



(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **22/02/2010** (51) Int. Cl: **A23L 1/00** (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **21/08/2008**
(21) Número de solicitud: **2008010779**

(71) Solicitante:
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL I. P. N.
Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508 07360
Distrito Federal MX**

(72) Inventor(es):
**MERCEDES GUADALUPE LÓPEZ PÉREZ
Cerrada de los Laureles Número 530 Guanajuato
36615 MX
JUDITH ESMERALDA URÍAS SILVAS**

(74) Representante:
**LUIS ANTONIO CARREÑO SÁNCHEZ.*
Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508,
Edificio Administrativo, 1er. piso, Subdirección de
Vinculación Tecnológica Distrito Federal 07360 MX**

(54) Título: **COMPOSICIONES DE AGAVINAS Y SU USO EN LA REDUCCION DE LA INGESTA DE ALIMENTOS.**

(54) Title: **AGAVINAS COMPOSITION AND THE USE THEREOF FOR REDUCING THE FOOD INTAKE.**

(57) Resumen

La presente invención se refiere a productos de Agavinas y composiciones de la misma así como su elaboración y su uso en la alimentación y en la medicina ya que este tipo de fructanos tienen un efecto prebiótico mayor que las inulinas comerciales estimulando de manera más eficiente el crecimiento de algunos tipos de bifidobacterias además de tener un efecto significativo sobre la reducción en la ganancia de peso corporal y la ingesta de alimento, así como también el aumentar excreción de heces, disminuir las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol en estado post-pandrial, así como aumentar la concentración del péptido-1 tipo glucagon (GLP-1), por lo que su impacto en el control y manejo de obesidad y diabetes y otra enfermedades relacionados es de gran importancia.

(57) Abstract

The present invention refers to Agavinas products and the compositions thereof, as well as their manufacture and use in food and medicine, since these types of agave fructans have a prebiotic effect higher than that of commercial insulin, thus stimulating in a more efficient manner the growth of some types of bifidobacteria, also significantly reducing weight gain and food intake, as well as increasing faeces excretion, reducing the concentrations of glucose, triglycerides and cholesterol in a postprandial state, increasing the concentration of the glucagon like peptide (GLP-1), so that the impact thereof over the control and handle of obesity and diabetes, and further related diseases, is of great importance.

Composiciones de agavinas y su uso en la reducción de ingesta de alimentos

Campo de la invención.

La presente invención se refiere a productos de agavinas y composiciones de la misma así como a su elaboración y su uso en la alimentación y en la medicina para modificar y modular la composición de la flora bacteriana en el intestino grueso de animales, así como para disminuir la ingesta de alimento y energía, reducir la ganancia de peso corporal, ayudar a la excreción de heces, disminuir las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol, en estado post-prandial, así como aumentar la concentración del péptido-1 tipo glucagon (GLP-1) por lo que su impacto en el control y manejo de obesidad y diabetes y otras enfermedades relacionadas con éstas es de gran importancia.

Antecedentes de la invención.

Las agavinas son carbohidratos del tipo de los fructanos que son extraídos de plantas del Orden Liliales como por ejemplo plantas de Agave y de Dasylirion.

Las agavinas son estructuralmente diferentes a las inulinas y por lo tanto con funciones y propiedades diferentes (López, 2003).

Sánchez-Marroquín y Hope (1953) y Bathia y Nandra (1979) reportaron a los fructanos tipo inulina como los principales carbohidratos de reserva en *A. tequilana* y *A. americana*. Sin embargo, en estudios mucho mas recientes, López y col. (2003) reportaron la estructura molecular para los fructanos de *A. tequilana* Weber var. azul, la cual consiste de una mezcla compleja de fructo-oligosacáridos presentando principalmente enlaces $\beta(2-1)$, pero también observaron enlaces del tipo $\beta(2-6)$, con ramificaciones y con glucosa terminal o interna (figura 1).

Realizando el análisis estructural de los fructanos de Agave, Mancilla-Margalli y López (2006) reportaron las diferencias estructurales entre los fructanos de Agave dentro de las mismas especies pero que crecieron en diferentes regiones ambientales. La heterogeneidad estructural observada, puede ser atribuida a los mecanismos de adaptación de la planta para sobrevivir en áreas hostiles. Mancilla-Margalli y López clasificaron a los fructanos de Agave en 3 grupos principales dependiendo del grado de polimerización (DP) y la abundancia de enlaces (tabla 1) con 2 diferentes estructuras, siendo estas, graminanos y Agavinas (figura 2).

Tabla 1

Grado de polimerización estimado para los fructanos de Agaves y Dasyllirion

	Grupo	DP estimado
	I	
5	<i>A. angustifolia</i> Oax	32
	<i>A. tequilana</i> Jal	18
	<i>A. potatorum</i> Oax	15
	<i>A. angustifolia</i> Son	13
	II	
	<i>A. cantala</i> Oax	11
	<i>Dasyllirion</i> spp. Chih	9
10	<i>A. fourcroydes</i> Yuc	6
	III	
	<i>A. tequilana</i> Gto	7

México es considerado el centro de origen y biodiversidad del género Agave, debido a que un gran número de especies se encuentran dentro de su territorio. Estas plantas presentan metabolismo ácido de las Crasuláceas (CAM) y su principal producto fotosintético son los fructanos (graminanos y Agavinas).

Debido a la configuración β del carbono 2 anomérico en sus monómeros de fructosa, los fructanos son resistentes a hidrólisis por las enzimas digestivas humanas y pueden llegar a ser fermentados por la microflora colónica que producen ácidos grasos de cadena corta (SCFA). Los fructanos poseen numerosas propiedades nutraceuticas, siendo una de ellas su efecto prebiótico. Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que en el hospedero que estimula selectivamente el crecimiento o actividad de algunas bacterias en el colon que pueden mejorar la salud del hospedero. En este sentido, la solicitud MX 04011739 hace mención de las agavinas de diferentes orígenes y su efecto prebiótico sobre diferentes bacterias prebióticas tales como: *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Su efecto fue mejor que el observado para la gran mayoría de las inulinas comerciales.

Existen múltiples documentos que refieren a productos, composiciones y usos de los fructanos tipos inulina, pero hasta la solicitud MX 04011739 no existe ninguno que se refiera a las Agavinas.

La solicitud WO 93/02566 (Raffinerie Tirlémontoise SA, 1993) describe una composición de inulina y fructo-oligosacáridos que tiene efectos bifido-estimulantes pero sin efectos nutricionales y de salud.

La solicitud WO 96/03888 (UNILEVER NV, 1996) se refiere a productos comestibles de inulina para untar (Raftiline R LS y Fibruline R) pero no menciona que tenga efectos nutricionales y para la salud.

La solicitud WO 02/066517 A1 (Legorreta Peyton Enrique y Ogura Fujii Tetsuya, 2002)

- 5 describe un método de procesamiento del agave para la obtención de inulina y con ello la producción de polvo y soluciones que son usadas como un complemento alimenticio y como un medio de cultivo para desarrollar fermentaciones de bacterias o levaduras.

En la industria alimentaria y de nutrimentos, la oligofructosa se utiliza ampliamente como un reemplazo parcial bajo en calorías o reemplazo total de azúcar, proveyendo dulzura,

- 10 cuerpo y sensación agradable en la boca, mientras que la inulina con un DP de al menos 10 y menor a 20, se utiliza como un reemplazo parcial o completo bajo en calorías para el azúcar en combinación o no con uno o más edulcorantes de alta intensidad que proveen cuerpo y sensación agradable en la boca; como un mejorador de textura y como un reemplazo bajo en calorías para la grasa. El uso de los fructanos como un reemplazo de
- 15 grasa resulta a partir del hecho de que los fructanos pueden formar con agua una partícula en gel con una estructura estable, homogénea, cremosa y con excelentes propiedades organolépticas.

Se ha descrito que la oligofructosa y la inulina tienen efectos preventivos y terapéuticos con respecto a la génesis y crecimiento de ciertos cánceres tales como cáncer de colon

- 20 WO 98/52578 (Tiense Suikerraffinaderij NV, 1998) y cáncer de mama EP 0692252 (Raffinerie Tirllemontoise SA, 1996).

Los efectos en contra del cáncer de mama parecen estar relacionados con un efecto inmunomodulador, particularmente con un efecto estimulante del sistema inmune, de la oligofructosa, inulina y/o sus productos de fermentación, principalmente ácidos grasos de

25 cadena corta (SCFA) (Namioka, 1991).

Con respecto al cáncer de colon en la ya citada solicitud de patente WO 98/52578 se ha reportado que la inulina de cadena larga (DP>20) es más efectiva para prevenir la génesis de este tipo de cáncer y para inhibir su crecimiento, que la oligofructosa (DP <10).

En estudios con humanos voluntarios saludables los cuales eran ligeramente

30 hiperlipidémicos, se encontró que el consumo de oligofructosa o inulina tiene efectos benéficos sobre el metabolismo de lípidos, puesto que el consumo resulta en una

reducción del nivel de triglicéridos y del colesterol en suero (principalmente colesterol LDL) en comparación con un tratamiento control placebo (Brighenti, 1999) y (Jackson, 1999).

Además, se han encontrado en varios estudios los efectos positivos del consumo de oligofructosa e inulina sobre la absorción intestinal de minerales, particularmente calcio, magnesio y hierro así como la densidad mineral ósea.

En el solicitud de patente EP 1125507A1 (Tiense Suikerraffinaderij NV, 2001) se describen productos de inulinas, composiciones y su uso para modular y modificar la composición de la flora bacteriana y el patrón de fermentación de inulina en el intestino grueso de animales. El producto de inulina consiste de una mezcla de un componente de inulina fácilmente fermentable ($DP < 10$) y un componente de inulina difícilmente fermentable ($DP > 20$).

Los fructanos afectan procesos fisiológicos y bioquímicos en ratas y humanos lo que ocasiona una mejora en la salud y reducción en el riesgo de muchas enfermedades, estimulando el sistema inmunológico y disminuyendo los niveles de bacterias patogénicas en el intestino. Así mismo alivian el estreñimiento, disminuyen el riesgo de osteoporosis incrementando la absorción mineral, reducen el riesgo de aterosclerosis disminuyendo la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado y disminuyen su nivel en sangre. La inulina y los fructo-oligosacáridos también reducen la incidencia de cáncer de colon. Como se mencionó anteriormente, los fructanos modulan el nivel hormonal de insulina y glucagon disminuyendo los niveles de glucosa en sangre, así como también se ha reportado que modulan los niveles del péptido-1 tipo glucagon (GLP-1), siendo este péptido de gran relevancia actualmente como posible agente terapéutico en el tratamiento de la obesidad y la diabetes.

La diabetes es una enfermedad grave que se relaciona con la incapacidad del cuerpo para producir (tipo 1) o regular (tipo 2) insulina, la cual controla los niveles de glucosa en la sangre. La prevalencia de la diabetes aumenta rápidamente entre la población, llegando a predecirse que para el año 2025, México podría ocupar el séptimo lugar dentro del panorama epidemiológico de esta enfermedad a nivel mundial. En nuestro país, la diabetes se ha convertido en la primera causa de muerte, superando a las enfermedades cardiovasculares, pero está muy ligada con los fallecimientos por infartos, aseguran especialistas (Smith, 2007; SSA, 2005).

Las consecuencias de esta enfermedad pueden ser bastante severas, incluyendo problemas al corazón y al riñón, mala circulación ocasionando amputación de las extremidades, problemas de visión llegando a presentarse ceguera, una disminuida calidad de vida con una consecuente muerte prematura (Smith, 2007).

- 5 Las principales causas que conllevan a la mayor prevalencia de la diabetes son una ganancia de peso excesivo y obesidad, así como factores hereditarios.

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es en la actualidad uno de los principales problemas de salud que enfrenta México y la mayoría de los países occidentales. Representa del 90 al 95% de todos los casos de diabetes. Este desorden afecta un estimado del 6% de la población adulta occidental; su frecuencia en todo el mundo se estima que continúe creciendo en un 6% por año, potencialmente llegando a ser más de 300 millones de casos para el 2025, siendo uno de los principales desencadenantes de esta patogénesis, la obesidad (Moller, 2001).

- 15 En el 2006, en México existían 6.5 millones de enfermos de diabetes, de los cuales el 22% no saben que la padecen, informa la Secretaría de Salud, siendo esta enfermedad considerada como la primera causa de muerte en nuestro país.

- 20 La DMT2 resulta tanto de la resistencia a la insulina como de la secreción defectuosa de esta hormona. La resistencia a la insulina se presenta como una consecuencia de la obesidad, de un estilo de vida sedentario y del envejecimiento, ocasionando hiperglicemia y diabetes, elevada presión sanguínea y dislipidemia, siendo definido todo lo anterior como síndrome metabólico.

- 25 Las personas con obesidad central (androide), en quienes la grasa se acumula alrededor de la cintura, presentan un riesgo mayor de hacerse resistentes a la insulina. No es una coincidencia que los casos de DMT2 hayan aumentado de forma paralela al incremento mundial del sobrepeso y la obesidad, hasta el punto de que la DMT2 recibe el nombre de diabetesidad.

- 30 En la actualidad, las terapias para el tratamiento de la DMT2 radican en reducir la hiperglicemia. Sin embargo, las terapias tienen limitada eficacia, limitada tolerabilidad y efectos secundarios considerables, siendo de particular importancia mencionar que la mayoría de los tratamientos muestran una tendencia hacia la ganancia de peso corporal y a episodios de hipoglucemia (Arulmozhi y Portha, 2006).

Una nueva terapia que esta emergiendo es la que se basa en la acción de la hormona incretina GLP-1.

El hecho de que GLP-1 induzca la síntesis y la secreción de insulina, aunado a que su actividad es dependiente de glucosa, indica que pueda aportar alguna ventaja sobre otros fármacos para el tratamiento de la diabetes. Además, disminuye los niveles de glucagon, retrasa el vaciado gástrico, reduce la ingesta alimentaria y puede aumentar la sensibilidad a la insulina y favorecer la neogénesis de células β de los islotes pancreáticos (Arulmozhi y Portha, 2006; Drucker, 2005; Knauf y col., 2005; Meier y col., 2002).

El GLP-1 es un producto del gen proglucagon que se expresa tanto en las células α pancreáticas, como también en las células L de la mucosa intestinal, uno de los tipos de células más abundantes en el intestino (Majsov y col., 1986; Bell y col., 1983). El GLP-1 se sintetiza del precursor de glucagon, el cual no solamente codifica para GLP-1, si no también para glucagon, principal fragmento de proglucagon, glicentina, oxintomodulina y GLP-2 (Drucker, 2005; Bell y col., 1983).

Se ha estimado que más del 50% de la secreción de insulina post-prandial es atribuida a las hormonas peptídicas intestinales. Esta respuesta se debe al efecto incretina y es definida como la acción de hormonas peptídicas liberadas por el intestino en respuesta a la ingestión de nutrientes por vía oral para estimular la liberación de insulina en concentraciones importantes fisiológicamente (Meier y col., 2002; Nauck y col., 1986).

Actualmente el tratamiento para la DM2 incluye dieta, ejercicio y una variedad de agentes farmacológicos. Sin embargo, el hecho de que GLP-1 induzca la síntesis y la secreción de insulina, aunado a que su actividad es dependiente de glucosa indican que GLP-1 puede aportar alguna ventaja sobre otros fármacos.

Periféricamente el GLP-1 afecta la motilidad intestinal e inhibe la secreción de glucagon.

En el sistema nervioso central, el GLP-1 induce saciedad, lo que conlleva a una menor ganancia de peso corporal. En el páncreas, induce expansión de la masa de las células β , además de la estimulación de secreción de insulina dependiente de glucosa (Drucker, 2006; 2005; MacDonald y col., 2002).

Como se mencionó anteriormente, el GLP-1 se produce en las células L intestinales en respuesta a la ingestión de nutrientes, de carbohidratos principalmente.

Dentro del sistema nervioso central, el GLP-1 actúa como un transmisor inhibiendo el comportamiento alimenticio, es decir, generando saciedad (Larsen y col., 1997; Turton y col., 1996).

5 Los efectos de GLP-1 en las células de los islotes pancreáticos incluyen un aumento de la secreción de insulina de las células β , dependiente de la ingesta; un aumento de la secreción de somatostatina de las células δ y una disminución de la secreción de glucagon de las células α . Estas acciones contribuyen a la disminución de la producción de glucosa hepática (Arulmozhi y Portha, 2006; Drucker, 2006).

10 La acción de GLP-1 en las células β es mediada por la unión del péptido a receptores transmembranales acoplados a proteínas G. La activación de estos receptores causa un incremento en la concentración de cAMP intracelular y la activación de protein cinasa A (PKA). GLP-1 actúa directamente a través de la ruta cAMP/PKA para aumentar y sensibilizar a las células β a la secreción de insulina estimulada por glucosa.

15 En estudios en animales, se ha demostrado que el tratamiento con GLP-1 aumenta la masa de las células β y mantiene su función. Los efectos de GLP-1 en las células β generalmente pueden ser agudos, subagudos y crónicos (Drucker, 2006; 2003). Entre los efectos agudos, el GLP-1 incrementa la secreción de insulina dependiente de glucosa y los efectos subagudos incluyen la estimulación de la transcripción de proinsulina y la biosíntesis de insulina. Los efectos crónicos son la estimulación de la proliferación y
20 neogénesis de las células β a partir de células ductales precursoras, además del aumento de la expresión de los transportadores GLUT-2 y la glucocinasa, que regula la captación y el metabolismo de la glucosa pancreática (Arulmozhi y Portha, 2006; Drucker, 2006; 2003).

25 Diversos modelos han mostrado que el tratamiento con GLP-1 estimula la regeneración de células β y la diferenciación de células ductales pancreáticas en células secretoras de insulina (Hui y col., 2001; Xu y col., 1999). Siendo esto otra ventaja sobre otros inductores de la secreción de insulina, los cuales llegan a ser ineficaces después de varios años de tratamiento. (Groop y col., 1989).

