín-Borreguero, P., Perez-Navero, J. L., Gil, A., & Gil-Campos, M. (2021). Dietary patterns, eating behavior, and nutrient intakes of spanish preschool children with autism spectrum disorders. *Nutrients*, 13(10), 3551. <https://doi.org/10.3390/nu13103551>
- Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., & Fitzgerald, G. F. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *The British Journal of Nutrition*, 111(3), 387–402. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002560>
- Prasadi, V. P. N., & Joye, I. J. (2020). Dietary fibre from whole grains and their benefits on metabolic health. *Nutrients*, 12(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/nu12103045>
- Rebollo-Hernanz, M., Cañas, S., Aguilera, Y., Benitez, V., Gila-Díaz, A., Rodriguez-Rodriguez, P., Cobeta, I. M., de Pablo, A. L. L., Gonzalez, M. C., Arribas, S. M., & Martin-Cabrejas, M. A. (2020). Validation of cocoa shell as a novel antioxidant dietary fiber food ingredient: nutritional value, functional properties, and safety. *Current Developments in Nutrition*, 4(Supplement_2), 773. https://doi.org/10.1093/cdn/nzaa052_042

- Rebollo-Hernanz, M., Cañas, S., Taladrid, D., Segovia, Á., Bartolomé, B., Aguilera, Y., & Martín-Cabrejas, M. A. (2021). Extraction of phenolic compounds from cocoa shell: Modeling using response surface methodology and artificial neural networks. *Separation and Purification Technology*, 270, 118779. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118779>
- Rocchetti, G., Gregorio, R. P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Oliveira, P. G., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Mosele, J. I., Motilva, M.-J., Tomas, M., Patrone, V., Capanoglu, E., & Lucini, L. (2022). Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 811–842. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12921>
- Rodrigues, D. B., Marques, M. C., Hacke, A., Loubet Filho, P. S., Cazarin, C. B. B., & Mariutti, L. R. B. (2022). Trust your gut: bioavailability and bioaccessibility of dietary compounds. *Current Research in Food Science*, 5, 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2022.01.002>
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa Bean shell—A by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients*, 12(4), 1123. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>
- Rolim, P. M. (2015). Development of prebiotic food products and health benefits. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(1), 3–10. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6546>

- Romero-Gómez, M., Jover, M., Galán, J. J., & Ruiz, A. (2009). Gut ammonia production and its modulation. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9124-3>
- Ruchi, S., Amanjot, K., Thakur, S., Keerti, B., & Bose, S. (2017). Role of nutraceuticals in health care: a review. *International Journal of Green Pharmacy*, 11, S385–S394.
- Sabater, C., Ruiz, L., & Margolles, A. (2021). A machine learning approach to study glycosidase activities from *Bifidobacterium*. *Microorganisms*, 9(5), 1034. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051034>
- Sabit, H., Tombuloglu, H., Rehman, S., Almandil, N. B., Cevik, E., Abdel-Ghany, S., Rashwan, S., Abasiyanik, M. F., & Yee Waye, M. M. (2021). Gut microbiota metabolites in autistic children: an epigenetic perspective. *Heliyon*, 7(1), e06105. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06105>
- Sadek, A., Berk, L., Mainess, K., & Daher, N. (2018). Antioxidants and autism: teachers' perceptions of behavioral changes. *Advances in mind-body medicine*, 32.
- Sairanen, U., Piirainen, L., Gråsten, S., Tompuri, T., Mättö, J., Saarela, M., & Korpela, R. (2007). The effect of probiotic fermented milk and inulin on the functions and microecology of the intestine. *Journal of Dairy Research*, 74(3), 367–373. <https://doi.org/10.1017/S0022029907002713>
- Sánchez, M., Laca, A., Laca, A., & Díaz, M. (2023). Cocoa bean shell: a by-product with high potential for nutritional and biotechnological applications. *Antioxidants*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/antiox12051028>

