



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

**“CARACTERIZACIÓN DE UN PRODUCTO GRANULADO CON PROTECCIÓN
ENTÉRICA, A BASE DE *BIFIDOBACTERIUM SP.* Y SU EFECTO EN LA
FORMACIÓN DE INCLUSIONES LIPÍDICAS EN EL HÍGADO DE RATAS
ALIMENTADAS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

QFB. CYNTHIA GARFIAS NOGUEZ
2171802067

COMITÉ TUTORIAL

COTUTOR: DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS
COTUTOR: DRA. MARÍA ANGÉLICA GUTIÉRREZ NAVA
ASESOR: DR. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN

SEPTIEMBRE, 2019

“CARACTERIZACIÓN DE UN PRODUCTO GRANULADO CON PROTECCIÓN ENTÉRICA, A BASE DE *BIFIDOBACTERIUM SP.* Y SU EFECTO EN LA FORMACIÓN DE INCLUSIONES LIPÍDICAS EN EL HÍGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA”

Vo.Bo. COMITÉ TUTORAL

DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS
COTUTORA

DRA. MARÍA ANGÉLICA GUTIÉRREZ NAVA
COTUTORA

DR. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN
ASESOR

PRSENTA

QFB. CYNTHIA GARFIAS NOGUEZ
2171802067

“CARACTERIZACIÓN DE UN PRODUCTO GRANULADO CON PROTECCIÓN ENTÉRICA, A BASE DE *BIFIDOBACTERIUM SP.* Y SU EFECTO EN LA FORMACIÓN DE INCLUSIONES LIPÍDICAS EN EL HÍGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA”

JURADO DEL EXAMEN

DR. ROBERTO DÍAZ TORRES
PRESIDENTE

DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS
SECRETARIO

DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ
VOCAL

Resumen

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas (10^6 UFC/g) confieren efectos benéficos sobre la salud del huésped, dichos microorganismos requieren resistir diferentes condiciones como la producción y almacenamiento de los productos a los que son incorporados y una vez que son consumidos requieren mantenerse vivos resistiendo el trayecto del tracto gastrointestinal para así llegar viables a su sitio de acción; algunos microorganismos probióticos son bacterias sensibles a condiciones tales como oxígeno y altas temperaturas, por lo que es de gran importancia desarrollar nuevas tecnologías biológico-farmacéuticas que permitan proteger al probiótico de ambientes hostiles, así entonces, el objetivo de este proyecto fue evaluar la estabilidad y las características físicas del granulado con protección entérica a base de *Bifidobacterium sp.*, obtenido mediante lecho fluido, y analizar el efecto que presenta su administración en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa. El producto granulado con protección entérica a base de *Bifidobacterium sp.* presentó un tamaño de partícula promedio de 340 μm , un contenido de humedad del 4% y una concentración de bacterias viables incorporadas de aproximadamente 10^9 UFC/g de producto, manteniendo dicha concentración viable durante 3 meses, de igual manera favoreció a una baja formación de inclusiones lipídicas (80% menos que el control) en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y tratadas con el producto granulado a base de *Bifidobacterium sp.* en un modelo experimental con duración de dos semanas.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Institucional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (624582) otorgada a lo largo de mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) por permitirme seguir en mi formación de Licenciatura y Maestría, es un gran orgullo pertenecer a una de las mejores universidades de México.

A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas (UAM) por reforzar y brindarme las herramientas necesarias para desarrollarme en el ámbito profesional de la investigación.

A los laboratorios de Farmacotecnia y Producción de Biológicos (UAM) por la confianza, hospitalidad, compañerismo y apoyo incondicional brindado no solo en esta etapa de maestría, si no desde mi estancia de servicio social.

Al laboratorio de Ecología Microbiana (UAM) por la confianza y hospitalidad brindada durante mi estancia en la maestría y por el compañerismo y apoyo incondicional generado.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por el apoyo otorgado para el uso de equipos de carácter histológico.

Al Ingeniero Iván Puente Lee por el apoyo brindado en la Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química (UNAM).

A mis cotutoras Luz Ma. Melgoza y Angélica Gutiérrez y a mi asesor Julio Pérez, por su apoyo, amistad, confianza, experiencia y aportaciones que enriquecieron no solo este proyecto, si no también mi formación académica, profesional y personal.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres Gustavo y Lourdes por su apoyo, sacrificio, por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mí y en mis expectativas, por no dejarme caer y por estar ahí siempre, por las palabras, las risas y los momentos compartidos, pero, sobre todo, por el amor incondicional que me dan.

A mi hermanita Lupita por su apoyo y amor incondicional, por su carisma y por las risas compartidas que le dan alegría a mi vida y por ser la razón principal de querer superarme y lograr mis sueños.

A toda mi familia porque con sus consejos, palabras de aliento y apoyo incondicional hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A Lux por la confianza y apoyo, por todo lo compartido y por siempre estar, por ser parte fundamental de mi crecimiento profesional, por sus consejos, los momentos y las risas que forman parte de su esencia, pero sobre todo por la amistad incondicional que me brinda.

Al Jefe (GG) por el apoyo, las risas, las largas charlas, siempre estar, por sus sabios consejos y por su maravillosa amistad incondicional.

A Zac por todo el apoyo brindado durante toda mi estancia en la UAM, por ser mi compañera de experimentos, por las risas, consejos y canciones compartidas y por su amistad incondicional.

A Angie por el apoyo y consejos, por los momentos y las risas compartidas, por mostrarme lo maravilloso que es París y por su amistad incondicional.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Verito por sus palabras, apoyo, por los momentos compartidos y por su amistad incondicional.

A Maru por su apoyo, por sus consejos y por su amistad.

A mis amigos incondicionales de Farmacotecnia (Uri, Erika, Balo, Betzi, Jan y Vanne), de Ecología Microbiana (Mariana, Lilian, Flor, Clarissa, Agustín, Mich, Juan, Norbert, Jeny, Karen, Iván, Vanne y el Dr. Rubén del Muro), de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas (Iván, Gaby, Martitha, Betza, Pau, Rulo, Estanis, Adrián, Harold, Karlita, Yerye e Ime) y de vida (GAP 44, Leilani, Gaby , Bryan, Diana Keith y Deysi Zamora), mi gratitud hacia ellos es infinita, su amistad es algo que valoró mucho, los admiró, soy muy privilegiada por haber compartido charlas y risas con ellos, gracias por todo el apoyo, los consejos y por alegrar mi vida.

¡GRACIAS!