30 La obesidad es el primer factor de riesgo para la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). La razón de esta asociación tan estrecha entre obesidad y DMT2 es la resistencia a la insulina. Cuando la resistencia a la insulina se combina con una disminución en la secreción de

insulina por las células pancreáticas. (Beysen y col., 2002; Kopelman, 2000) puede presentarse DMT2.

Los cambios fisiológicos responsables de las manifestaciones clínicas de la DMT2 incluyen la secreción defectuosa de la insulina, el aumento en la producción de glucosa por el hígado, la resistencia a la acción de la insulina en tejidos sensibles a ella (músculo, tejido adiposo e hígado) y los niveles altos en sangre de triglicéridos y ácidos grasos libres.

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por un aumento de la masa grasa y en consecuencia por un aumento de peso. Existe entonces, un aumento en las reservas energéticas del organismo en forma de grasa. De acuerdo con la primera ley de la termodinámica, la obesidad es consecuencia de un desequilibrio entre el consumo y el aporte de energía (Marti y col., 2004; Barbany y Foz, 2002; Beysen y col., 2002). El término crónico se le aplica debido a que forma parte del grupo de enfermedades que no se pueden curar con los medicamentos terapéuticos que existen actualmente (Barbany y Foz, 2002).

La obesidad es un problema muy complejo, que resulta de la combinación de influencias genéticas, comportamientos individuales, cultura y factores económicos y ambientales. México dentro del panorama mundial se sitúa como el segundo país con el mayor porcentaje de su población padeciendo de obesidad, después de Estados Unidos (OECD Factbook, 2006).

El aparato digestivo transforma y degrada los alimentos mediante procesos mecánicos y químicos para facilitar la asimilación de los nutrientes contenidos en ellos (Woods, 2004). Dichos procesos se acompañan de señales nerviosas y de la estimulación y secreción de distintas hormonas y péptidos, que mediante señalizaciones periféricas pueden informar al sistema nervioso central de la situación nutritiva y metabólica (Stanley y col., 2005). Por otro lado, no se pueden excluir ambas conexiones de otro sistema esencial en la regulación de la ingesta y balance energético: el tejido adiposo (Erlanson-Albertsson, 2005).

En definitiva, el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central participan conjuntamente tanto en la regulación del apetito a corto y mediano plazo, como en el control del gasto energético y por lo tanto, en la homeostasis energética y en la estabilidad de peso y composición corporal (Solomon y Martínez, 2006).

Los medicamentos antiobesidad pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo primario de acción en el balance de energía, dentro de los cuales encontramos cuatro clases generales; **1)** Los inhibidores de la ingesta de energía (o supresores del apetito) reduciendo la percepción de hambre, incrementando la sensación de saciedad, esto se logra actuando a nivel cerebral; **2)** los inhibidores de la absorción de grasas a través de mecanismos de acción gastrointestinales sin alterar la química cerebral; **3)** mejoradores del gasto de energía incrementando la termogénesis, sin requerir incremento en actividad física; y **4)** estimuladores de la movilización de grasas los cuales reducen la masa grasa y/o disminuyen la síntesis de triglicéridos (Campfield y col., 1998).

- 10 Las bases sobre las que descansa el tratamiento de la obesidad se orientan hacia la manipulación de la ecuación de equilibrio energético en un intento de conseguir un balance calórico negativo que conduzca a la reducción del exceso de grasa corporal, que es el elemento que define la condición de obesidad. En consecuencia, la instauración de un plan de alimentación hipocalórico equilibrado junto al aumento de actividad física y la
15 consiguiente educación nutricional encaminada a la adquisición de hábitos saludables conforman el tratamiento convencional de la obesidad. El frecuente fracaso de estas medidas ha generado la necesidad de contar con recursos terapéuticos adicionales. Es precisamente la estimulación de algunos sistemas de neurotransmisión el mecanismo que más se ha aprovechado para modular el comportamiento alimentario y así aumentar la
20 saciedad y/o disminuir el apetito.

Se ha mostrado que la incretina GLP-1 reduce la ingesta calórica y genera saciedad, muy probablemente vía receptores específicos dentro del sistema nervioso central, lo que resulta en una reducida ganancia de peso corporal y menor tejido adiposo en experimentos con animales (Meier y col., 2002; Zander y col., 2001; Gutzwiller y col.,
25 1999; Flint y col., 1998; Turton y col., 1996).

Meier y col. (2002) mencionan que GLP-1 muestra efectos anorexigénicos y puede tener un gran potencial en la farmacoterapia de la obesidad.

Por lo anterior, es importante contar con productos derivados de agave y composiciones que las contengan para disminuir la ingesta de alimento y energía, y al mismo tiempo
30 reducir la ganancia de peso corporal e incrementar las concentraciones de péptido-1 tipo glucagon (GLP-1), esto con la finalidad de proporcionar productos que puedan coadyuvar al control de la ingesta de alimentos, con lo cual también se permite prevenir, manejar y

tratar condiciones patológicas asociadas a una mayor ingesta de alimentos, tales como diabetes, obesidad y enfermedades relacionadas.

Objetivos de la invención.

- 5 En un objetivo de la presente invención proporcionar un producto de Agavinas obtenidas de plantas del Orden Liliales como por ejemplo: plantas de Agave y de Dasylirion que presentan propiedades nutricionales benéficas y mejoradas para humanos y animales, en comparación con productos de otros tipos de fructanos tal como la inulina.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un producto de Agavinas con efecto
10 prebiótico que ayude a modificar y modular la composición de la flora bacteriana en el intestino grueso de animales.

Otro de los objetivo de la presente invención es proporcionar productos de Agavinas y composiciones que las contengan, así como su elaboración y su uso en la alimentación y en la medicina ya que ayuda en la disminución de la ingesta de alimento y energía, en la
15 reducción de la ganancia de peso corporal, en la mayor excreción de heces, disminución del tejido epididimal, disminución de las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol así como el aumento de la concentración del péptido-1 tipo glucagon (GLP-1) por lo que tienen impacto en el control y manejo de obesidad y diabetes así como su potencial para prevenir y tratar otras enfermedades tales como la osteoporosis y el cáncer.

- 20 Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar el uso de las Agavinas y composiciones de las mismas para la preparación de productos y composiciones para generar efectos nutricionales, en particular los referentes al control de peso, la regulación de la glicemia y del control y modificación de la flora intestinal en animales.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1. Se muestra la estructura molecular básica de los fructanos de *A. tequilana* Weber var. azul.

Figura 2. Se muestra la clasificación de los fructanos de Agave y Dasylirion.

Figura 3. Se muestra el esquema general de trabajo de los experimentos *in vitro*
30 conforme a la presente invención.

Figura 4. Se muestra el esquema general de trabajo de los experimentos *in vivo* conforme a la presente invención.

Figura 5. Se muestra una cromatografía de capa fina de los fructanos de *Dasyilirion* spp. (DSC), *Agave tequilana* Weber var. azul. de Gto (ATG), Raftilosa®Synergy1 (RSE), *A. fourcroydes* Yuc (AFY), *A. angustifolia* Son (AAS) y Raftiline®GR (RNE). STD, estándar. Xil, xilosa; Glu, glucosa; Fru, Fructosa, Sac, sacarosa; DP3, 1-cestosa; DP4, nistosa; DP5, fructosil-nistosa.

Figura 6. Se muestra el efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de *Bifidobacterium adolescentis* (a), *B. animalis* (b), *B. bifidum* (c), *B. breve* (d), *B. infantis* (e) y *B. longum* (f) incubados anaerobicamente a 37°C en presencia de 10g de fructanos/L. Los resultados son la media de 3 determinaciones independientes $\pm$ SEM. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P \leq 0.05$. O.D, Densidad óptica; CIS, *Cichorium intybus* Sigma; DVS, *Dahlia variabilis* Sigma; RNE, Raftiline®GR; RSE, Raftilosa®Synergy1; ATJ, *A. tequilana* Weber var. azul de Jal; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul de Gto; AAO, *A. angustifolia* Oax; AAS, *A. angustifolia* Son; APO, *A. potatorum* Oax; ACO, *A. cantala* Oax; AFY, *A. fourcroydes* Yuc; DSC, *Dasyilirion* spp. Chih.

Figura 7. Se muestra el efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* (a), *L. casei* (b), *L. paracasei* (c) y *L. rhamnosus* (d) incubados anaerobicamente a 37°C en la presencia de 10 g de fructanos/L. Los resultados son la media de 3 determinaciones independientes $\pm$ SEM. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P \leq 0.05$. OD, Densidad óptica; CIS, *Cichorium intybus* Sigma; DVS, *Dahlia variabilis* Sigma; RNE, Raftiline®GR; RSE, Raftilosa®Synergy1; ATJ, *A. tequilana* Weber var. azul de Jal; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul de Gto; AAO, *A. angustifolia* Oax; AAS, *A. angustifolia* Son; APO, *A. potatorum* Oax; ACO, *A. cantala* Oax; AFY, *A. fourcroydes* Yuc; DSC, *Dasyilirion* spp. Chih.

Figura 8. Se muestra la ganancia de peso corporal. STD, Estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul Gto. DSC, *Dasyilirion* spp. Chih. Valores promedio (n = 8) con SEM. Valores con letra diferente fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Figura 9. Se muestra la ingesta de energía total. STD, Estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* spp. Chih. Valores promedio

(n = 11) con SEM. Valores con letra diferente fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Figura 10. Se muestra el efecto de la dieta sobre el peso del ciego en ratones. STD, Estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* spp. Chih. Valores promedio (n = 8) para cada parámetro evaluado con SEM. Valores con letra diferente fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Figura 11. Se muestra la concentración intestinal de GLP-1 (7-36) amida. STD, Estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* spp. Chih. Valores promedio con SEM. Resultados con diferente letra fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). Ciego: n = 8 para STD, RSE y DSC y n = 6 para ATG; Colon proximal: n = 7 para STD, DSC y ATG y n = 6 para RAF; Colon medio y distal: n = 7 para todos los grupos.

Figura 12. Se muestra la concentración de GLP-1 (7-36) amida en vena porta. STD, Estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* spp. Chih. Valores promedio con SEM. Resultados con diferente letra fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). n = 5 para STD, n = 6 para RSE y DSC y n = 8 para ATG.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención describe composiciones alimenticias que contienen agavinas provenientes de plantas de Agave, las cuales permiten disminuir la ingesta de alimento y energía, por lo que dichas composiciones reducen la ganancia de peso corporal. Así mismo permiten mediante su consumo, una mayor excreción de heces, disminución en las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol y un aumento significativo en la cantidad de péptido-1 tipo glucagon (GLP-1). Debido a estas propiedades, las composiciones de la presente invención son útiles en la disminución de peso corporal mediante la reducción del consumo de energía a través de los alimentos, lo que permite utilizarse para el control de obesidad y enfermedades que se relacionan con ésta, o bien para controlar el nivel de ingesta de alimentos.

Las composiciones descritas aquí comprenden fructanos aislados de Agave denominados agavinas, los cuales permiten proporcionar los efectos de reducción de ganancia de peso

cuando son consumidos. Para efectos de la invención puede utilizarse cualquier agavina que proporcione dichos efectos, como por ejemplo agavinas obtenidas de Agave tequilana Jal., Agave tequilana Gto., Agave angustifolia Oax., Agave angustifolia Son., Agave potatorum Oax., Agave cantala Oax., Agave fourcroydes Yuc., Dasyilirion spp. Chih. o mezclas de las mismas. Sin embargo, en una modalidad preferida de la invención, las agavinas obtenidas de Agave tequilana Gto. y de Dasyilirion spp Chih. son las que más se prefieren debido a que ofrecen un mayor potencial prebiótico, abriendo nuevas alternativas como ingredientes alimenticios y/o ingredientes promotores de bienestar y salud.

Las agavinas utilizadas en la presente invención comprenden los compuestos de los 3 grupos principales de fructanos de agave tales como los grupos I, II y III, clasificados con base en el grado de polimerización (DP) y la abundancia de enlaces (Mancilla-Margalli y López, 2006), así como los compuestos que se observan en la figuras 1 y 2. Aunque la inclusión de cualquiera de dichos compuestos o sus mezclas en las composiciones de la invención permiten proporcionar los efectos benéficos que exhiben dichas composiciones, se prefiere la utilización de los compuestos de los grupos II y III.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse solas o combinadas con los alimentos con la finalidad de reducir la ganancia de peso corporal, así como coadyuvante para controlar los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol. Por otra parte, el consumo de las composiciones de la invención permite inducir la síntesis y la secreción de insulina debido a que son capaces de estimular la producción de GLP-1, por lo que pueden ser útiles para condiciones patológicas como la diabetes donde la producción de insulina es necesaria. Debido a los múltiples efectos benéficos que proporciona para la salud el consumo de las composiciones de la invención, dichas composiciones pueden utilizarse para controlar o incluso disminuir los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en sangre, con lo cual pueden ocuparse como productos alimenticios convenientes en el control de dichos compuestos en sangre, principalmente en dietas especiales aplicadas en terapias donde dicho control es importante.

Adicionalmente las composiciones de la invención proporcionan efectos prebióticos muy convenientes debido a que su consumo permite estimular el crecimiento de bacterias probióticas de mejor forma que otros fructanos, ya que son capaces de estimular el crecimiento de dichas bacterias (Bifidobacteria y Lactobacilli, por ejemplo) debido posiblemente a las estructuras ramificadas que presentan los fructanos de Agaves. Debido

a ello, las composiciones de la presente invención resultan tener un gran potencial como ingredientes alimenticios y/o ingredientes promotores de bienestar y salud.

Las composiciones de la invención también pueden incluir componentes que no inhiban el efecto prebiótico y de disminución de ingesta de alimento y energía y que permitan a la vez obtener diversas presentaciones o mejoras en el sabor o aspecto de las mismas tales como excipientes, saborizantes, estabilizadores, conservadores o adyuvantes comúnmente conocidos en la elaboración de alimentos.

Para efectos de la invención, las composiciones descritas aquí comprenden una concentración de agavinas del orden de 50% al 100% en peso con respecto del peso total de la composición. Así mismo, las composiciones de la invención se pueden adicionar a los alimentos en proporciones del 2 al 10% en peso con respecto del peso total de la composición alimenticia, siendo perfectamente compatibles con ingredientes alimenticios típicos tales como proteínas, grasas y carbohidratos presentes en la mayoría de los alimentos.

Las composiciones descritas aquí pueden ser administradas en forma de composiciones comestibles sólidas, polvos, líquidos, geles o cualquier otra forma que resulte conveniente para su consumo.

Las composiciones de la invención pueden ser obtenidas mediante métodos convencionales conocidos en el estado del arte, mediante la mezcla de los diversos ingredientes que sean de interés junto con las agavinas seleccionadas en las cantidades y proporciones que resulten adecuadas. Sin embargo son preferibles aquellos métodos que permitan conservar las propiedades de las agavinas en dichas composiciones.

En comparación con composiciones alimenticias que comprenden fructanos de baja complejidad química tales como las inulinas comerciales, las composiciones de la invención proporcionan efectos mayores y mejorados con las mismas cantidades de principios activos, así como mayores efectos benéficos con su consumo, como por ejemplo el proporcionar efectos prebióticos al mismo tiempo que proporciona efectos de reducción en la ingesta de alimento y por ende en la ganancia de peso corporal. Debido a ello, las composiciones de la invención proporcionan mayores y mejores beneficios que las composiciones conformadas únicamente por fructanos del tipo de las inulinas.

Como una manera de ilustrar la presente invención se muestran los siguientes ejemplos sin el propósito de limitar su alcance.

Ejemplo 1. Metodología.

Materiales de agavinas e inulinas.

Para la obtención de Agavinas se utilizaron tanto el material vegetal de plantas del Orden

5 Liliales como por ejemplo plantas de Agave y de *Dasyilirion* de diferentes regiones del territorio nacional, tales como:

- Agave tequilana Jal. (ATJ),
- Agave tequilana Gto. (ATG),
- Agave angustifolia Oax (AAO),
- 10 • Agave angustifolia Son (AAS),
- Agave potatorum Oax (APO),
- Agave cantala Oax. (ACO),
- Agave fourcroydes Yuc. (AFY), y
- *Dasyilirion* spp. Chih. (DSC).

15 Así mismo se utilizaron inulinas comerciales con fines de comparación, tales como:

- Achicoria Sigma (CIS),
- Dalia Sigma (DVS),
- Raftiline GR (RNE),
- 20 • Raftilosa Synergyl 1 (SER), y
- Raftilosa P95 (RAF).

Extracción de los Fructanos de Agaves y *Dasyilirion* spp.

Los fructanos de Agaves y *Dasyilirion* spp. se extrajeron de acuerdo al método reportado

25 por López y col. (2003). Brevemente, 100 g de piña de Agaves y *Dasyilirion* se extrajeron con solución alcohólica al 80% y agitación continua por 1 h. Las muestras se filtraron y el material vegetal (que corresponde al pellet) se re-extrajo con H₂O por 30 min. Los sobrenadantes se mezclaron con cloroformo para eliminar así la fracción lipídica. La fase acuosa se concentró por evaporación rotatoria bajo presión reducida. Posteriormente las

30 muestras se liofilizaron y se almacenaron en un desecador, hasta que fueran requeridas para los siguientes análisis.

Cromatografía de Capa Fina (TLC).

La detección y caracterización preliminar de los fructanos de Agaves y Dasylirion se realizó por TLC. Se aplicó 1 µL de la muestra (20 mg/mL) en placas de silica gel (10 X 10 cm). Las placas se corrieron en una cámara de TLC, usando como fase móvil
5 propanol:agua:butanol (12:4:3). El agente revelador empleado fue difenilamina-anilina-ácido fosfórico.