- Sánchez-Quezada, V., Gaytán-Martínez, M., Recio, I., & Loarca-Piña, G. (2023). Avocado seed by-product uses in emulsion-type ingredients with nutraceutical value: Stability, cytotoxicity, nutraceutical properties, and assessment of in vitro oral-gastric digestion. *Food Chemistry*, *421*, 136118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136118>
- Sanctuary, M. R., Kain, J. N., Angkustsiri, K., & German, J. B. (2018). Dietary considerations in autism spectrum disorders: the potential role of protein digestion and microbial putrefaction in the gut-brain axis. *Frontiers in Nutrition*, *5*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2018.00040>
- Sanctuary, M. R., Kain, J. N., Chen, S. Y., Kalanetra, K., Lemay, D. G., Rose, D. R., Yang, H. T., Tancredi, D. J., German, J. B., Slupsky, C. M., Ashwood, P., Mills, D. A., Smilowitz, J. T., & Angkustsiri, K. (2019). Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *PLoS ONE*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210064>
- Sanz-Cortes, M., Egaña-Ugrinovic, G., Zupan, R., Figueras, F., & Gratacos, E. (2014). Brainstem and cerebellar differences and their association with neurobehavior in term small-for-gestational-age fetuses assessed by fetal MRI. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *210*(5), 452.e1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.12.008>
- Saturio, S., Nogacka, A. M., Alvarado-jasso, G. M., Salazar, N., Reyes-Gavilán, C. G. de los, Gueimonde, M., & Arbolea, S. (2021). Role of bifidobacteria on

- infant health. *Microorganisms*, 9(12), Article 12.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9122415>
- Secretaria de salud. (2021). *Autismo, trastorno del neurodesarrollo que se caracteriza por falta de interacción social y de comunicación*.
<https://www.gob.mx/salud/prensa/089-autismo-trastorno-del-neurodesarrollo-que-se-caracteriza-por-falta-de-interaccion-social-y-de-comunicacion>
- Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485–6501. <https://doi.org/10.1021/jf902107d>
- Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Current Research in Food Science*, 4, 308–319.
<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>
- Shanmugam, H., Ganguly, S., & Priya, B. (2022). Plant food bioactives and its effects on gut microbiota profile modulation for better brain health and functioning in Autism Spectrum Disorder individuals: A review. *Food Frontiers*, 3(1), 124–141. <https://doi.org/10.1002/fft2.125>
- Shao, D., Li, J., Li, J., Tang, R., Liu, L., Shi, J., Huang, Q., & Yang, H. (2015). Inhibition of gallic acid on the growth and biofilm formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *Journal of Food Science*, 80(6), M1299-1305. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12902>
- Shen, T.-C. D., Albenberg, L., Bittinger, K., Chehoud, C., Chen, Y.-Y., Judge, C. A., Chau, L., Ni, J., Sheng, M., Lin, A., Wilkins, B. J., Buza, E. L., Lewis, J.

- D., Daikhin, Y., Nissim, I., Yudkoff, M., Bushman, F. D., & Wu, G. D. (2015). Engineering the gut microbiota to treat hyperammonemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(7), 2841–2850. <https://doi.org/10.1172/JCI79214>
- Singh, N., Jain, P., Ujinwal, M., & Langyan, S. (2022). Escalate protein plates from legumes for sustainable human nutrition. *Frontiers in Nutrition*, 9, 977986. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.977986>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. En *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(4), 383–395.
- Soares, T. F., & Oliveira, M. B. P. P. (2022). Cocoa by-products: characterization of bioactive compounds and beneficial Health Effects. *Molecules*, 27(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/molecules27051625>
- Sobamiwa, O., & Longe, O. G. (1994). Utilization of cocoa-pod pericarp fractions in broiler chick diets. *Animal Feed Science and Technology*, 47(3), 237–244. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90127-9)
- Sorrentino, E., Succi, M., Tipaldi, L., Pannella, G., Maiuro, L., Sturchio, M., Coppola, R., & Tremonte, P. (2018). Antimicrobial activity of gallic acid against food-related *Pseudomonas* strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. *International Journal of Food*

Microbiology, 266, 183–189.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.026>

Sousa, L. S., Rocha, F. de S., Silveira, P. T. de S., Bispo, E. da S., & Soares, S. E.