INDICE

Introducción.....	10
Marco teórico.....	12
Probióticos.....	12
Género <i>Bifidobacterium</i>	13
Características de los probióticos.....	14
Beneficios de los probióticos	15
Probióticos y su aplicación en la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico... 	17
Esteatosis hepática no alcohólica.....	19
Aspectos tecnológicos de los probióticos.....	20
Protección de los probióticos.....	21
Materiales utilizados para la protección de probióticos.....	21
Métodos de encapsulación.....	23
Recubrimiento por lecho fluido.....	24
Caracterización de los productos.....	25
Planteamiento del problema.....	28
Hipótesis.....	28
Objetivo General.....	29
Objetivos Específicos	29
Materiales y métodos	30
Estrategia general de la metodología	30
Caracterización física.....	31
Análisis Morfológico.....	31
Análisis de la distribución de partícula.....	31
Determinación del porcentaje del contenido de humedad	31
Viabilidad.....	32
Evaluación de la resistencia del producto granulado y la liberación de <i>Bifidobacterium sp.</i> a diferentes pH.....	32
Evaluación del producto granulado a condiciones simuladas de fluidos gastrointestinales.....	33
Prueba funcional <i>in-vivo</i>	34

Diseño experimental.....	34
Evaluación de la ganancia en peso corporal de las ratas.....	35
Evaluación de presencia de grasa, glucosa y enzimas de daño hepático en las bioquímicas sanguíneas de las ratas	35
Evaluación de la formación de inclusiones lipídicas en el hígado.....	35
Análisis de datos.....	36
Resultados y discusión.....	37
Caracterización física.....	37
Análisis morfológico	37
Análisis de la distribución del tamaño de partícula del producto	38
Determinación del porcentaje del contenido de humedad	39
Viabilidad.....	40
Evaluación de la resistencia del producto granulado y la liberación de <i>Bifidobacterium sp.</i> a diferentes pH.....	40
Evaluación del producto granulado a condiciones simuladas de fluidos gastrointestinales.....	42
Prueba funcional <i>In-vivo</i>	43
Evaluación de la ganancia en peso corporal de las ratas.....	43
Evaluación de presencia de grasa, glucosa y enzimas de daño hepático en las bioquímicas sanguíneas de las ratas	46
Evaluación de la formación de inclusiones lipídicas en el hígado.....	51
Discusión.....	54
Conclusiones.....	57
Referencias.....	58
Anexo.....	68

Introducción

Las investigaciones sobre el uso de probióticos para obtener beneficios sobre la salud humana han ido en aumento recientemente, transformando la cultura de la población a nivel mundial, concientizando sobre el consumo de estos microorganismos, por lo que se ha creado un enorme mercado en todo el mundo, colocando a disposición productos probióticos en forma de suplementos alimenticios y productos lácteos fermentados¹. Es esencial que, durante la elaboración de un producto probiótico, se mantenga la concentración adecuada de microorganismos viables para que, al ser consumidos, puedan ejercer el efecto benéfico sobre la salud del huésped, dicha concentración de microorganismos requiere mantenerse viable durante el almacenamiento del producto y principalmente durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal después de haber sido consumidos².

En los últimos años se han estudiado diferentes cepas probióticas, entre ellas, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales han sido evaluadas para comprender sus efectos metabólicos en diferentes modelos animales de obesidad. Actualmente los mecanismos no han sido completamente dilucidados, ya que, en algunos trabajos en ratones obesos al administrar *Lactobacillus*, se reporta una disminución de la ganancia en peso corporal, del tejido adiposo y de los niveles de insulina en suero³, y en otros, se muestra un aumento en el peso y la inflamación de los hígados⁴.

Por otro lado, se ha demostrado que las cepas del género *Bifidobacterium*, ejercen efectos benéficos contra la obesidad en modelos animales⁵⁻⁷. Por ejemplo, al administrar una mezcla de cepas del género *Bifidobacterium*, se observó una reducción de lípidos en ratas alimentadas con dietas altas en grasa⁶; así como la mejora en las alteraciones metabólicas e inmunológicas relacionadas con la obesidad en ratones alimentados con este tipo de dietas.

Con el fin de proteger a los microorganismos probióticos de factores ambientales, como oxígeno, humedad, pH y asegurar un aumento en la vida útil del producto, se han utilizado una gran variedad de métodos utilizando diversos materiales encapsulantes o de recubrimiento que generan su aislamiento, y favorecen que los

microorganismos mantengan su viabilidad, confiriendo mayor resistencia frente a factores ambientales y proporcionando mayor resistencia durante su paso por el tracto gastrointestinal⁸⁻¹⁰.

Debido a la relevancia de este tema, en este trabajo se evaluó la estabilidad y las características físicas de un producto granulado con protección entérica a base de *Bifidobacterium sp.* obtenido mediante lecho fluido y el efecto en la formación de inclusiones lipídicas al ser administrado en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

Marco teórico

Probióticos

Las primeras observaciones sobre el papel benéfico que desempeñan determinadas bacterias se atribuyen al inmunólogo Eli Metchnikoff del Instituto Pasteur, ganador del premio nobel, quien, en 1907, resaltó “la importancia de la alimentación en la modificación de la flora intestinal (hoy llamada, microbiota intestinal), reemplazando microorganismos dañinos por microorganismos con efectos benéficos”¹¹.

Los primeros en definir y citar el termino probiótico fueron Lilly y Stillwell en 1965, como “sustancias secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro”¹², entendiendo como probiótico lo contrario a antibiótico. En 1989, Fuller amplía el concepto de probiótico como un “complemento alimenticio a base de microorganismos vivos y vitales que produce efectos benéficos en el organismo animal, mejorando el equilibrio microbiano intestinal”¹³. El término probiótico deriva de una mezcla del latín (*pro* = a favor de) y griego (*bios* = vida) que significa “a favor de la vida”.

A lo largo de varios años se han desarrollado múltiples términos en torno al concepto probiótico, hasta que, en 2001, la Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO)¹³ llega a un consenso y establece la definición de probiótico como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico sobre la salud del huésped”, presentan característica como resistencia a los ácidos grasos, adhesión a la mucosa intestinal, ejercer efecto barrera, entre otras, lo cual da como resultado que una gran variedad de géneros y especies de bacterias puedan ser considerados probióticos, las bacterias más destacadas y más utilizadas comercialmente son las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*¹⁴.

Género *Bifidobacterium*

Las bacterias del género *Bifidobacterium* son caracterizadas como gram positivas anaerobias estrictas (algunas pueden tolerar el O₂), no formadoras de esporas, inmóviles, catalasas y oxidasas negativas, presentan forma de bacilos pleomórficos variando su morfología desde bacilos delgados y alargados con formas ramificadas en “Y” o “V” anchas frecuentemente en uno de sus extremos, dicha ramificación depende del medio de cultivo y de la especie, la temperatura óptima de crecimiento oscila entre 35-40°C, con un desarrollo mínimo a 22-25°C y 43-45°C¹⁵.

Las bifidobacterias fermentan hexosas mediante la vía de la fructosa-6-fosfato fosfoetolasa, y son las únicas bacterias intestinales conocidas capaces de utilizar esta ruta metabólica. El producto final de su metabolismo es ácido acético y láctico en relación 3:2¹⁶.

La descripción de 45 especies dentro de este género ha sido reconocida por el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey en 2012, el número de especies ha aumentado, actualmente se describen 54 especies y 10 subespecies, de las cuales 11, han sido detectadas en heces humanas y por lo tanto han sido de mayor relevancia para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales¹⁵.