Metodología *in vitro*.

Como esquema general de trabajo para los experimentos *in vitro* se siguió el
10 procedimiento descrito en la figura 3.

Crecimiento bacteriano.

Se utilizaron cepas probióticas de Bifidobacteria y Lactobacilli siguiendo el método reportado por Gibson y Wang (1994) con algunas modificaciones. Se usó el medio de
15 Mann Rogosa y Sharpe (MRS); en el caso de Bifidobacteria el medio de cultivo se suplementó con L-cisteína. Se aplicó un inóculo bacteriano de 1% en 10 mL de medio de cultivo. Las bacterias se crecieron bajo condiciones anaeróbicas por 20 h a 37°C. Para evaluar el efecto de los diferentes fructanos en el crecimiento bacteriano, el medio se preparó sin glucosa. Se adicionaron los fructanos como única fuente de carbono a una
20 concentración de 10 g/L. El crecimiento bacteriano se midió por densidad óptica a 630 nm.

Fermentación de carbohidratos.

Como un indicador de la producción de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) por las bacterias probióticas se evaluó el cambio de pH del medio de cultivo, tanto al inicio del
25 experimento como después del período de incubación bacteriano, bajo las condiciones descritas previamente, para lo cual se utilizó un medidor de pH digital Hanna Instrument.

Determinación de ácidos grasos de cadena corta por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Después del período de incubación, se tomó 1 mL del medio de cultivo para el análisis de los SCFA de acuerdo al método de Al-Tamimi y col. (2006). En breve, la muestra se centrifugó X 5 min en una microcentrífuga Eppendorf para remover las células bacterianas

y cualquier material no solubilizado que pudiera interferir con el análisis de HPLC. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) y como eluyente se usó el H₂SO₄ 5mM a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min y la temperatura de operación de 50°C. Los ácidos fueron detectados por UV a una longitud de onda de 220 nm y calibrado contra el estándar correspondiente a una concentración de 10 a 100 mM. El volumen de inyección fue de 20 µL.

Metodología *in vivo*.

En cuanto al esquema general de trabajo para los experimentos *in vivo*, se siguió el procedimiento descrito en la figura 4.

Materiales.

Raftilosa P₉₅ (Orafti, Belgium) (RAF) es una mezcla de fructanos con un DP promedio de 4.8. Los fructanos de *A. tequilana* Weber var. azul de Gto. (ATG) fueron analizados por MALDI-TOF-MS (datos no mostrados) y presentaron un intervalo de DP de 3 hasta 22 con mayor abundancia entre 7 y 9, mientras que en el caso de los fructanos de *Dasyilirion* spp. de Chihuahua (DSC) mostraron un intervalo de DP de 3 a 20.

Animales y dietas.

Se utilizaron 32 ratones macho C57Bl/6J de 12 semanas de edad de los Laboratorios Charles River de Francia, los cuales se mantuvieron bajo condiciones de humedad y temperatura controladas y un ciclo de luz:oscuridad de 12 h. Los ratones se dividieron en 4 grupos, 8 ratones por grupo, 4 ratones por jaula, de acuerdo a la dieta (Suplementada o no con fructanos). Antes de iniciar el experimento, los ratones se sometieron a un período de aclimatación de 6 días, después de dicho período, los ratones control (dieta STD) se alimentaron con la dieta estándar A04 (UAR, Villemoisson-sur-Orge, Francia), mientras que los ratones alimentados con las dietas suplementadas con fructanos, RAF, ATG y DSC recibieron una dieta preparada mezclando 90 g de la dieta estándar A04 con 10 g de los fructanos correspondientes (Raftilosa P₉₅, *A. tequilana* Weber var. azul de Gto. y *Dasyilirion* spp. de Chih., respectivamente). La dieta estándar A04 contenía lo siguiente: (g/100 g peso seco) proteína 19.3 (mezcla equivalente de proteínas de soya y de

pescado); carbohidratos provenientes de maíz, trigo, cebada y salvado 70.4; lípidos 3.0; mezcla mineral 6.0 y mezcla de vitaminas 1.3.

Ingesta de alimento, peso corporal y heces.

- 5 La ingesta de alimento y el peso corporal se monitorearon tres veces por semana y la colecta de heces se realizó una vez por semana evaluando la producción de heces en 24 horas. El promedio de la ingesta energética diaria (kJ/d) se calculó como sigue: ingesta de alimento (g) X valor energético de la dieta (kJ/g). El valor energético de la dieta estándar fue de 13.86 kJ/g, mientras que para las dietas suplementadas con fructanos fue de 13.08
- 10 kJ/g.

Muestras de sangre.

- Las muestras de sangre se colectaron una vez por semana, haciendo una pequeña incisión en la cola de los ratones. A partir de estas muestras se evaluaron los niveles de
- 15 glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados, utilizando kits acoplados a reacciones enzimáticas y detección espectrofotométrica de los productos finales de las reacciones (Elitech, Brussels, Belgium).

- Al final del período experimental, en el día 37, los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de una solución de pentobarbital de sodio (60 mg/Kg de peso corporal;
- 20 Nembutal®, Sanofi Santé Animale, Brussels Belgium). Se colectaron muestras de sangre de vena porta en tubos con EDTA (Sarstedt, Numbrecht, Germany), con o sin inhibidor de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) (Linco Research, St Charles, MO, USA).

- Las muestras de sangre se centrifugaron y el suero se almacenó a -80°C. La concentración de GLP-1 (7-36) amida se midió usando un kit ELISA específico para este
- 25 péptido sin reactividad hacia GLP-1 (9-36) amida, GLP-2 o glucagon (GLP-1 active ELISA kit; Linco Research).

Muestras de tejidos.

- Los segmentos del ciego y colon (proximal, medio y distal) se cortaron inmediatamente,
- 30 lavando con solución fisiológica (9 g NaCl/L), y posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido almacenándolos a -80°C hasta que se requirieron para el análisis de mRNA y péptidos.

El hígado, tejido epididimal y ciego se pesaron, posteriormente el hígado se seccionó, una parte se congeló inmediatamente en N₂ y luego se almacenó a (-80°C) para análisis de lípidos (niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados), y la otra sección del hígado se congeló en isopentano y se almacenó a -80°C para los análisis
5 histológicos con tinción de hematoxilina/eosina.

Análisis de hígado.

Las muestras de hígado se homogenizaron con buffer de fosfatos y la determinación de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados se realizó como previamente se
10 describió para las muestras de sangre después de una extracción con cloroformo-metanol de acuerdo al método de Folch y col. (1957). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como estándar (Bradford, 1976).

Extracción del péptido-1 tipo glucagon (7-36) amida intestinal.

La extracción de GLP-1 (7-36) amida de segmentos intestinales se realizó con una solución de etanol-ácido clorhídrico. Las muestras se homogenizaron y se llevaron a 4°C por 24 h. El homogenado se centrifugó y se colectó el sobrenadante para posteriormente diluirlo 100 y 250 veces en solución salina para ciego y colon, respectivamente. La
20 concentración intestinal de GLP-1 amida (7-36) se midió como previamente se describió para las muestras de sangre.

Aislamiento del ácido ribonucleico.

El RNA total fue aislado de cada segmento intestinal de acuerdo a Chomczynski y Sacchi
25 (1987) usando el reactivo de aislamiento TriPure. Se utilizaron aproximadamente de 50-100 mg de tejido intestinal para extraer el RNA total. La cantidad y pureza del RNA se determinó por espectroscopía ultravioleta (UV) a 260 y 280 nm.

Reacción en cadena de la polimerasa - transcripción reversa (RT-PCR).

30 Para realizar la RT-PCR se utilizó 1 µg de RNA y el kit para RT-PCR. Los primers de interés para la amplificación del cDNA fueron las secuencias sentido y antisentido del gene proglucagon y β-actina. Se desarrollaron 23 ciclos para la detección de los transcritos de

proglucagon y β -actina. Para verificar una posible contaminación se utilizaron tubos control sin RNA.

Los productos de RT-PCR se aplicaron en gel de agarosa al 1.8% y se visualizaron utilizando bromuro de etidio y luz UV. La cuantificación de los productos de PCR se desarrolló usando un método fluorimétrico.

Ejemplo 2. Análisis de Fructanos por Medio de Cromatografía de Capa Fina (TLC).

Una vez que los fructanos se extrajeron y que se preparó una solución de 20 mg/mL de cada uno de ellos, se analizaron por TLC para visualizar sus diferencias en el perfil de DP (Figura 5). Los fructanos de *Dasyilirion* spp. (DSC) mostraron una mayor proporción de fructanos con bajo DP comparados con los fructanos de las otras especies, seguido por *A. tequilana* Weber var. azul de Guanajuato (ATG), esto únicamente basado en la intensidad de la mancha en el origen de la aplicación de la muestra, la cual fue débil para estas muestras, pudiendo asumirse que DSC muestra un perfil de fructanos con DP menor a 20.

Para el caso de los fructanos comerciales, Raftilosa®Synergy1 (RSE) mostró una gran cantidad de fructanos de bajo DP comparado a Raftiline®GR (RNE). No se observaron diferencias marcadas entre los fructanos de *A. fourcroydes* de Yucatán (AFY) y *A. angustifolia* de Sonora (AAS). Un importante punto que cabe remarcar, es que en todos los casos de los fructanos de Agaves y *Dasyilirion*, se pudo observar la presencia de una mancha entre DP2 y DP3, la cual corresponde a los fructanos de tipo neo reportado por Mancilla-Margalli y López (2006).

Ejemplo 3. Efecto prebiótico de Agavinas *in vitro*.

Después de observar el perfil de DP de los diferentes fructanos de Agaves, se analizó su efecto prebiótico *in vitro* utilizando bacterias probióticas, tanto del género *Bifidobacterium* como de *Lactobacillus*, en donde se pudieron observar diferentes efectos en la estimulación del crecimiento de ambos géneros bacterianos (ver figuras 6 y 7).

En general, el medio suplementado con fructanos DSC mostró el mejor crecimiento de *Bifidobacteria* (figura 6), independientemente de la especie, solamente en el caso de *B. breve* (figura 6d), DSC no mostró diferencia significativa respecto a RSE. La segunda mejor fuente de prebióticos fue ATG, seguido por ACO en *B. adolescentis* (figura 6a), por RSE en *B. animalis* (figura 6b), *B. breve* (figura 6d) y *B. longum* (figura 6f), en el caso de

B. bifidum (figura 6c). ATG no mostró diferencia significativa respecto a RSE, AAS, APO, ACO y AFY y finalmente, para *B. infantis* (figura 6e) fue similar a ACO.

Para Lactobacilli (figura 7), los fructanos de DSC fueron de nuevo mejores prebióticos, con una mayor estimulación del crecimiento de todas las especies de este género comparado con el resto de los fructanos, con la excepción de *L. acidophilus* (figura 7a), DSC no fue significativamente diferente a AAS; además fue seguido por ATG y este no mostró alguna diferencia comparado a ACO y a AAS en *L. casei* (figura 7b) y *L. rhamnosus* (figura 7d). Con *L. acidophilus* (figura 7a), ATG, AAS y ACO fueron similares a RNE, RSE y a AFY. Esos resultados concuerdan con lo reportado por McKellar y Modler (1989), donde ellos mencionan que las inulinazas de *Bifidobacterium* spp. fueron más activas contra fructanos de la serie *neo* y menos activas contra inulinas. Si la naturaleza de los carbohidratos determina la fermentabilidad de los mismos es una pregunta que rara vez se ha manejado (Cummings y Macfarlane, 2002).

En relación a este punto, van Laere y col. (1997) evaluaron el rompimiento de diferentes fructooligosacáridos, respecto a su composición y tamaño molecular, por varias especies bacterianas incluyendo géneros de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*. Los autores observaron que los fructooligosacáridos fueron extensivamente fermentados por la mayoría de las bacterias, excepto por *Clostridia*. Por otra parte, los carbohidratos de bajo DP fueron utilizados mejor o quizás de una forma más rápida por *Bifidobacteria*.

Por lo tanto, la estructura de los carbohidratos y la especie bacteriana presente en el ecosistema son definitivamente factores determinantes en el control de la fermentación de prebióticos. En la presente invención, DSC con valores de DP de 3 a 20 y ATG de 3 a 22 estimularon mejor el crecimiento de ambos géneros bacterianos. Un comportamiento similar fue observado con RSE y RNE, siendo RSE una mezcla de mayores cantidades de bajo DP comparado con RNE, tal como reportaron Al-Tamimi y col. (2006), donde el crecimiento de *Bifidobacteria* fue estimulado en diferente magnitud dependiendo del peso molecular de los arabinanos y arabino oligosacáridos, por ejemplo, se observó un máximo incremento en *Bifidobacteria* después de 48 horas con las fracciones de menor peso molecular. Palframan y col. (2003) mencionaron que *Bifidobacteria* difirió en los perfiles de fermentación cuando se probaron en diferentes carbohidratos. Similarmente, en otros trabajos, van Der Meulen y col. (2004) evaluaron el crecimiento de *B. animalis* en diferentes fuentes de energía a través de fermentaciones a pequeña y gran escala. En

general, la fermentación de los fructanos tipo inulina resultó en cambios en el crecimiento y producción metabólica, debido a la preferencia sobre ciertos fructanos, especialmente sobre los fructooligosacáridos.

En la presente invención, los fructanos con el DP más grande fueron las inulinas comerciales de *Cichorium intybus* (CIS) y los de *Dalia variabilis* (DVS), ambas inulinas mostraron el menor efecto en la estimulación en el crecimiento bacteriano para todas las especies evaluadas (figuras 6 y 7).

De acuerdo a los resultados reportados por Mancilla-Margalli y López (2006), los fructanos de Agaves fueron clasificados en 3 grupos dependiendo de los puntos de ramificación y la presencia de moléculas α -D-glucopiranosas terminales e internas, en donde DSC pertenece al grupo II y ATG es clasificado en el grupo III. Con lo anterior, se puede decir que el mejor efecto prebiótico se encuentra en los fructanos de Agaves que pertenecen al grupo II y al III, teniendo dichos grupos la característica de ser fructanos con estructuras menos ramificadas y menor DP, mientras que los fructanos del grupo I poseen estructuras altamente ramificadas y con mayores DP.

Por otro lado, los fructanos de la misma especie de Agave, pero de plantas que crecieron en diferentes zonas geográficas, mostraron mayores diferencias cuando se evaluaron con la misma especie bacteriana (figuras 6 y 7). Los fructanos de *A. tequilana* Weber var. azul del estado de Jalisco (ATJ) muestran ser un sustrato pobre para todas las especies bacterianas cuando se comparó con la misma especie de Agave pero que creció en el estado de Guanajuato (ATG). El mismo comportamiento se observó para *A. angustifolia* de Sonora (AAS, grupo II) y de Oaxaca (AAO, grupo I), siendo AAS un mejor sustrato para todas las especies bacterianas (figuras 6 y 7). Estos resultados pueden ser explicados en base a la diversidad estructural dentro de las especies de Agave como lo mencionan Mancilla-Margalli y López (2006).

Otro importante parámetro durante la fermentación de fructanos, es la caída del pH en el medio de crecimiento como una consecuencia de la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA). En la presente invención la mayor caída de pH se observó en el medio de cultivo que tenía como sustrato a los fructanos de *Dasyilirion* spp. (DSC) con una relación directa entre el crecimiento bacteriano y la caída de pH la cual se puede apreciar en las tabla 2 y 3.

Tabla 2

Caída de pH debido a la fermentación de fructanos por *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*.

Fructano	Caída de pH					
	<i>B. adolescentes</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>
CIS	0.25 ± 0.07 ^d	0.16 ± 0.04 ^e	0.19 ± 0.06 ^c	0.18 ± 0.05 ^d	0.31 ± 0.04 ^e	0.49 ± 0.13 ^e
DVS	0.26 ± 0.03 ^d	0.19 ± 0.01 ^e	0.14 ± 0.10 ^c	0.15 ± 0.07 ^d	0.30 ± 0.04 ^e	0.43 ± 0.09 ^e
RNE	0.31 ± 0.05 ^d	0.53 ± 0.01 ^d	0.17 ± 0.07 ^c	0.40 ± 0.10 ^{cd}	0.36 ± 0.04 ^e	0.82 ± 0.05 ^{de}
RSE	0.45 ± 0.08 ^{cd}	1.54 ± 0.04 ^{ab}	0.43 ± 0.07 ^{bc}	1.54 ± 0.05 ^a	0.43 ± 0.09 ^{de}	1.83 ± 0.02 ^{ab}
ATJ	0.22 ± 0.06 ^d	0.39 ± 0.01 ^{de}	0.21 ± 0.06 ^c	0.24 ± 0.06 ^d	0.27 ± 0.07 ^e	0.64 ± 0.14 ^e
ATG	0.76 ± 0.07 ^{bc}	1.27 ± 0.04 ^{bc}	0.74 ± 0.07 ^b	0.83 ± 0.08 ^b	0.85 ± 0.09 ^b	1.29 ± 0.09 ^c
AAO	0.44 ± 0.05 ^{cd}	0.32 ± 0.02 ^{de}	0.33 ± 0.12 ^{bc}	0.17 ± 0.06 ^d	0.46 ± 0.07 ^{cde}	0.60 ± 0.02 ^e
AAS	0.82 ± 0.07 ^b	1.07 ± 0.07 ^c	0.70 ± 0.15 ^b	0.76 ± 0.04 ^b	0.88 ± 0.04 ^b	1.41 ± 0.08 ^{bc}
APO	0.48 ± 0.03 ^{bcd}	0.30 ± 0.05 ^{de}	0.39 ± 0.11 ^{bc}	0.11 ± 0.03 ^d	0.44 ± 0.04 ^{cde}	0.65 ± 0.10 ^e
ACO	0.80 ± 0.14 ^b	1.08 ± 0.11 ^c	0.49 ± 0.04 ^{bc}	0.67 ± 0.10 ^{bc}	0.74 ± 0.07 ^{bc}	1.21 ± 0.07 ^{cd}
AFY	0.67 ± 0.05 ^{bc}	1.30 ± 0.06 ^{bc}	0.55 ± 0.12 ^{bc}	0.92 ± 0.05 ^b	0.73 ± 0.07 ^{bcd}	1.33 ± 0.11 ^c
DSC	1.76 ± 0.04 ^a	1.71 ± 0.09 ^a	1.83 ± 0.10 ^a	1.56 ± 0.02 ^a	1.79 ± 0.02 ^a	2.17 ± 0.05 ^a

La caída de pH inducida por la fermentación de fructanos se expresa, como el pH del medio de cultivo (Valor promedio ± SEM) al final de la fermentación en presencia de los fructanos menos el pH al inicio de la fermentación (Adaptado de Roberfroid y col., 1998). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$. La caída de pH se midió directamente en el tubo de crecimiento. CIS, *Cichorium intybus* Sigma; DVS, *Dahlia variabilis* Sigma; RNE, Raffinose®GR; RSE, Raffinosa®Synergy1; ATJ, *A. tequilana* Weber var. azul de Jal; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul de Gto; AAO, *A. angustifolia* Oax; AAS, *A. angustifolia* Son; APO, *A. potatorum* Oax; ACO, *A. cantala* Oax; AFY, *A. fourcroydes* Yuc; DSC, *Dasyliion* spp. Chih.