(2016). Enzymatic activity of proteases and its isoenzymes in fermentation process in cultivars of cocoa (*Theobroma cacao* L.) produced in southern Bahia, Brazil. *Food Science and Technology*, 36, 656–663.

<https://doi.org/10.1590/1678-457X.10916>

Spagnuolo, C., Moccia, S., & Russo, G. L. (2018). Anti-inflammatory effects of

flavonoids in neurodegenerative disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 153, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.001>

Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., Mickowska, B., & Socha, R. (2021).

Fermentation with edible *Rhizopus* strains as a beneficial alternative method in wheat germ cake processing. *Journal of Cereal Science*, 102, 103309.

<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103309>

Sun, X., & Zhu, M.-J. (2018). Butyrate inhibits indices of colorectal carcinogenesis

via enhancing α -ketoglutarate-dependent DNA demethylation of mismatch repair genes. *Molecular nutrition & food research*, 62(10), e1700932.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201700932>

Sunand, K., Mohan, G., & Bakshi, V. (2020). Supplementation of *Lactobacillus*

probiotic strains supports gut- brain-axis and defends autistic deficits occurred by valproic acid-induced prenatal model of autism.

Pharmacognosy Journal, 12, 1658–1669.

<https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.226>

- Taniya, M. A., Chung, H.-J., Al Mamun, A., Alam, S., Aziz, M. A., Emon, N. U., Islam, M. M., Hong, S.-T. shool, Podder, B. R., Ara Mimi, A., Aktar Suchi, S., & Xiao, J. (2022). Role of gut microbiome in autism spectrum disorder and Its therapeutic regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 915701. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.915701>
- Tezara, W., Urich, R., Jaimez, R., Coronel, I., Araque, O., Azócar, C., Chacón, I., Tezara, W., Urich, R., Jaimez, R., Coronel, I., Araque, O., Azócar, C., & Chacón, I. (2016). Does Criollo cocoa have the same exophysiological characteristics as Forastero? *Botanical Sciences*, 94(3), 563–574. <https://doi.org/10.17129/botsci.552>
- The Top Cocoa Producing Countries In The World*. (2022). WorldAtlas. <https://www.worldatlas.com/industries/the-top-cocoa-producing-countries-in-the-world.html>
- Tomova, A., Husarova, V., Lakatosova, S., Bakos, J., Vlkova, B., Babinska, K., & Ostatnikova, D. (2015). Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & Behavior*, 138, 179.
- Ukuku, D. O., Mukhopadhyay, S., Juneja, V., & Rajkowski, K. (2015). 9—Evaluating natural antimicrobials for use in food products. En T. M. Taylor (Ed.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (pp. 185–209). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00009-8>
- Van de Velde, F., Vignatti, C., Paula Méndez-Galarraga, M., Gomila, M., Fenoglio, C., Donda Zbinden, M., & Élica Pirovani, M. (2022). Intestinal and colonic

- bioaccessibility of phenolic compounds from fruit smoothies as affected by the thermal processing and the storage conditions. *Food Research International*, 155, 111086. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111086>
- Vanwong, N., Srisawasdi, P., Ngamsamut, N., Nuntamool, N., Puangpetch, A., Chamkrachangpada, B., Hongkaew, Y., Limsila, P., Kittitharaphan, W., & Sukasem, C. (2017). Hyperuricemia in children and adolescents with autism spectrum disorder treated with risperidone: the risk factors for metabolic adverse effects. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 527. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00527>
- Vásquez C., M., Rodríguez G, J., Lira M., B., Cueva M, S., Ayón S, M., & Mallma D, Y. (2012). Ph de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(1), 20–26.
- Velásquez-Jiménez, D., Luzardo-Ocampo, I., Gaytán-Martínez, M., & Campos-Vega, R. (2023). Design and characterization of a solid-state fermented cacao pods and husk-based functional ingredient to potentially modulate circadian rhythm-associated proteins. *Food Bioscience*, 56, 103199. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103199>
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (2015). In Vitro fermentation models: general introduction. En *The Impact of Food Bioactives on Health: In vitro and ex vivo models [Internet]*. Springer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500158/>