Las especies nativas de bifidobacterias son dependientes de la edad del individuo, por ejemplo *B. infantis* y *B. breve* son predominantes en infantes, *B. adolescentes* es predominantes en adultos y *B. longum* se encuentra presente a lo largo de nuestra vida¹⁶.

Características de los probióticos

Las cepas de microorganismos probióticos deben presentar y mantener características que garanticen su crecimiento y supervivencia, entre las principales características se encuentran¹⁴:

- Resistir la acción de los ácidos gástricos y las sales biliares, y tener capacidad de adhesión a la mucosa intestinal para colonizar el segmento gastrointestinal.
- No debe causar infecciones y ha de ser tolerado por el sistema inmunitario del organismo hospedador (debe ser biológicamente seguro).
- Debe tener sinergia con la microbiota endógena normal.
- Debe ejercer un efecto barrera: el cuál evita que los agentes patógenos que se ingieren se implanten en el tracto digestivo.
- Durante su uso y almacenamiento deberá permanecer viable y estable.

Dichas características no son estrictamente específicas, dependerán de la especie, o del tipo de bacteria de la que se hable, por ejemplo, en un estudio realizado por Cueto y colaboradores¹⁷, evaluaron la resistencia gástrica de 53 cepas ácido lácticas, sometiéndolas a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal y encontraron que solo 54.7% de las cepas utilizadas eran tolerantes en un 60% a las condiciones simuladas gastrointestinales.

La mayoría de los microorganismos probióticos nativos, se encuentran sobre el tracto gastrointestinal, en donde se presenta una comunidad compleja que incluye anaerobios estrictos y anaerobios facultativos, debido a características definidas, tales como las condiciones estables de temperatura, pH, suministro de alimento y oxígeno, las cuales promueven la creación de sitios específicos con cualidades que solo algunas especies microbianas pueden soportar¹⁸.

Se reconocen diferentes hábitats pertenecientes al tracto gastrointestinal, tales como la boca, el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), intestino grueso (ciego y colon) y recto, en los que normalmente existe una estabilidad influenciada por el hospedador, lo que significa que existe una variación individual

de microorganismos¹⁹. De todos los hábitats pertenecientes al tracto gastrointestinal el que alberga la colección más densa de microorganismos es el intestino grueso, específicamente el colon esto debido a que presenta condiciones óptimas para la supervivencia de las bacterias, tales como, un hábitat anaerobio, un pH de 7.0, tiempo de tránsito lento y que favorece el crecimiento y la actividad de las bacterias debido a carbohidratos no digeribles por el humano, pero que estas sí pueden fermentar²⁰⁻²², dichos carbohidratos son obtenidos de forma natural de alimentos tales como la leche y la miel, así como en hortalizas, verduras, frutas, cereales, legumbres y frutos secos, pudiéndose obtener, de estos últimos, por extracción directa mediante solubilización en agua o soluciones acuosas por ejemplo inulinas, oligosacáridos de achicoria o soya²³, éstos han sido denominados como prebióticos y por definición la FAO/WHO los describe como “Ingredientes fermentados selectivamente que dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped”²⁴; sin embargo el actual estilo de vida que los humanos han adaptado, principalmente en países occidentales, ha provocado el abandono de determinados hábitos saludables, y ha generado un consumo alto de proteínas y grasas saturadas, lo que resulta en la baja viabilidad de las bacterias probióticas y por lo tanto un bajo o nulo efecto benéfico²⁵.

Beneficios de los probióticos

Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo, y son reconocidos por ser bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos, y se han utilizado durante muchos años para prevenir infecciones gastrointestinales²⁶.

Para que un microorganismo pueda realizar la función de protección, debe cumplir con los postulados de Huchetson, los cuales mencionan que el microorganismo debe ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, favorecer la producción de compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino²⁷.

Existe una creciente evidencia de que el consumo de probióticos puede ser eficaz para prevenir o tratar determinadas enfermedades. No obstante, estas ventajas sólo han sido mostradas en condiciones precisas y en número limitado de ensayos clínicos, por lo que los resultados no son generalizables para todos los probióticos.

Una lista de los diferentes beneficios de los probióticos se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de los efectos biológicos de los probióticos

Efectos benéficos	Estudios	Referencias
Inmunológico	Reducción de inflamación (citocinas antiinflamatorias)	Korpela, R. (2008). Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults.
Neurológicas	Regulación de la depresión y estrés (interacción intestino-cerebro/hormonas)	Mayer, E. A. (2013). Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity.
Enfermedades Gastrointestinales	Diarrea Síndrome del colon irritable Cáncer de colon (competencia de nutrientes, traslocación bacteriana, bacteriocinas)	Paerregaard, A. (2002). Effect of probiotic Lactobacillus strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers.
		McFarland, L. V., & Dublin, S. (2008). Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome
Enfermedades Hepáticas	Cirrosis Cáncer hepático Hígado Graso No Alcohólico (bacteriocinas, regulación de la esterificación de grasas)	S. M. (2004). Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis.
		Jobin, C. (2013). VSL# 3 probiotic modifies mucosal microbial composition but does not reduce colitis-associated colorectal cancer.
		Clément, K. (2019). Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials.

Elaborado por Garfias Noguez.

Probióticos y su aplicación en la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es el término empleado para describir un conjunto amplio de manifestaciones clínicas interrelacionadas que inician con la esteatosis hepática definida por acumulación de grasa a nivel citoplasmático y puede progresar a un estado de inflamación y fibrosis, conocido como esteatohepatitis, actualmente, el EHGNA representa la patología crónica de hígado más frecuente en los países de occidente, probablemente debido al aumento en obesidad, diabetes y síndrome metabólico, cuya definición incluye la manifestación hepática propia del EHGNA²⁸.

Las estrategias de tratamiento existentes para EHGNA se han centrado en reducir los factores de riesgo metabólicos, modificando el estilo de vida como la pérdida de peso a través de la dieta y el ejercicio como terapia clave²⁹⁻³⁰, el uso de farmacoterapia administrando agentes hepato-protectores como antioxidantes y antiinflamatorios³¹⁻³⁶. Muchas de estas estrategias han demostrado su eficacia en diferentes estudios piloto, sin embargo, dado que a veces no existe una relación entre la histología hepática y los niveles séricos de enzimas indicadoras de daño hepático, los resultados de los ensayos que utilizan estos marcadores bioquímicos deben interpretarse con cuidado, especialmente cuando no se utiliza un grupo de control en el diseño del estudio³⁷⁻³⁸.

Varios modelos animales han evidenciado que los probióticos pueden reducir la progresión de EHGNA³⁹⁻⁴². Un estudio en el que se utilizó una mezcla de probióticos llamada VSL # 3 (*Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) durante 4 semanas en ratones ob / ob mostraron una reducción en el contenido de ácido graso total hepático y la inflamación hepática, así como una mejora en la resistencia a la insulina³⁹.