Tabla 3

Caída de pH debido a la fermentación de fructanos por *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*

Fructano	Caída de pH			
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>
CIS	0.65 ± 0.04 ^f	0.33 ± 0.05 ^e	0.35 ± 0.05 ^d	0.39 ± 0.04 ^e
DVS	0.52 ± 0.01 ^f	0.30 ± 0.04 ^e	0.31 ± 0.04 ^d	0.29 ± 0.02 ^e
RNE	2.10 ± 0.12 ^b	0.45 ± 0.01 ^{de}	0.48 ± 0.02 ^{cd}	0.40 ± 0.02 ^e
RSE	2.40 ± 0.03 ^a	0.61 ± 0.01 ^{cd}	0.52 ± 0.08 ^{bcd}	0.65 ± 0.04 ^{bcd}
ATJ	1.27 ± 0.02 ^{de}	0.34 ± 0.02 ^e	0.32 ± 0.03 ^d	0.31 ± 0.04 ^e
ATG	1.77 ± 0.03 ^c	0.76 ± 0.03 ^{bc}	0.81 ± 0.04 ^b	0.68 ± 0.07 ^{bc}
AAO	1.10 ± 0.03 ^e	0.46 ± 0.01 ^{de}	0.48 ± 0.05 ^{bcd}	0.47 ± 0.04 ^{cde}
AAS	2.30 ± 0.03 ^{ab}	0.91 ± 0.04 ^b	0.73 ± 0.05 ^{bc}	0.78 ± 0.05 ^b
APO	1.46 ± 0.05 ^d	0.47 ± 0.03 ^{de}	0.46 ± 0.05 ^{cd}	0.45 ± 0.01 ^{de}
ACO	2.08 ± 0.04 ^b	0.77 ± 0.04 ^{bc}	0.78 ± 0.09 ^{bc}	0.78 ± 0.07 ^b
AFY	2.11 ± 0.11 ^b	0.82 ± 0.03 ^b	0.76 ± 0.12 ^{bc}	0.77 ± 0.03 ^b
DSC	2.27 ± 0.04 ^{ab}	1.81 ± 0.06 ^a	1.92 ± 0.09 ^a	1.82 ± 0.04 ^a

La caída de pH inducida por la fermentación de fructanos se expresa, como el pH del medio de cultivo (Valor promedio ± SEM) al final de la fermentación en presencia de los fructanos menos el pH al inicio de la fermentación (Adaptado de Roberfroid y col., 1998). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$. La caída de pH se midió directamente en el tubo de crecimiento. CIS, *Cichorium intybus* Sigma; DVS, *Dahlia variabilis* Sigma; RNE, Raftiline®GR; RSE, Raftilosa®Synergy1; ATJ, *A. tequilana* Weber var. azul de Jal; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul de Gto; AAO, *A. angustifolia* Oax; AAS, *A. angustifolia* Son; APO, *A. potatorum* Oax; ACO, *A. cantala* Oax; AFY, *A. fourcroydes* Yuc; DSC, *Dasyliiron* spp. Chih.

De estos resultados se puede mencionar que a mayor crecimiento, mayor caída de pH, lo cual se ha reportado tiene efectos benéficos inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas (Gibson y Wang, 1994).

Las concentraciones de los SCFA de 4 diferentes fructanos se enlistan en la tabla 4, siendo láctico, fórmico y acético los ácidos detectados. Las concentraciones de los ácidos variaron dependiendo del sustrato usado por las diferentes bacterias tal como lo reportan Shene y col. (2005), observándose mayor concentración de los ácidos con los fructanos DSC, seguido por ATG. Con estos resultados se puede mencionar que en general, un mayor crecimiento de las bacterias generó una mayor caída de pH y consecuentemente una mayor concentración de los ácidos láctico, fórmico y acético, sin embargo, dentro de una misma especie bacteriana se pudo observar que si se presentaba una concentración alta de ácido láctico se observaba también una correspondiente baja concentración de ácido fórmico y viceversa, una baja concentración de ácido láctico corresponde a una alta concentración de ácido fórmico. En este contexto, Palframan y col. (2003) mencionaron que cuando *Bifidobacteria* se probó con diferentes fuentes de carbohidrato se observó una alta producción de lactato con una baja producción de formato y bajos niveles de lactato fueron generalmente obtenidos con una alta concentración de formato.

De los 4 fructanos utilizados en la determinación de los SCFA, RNE fue el que exhibió menor estimulación del crecimiento y menor caída de pH, esto se puede relacionar con las menores concentraciones de dichos ácidos detectados en el medio de cultivo.

La producción de los ácidos acético y láctico son de gran interés en la inhibición de patógenos intestinales como lo son *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Siendo conocido que la propiedad inhibitoria del crecimiento de patógenos conferido por *Bifidobacteria* depende de la producción de ácidos orgánicos (van Der Meulen y col., 2004; Fooks y Gibson, 2002; Ibrahim y Bezkorovainy, 1993).

En este contexto, ha sido reportado que *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* no producen ácido butírico, lo cual juega un papel particularmente importante como fuente de energía preferida por el epitelio colónico y proporciona protección contra cáncer de colon y colitis (Pool-Zobel, 2005; Archer y col., 1998; Christl y col., 1996; Csordas, 1996), sin embargo, los ácidos acético y láctico generados por esas bacterias han sido reportados como precursores butirogénicos (Duncan y col., 2004a; b; 2002).

Para concluir, los fructanos de Agaves y Dasyilirion fueron capaces de estimular el crecimiento de bacterias probióticas en medio MRS mejor que otros fructanos; pudiendo esto ser debido al tipo de enlace, grado de polimerización y a las estructuras ramificadas que presentan los fructanos de Agaves y Dasyilirion. Bifidobacteria y Lactobacilli crecieron mejor con los fructanos de menores DP. La técnica de HPLC fue útil en la determinación de los SCFA's generados por la fermentación de los fructanos, siendo detectados los ácidos acético, fórmico y láctico. Los fructanos de Agaves y Dasyilirion ofrecen un tremendo potencial prebiótico, abriendo nuevas alternativas como ingredientes alimenticios y/o ingredientes promotores de bienestar y salud.

Ejemplo 4. Pruebas *in vivo*.

Después de haber realizado los experimentos *in vitro* se seleccionaron los dos fructanos con mejores características prebióticas, con los cuales se diseñaron los experimentos *in vivo*, donde se evaluó por primera vez el efecto del consumo de fructanos de *A. tequilana* Weber var. azul de Gto. y de *Dasyilirion* spp. de Chih. sobre los niveles de glucosa y lípidos en un ensayo *in vivo* utilizando como modelo de estudio ratones macho C57Bl/6J. Los ratones se alimentaron con una dieta estándar o suplementada con fructanos (DSC, ATG y RAF) al 10%. Los tratamientos con fructanos fueron bien tolerados por los ratones. En general, el suplementar la dieta con fructanos disminuyó la ingesta de alimento (tabla 5), así como también, la ganancia de peso corporal (figura 8) y excreción de heces (tabla 5) comparado con la dieta estándar. En relación a la ingesta de alimento (tabla 5), los ratones con la dieta suplementada con RAF o ATG comieron un 11% y 10% menos alimento que las que se alimentaron con la dieta estándar, respectivamente. La ingesta de energía total (figura 9) fue significativamente menor en todos los grupos alimentados con fructanos que en el grupo estándar. Los ratones que recibieron las dietas suplementadas con fructanos, ATG, DSC y RAF mostraron una ganancia de peso corporal significativamente menor durante todo el período experimental (figura 8). Solo la dieta ATG incrementó significativamente la excreción de heces comparado con el grupo STD (17% más, en base seca), no siendo significativo el incremento para los otros grupos de fructanos, DSC y RAF (tabla 5).

Tabla 4
Concentración (mM) de los ácidos grasos de cadena corta generados a través de la fermentación de 4 diferentes fructanos

FRUCTANO	ÁCIDO	BA	BAN	BBF	BI	BBR	BLON	LA	LCC	LPC	LR
DSC	Láctico	38.66	8.63	43.23	45.17	5.24	6.99	63.78	33.41	54.70	37.45
	Fórmico	13.18	18.28	14.14	12.78	17.75	14.09	40.95	13.11	6.56	3.70
	Acético	10.16	17.50	12.72	11.68	23.42	19.93	14.93	12.30	12.50	10.35
RSE	Láctico	4.39	3.66	7.07	7.17	4.11	0.00	62.25	21.03	9.41	0.00
	Fórmico	3.62	7.99	2.73	4.35	13.57	5.56	14.98	10.12	0.00	0.89
	Acético	7.07	6.06	10.09	9.35	17.55	7.95	10.01	10.73	9.87	7.31
ATG	Láctico	10.64	0.00	6.64	11.15	0.00	0.00	45.33	6.75	21.32	15.13
	Fórmico	17.38	10.47	7.97	14.67	9.79	10.57	76.78	7.16	2.76	5.89
	Acético	9.79	7.72	8.02	8.58	12.15	10.26	18.43	9.04	14.24	9.40
RNE	Láctico	1.59	0.00	0.31	4.87	0.89	0.00	51.26	0.00	0.00	0.00
	Fórmico	3.22	1.55	0.08	4.06	6.70	1.33	18.26	2.66	0.00	1.57
	Acético	7.36	0.00	7.04	9.31	8.26	0.00	14.24	5.95	5.46	8.33

5

BA, *B. adolescentis*; BAN, *B. animalis*; BBF, *B. bifidum*; BI, *B. infantis*; BLO, *B. longum*; LA, *L. acidophilus*; LR, *L. rhamnosus*. DSC, *Dasyliirion* spp.; ATG, *Agave tequilana* Weber var. azul Gto.; RSE, Raftilosa@Synergy1; RNE, Raftiline@GR.

Peso y contenido de lípidos de hígado y tejido epididimal.

Solamente la dieta suplementada con ATG disminuyó significativamente tanto el peso de tejido epididimal como el de hígado (tabla 5), mostrando una disminución no significativa en los niveles de colesterol hepático en este grupo (tabla 6), siendo la única modificación bioquímica observada.

Niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en sangre.

En el estado post-pandrial las concentraciones de glucosa en sangre se vieron disminuidas en 19, 15 y 14% en ratones alimentados con RAF, ATG y DSC, respectivamente, cuando se comparó contra la dieta STD (tabla 7). Las concentraciones de triglicéridos (TAG) comparado contra la dieta STD se vieron reducidas en un 31%, 11% y 7% en ratones alimentados con RAF, ATG y DSC, respectivamente. La reducción en las concentraciones de colesterol fue de aproximadamente de 20% en animales que recibieron la dieta suplementada con fructanos independientemente del grupo, comparado con la dieta STD. Los ácidos grasos no esterificados (NEFA) no se vieron significativamente modificados por ninguno de los tratamientos con fructanos. Los niveles de glucosa y colesterol plasmáticos se correlacionaron positivamente con la ganancia de peso corporal.

Análisis histológicos.

Los análisis histológicos del hígado no revelaron ninguna diferencia entre grupos. Se observó una estructura normal de los hepatocitos arreglados en trabeculi centriportal típico en todos los grupos de dietas. La tinción de grasa con oil red se observó como reacción negativa.

Peso del ciego.

Los fructanos mostraron un efecto más pronunciado en el peso del ciego total (figura 10). Se observó un alargamiento significativo del ciego en los ratones alimentados con ATG a casi el doble comparado contra la dieta STD; las dietas DSC y RAF incrementaron el peso del ciego total en aproximadamente un 65%.

mRNA de proglucagon intestinal (precursor) y niveles de péptido-1 tipo glucagon en intestino y vena porta.

Los niveles de mRNA de proglucagon en el ciego (tabla 8) se incrementaron por más del 30% en las dietas RAF y ATG, comparado contra la dieta STD, sin embargo, no se observó efecto significativo para el grupo de DSC. La concentración de GLP-1 en el ciego fue mayor en las dietas suplementadas con fructanos. Las dietas de ATG, RAF y DSC mostraron concentraciones equivalentes (expresadas como pmol/ciego) a 12.92 ± 1.20 , 11.65 ± 1.19 y 9.34 ± 0.62 , respectivamente, mientras que en el caso de la dieta STD, la concentración fue de 6.79 ± 0.70 .

Los niveles de mRNA de proglucagon medidos en el colon no fueron significativamente diferentes entre grupos (tabla 8), excepto por un incremento moderado pero significativo en el grupo ATG comparado contra el control en el colon medio. La cuantificación del contenido del péptido GLP-1 en los diferentes segmentos del colon (figura 6), reveló que los ratones alimentados con la dieta suplementada con diferentes fructanos exhibieron una mayor concentración de GLP-1 que la dieta STD. Este incremento fue solo significativo en el colon proximal nuevamente para la dieta ATG, en el colon medio para la dieta DSC y en el colon distal para RAF.

Finalmente, cuando la concentraciones de GLP-1 se midieron en la vena porta (figura 12), estas fueron mayores en los ratones alimentados con las dietas suplementadas con fructanos independientemente del tipo de éste, comparado con la dieta STD; siendo casi el doble en el grupo RAF contra el control.

Para concluir de los resultados *in vivo*, como se ha reportado previamente, el suplementar la dieta con fibras solubles tiene efectos benéficos en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, ya que ayuda a mejorar el control glicémico, disminuye la hiperinsulinemia y disminuye las concentraciones de lípidos plasmáticos (Chen y col., 2003; Chandalia y col., 2000; Vuksan y col., 2000; Anderson y col., 1999; Groop y col., 1993). La viscosidad de las fibras se ha propuesto como una importante propiedad (Vuksan y col., 2000). Sin embargo, algunas fibras tales como los oligosacáridos no digeribles, pueden mostrar sus efectos a pesar de que no tienen excelentes propiedades gelificantes y no modifican sustancialmente la viscosidad al encontrarse en solución.

La fermentación de fibras genera ácidos grasos de cadena corta (SCFA), pudiendo este efecto estar implicado en la modulación de la expresión del gen proglucagon a nivel

intestinal y subsecuentemente, secretar los péptidos derivados de proglucagon como el GLP-1 (Tappenden y col., 2003; Massimino y col., 1998; Reimer y McBurney, 1996).

Como se mencionó anteriormente, el GLP-1 actúa como una hormona incretina y es conocido como un agente antidiabético que combina efectos insulíntricos y anorécticos

5 (Meier y col., 2002). El péptido-1 tipo glucagon juega un importante papel en disminuir los niveles de glucosa en sangre principalmente a través de su habilidad de potenciar el efecto estimulante de la glucosa sobre la secreción de insulina en las células β -pancreáticas (Holz y col., 1993). También afecta los niveles de glucosa en sangre a través de su efecto inhibitorio de vaciado gástrico (Nauck y col., 1997), supresión del apetito
10 (Turton y col., 1996) y por medio de la inhibición en la secreción de glucagon de las células α (Komatsu y col., 1989).

En la presente invención se puede observar por primera vez el efecto del consumo de fructanos de *A. tequilana* Weber var. azul de Gto. y de *Dasyilirion* spp. de Chih. sobre el metabolismo de glucosa y lípidos en un ensayo *in vivo* utilizando como modelo de estudio

15 ratones macho C57bl/6J. Los tratamientos con fructanos fueron bien tolerados por los ratones, siendo el tratamiento ATG el único responsable de un incremento en la excreción fecal. Los incrementos observados de peso del ciego y de la producción de heces en la presente invención, concuerdan con otros trabajos previamente publicados, y son atribuibles al consumo de fructanos por ratas y hámsteres (Trautwein y col., 1998;
20 Campbell y col., 1997; Delzenne y col., 1995). El efecto sobre el incremento en tejido del ciego, refleja hipertrofia y sugiere un incremento en actividad bacteriana y esto a su vez, sugiere un incremento en la producción de SCFA como consecuencia de la fermentación defructanos por bacterias colónicas (Trautwein y col., 1998; Campbell y col., 1997).

Algunos de los efectos positivos similares a los ya descritos en el estado del arte para los
25 fructanos tipo inulina se observaron con los fructanos ATG y DSC en la presente invención, los cuales son, una disminución en la ingesta de energía y ganancia de peso corporal, junto con una disminución en glicemia y trigliceridemia. La trigliceridemia ha sido considerada como un factor implicado en la obesidad de roedores (Ji y Friedman, 2003).