- Vriesmann, L. C., de Mello Castanho Amboni, R. D., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2011). Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1173–1181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.004>
- Wahyuni, N. L., Sunarharum, W. B., Muhammad, D. R. A., & Saputro, A. D. (2021). Formation and development of flavour of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivar Criollo and Forastero: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 733(1), 012078. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/733/1/012078>
- Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., & Conlon, M. A. (2012). Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(8), 2096–2102. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2167-7>
- Wang, X., Qi, Y., & Zheng, H. (2022). Dietary Polyphenol, Gut Microbiota, and Health Benefits. *Antioxidants*, 11(6), 1212. <https://doi.org/10.3390/antiox11061212>
- Wasilewska, J., & Klukowski, M. (2015). Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: Links and risks - a possible new overlap syndrome. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics*, 6, 153–166. <https://doi.org/10.2147/PHMT.S85717>
- Wickramasinghe, S., Pacheco, A. R., Lemay, D. G., & Mills, D. A. (2015). Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the

- expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC Microbiology*, 15, 172. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0508-3>
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of In vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols-a non-systematic Review. *Nutrients*, 12(5), 1401. <https://doi.org/10.3390/nu12051401>
- Wu, H., Liu, Z., Lu, P., Barrow, C., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2022). Bioaccessibility and bioactivities of phenolic compounds from roasted coffee beans during in vitro digestion and colonic fermentation. *Food Chemistry*, 386, 132794. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132794>
- Yan, R., Ho, C.-T., & Zhang, X. (2020). Interaction between tea polyphenols and intestinal microbiota in host metabolic diseases from the perspective of the gut-brain axis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 64, 2000187. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000187>
- Yapo, B. M., Besson, V., Koukala, B. B., & Koffi, K. L. (2013). Adding value to cacao pod husks as a potential antioxidant-dietary fiber source. *American Journal of Food and Nutrition*, 1(3), Article 3. <https://doi.org/10.12691/ajfn-1-3-4>
- Zeidan, J., Fombonne, E., Scora, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., & Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research: Official Journal of the*

International Society for Autism Research, 15(5), 778–790.

<https://doi.org/10.1002/aur.2696>

Zhang, L., Wu, T., Zhang, Y., Chen, Y., Ge, X., Sui, W., Zhu, Q., Geng, J., &

Zhang, M. (2023). Release of bound polyphenols from wheat bran soluble dietary fiber during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation in vitro. *Food Chemistry*, 402, 134111.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134111>

Zwinkels, J., Wolkers-Rooijackers, J., & Smid, E. J. (2023). Solid-state fungal

fermentation transforms low-quality plant-based foods into products with improved protein quality. *LWT*, 184, 114979.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114979>

Anexo 1



CEI-2020-2-214

Ciudad Juárez, Chihuahua, a 24 de Septiembre de 2020

M. en C. Julián Herrera Mejía
Dra. Rocío Campos Vega
Dr. Abraham Wall Medrano
Presente.

El Comité de Ética en la Investigación (CEI), después de recibir las recomendaciones del protocolo de investigación CIEB-2020-1-20, denominado "Alimentación funcional y salud gastrointestinal en el espectro autista: El eje microbiota-intestino-cerebro (MIC)", resolvió:

Dictamen favorable

Atentamente
"Por una vida científica
Por una ciencia vital"


Dra. Gwendolyne Peraza Mercado
Presidente del Comité de Ética en la
Investigación


Dra. Santos Adriana Martel Estrada
Secretaria del Comité de Ética
en la Investigación

c.c.p. Archivo.