Otro estudio sugirió una disminución directa en las citocinas proinflamatorias a través de la regulación negativa de la actividad NF-κB utilizando probióticos.⁴⁰ En un modelo animal EHGNA alimentado con una dieta rica en grasa, la suplementación con VSL # 3 redujo la expresión de los marcadores de peroxidación

de lípidos, TNF- α (Factor de necrosis tumoral), iNOS (óxido nítrico sintasa) y ciclooxigenasa 2 en comparación con el grupo control.⁴¹ Además, la administración de este coctel de microorganismos, mejoró la resistencia a la insulina en los tejidos hepáticos y adiposos y contrarrestó el desarrollo de aterosclerosis en ratones.⁴³

Se ha observado que las cepas del género *Bifidobacterium* ejercen efectos benéficos contra la obesidad en modelos animales⁴⁴⁻⁴⁶. Por ejemplo, una mezcla de *Bifidobacterium spp.* ejerció efectos anti-obesidad y de reducción de lípidos en ratas alimentadas con dieta alta en grasa⁴⁵ y, muy recientemente, se informó que *B. pseudocatenulatum* mejoró las alteraciones metabólicas e inmunológicas relacionadas con la obesidad en ratones alimentados con dietas altas en grasa⁴⁶.

De igual manera se ha evidenciado en pacientes humanos efectos benéficos de los probióticos, por ejemplo, en un estudio en donde pacientes adultos obesos, fueron tratados con *Lactobacillus gasseri* BNR17 (BNR-H) con una concentración de 10⁹ UFC por día durante 12 semanas se observó una reducción significativa (P<0.05) del índice de masa corporal y de triglicéridos en sangre⁴⁷.

En otro estudio, un grupo de mujeres obesas, fueron tratadas durante 12 semanas, con una mezcla de *Lactobacillus acidophilus* LA5 y *Bifidobacterium lactis* BB12, los cuales se encontraban adicionados en yogurt a una concentración de 10⁷ UFC por día, se observó que la masa corporal decreció significativamente (P<0.05), la circunferencia de la cintura bajo y los niveles de triglicéridos disminuyeron respecto al control⁴⁸.

El conocimiento de los mecanismos moleculares referentes a los efectos de los probióticos es muy limitado ya que la compleja microbiota intestinal interactúa y regula las múltiples vías metabólicas de señalización e inflamatorias del huésped que conectan el intestino con el hígado, el tejido adiposo, el páncreas, el músculo y el cerebro⁴⁹⁻⁵⁰.

Esteatosis hepática no alcohólica

Dentro de las aplicaciones terapéuticas de los probióticos se destaca su uso en el tratamiento de la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), la cual es la acumulación de grasa (triglicéridos) en el citoplasma de los hepatocitos en forma de vacuolas, las cuales pueden quedar dentro o fuera de la célula hepática, se caracteriza por presentar lesiones hepáticas similares a las producidas por el consumo de alcohol y se describe como una manifestación clínica de la enfermedad del hígado graso derivada de una obesidad mórbida, como consecuencia de una mala alimentación⁵¹. México ocupa el segundo lugar en obesidad adulta y el primer lugar en obesidad infantil⁵², esto deriva en el aumento de la prevalencia de la EHNA estimando del 6 al 45% de la población mundial presenta dicha manifestación clínica, aumentando hasta 70% en pacientes con *diabetes mellitus* tipo 2 o 90% en individuos con obesidad mórbida⁵³.

La fisiopatológica más aceptada para explicar la esteatosis es la de doble impacto, propuesta por Day y James en 1998⁵⁴. El “primer impacto” refleja la acumulación de triglicéridos (inclusiones lipídicas macrovesiculares) en los hepatocitos, principalmente en la zona 3 del lobulillo hepático (centrolobulillar), la cual es una consecuencia del aumento de la lipogénesis hepática y de la resistencia a la insulina, desarrollada por un desequilibrio en la microbiota intestinal, está asociada con mínima o nula inflamación. El “segundo impacto” implica la inflamación del tejido adiposo, resultado del daño de los hepatocitos⁵⁵.

La inflamación es precedida por la retención elevada de triglicéridos en el tejido adiposo, lo cual favorece la producción y secreción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la Interleucina-6 (IL-6)⁵⁶, estos últimos contribuyen de manera importante al proceso inflamatorio sistémico, estos mediadores proinflamatorios también disminuyen la sensibilidad a la resistencia a la insulina y por ende a una retención de ácidos grasos en el hepatocito, esto se convierte en un ciclo vicioso llevando a un daño continuo que puede desencadenar en fibrosis o cirrosis⁵⁷.

Aspectos tecnológicos de los probióticos

De manera generalizada el consumo de probióticos se realiza a través de bebidas, alimentos o suplementos alimenticios, los cuales contienen a las bacterias probióticas en estado viable, esto ha generado un incremento de su popularidad en el mercado actual, sin embargo, diferentes estudios han demostrado fluctuaciones y baja viabilidad de las bacterias probióticas⁵⁸. La idea de ingerir células vivas probióticas con la incorporación de una barrera física contra las condiciones intestinales adversas, es un planteamiento que actualmente adopta un gran interés por las industrias alimenticias y farmacológicas, por lo que, la protección mediante diversas técnicas como lo es la encapsulación, podrá ayudar a la conservación y/o mantener la cantidad requerida de biomasa en el producto final con buenas tasas de viabilidad y supervivencia⁵⁹.

Algunos ejemplos de probióticos comercializados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de probióticos comercializados como especialidades farmacéuticas y como derivados lácteos

Probióticos comercializados como especialidades farmacéuticas				
Nombre	Microorganismo	Presentación	Concentración	Ref.
Sinuberase®	<i>Bacillus clausii</i>	Comprimidos	S/R	61
Casenflus®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sobre / Polvo	10 ⁶ UFC/sobre	60
Infloran®	<i>L. acidophilus</i> y <i>B. bifidum</i>	capsulas	10 ⁹ UFC/ capsula	60
Floratil®	<i>Saccharomyces boulardii</i>	capsulas	S/R	62
Ultralevura®	<i>Saccharomyces boulardii</i>	capsulas	S/R	60
Lactofilus®	<i>L. acidophilus</i>	Sobre / Polvo	10 ⁶ UFC/sobre	60
Probióticos comercializados como derivados lácteos				
Nombre	Microorganismo	Presentación	Concentración	Ref.
Activia®	<i>Bifidus essensis</i>	Bebida láctea fermentada	10 ⁸ UFC/producto	64
Lala Bio4®	<i>Bifidobacterium</i>	Bebida láctea fermentada	10 ⁸ UFC/producto	64
Vitalinea®	<i>Lactobacillus delbruekii</i> <i>Subsp. bulgaricus</i>	Producto lácteo batido	10 ⁸ UFC/producto	64
Yakult®	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Producto lácteo fermentado (80mL)	10 ⁹ UFC/producto	63

Elaborado por Garfias Noguez; S/R: Sin registro

Protección de los probióticos

Para lograr cumplir el reto de mantener viables a los microorganismos probióticos, se propone utilizar la técnica de **encapsulación**, la cual por definición es una técnica de recubrimiento que genera un ambiente aislado del exterior, el cual preserva y protege al agente activo de factores ambientales tales como el oxígeno, la humedad y el pH, promoviendo un aumento en la vida útil del producto, la liberación gradual y controlada del agente activo bajo determinadas condiciones e incluso facilitando su manipulación⁶⁵.