Por otro lado, en la presente invención se observó una correlación positiva entre los
30 niveles de glucosa, colesterol en sangre y la ganancia de peso corporal, sugiriendo que estos parámetros están más relacionados a la ingesta de energía y al desarrollo de la masa grasa o tejido adiposo.

Tabla 5

Efecto de la dieta sobre la ingesta de alimento, producción de heces, peso de hígado y tejido epididimal

	STD		RAF		ATG		DSC	
	Prom	SEM	Prom	SEM	Prom	SEM	Prom	SEM
Ingesta de alimento, g/d/ratón	3.034 ^a	0.08	2.702 ^b	0.08	2.718 ^b	0.09	2.814 ^{ab}	0.11
Heces, peso seco, g/jaula	2.730 ^a	0.08	2.890 ^{ab}	0.24	3.200 ^b	0.14	2.910 ^{ab}	0.13
Peso de hígado, g	4.213 ^a	0.07	4.183 ^a	0.12	3.654 ^b	0.15	4.011 ^{ab}	0.11
Peso de tejido epididimal, g	1.502 ^a	0.11	1.320 ^{ab}	0.07	1.098 ^b	0.10	1.346 ^{ab}	0.07

STD, estándar, RAF, *raffilosa* P95; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul Gto.; DSC, *Dasyllirion* spp. Chih. Valores promedio con SEM. Valores con letra diferente fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). n = 11 para ingesta de alimento; n = 4 para heces; Peso de hígado: n = 7 para RSE y ATG y n = 8 para STD y DSC; Tejido epididimal: n = 7 para STD y ATG y n = 8 para RSE y DSC.

Tabla 6.

Efecto de la dieta sobre los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en hígado

	STD		RAF		ATG		DSC	
	Prom*	SEM	Prom*	SEM	Prom*	SEM	Prom*	SEM
Triglicéridos	0.127 ^a	0.01	0.125 ^a	0.01	0.114 ^a	0.01	0.127 ^a	0.02
Colesterol	0.082 ^{ab}	0.00	0.102 ^a	0.01	0.076 ^b	0.00	0.090 ^{ab}	0.01
NEFA	0.109 ^a	0.01	0.122 ^a	0.01	0.097 ^a	0.01	0.096 ^a	0.01

*[mmol/mg proteína]. STD, estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul Gto.; DSC, *Dasyllirion* spp. Chih. NEFA, ácidos grasos no esterificados; Valores promedio (n = 8) para cada parámetro evaluado con SEM. Valores con letra diferente fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Tabla 7.

Concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en sangre

Dieta	Glucosa*		Triglicéridos*		Colesterol*		NEFA*	
	Prom	SEM	Prom	SEM	Prom	SEM	Prom	SEM
STD	10.36 ^a	0.27	1.40 ^a	0.11	2.88 ^a	0.12	1.22 ^a	0.12
RAF	8.44 ^b	0.38	0.97 ^b	0.08	2.40 ^b	0.04	1.12 ^a	0.11
ATG	8.76 ^b	0.31	1.24 ^{ab}	0.09	2.40 ^b	0.14	1.36 ^a	0.11
DSC	8.91 ^b	0.39	1.31 ^{ab}	0.08	2.30 ^b	0.10	1.32 ^a	0.11

* [mM]; NEFA, Ácidos grasos no esterificados; STD, estándar, RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul Gto.; DSC, *Dasyllirion* spp. Chih. Valores promedio (n = 8) para cada parámetro evaluado con SEM. Valores con letra diferente fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Tabla 8

Niveles de mRNA de proglucagon en el ciego

Dieta	Ciego*		Colon proximal*		Colon medio*		Colon distal*	
	Prom	SEM	Prom	SEM	Prom	SEM	Prom	SEM
STD	0.44 ^a	0.03	0.65 ^a	0.03	0.49 ^a	0.03	0.86 ^a	0.13
RAF	0.60 ^c	0.01	0.77 ^a	0.05	0.51 ^{ab}	0.03	1.15 ^a	0.02
ATG	0.58 ^{bc}	0.02	0.73 ^a	0.04	0.59 ^b	0.02	0.84 ^a	0.12
DSC	0.48 ^{ab}	0.04	0.69 ^a	0.04	0.50 ^{ab}	0.02	0.96 ^a	0.11

*Valores en RFU (Unidades de fluorescencia relativa, mRNA proglucagon/mRNA β -actina). STD, Estándar; RAF, raftilosa P₉₅; ATG, *A. tequilana* Weber var. azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* spp. Chih. Valores promedio (n = 7) con SEM para cada parámetro evaluado. Resultados con diferente letra fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

De los fructanos evaluados en la presente invención, ATG fue el más eficiente en cuanto a la disminución de ganancia de peso corporal, mientras que su efecto en glicemia y en trigliceridemia fue menos pronunciado que el observado con RAF. Esto sugiere que la disminución en peso corporal no es la única manera por la cual los fructanos probados en la presente invención pueden modular la homeostasis de glucosa y lípidos. Delzenne y Kok mencionaron que el principal efecto sistémico de alimentar ratas con RAF, es una disminución en los niveles de triglicérido en sangre (Delzenne y Kok, 1999). Kok y col. reportaron que la ingesta de RAF reduce glicemia post-pandrial e insulinemia en un 17% y 26% respectivamente, pudiendo esto estar implicado en una menor lipogénesis y consecuentemente en la menor producción de triglicéridos hepáticos (Kok y col., 1996; Hillgartner y col., 1995).

La presente invención confirma este aspecto, en cuanto a la disminución de trigliceridemia debido a RAF; mientras que los fructanos de Agaves y *Dasyilirion* no mostraron efecto en este parámetro. Sin embargo, todos los tipos de fructanos disminuyeron significativamente la glicemia. Esto sugiere, que una disminución de trigliceridemia por efecto de la

fermentación de los fructanos no es necesariamente atribuible a una disminución en la disponibilidad de glucosa.

La fermentación intestinal ha sido tomada en consideración en la interpretación de los efectos metabólicos de los fructanos dietarios. La fermentación de fructanos en el ciego-colon conduce la producción de SCFA, de los cuales el propionato ha sido reportado como un inhibidor de la síntesis de lípidos hepáticos (Delzenne, 2003; Demigné y col., 1999; Kok y col., 1998;1996).

Demigné y col. (1999) reportaron que el propionato disminuye la síntesis de colesterol. Interesantemente se observa en la presente invención, una disminución significativa en los niveles de colesterol en sangre, así como una disminución significativa en colesterol hepático con el tratamiento de ATG solamente. Los efectos en comportamiento alimenticio y de desarrollo fueron similares al comparar a los fructanos de Agave y Dasyliion con los comerciales, es decir, con RAF. El efecto de los fructanos sobre la ingesta de energía no es debida a un efecto directo de esos fructanos, si no que realmente se puede atribuir al efecto metabólico en el ciego-colon, debido a la fermentación de dichos carbohidratos.

La fermentación es un punto clave, ya que en ratas obesas Zucker, la administración de celulosa, la cual no es fermentable, en lugar de fructooligosacáridos, no permitió observar alguna mejora en parámetros relacionados a tejido adiposo, peso corporal y/o metabolismo de lípidos (Daubioul y col., 2002). Sin embargo, y para apoyar la falta de un efecto directo debido al tratamiento con fructanos, ratones con el receptor de GLP-1 bloqueado (ratones knockout o ratones tratados crónicamente con antagonistas al receptor GLP-1) y sometidos a un tratamiento con fructanos tipo inulina, no exhibieron ningún efecto en saciedad, peso corporal y tejido adiposo comparados a ratones que recibieron la dieta basal correspondiente, mostrando con esto, que el efecto de los fructanos en saciedad (y consecuentemente en peso corporal) son debidos a la interacción con la producción de GLP-1 y puede no ocurrir a través de los fructanos *per se* (Cani y col., 2006a).

El péptido-1 tipo glucagon (GLP-1) puede jugar un papel en la modulación de la ingesta de alimento y de la glicemia, ya que todos los tipos de fructanos incrementaron su concentración en la vena porta. Un incremento en el contenido del ciego de GLP-1 y de su mRNA precursor (proglucagon) en diferente secciones del colon están de acuerdo con la hipótesis de que la mayor secreción de GLP-1 en la vena porta, es resultado de un

incremento en la expresión de proglucagon en las células L dependiente de la fermentación, estando presentes dichas células en la parte inferior del intestino, es decir, ciego y colon (Reimer y col., 1997). Sin embargo, datos recientes sugieren que Raftilosa puede incrementar el contenido colónico de GLP-1 promoviendo la diferenciación de las células L (Cani y col., 2007). Se ha reportado que los SCFA estimulan la secreción de péptidos derivados de proglucagon, siendo el butirato el principal ácido implicado en este aspecto (Tappenden y col., 1998; Tappenden y McBurney 1998). Recientemente, Zhou y col. (2006) por medio de análisis *in vitro* encontraron que el butirato incrementó la expresión del gen proglucagon en una manera dependiente de la dosis (Zhou y col., 2006). En la presente invención se observa que el incremento del nivel de mRNA de proglucagon y de GLP-1 en los diferentes segmentos intestinales fue diferente y dependiente de la fuente de fructanos evaluada.

Interesantemente entre los fructanos evaluados, los de *A. tequilana* Weber var. azul fueron los más eficaces en la disminución de tejido adiposo, peso corporal y de tejido hepático, por lo cual se propone que esta nueva fuente de fructanos puede ser de interés en estudios enfocados a relacionar la modulación específica de la flora microbiana colónica y el riesgo de enfermedades asociadas con obesidad.

Flint y col. (1998) examinaron el efecto de una infusión intravenosa de GLP-1 sobre el apetito. Ellos reportaron que GLP-1 aumentó la saciedad y redujo la ingesta energética, pudiendo entonces GLP-1 jugar un papel importante en la regulación fisiológica del apetito y de la ingesta energética en humanos. Por otro lado, en el 2003, Piche y col. mostraron que los fructanos fueron capaces de incrementar la producción de GLP-1 por varias horas después de la ingesta de alimento. En este contexto, Cani y col. (2006b) mostraron que Raftilosa fue capaz de inducir saciedad en voluntarios humanos normales.

25

Referencias.

- Al-Tamimi, M. A., Palframan, R. J., Cooper, J. M., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. 2006. *in vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 407-414.
- Anderson, J. y Hanna, T. 1999. Impact of nondigestible carbohydrate on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *J. Nutr.*, 129, 1457-1466.

30

- Archer, S., Meng, S., Wu, J., Johnson, J., Tang, R. y Hodin, R. 1998. Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinctive path-ways. *Surgery*, 124, 248-253.
- Arulmozhi, D. K. y Portha, B. 2006. GLP-1 based therapy for type 2 diabetes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 28, 96-108.
- 5 Barbany, M. y Foz, M. 2002. Obesity: concept, classification and diagnosis. *Anal. Sis. San. Navarra*, 25, 7-16.
- Bathia, I. S. y Nandra, K. S. 1979. Studies on fructosyl transferase from *Agave americana*. *Phytochemistry*, 18, 923-927.
- Bell, G.I., Sanchez-Pescador, R., Laybourn, P. J. y Najarian, R. C. 1983. Exon duplication
10 and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature*, 304, 368-371.
- Beysen, C., Karpe, F., Fielding, B. A., Clark, A., Levy, J.C. y Frayn, K. N. 2002. Interaction between specific fatty acids, GLP-1 and insulin secretion in humans. *Diabetologia*, 45, 1533-1541.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
15 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brighenti, F., et al. 1999. *Eur. J. Clin. Nutr.*, , 53 (9), 726-733.
- Campbell, J. M., Fahey, G. C. y Wolf, B. W. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats.
20 *J. Nutr.*, 127, 130-136.
- Campfield, L. A., Smith, F. J. y Burn, P. 1998. Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. *Science*, 280, 1383-1387.
- Cani, P. D., Hoste, S., Guiot, Y. y Delzenne, N. M. 2007. Dietary non digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Brit. J. Nutr.*, en
25 prensa.
- Cani, P. D., Knauf, C., Iglesias, M. A., Drucker, D. J., Delzenne, N. M. y Burcelin, R. 2006a. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*, 55, 1484-90.
- Cani, P. D., Joly, E., Horsmans, Y. y Delzenne, N., M. 2006b. Oligofructose promotes
30 satiety in healthy human: a pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 60, 567-72.

- Cani, P. D., Dewever, C. y Delzenne, N. M. 2004. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Brit. J. Nutr.*, 92, 521-526.
- Chandalia, M., Abhimanyu, G., Lutjohann, D., von Bergmann, K., Grundy, S. M. y Brinkley, L. J. 2000. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *New Eng. J. Med.*, 342, 1392-1398 (Abstr).
- Chen, H. -L., Sheu, W. H. -H., Tai, T. -S., Liaw, Y. -P. y Chen, Y. -C. 2003. Konjac supplement alleviated hypercholesterolemia and hyperglycemia in type 2 diabetic subjects- a randomized double-blind trial. *J. Am. Coll. Nutr.*, 22, 36-42.
- 10 Chomczynski, P., y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- Christl, S. U., Eisner, H. D., Dusel, G., Kasper, H. y Scheppach, W. 1996. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.*, 41, 2477-2481.
- 15 Csordas, A. 1996. Butyrate, aspirin, and colorectal cancer. *Eur. J. Can. Prevent.*, 5, 221-231.
- Cummings, J. H. y Macfarlane, G. T. 2002. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Brit. J. Nutr.*, 87, 145-151.
- Daubioul, C., Rousseau, N., Demeure, R., Gallez, B., Taper, H., Declercq, B. y
- 20 Delzenne, N. M. 2003. Oligosaccharides: state of the art. *Proc. Nutr. Soc.*, 62, 177-182.
- Delzenne, N. M. y Kok, N. N. 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *J. Nutr.*, 129, 1467-1470.
- Delzenne, N. M., Aertssens, J., Verplaetse, H., Rocco, M. y Roberfroid, M. 1995. Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen, and energy digestive balance
- 25 in the rat. *Life Sci.*, 57, 1579-1587.
- Demigné, C., Rémésy, C. y Morand, C. 1999. Short chain fatty acids. En: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. pp. 55-69. Eds. G. Gibson and M. Roberfroid. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
- Demonty, I., Lamarche, B., Deshaies, Y. y Jacques, H. 2002. Role of soy isoflavones in the
- 30 hypotriglyceridemic effect of soy protein in the rat. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 671-677.
- Drucker, D. J. 2006. The biology of incretin hormones. *Cell Metabol.*, 3, 153-165.

- Drucker, D. J. 2005. Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metabol.*, 1, 22-31.
- Drucker, D. J. 2003. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol. Endocrinol.*, 17, 161-171.
- 5 Duncan, S. H., Holtrop, G., Lobley, G. E., Calder, A. G., Stewart, C. S. y Flint, H. J. 2004a. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Brit. J. Nutr.*, 91, 915-923.
- Duncan, S. H., Louis, P. y Flint, H. J. 2004b. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70,
10 5810-5817.
- Duncan, S. H., Barcenilla, A., Stewart, C. S., Pryde, S. E. y Flint, H. J. 2002. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5186-5190.
- Erlanson-Albertsson, C. 2005. Appetite regulation and energy balance. *Acta Paediatr.*
15 *Suppl.*, 94, 40-1.
- Flint, A., Raben, A., Astrup, A. y Holst, J. J. 1998 Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J. Clin. Invest.*, 101, 515-520.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- 20 Gibson, G. R., y Wang, X. 1994. Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiol.*, 11, 491-498.
- Groop, L., Schalin, C., Franssila-Kallunki, A., Widen, E., Erstrand, A. y Eriksson, J., 1989. Characteristic of non-insulin-dependent diabetic patients with secondary failure to oral antidiabetic therapy. *Am. J. Med.*, 87, 183-190.
- 25 Gutzwiller, J. P., Drewe, J., Goke, B., Schmidt, H., Rohrer, B., Lareida, J. y Beglinger, C. 1999. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am. J. Physiol.*, 276, 1541-1544.
- Hillgartner, F. D., Salati, L. M. y Goodridge, A. G. 1995. Physiological and molecular mechanism involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.*, 75, 47-
30 76.

- Holz, G. G., Kuhlreiber, W. M. y Habener, J. F. 1993. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37). *Nature*, 361, 362-365.
- Hui, H., Wright, C. y Perfetti, R. 2001. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1 positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes*, 50, 785-796.
- Ibrahim, S. y Bezkorovainy, A. 1993. Inhibition of *Escherichia coli* by Bifidobacteria. *J. Food Prot.*, 56, 713-715.
- Jackson, K., et al. 1999. *Brit. J. Nutr.*, 82 (1), 23-30.
- 10 Ji, H. y Friedman, M. I. 2003. Fasting plasma triglyceride levels and fat oxidation predicts dietary obesity in rats. *Physiol. Behaviour*, 78, 767-772.
- Knauf, C., Cani, P. D., Perrin, C., Iglesias, M. A., Maury, J. F., Bernard, E., Benhamed, F., Grémeaux, T., Drucker, D. J., Kahn, C. R., Girard, J., Tanti, J. F., Delzenne, N. M., Postic, C. y Burcelin, R. 2005. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J. Clin. Invest.*, 115, 3554-3563.
- 15 Kok, N., Taper, H. y Delzenne, N. 1998. Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by a fat-rich diet in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 18, 47-53.
- Kok, N., Roberfroid, M., Robert, A. y Delzenne, N. 1996. Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Brit. J. Nutr.* 76, 881-890.
- 20 Komatsu, R., Matsuyama, T., Namba, M., Watanabe, N., Itoh, H., Kono, N. y Tarui, S. 1989. Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide. *Diabetes*, 38, 902-905.
- Kopelman, P. G. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature*, 404, 635-643.
- 25 Larsen, P. J., Tang-Christensen, M. y Jessop, D. 1997. Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*, 138, 4445-4455.
- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A. y Mendoza-Díaz, G. 2003. Molecular structure of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7835-7840.
- 30 MacDonald, P. E., El-Kholy, W., Riedel, M. J., Salapatek, A. M. F., Light, P. E. y Wheeler, M. B. 2002. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, 51, 434-442.