Existen dos diferentes tipos de sistemas de encapsulación los cuales según su estructura se pueden clasificar en 1) *sistema reservorio o capsular* en donde el material activo se encuentra incluido en una especie de reservorio o matriz/núcleo, que puede ser de naturaleza líquida o sólida, el cual se encuentra envuelto por una película de material de recubrimiento y 2) *sistema matricial* en donde el material activo se encuentra altamente disperso en una matriz polimérica⁶⁶.

Materiales utilizados para la protección de probióticos

La elección ideal del núcleo y el material de recubrimiento apropiado para el agente activo es considerado como el punto estratégico para realizar la encapsulación. Los materiales de protección deben reunir ciertas propiedades que dependen de las características químicas del agente activo, la aplicación, las condiciones de almacenamiento y del proceso al cual será expuesto⁶⁷.

Las características de un recubrimiento ideal para encapsular⁶⁸ son: baja viscosidad a altas concentraciones, baja higroscopicidad, y no ser reactivo con el agente activo, proveer máxima protección al agente activo contra condiciones adversas (luz, pH, oxígeno, humedad), liberación completa de disolventes y otros materiales usados durante el proceso de encapsulación y sabor insípido. En el caso de los microorganismos probióticos, normalmente se emplean como material de encapsulación y matrices algunos polisacáridos de diferentes orígenes⁶⁸ (tabla 3).

Tabla 3. Polisacáridos empleados en la encapsulación de probióticos

Origen	Polisacárido
algas marinas	κ-carragenano, alginato
plantas	almidón, celulosa, goma arábica
bacterias	gelano, xantano
animales	Quitosano
proteínas animales	leche, gelatina

Adaptada de Yadav y col (2013)⁶⁸

Dado que los probióticos requieren llegar de manera inalterada al colón, se ha propuesto como nuevo sistema de recubrimiento el uso de la encapsulación con recubrimiento entérico, el cual brinda protección a los probióticos para que puedan resistir el ambiente gástrico durante su paso por el tracto gastrointestinal y lograr la llegada y liberación correcta en el intestino grueso, sitio en donde ejercen su actividad benéfica⁶⁸.

Dentro de la gama de polímeros pH dependientes se encuentran los polímeros de polimetacrilato, los cuales, se disuelven en una región de pH específica del tracto gastrointestinal, presentan una variación en las proporciones de los metacrilatos de dimetilaminoetilo, ácido metacrílico y ésteres de ácido metacrílico, por lo que se clasifican como polímeros sintéticos catiónicos, aniónicos o neutros. Estos polímeros se encuentran comercialmente en forma de polvo seco, dispersión acuosa o como solución orgánica⁶⁹⁻⁷⁰. Se utilizan principalmente como formadores de película en la aplicación de recubrimientos farmacéuticos funcionales para controlar la liberación de fármacos y como formadores de matriz en técnicas de granulación. Las resinas acrílicas Eudragit® (tabla 4) comercializadas principalmente por Evonik-Alemania, son compuestos inofensivos e inertes, que no se absorben en el tracto gastrointestinal y son resistentes a los fluidos corporales. Permanecen por un tiempo limitado en el tracto gastrointestinal, se excretan sin cambios y no producen productos de degradación⁷⁰. Algunos ejemplos de resinas acrílicas Eudragit® utilizadas para recubrimiento, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Polímeros funcionales Eudragit® para formas de dosificación sólidas orales

Liberación inmediata		
Producto	Disponibilidad	Propiedades de disolución
Eudragit® E 100	Gránulos	Soluble en jugo gástrico hasta pH 5.0 Permeable por encima de pH 5.0
Eudragit® E 12.5	solución orgánica	
Eudragit® E PO	Polvo	
Liberación retardada		
Eudragit® L 100-55	Polvo	Disolución por encima de pH 5.5
Eudragit® L 30 D-55	dispersión acuosa	
Eudragit® L 100	Polvo	Disolución por encima de pH 6.0
Eudragit® L 12.5	solución orgánica	
Eudragit® S 100	polvo	Disolución por encima de pH 7.0
Eudragit® S 12.5	solución orgánica	
Eudragit® FS 30 D	dispersión acuosa	
Liberación prolongada		
Eudragit® RL 100	Gránulos	Insoluble Alta permeabilidad Hinchamiento independiente del pH
Eudragit® RL PO	Polvo	
Eudragit® RL 30 D	dispersión acuosa	
Eudragit® RL 12.5	solución orgánica	
Eudragit® RS 100	Gránulos	Insoluble Baja permeabilidad Hinchamiento independiente del pH
Eudragit® RS PO	Polvo	
Eudragit® RS 30 D	dispersión acuosa	
Eudragit® RS 12.5	solución orgánica	

Eudragit® 2018, Evonik⁷¹

Métodos de encapsulación

La presencia de las diversas condiciones en el sistema digestivo dificulta el diseño de sistemas de liberación de probióticos, por lo tanto, se requiere de un sistema altamente adaptado que proporcione mantenimiento de la viabilidad después de enfrentar condiciones ambientales y de producción perjudiciales, capacidad de liberación celular y ubicación de destino específico⁷².

Los probióticos son comúnmente encapsulados por extrusión, emulsificación, liofilización, secado por aspersión y recubrimiento por lecho fluido.

Sin embargo, la evidencia del uso de la encapsulación con aporte de una protección entérica para la protección de probióticos y con el objetivo de su posterior administración oral es muy baja, una de éstas es la descrita por Barros, J.M y col. (2015) en *Enteric coated spheres produced by extrusion/spheronization provide effective gastric protection and efficient release of live therapeutic bacteria* publicado en *International journal of pharmaceutics*, 493(1-2), quienes mediante la técnica de granulación incorporaron a *L. casei* en celulosa microcristalina, posteriormente la masa de polvo húmedo se extruyó, los productos extruidos se esferonizaron y se secaron a 40°C, posteriormente con apoyo de un mini spray-dry las esferas se recubrieron con Eudragit L-100 y se evaluaron de manera *in-vitro*, los resultados muestran una pérdida de la viabilidad durante el proceso de protección, ya que la concentración inicial fue 10¹⁰ UFC/ml y el total de bacterias protegidas fue de 10⁸ UFC/g de producto, la liberación total de la bacteria se presentó después de una hora de estar en contacto con pH 7, sin embargo el estudio menciona que durante su almacenamiento la viabilidad baja a 10⁶ durante los primeros 3 meses.

Recubrimiento por lecho fluido

El lecho fluido es un equipo versátil en el que se pueden realizar hasta tres procesos diferenciados: granulación, recubrimiento y secado.

El proceso de encapsulación en lecho fluido involucra la granulación y el secado de la materia utilizada; las partículas se mantienen suspendidas y en constante movimiento por aire, el líquido aglutinante o polímero de protección es atomizado a través de una boquilla nebulizadora localizada en la parte superior y el aire que mantiene suspendidas a las partículas mantiene una temperatura que favorece el secado de las mismas⁷³ (imagen 1).