- Majsoy, S., Henrich, G., Wilson, I. B., Ravazzola, M., Orci, L. y Habner, J. F. 1986. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J. Biol. Chem.*, 261, 11880-11889.
- Mancilla-Margalli, N. A. y López, M. G. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7832-7839.
- Marti, A., Moreno-Aliaga, M. J. y Hebebrand, J. 2004. Genes, lifestyles and obesity. *Int. J. Obes. Relat. Meta. Disord.*, 28, 29-36.
- Massimino, S. P., McBurney, M. I., Field, C. J., Thomson, A. B. R., Keelan, M., Hayek, M. C. y Sunvold, G. D. 1998. Fermentable dietary fiber increases GLP-1 secretion and improves glucose homeostasis despite increased intestinal glucose transport capacity in healthy dogs. *J. Nutr.*, 128, 1786-1793.
- Meier, J. J., Gallwitz, B., Schmidt, W. E. y Nauck, M. A. 2002. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur. J. Pharmacol.*, 440, 269-279.
- Moller, D. E. 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 414, 821-827.
- Namioka, F., et al. 1991. Bifodobacteria microflora. 10, 1-9.
- Nauck, M. A., Homberger, E., Siegel, E. G., Allen, R. C., Eaton, R. P., Ebert, R. y Creutzfeldt, W. 1986. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63, 492-498.
- OECD Factbook, 2006. Estadística económica ambiental y social.
- Palframan, R. J., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. 2003. Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut. *Curr. Is. Intest. Microbiol.*, 4, 71-75.
- Piche, T., des Varannes, S. B., Sacher-Huvelin, S., Holst, J. J., Cuber, J. C. y Galmiche, J. P. 2003. Colonic fermentation influences lower esophageal sphincter function in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*, 124, 894-902.
- Pool-Zobel, B. L. 2005. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Brit. J. Nutr.*, 93, 73-90.
- Reimer, R. A., Thomson, A. B. R., Rajotte, R. V., Basu, T. K., Oraikul, B. y McBurney, M. I. 1997. A physiological level of rhubarb fiber increases proglucagon gene expression and modulates intestinal glucose uptake in rats. *J. Nutr.*, 127, 1923-1928.

- Reimer, R. A. y McBurney, M. I. 1996. Dietary fiber modulates intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and post-prandial secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin in rats. *Endocrinology*, 137, 3948-3956.
- Sánchez-Marroquín, A. y Hope, P. 1953. Agave juice: Fermentation and chemical
5 composition studies of some species. *J. Agric. Food Chem.*, 1, 246-249.
- Shene, C., Mardones, M., Zamora, P. y Bravo, S. 2005. Kinetics of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 fermentations: effect of the dilution rate and carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 623-630.
- Smith, J. P. 2007. Nature and causes of trends in male diabetes prevalence, undiagnosed
10 diabetes, and the socioeconomic status health gradient. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 104, 13225-13231.
- Solomon, A. y Martínez, J. A. 2006. Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 50, 27-37.
- SSA, México, 2005. Instituto de Estadística e Informática y Dirección General de
15 Información en Salud. Secretaría de Salud, México.
- Stanley, S., Wynne, K. y McGowan, B. 2005. Hormonal regulation of food intake. *Physiol. Rev.*, 85, 1131-58.
- Tappenden, K. A., Albin, D. M., Bartholome, A. L. y Mangian, H. F. 2003. Glucagon-like peptide-2 and short chain fatty acids: a new twist to an old story. *J. Nutr.*, 133, 3717-3720.
- 20 Tappenden, K. A., Drozdowski, L. A., Thomson, A. B. R. y McBurney, M. I. 1998. Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition alters intestinal structure, glucose transporter 2 (GLUT2) mRNA and protein, and proglucagon mRNA abundance in normal rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68, 118-125.
- Tappenden, K. A. y McBurney, M. I. 1998. Systemic short-chain fatty acids rapidly alter
25 gastrointestinal structure, function, and expression of early response genes. *Did. Dis. Sci.*, 43, 1526-1536.
- Trautwein, E. A., Rieckhoff, D. y Erbersdobler, H. F. 1998. Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in Hamsters. *J. Nutr.*, 128, 1937-1943.
- 30 Turton, M. D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S. A., Edwards, C. M., Meeran, K., Choi, S. J., Taylor, G. M., Heath, M. M., Lambert, P. D., Wilding, J. P., Smith, D. M., Ghatei, M. A.,

Herbert, J. y Bloom, S. R. 1996. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379, 69-72.

Vuksan, V., Sievenpiper, J. L. y Owen, R. 2000. Beneficial effects of viscous dietary fiber from Konjac-mannan in subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care*, 23,

5 9-14.

Woods, S. C. 2004. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 286, 7-13.

Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F. y Bonner-Weir, S. 1999. Exendin-4 stimulates both β -cell replication and neogénesis, resulting in increased β -cell mass and improved glucose

10 tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, 48, 2270-2276.

Zander, M., Madsbad, S. y Holst, J. J. 2001. GLP-1 for six weeks reduces body weight and improves insulin sensitivity and glycemic control in patients with Type 2 diabetes. *Diabetes*, 50, 31-37.

Zhou, J., Hegsted, M. y McCutcheon, K. L. 2006. Peptide YY and proglucagon mRNA

15 expression patterns and regulation in the gut. *Obesity*, 14, 683-689.

20

25

30

Reivindicaciones.

1. Un producto de Agavinas obtenidas de plantas del Orden Liliales, como por ejemplo, plantas de Agave y de *Dasyilirion* utilizado como agente prebiótico para la estimulación del crecimiento de las bacterias *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus* y *L. rhamnosus*.
2. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 1 caracterizado por comprender una concentración de 10 g de fructanos/L de medio de cultivo bacteriano.
3. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 1 caracterizado porque los fructanos de las Agavinas pertenecen al grupo II y III, siendo fructanos con estructuras menos ramificadas y menor índice de polimerización (DP).
4. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 3 caracterizado porque durante la fermentación de fructanos por medio de las bifidobacterias, el pH del medio desciende como consecuencia de la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA).
5. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 4 caracterizado porque los SCFA que se producen son los ácidos: láctico, fórmico y acético.
6. El producto de Agavinas conforme a las reivindicaciones 1-5 utilizado para inhibir el crecimiento de patógenos intestinales, como por ejemplo *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.
7. El producto de Agavinas conforme a las reivindicaciones anteriores, preferentemente obtenidas de Agave tequilana Gto. y de *Dasyilirion* spp Chih.
8. El producto de Agavinas conforme a las reivindicaciones 1-6 utilizado como promotor de bienestar y salud en los animales.
9. Un producto de Agavinas obtenidas de plantas del Orden Liliales, como por ejemplo, plantas de Agave y de *Dasyilirion* caracterizado por estar en una concentración del 10 % (peso/peso).
10. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9, preferentemente obtenidas de *Agave Weber tequilana* de Gto. y de *Dasyilirion* spp. de Chih.
11. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 empleado para disminuir la ingesta de alimento.
12. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 empleado para disminuir la ganancia de peso corporal.

13. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 empleado como agente que induce la saciedad del apetito.
14. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 empleado como agente que incrementa la excreción de heces fecales obteniéndose un efecto benéfico en la función intestinal.
15. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 utilizado como agente que disminuye las concentraciones de glucosa en animales en estado post-pandrial.
16. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 utilizado como agente que disminuye las concentraciones de triglicéridos en animales en estado post-pandrial.
17. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 utilizado como agente que disminuye las concentraciones de colesterol en animales en estado post-pandrial.
18. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 utilizado como agente que incrementa los niveles de mRNA de proglucagon en animales.
19. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 utilizado como agente que incrementa las concentraciones del péptido-1 tipo glucagon GLP 1 en animales.
20. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 utilizado como agente terapéutico contra enfermedades asociadas con la obesidad.
21. El producto de Agavinas conforme a la reivindicación 9 para preparar alimentos, composiciones y medicamentos útiles para promover y conservar el bienestar y la salud de animales.
22. El producto de Agavinas conforme a la reivindicaciones 11-18 utilizado como medicamento o compuesto farmacéutico.
23. El producto de Agavinas conforme a la reivindicaciones 11-18 utilizado como un alimento funcional, nutrimento funcional o complemento alimenticio.
24. Un método para preparar un producto, una composición y/o un medicamentos que contenga Agavinas el cual comprende mezclar un producto de agavina como se define en las reivindicaciones 1 y 9 en relación en peso como se define en las reivindicaciones 2 y 9, con por lo menos otro componente, opcionalmente seguido por llevar a la composición a la forma deseada.
25. El uso de las Agavinas para producir productos, composiciones y medicamentos para promover el bienestar y la salud de animales.

26. El uso de Agavinas para preparar productos, composiciones y medicamentos para prevenir y tratar enfermedades relacionadas con la obesidad.
27. El uso de Agavinas para preparar productos, composiciones y medicamentos para prevenir y tratar la diabetes mellitus.
- 5 28. El uso de Agavinas para preparar productos, composiciones y medicamentos para prevenir y tratar enfermedades tales como cáncer y osteoporosis.

10

15

20

25

30

Resumen.

La presente invención se refiere a productos de Agavinas y composiciones de la misma así como su elaboración y su uso en la alimentación y en la medicina ya que este tipo de fructanos tienen un efecto prebiótico mayor que las inulinas comerciales estimulando de manera más eficiente el crecimiento de algunos tipos de bifidobacterias además de tener un efecto significativo sobre la reducción en la ganancia de peso corporal y la ingesta de alimento, así como también el aumentar excreción de heces, disminuir las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol en estado post-pandrial, así como aumentar la concentración del péptido-1 tipo glucagon (GLP-1), por lo que su impacto en el control y manejo de obesidad y diabetes y otras enfermedades relacionadas es de gran importancia.

15

20

25

30

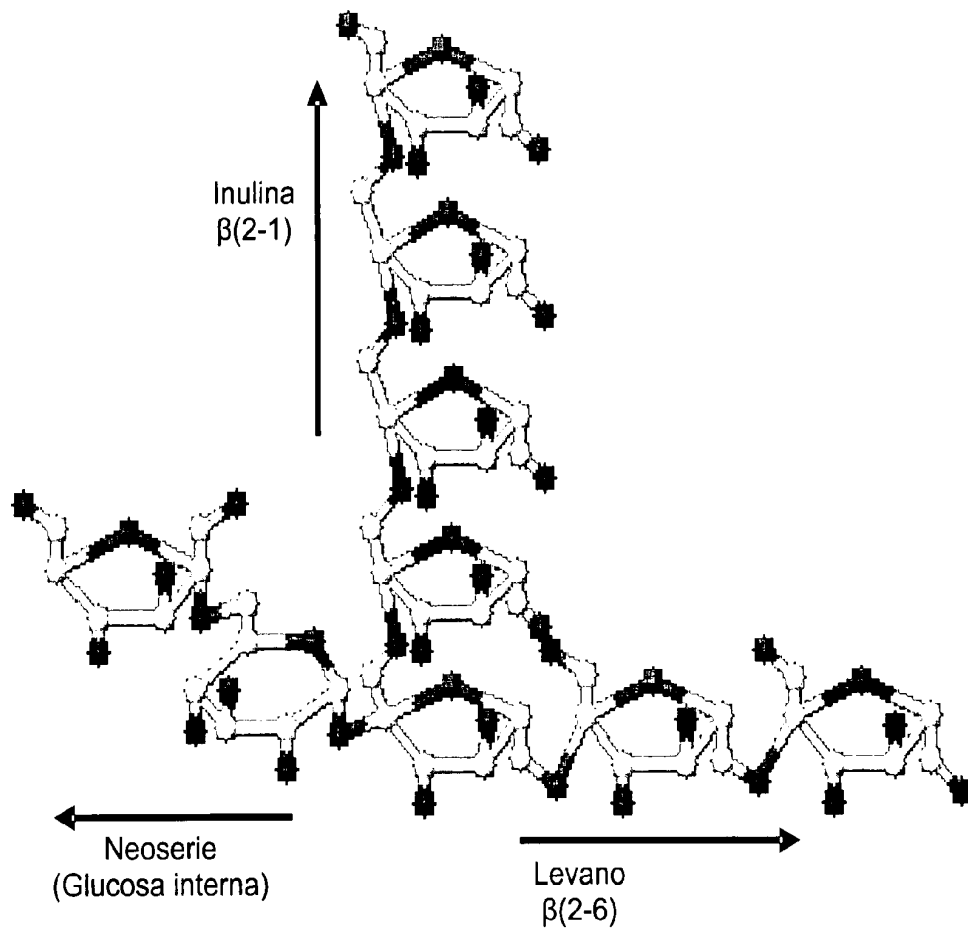


Figura 1

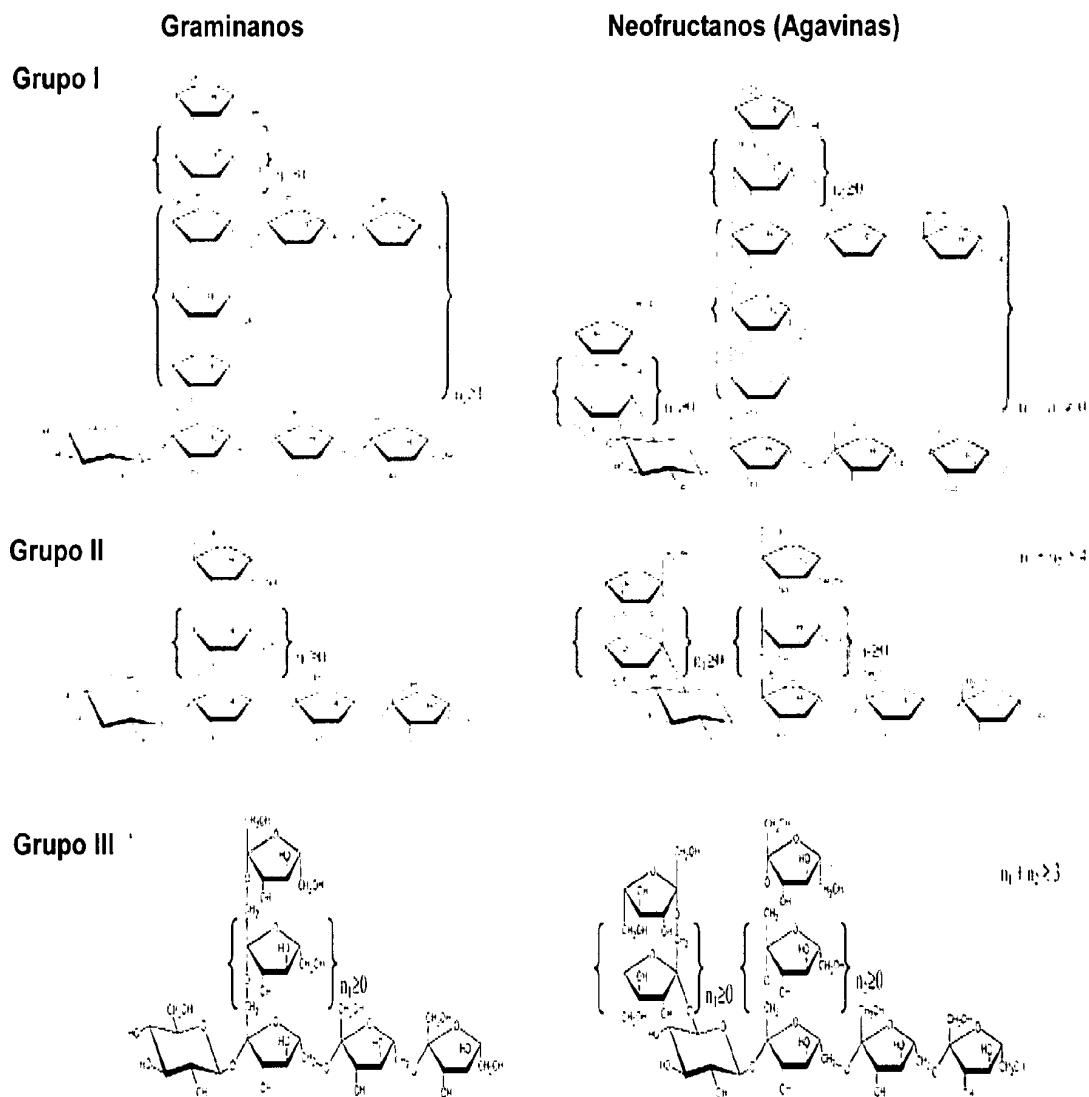


FIGURA 2

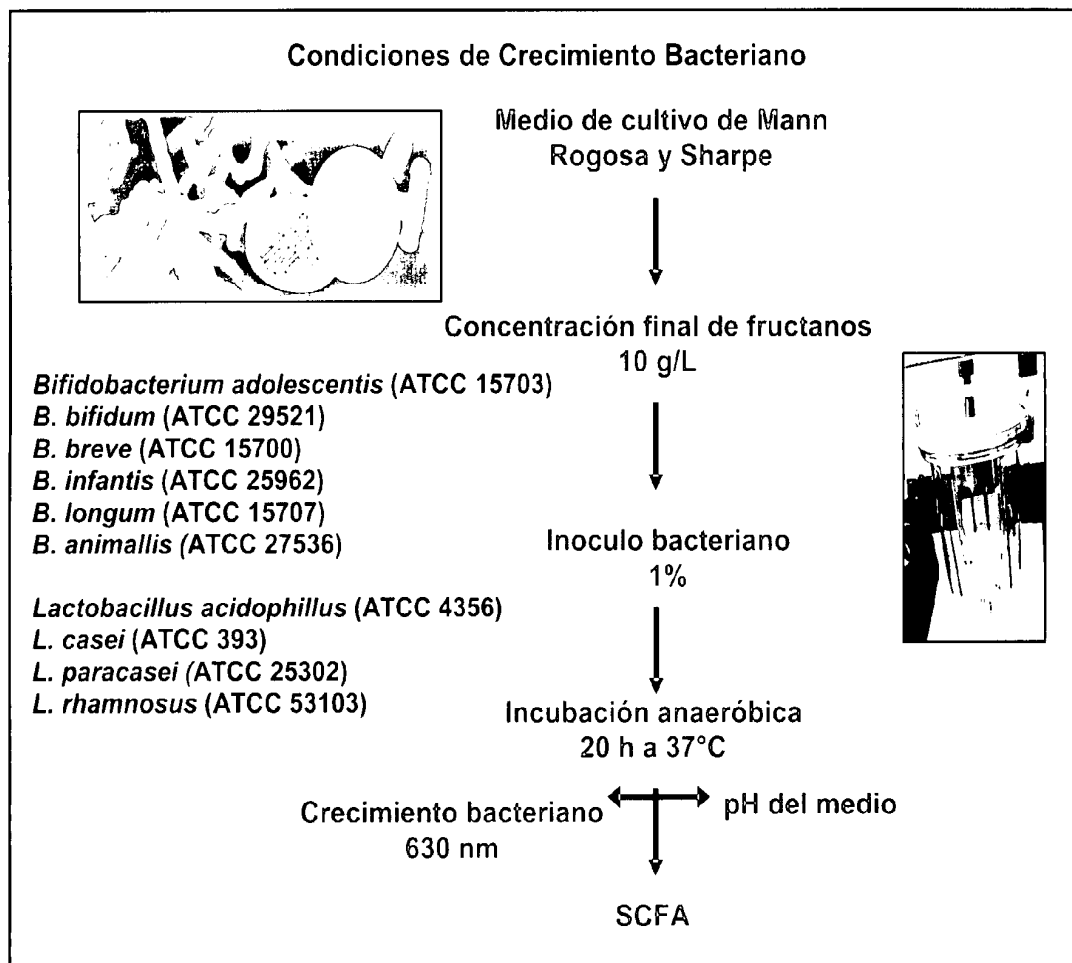


FIGURA 3

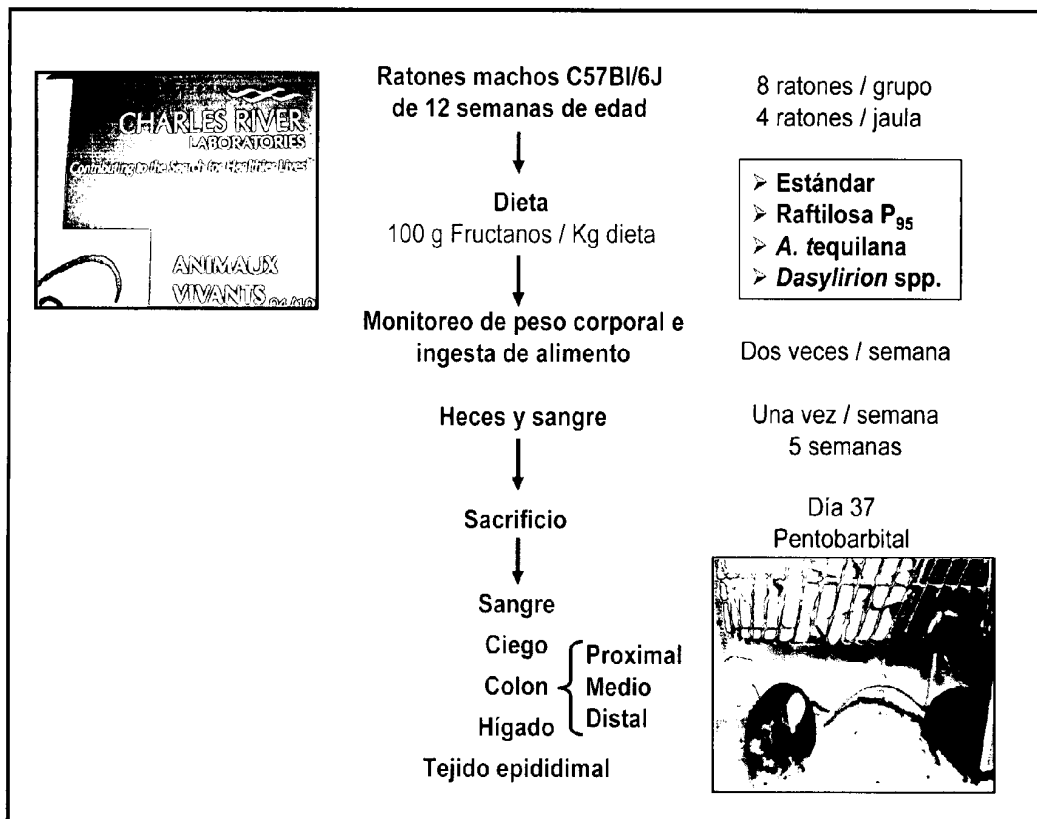


FIGURA 4

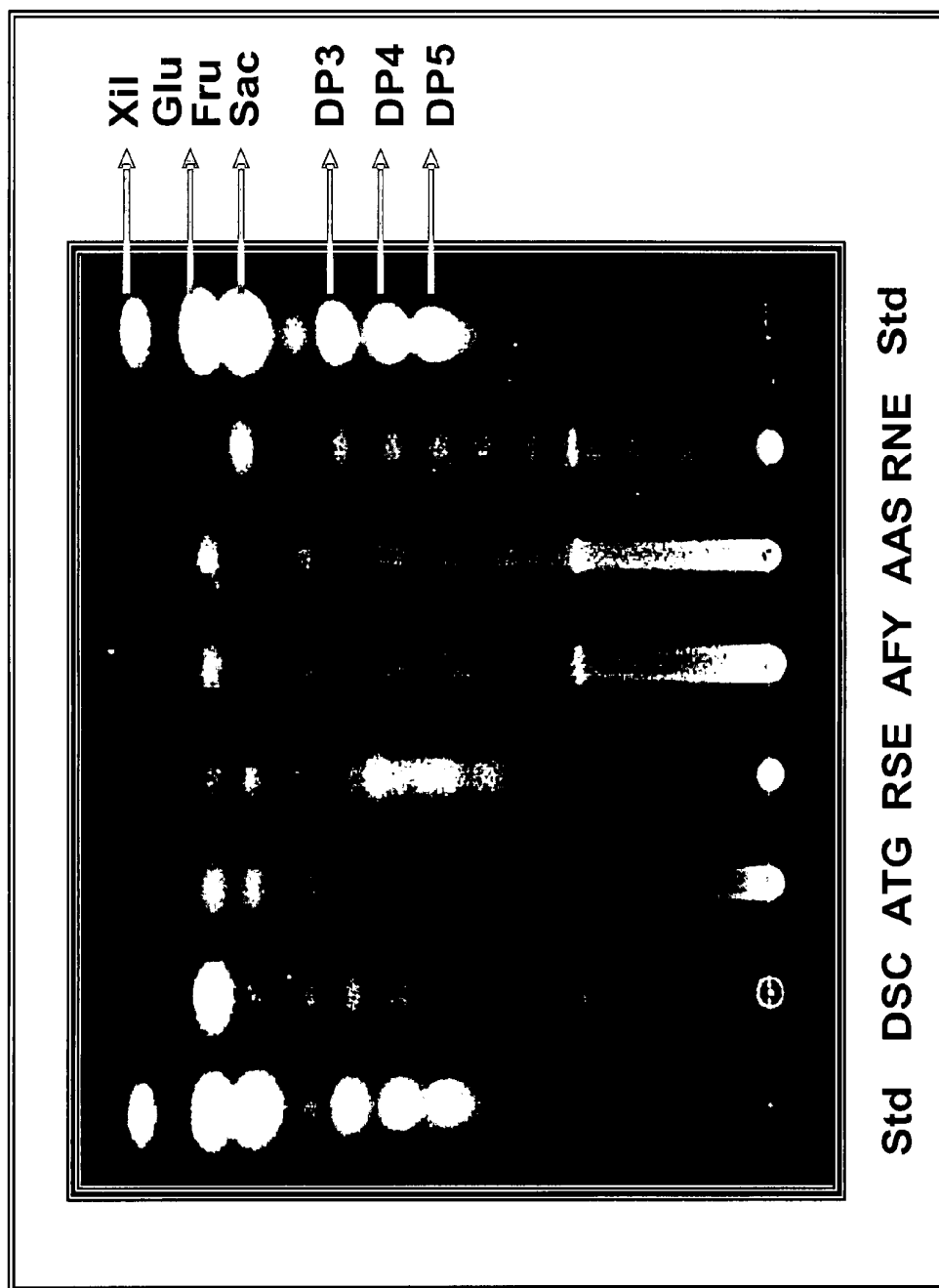
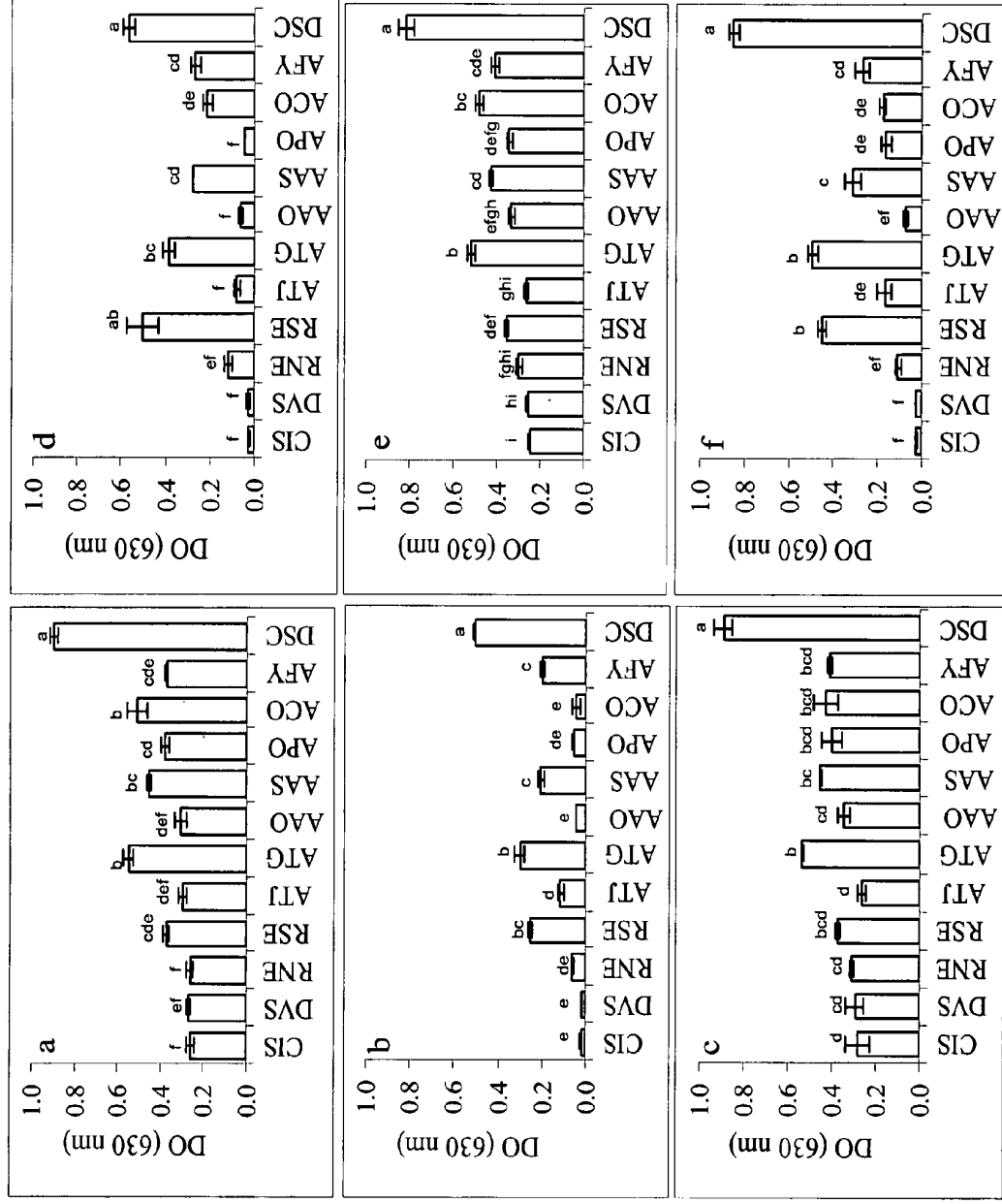