Dentro de las ventajas que proporciona el equipo son: un control total sobre la temperatura durante el proceso de encapsulación, lo cual favorece a la viabilidad de la cepa probiótica, proporciona una alta carga útil de microorganismos y genera una mayor estabilidad al producto obtenido debido al secado proporcionado⁷⁴; dichas ventajas son observadas aun cuando el equipo demanda que primero sea

incorporado el microorganismo probiótico, y después se realice la protección resultando en una duración larga de proceso.

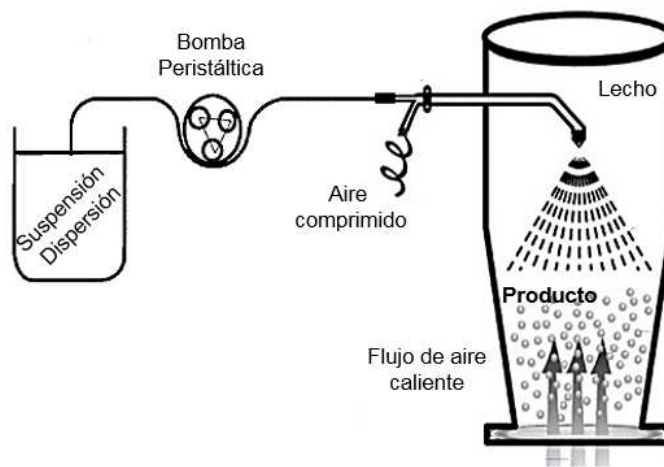


Imagen 1. Representación de proceso de encapsulación en lecho fluido

Modificada por Garfias Noguez

Caracterización de los productos

Un resultado satisfactorio en la manufactura de productos biológico-farmacéuticos depende de que se apliquen sistemas de control en todos los aspectos en que se base el producto el analítico, la ingeniería de fabricación y en la calidad de los materiales. Regularmente, muchos de los aspectos de la manufactura de un medicamento se pueden controlar satisfactoriamente. Sin embargo, es común que los fármacos y excipientes sean los que puedan provocar variaciones en la calidad del producto terminado, es por que requieren realizarse pruebas de control de calidad que aseguren la buena manufactura del producto.

Morfología ⁷⁵⁻⁷⁶: los estudios morfológicos de las muestras de micropartículas revelan sus características importantes, tales como: forma, regularidad de la superficie, continuidad de la membrana, presencia de poros y uniformidad en su distribución, así como presencia de defectos y agregación. La morfología de las partículas se estudia mediante técnicas de microscopía, de las cuales la más empleada es la microscopía electrónica de barrido, está técnica a diferencia de un

microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el microscopio electrónico de barrido se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra, es decir, el funcionamiento se basa en la incidencia de un haz electrónico sobre una muestra conductora. Este haz se enfoca en un punto en el que se lleva a cabo un barrido de la superficie. El resultado de la interacción es la emisión de diversas señales: electrones retrodispersados, electrones secundarios y rayos X, entre otros. Estas señales son captadas por detectores que las procesan, posteriormente se amplifican y se transforman en señales eléctricas que son codificadas como píxeles en un monitor.

Tamaño de partícula⁷⁷⁻⁷⁸: El tamaño de las partículas obtenidas puede ser observado mediante el método de difracción laser, el cual, proporciona datos sobre la distribución del tamaño de las partículas de una muestra, a través del análisis de sus patrones de dispersión de luz angulares, la aproximación más común para mostrar los rangos de resultados de dicho análisis es reportar el diámetro (D) de la partícula que divide el volumen de la muestra en un porcentaje específico (10%, 50%, 90%), a esto comúnmente se le llama, cálculo del D₁₀, D₅₀ y D₉₀. La técnica de espectrometría por difracción de rayo láser mide las distribuciones de tamaño de partícula a partir de la variación angular de la intensidad de la luz dispersada cuando un rayo láser pasa a través de una muestra de partículas dispersas. Las partículas grandes dispersan la luz en ángulos pequeños en relación con el rayo láser, y las partículas pequeñas dispersan la luz en ángulos grandes, luego se analizan los datos de la intensidad de dispersión angular para calcular el tamaño de las partículas responsables de crear el patrón de dispersión, utilizando la teoría Mie de la dispersión de luz, el tamaño de partícula se registra como un diámetro de esfera equivalente al volumen.

La teoría Mie requiere que se conozcan las propiedades ópticas (índice de refracción y componente imaginario) de la muestra que se está midiendo, junto con el índice de refracción del dispersante. Por lo general, las propiedades ópticas del dispersante son relativamente fáciles de encontrar a partir de los datos publicados,

y muchos instrumentos modernos cuentan con bases de datos integradas que incluyen dispersantes comunes.

Porcentaje de cantidad de humedad⁷⁹: el proceso de protección en lecho fluido involucra la granulación y el secado del producto en un solo proceso, lo que favorece la evaporación del agua en el sistema (humedad libre), dicha evaporación no es total por lo que existe la presencia de agua en el producto (humedad ligada), aquella cantidad de agua que al finalizar el proceso de secado se mantiene en el producto y no fue evaporada, es considerada como “humedad en equilibrio” bajo las condiciones establecidas del aire. Dicha humedad es un parámetro muy importante que influye en la vida útil de los productos, ya que favorece la estabilidad del sistema, la humedad óptima para los gránulos se recomienda entre 3 – 5%. La humedad es tomada como la pérdida de peso al secado, usando un instrumento de humedad, el cual emplea una balanza de torsión sensible para pesar la muestra y una lámpara infrarroja para secar.

Planteamiento del problema

En los últimos años se ha incrementado el interés por obtener un estado óptimo de salud mediante el uso de probióticos, debido a la gran cantidad de evidencia que presume la eficacia de dichos microorganismos, principalmente en enfermedades gastrointestinales, por lo que el reto de mantener viables a las células durante el proceso de incorporación al sistema de dosificación, así como el de mantener la concentración durante un periodo de tiempo largo, ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias fármaco-biológicas que favorezcan la estabilidad de la bacteria y la protección a diferentes condiciones ambientales, por lo que es importante caracterizar las nuevas estrategias de entrega de probióticos determinando la concentración de bacterias en los sistemas, así como las propiedades de protección para las cuales están diseñadas.

Hipótesis

El producto granulado con protección entérica a base de *Bifidobacterium sp.*, será estable a condiciones de anaquel, protegerá a la bacteria de pH ácidos, y al ser administrado en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa evitará la formación de inclusiones lipídicas en el hígado.

Objetivo General

Evaluar la estabilidad y las características físicas del granulado con protección entérica a base de *Bifidobacterium sp.*, obtenido mediante lecho fluido, y analizar el efecto que presenta su administración en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

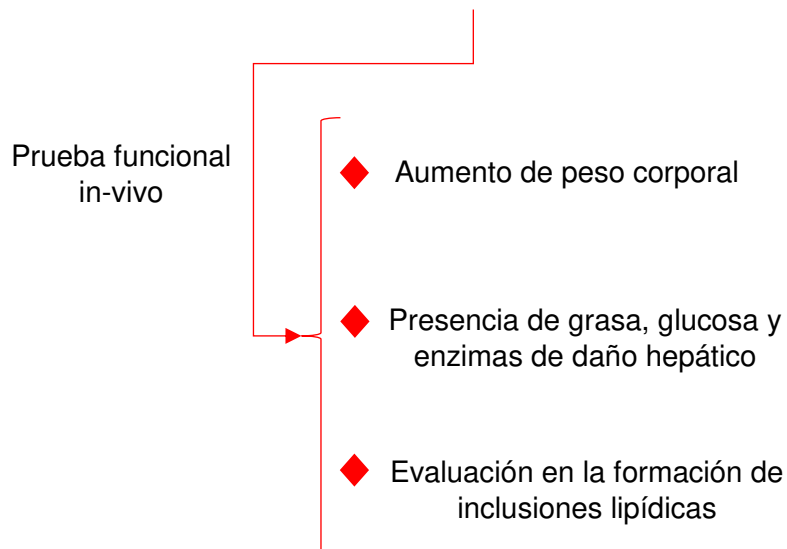
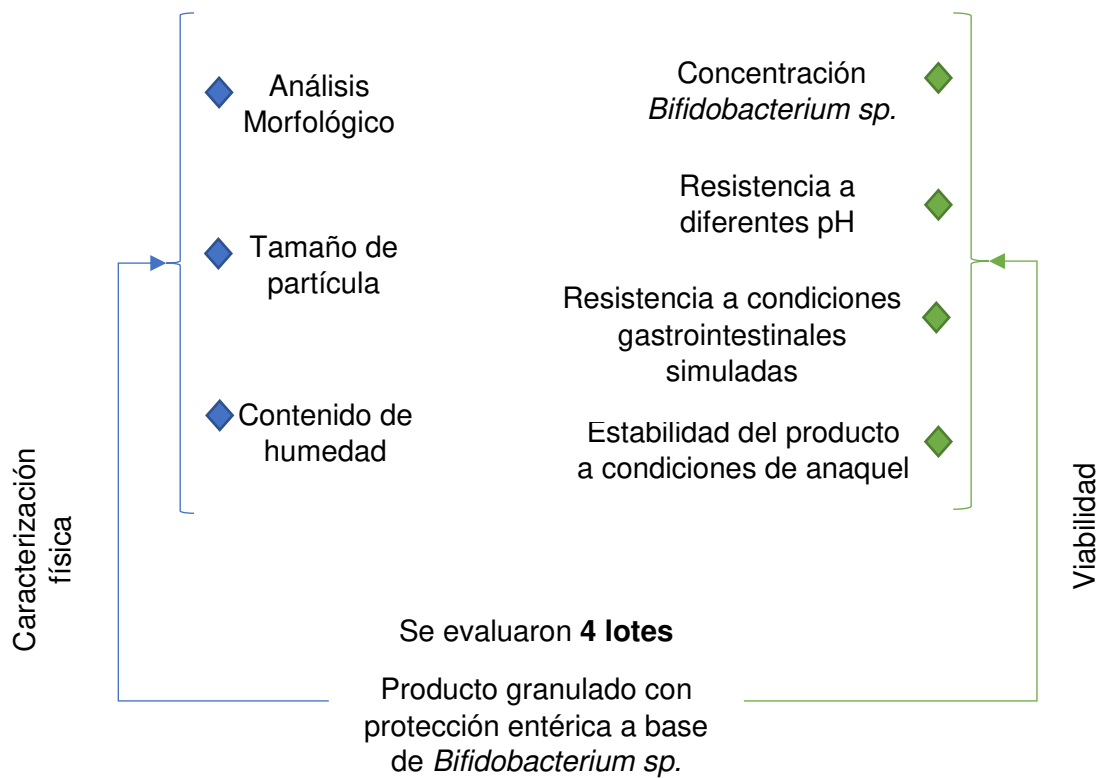
Objetivos Específicos

1. Evaluar las características físicas del producto granulado con protección entérica elaborado a base de *Bifidobacterium sp.* (morfología, tamaño de partícula y porcentaje del contenido de humedad).
2. Determinar la concentración de *Bifidobacterium sp.* presente en el producto granulado y monitorear la estabilidad del producto almacenado en condiciones de anaquel.
3. Evaluar la resistencia del producto granulado con protección entérica a diferentes pH.
4. Evaluar la resistencia de *Bifidobacterium sp.* en el producto granulado a condiciones simuladas de fluidos gastrointestinales.
5. Evaluar el efecto del producto granulado administrado con protección entérica a base de *Bifidobacterium sp.* en la formación de inclusiones lipídicas en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

Materiales y métodos

Se analizaron 4 lotes de producto granulado con protección entérica, a base de *Bifidobacterium sp.*, elaborados en lecho fluido, los cuales fueron diseñados y obtenidos como parte de otro proyecto que aún se encuentra en proceso.

Estrategia general de la metodología



Caracterización física

Análisis Morfológico

El producto granulado fue observado en un microscopio digital portátil DinoLite AM4515ZT, con una potencia de magnificación óptica de 15x - 220x, con el cual fue posible observar las características físicas del producto granulado tales como forma y tamaño.

Posteriormente, el producto fue observado en un Microscopio Electrónico de Barrido en la Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, con el apoyo del Ingeniero Iván Puente Lee, para lo cual, las muestras fueron fijadas con glutaraldehído, y deshidratadas con etanol a diferentes concentraciones y finalmente se realizó un paso de secado con apoyo de un sistema thermoblock a 37°C.

Análisis de la distribución de partícula

La distribución del tamaño de partícula del producto granulado se determinó utilizando la técnica de difracción de rayo láser, mediante el equipo "LA-950V2 HORIBA®", utilizando el sistema de alimentación en seco "PowderJet", colocando una muestra de aproximadamente 50 mg y analizando los resultados de acuerdo a lo mencionado en el MGA-0820 (Determinación de tamaño de partícula en sistemas dispersos por difracción laser).

Determinación del porcentaje del contenido de humedad

Para conocer el porcentaje del contenido de humedad del producto granulado, se utilizó una termobalanza MB45 OHAUS®, colocando una muestra de 5 g durante 10 min a 100°C.

Viabilidad

Evaluación de la resistencia del producto granulado y la liberación de *Bifidobacterium sp.* a diferentes pH.

Para conocer la resistencia del producto granulado con protección entérica a diferentes pH's, la concentración de *Bifidobacterium sp.* presente por gramo de producto, así como su viabilidad durante 3 meses, cada 15 días, se colocaron 0.5 g del producto en 5 mL de buffer de acetatos pH 3 durante 1 hora tomando una muestra de 150 μ L en los tiempos 0 y 60 minutos, posteriormente el producto granulado incorporado en el buffer de acetatos fue centrifugado a 3,000 rpm durante 15 min, se decantó el sobrenadante y el pellet del producto granulado obtenido se resuspendió con 5 mL de buffer de fosfatos y se mantuvo en dicho buffer durante 2 horas, se tomó una muestra de 150 μ L en los tiempos 0, 60 y 120 minutos.