FIGURA 5

FIGURA 6



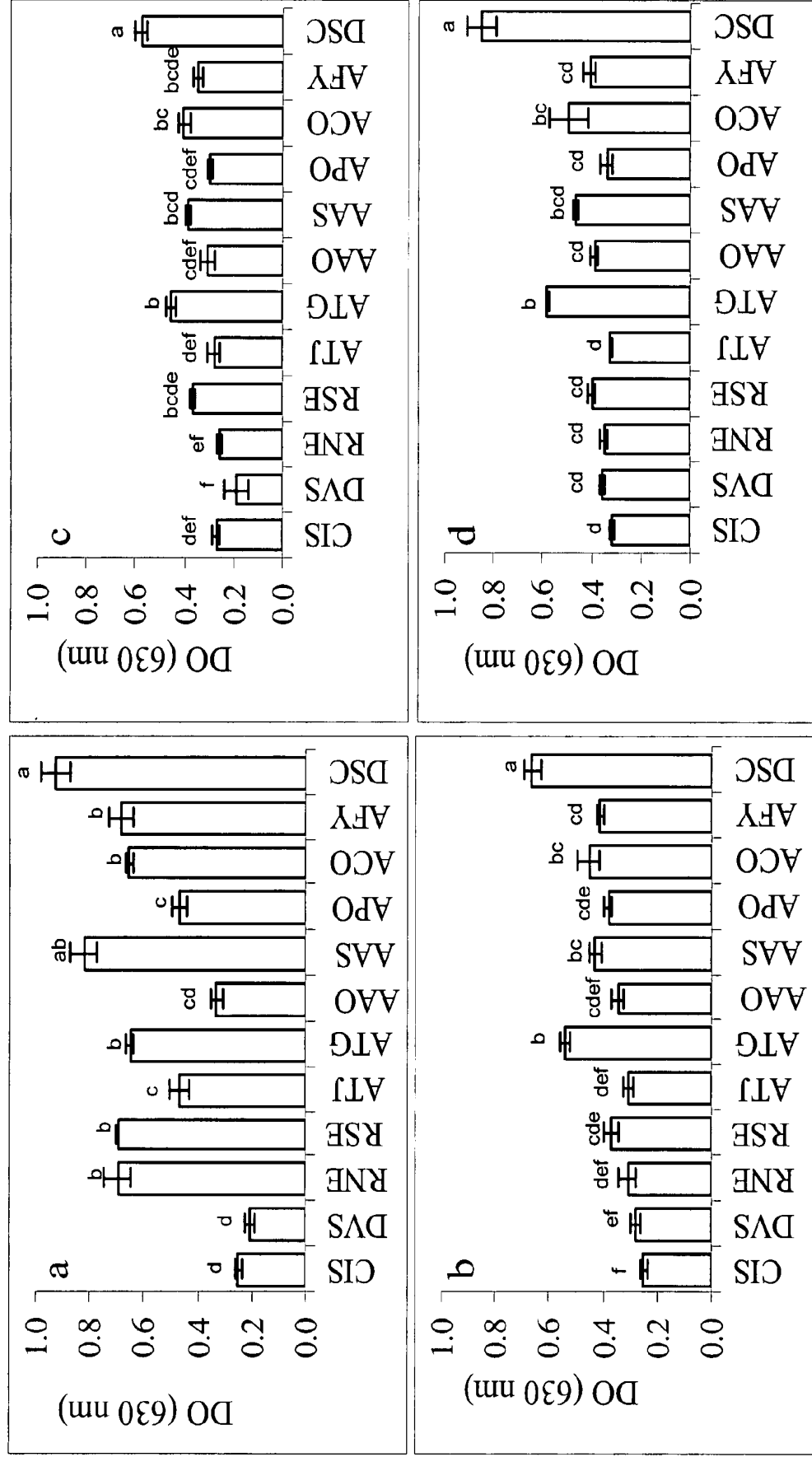


FIGURA 7

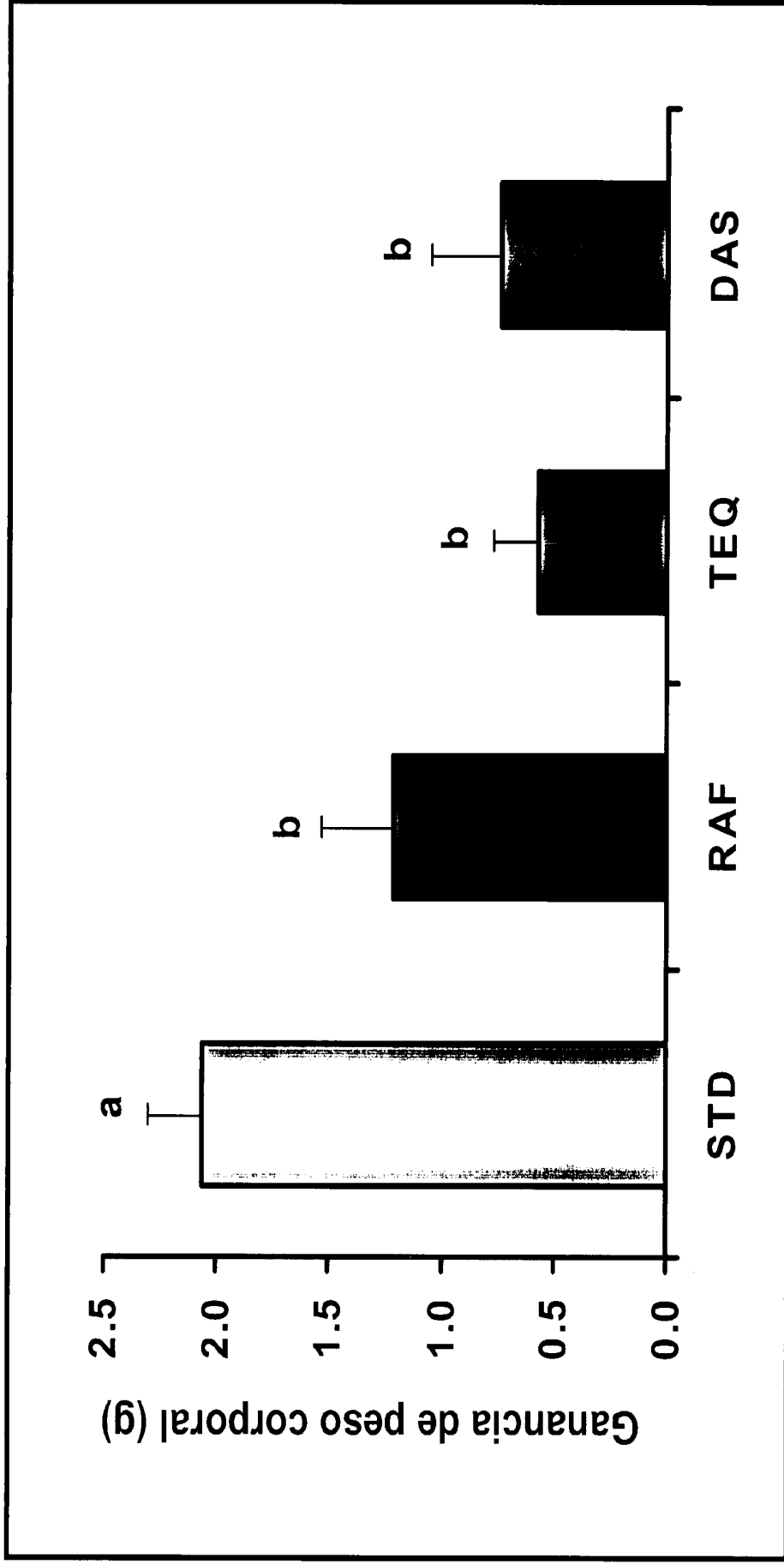


FIGURA 8

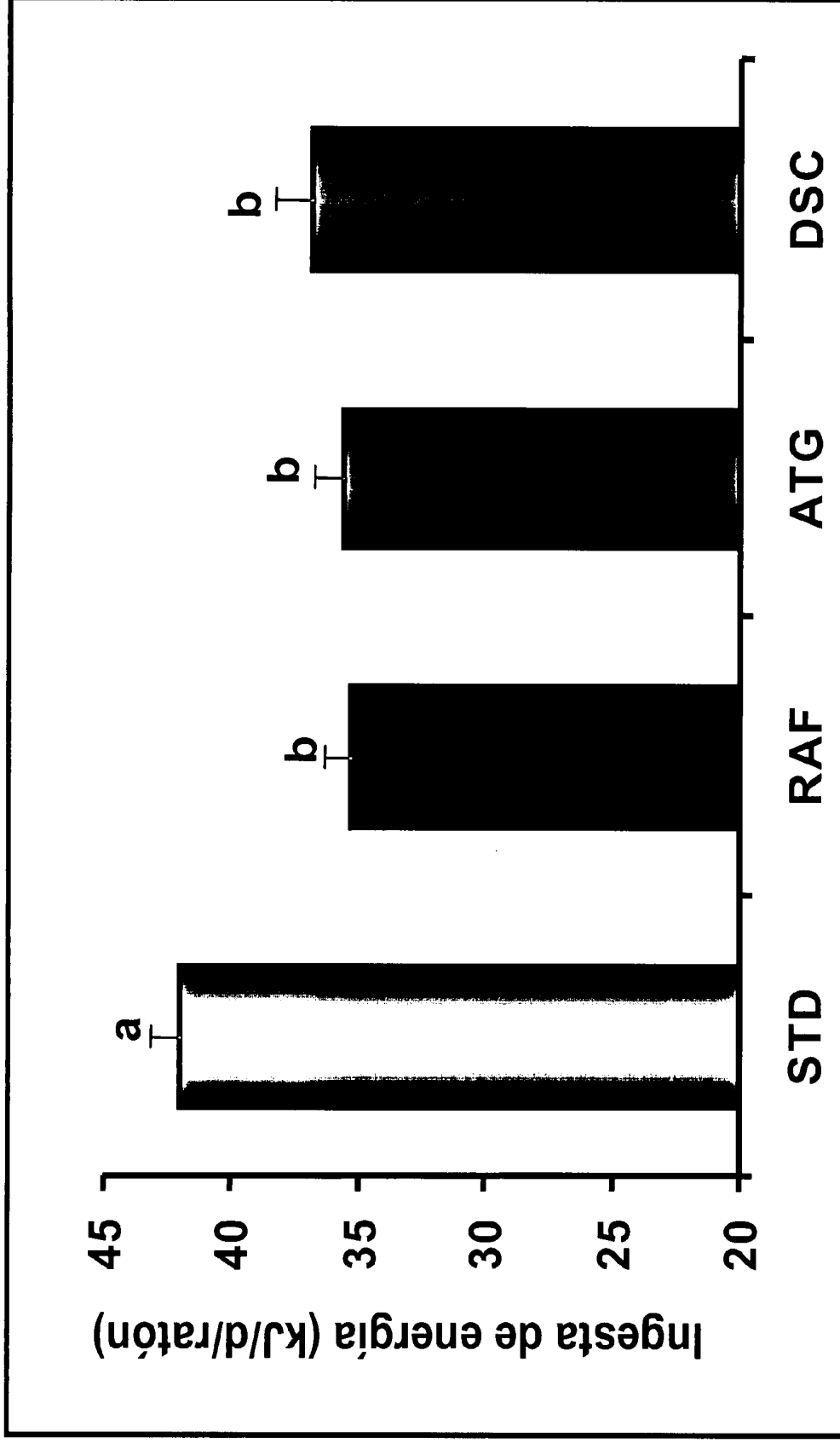


FIGURA 9

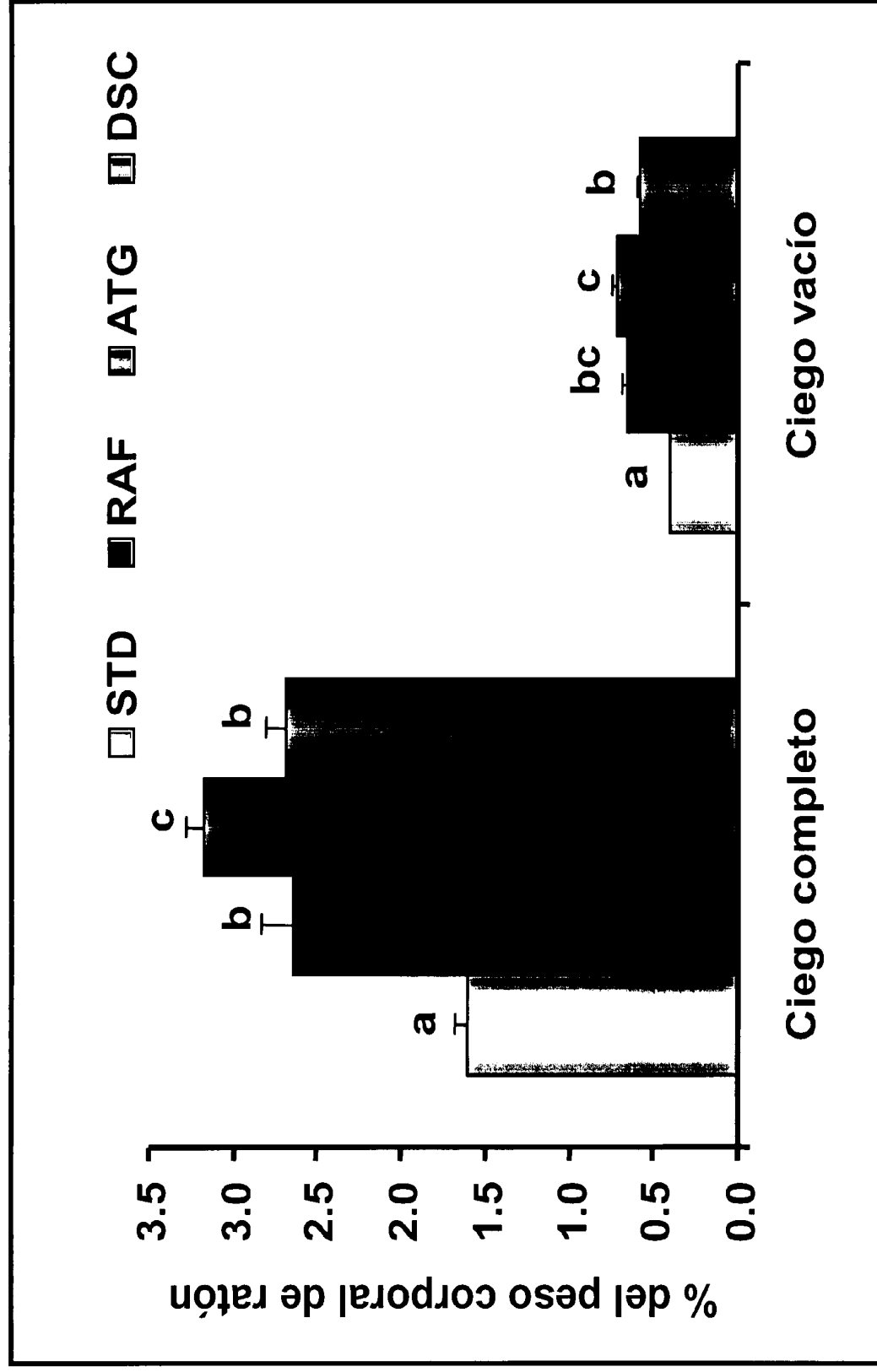


FIGURA 10

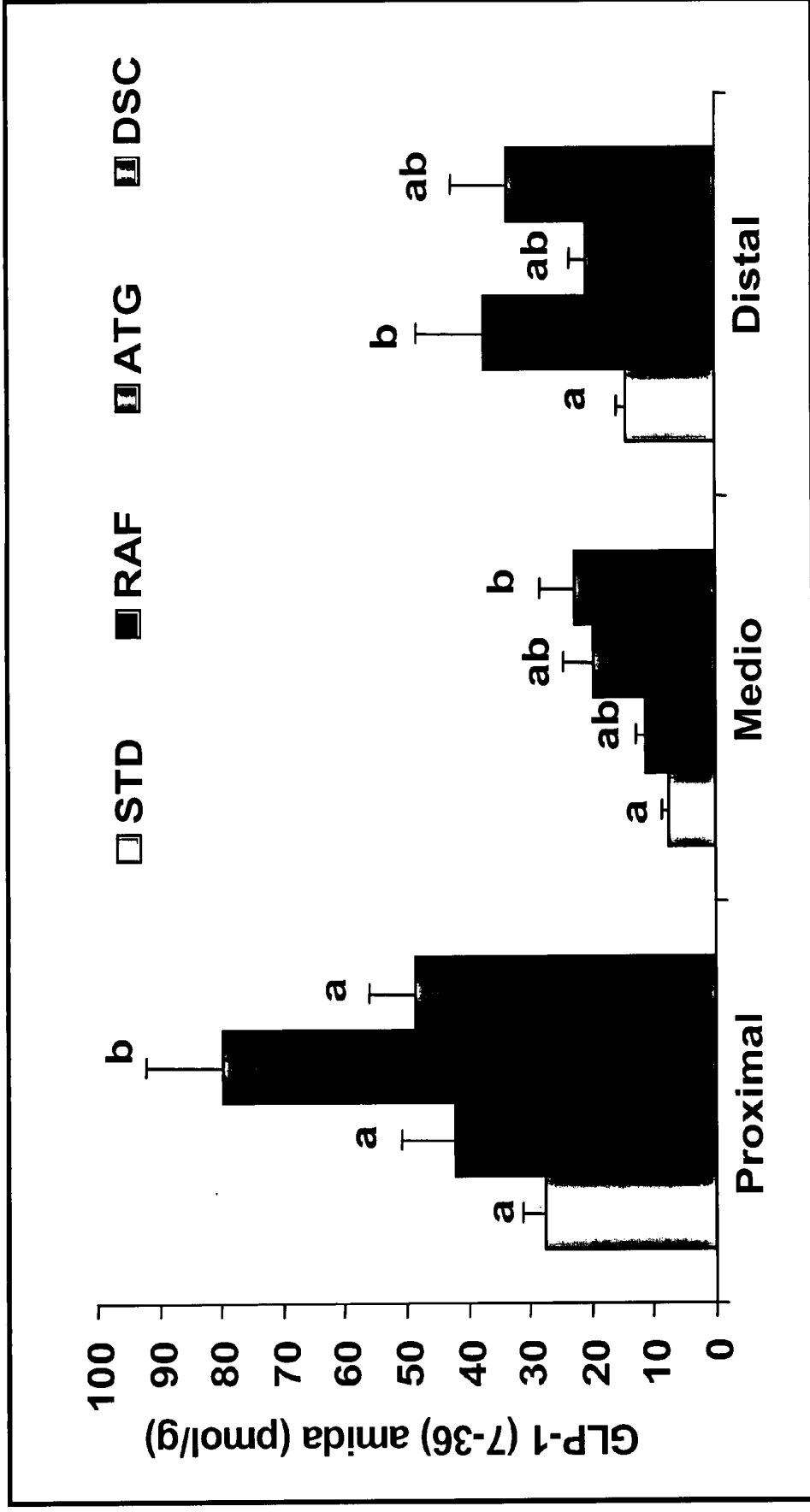


FIGURA 11

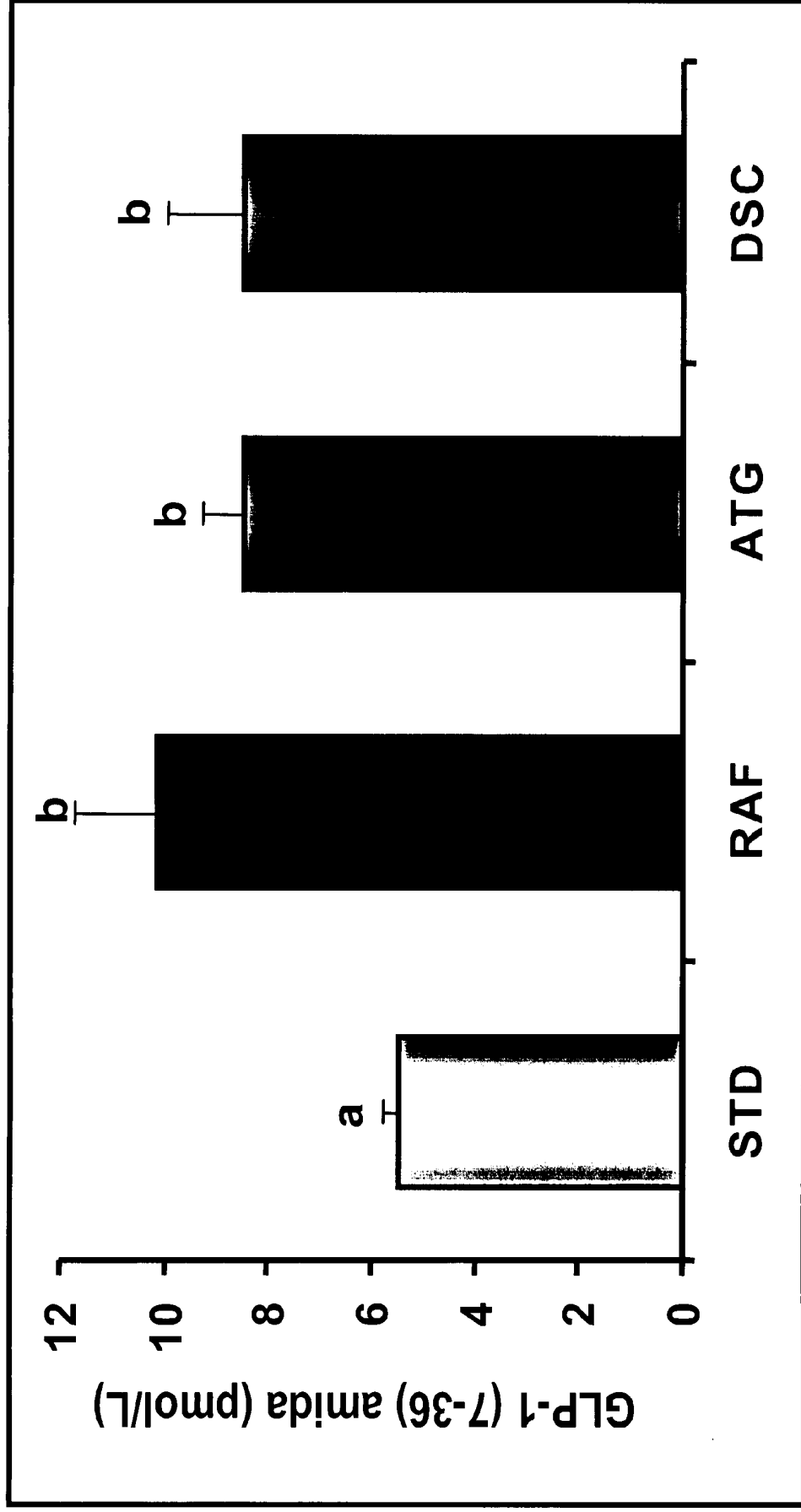


FIGURA 12