De cada una de las muestras obtenidas se realizaron 2 diluciones decimales seriadas (1:10 y 1:100) y se plaquearon 3 μ L por triplicado, en agar MRS-Cys, las cajas se incubaron bajo condiciones anaeróbicas con apoyo de sobres GasPak™ en una jarra de anaerobiosis a 37°C durante 48 horas en una incubadora Felisa® modelo FE132 Serie 096 y posteriormente se procedió al conteo de las colonias.

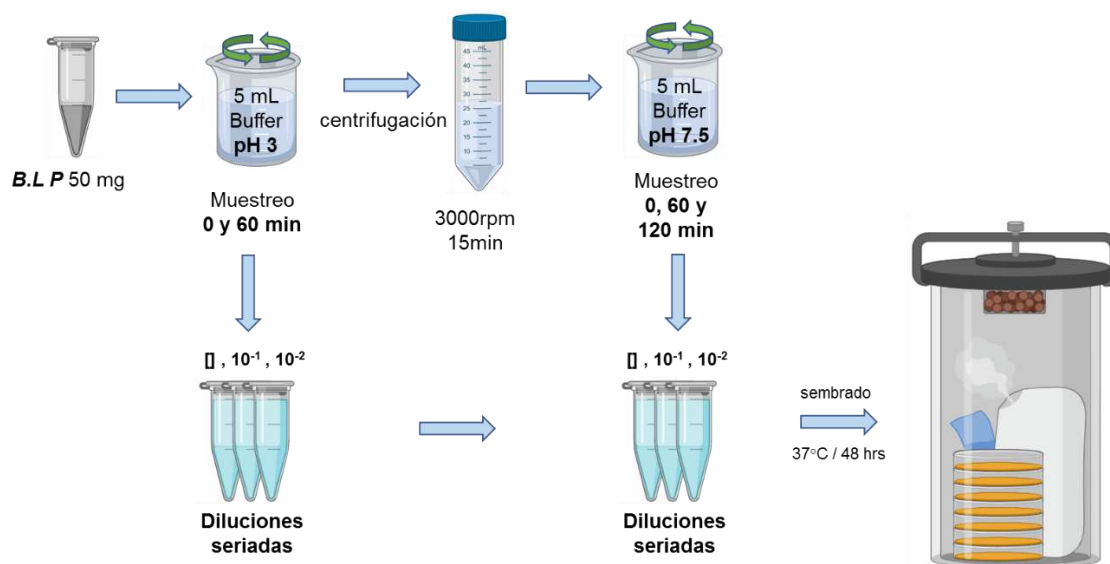


Imagen 2. Representación del experimento diseñado para la evaluación de la resistencia del producto granulado y la liberación de *Bifidobacterium sp.* a diferentes pH.

Evaluación del producto granulado a condiciones simuladas de fluidos gastrointestinales

Con el fin de evaluar la resistencia del producto granulado con protección entérica, la viabilidad del microorganismo incorporado en el producto y así mismo la viabilidad del microorganismo sin protección, en condiciones gastrointestinales simuladas de rata, se preparó fluido gástrico simulado pH 1.2 (FEUM) cuya composición es: NaCl 0.2 g, pepsina 0.32 g, HCl 0.7 mL y agua destilada c.b.p. 100 mL; así como fluido intestinal simulado pH 7.5 cuya composición es: KH_2PO_4 0.68 g, NaOH 0.2N 14 mL, pancreatina 1 g, agua destilada c.b.p. 100 mL (ajustar con NaOH 0.2N), de igual manera se preparó buffer de fosfatos pH 6, se colocó una muestra del producto (1g) y del cultivo sin protección (100mL) de tal manera que presentaran la misma concentración (10^9 UFC/g) bacteriana, en 5 mL de los fluidos gástrico e intestinal simulados y del buffer pH 6, tomando muestras de la siguiente manera: 1 muestra a los 5 min en pH 1.2, 1 muestra cada 30 minutos durante 2 horas en buffer pH 6, y muestra cada 30 minutos durante 2 horas en fluido intestinal simulado pH 7.5, a cada una de las muestras obtenidas se realizaron 2 diluciones decimales seriadas (1:10 y 1:100) y se plaquearon 3 μL por triplicado, en agar MRS enriquecido con cisteína, las cajas se incubaron bajo condiciones anaeróbicas con apoyo de sobres GasPakTM en una jarra de anaerobiosis a 37°C durante 48 horas en una incubadora Felisa[®] modelo FE132 Serie 096 y posteriormente se procedió al conteo de las colonias.

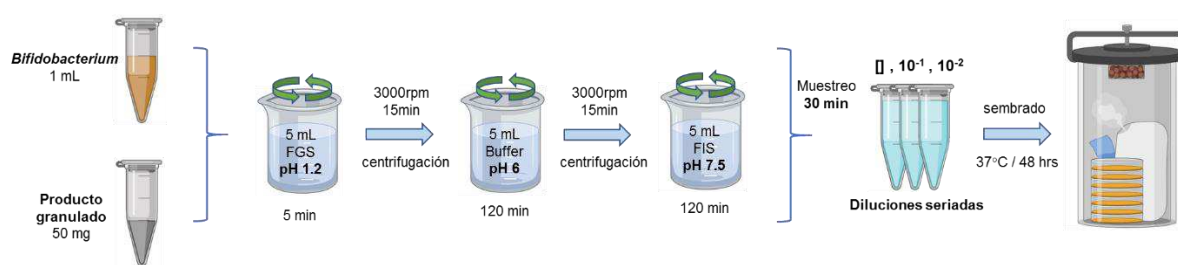


Imagen 3. Representación del experimento para la Evaluación del producto granulado a condiciones simuladas de fluidos gastrointestinales

Prueba funcional *in-vivo*

Diseño experimental

Para la evaluación del efecto de la administración del producto granulado con protección entérica a base de *Bifidobacterium sp.*, se emplearon 24 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 150-180 g, las cuales fueron proporcionadas por la UPEAL de la UAM-X. Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales por grupo, con un ambiente climatizado a una temperatura de aire de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclos de luz/obscuridad de 12 X 12, y con acceso “*ad libitum*” a agua. La duración del experimento fue de 14 días de dieta con 7 días de tratamiento, las ratas fueron divididas en seis grupos de 4 animales cada uno, 2 grupos corresponden a los controles de la dieta normal (DN) “Lab Diet 5001 Rodent Diet” y la dieta alta en grasa (HFD), los 4 grupos restantes corresponden a los tratamientos, es decir dieta normal y dieta alta en grasa con *Bifidobacterium sp.* sin protección (DN+B y HFF+P) y dieta normal y dieta alta en grasa con *Bifidobacterium sp.* incorporada en el producto granulado con protección entérica tabla 5, a cada grupo se le dispensó 30 g de cada dieta diario, y una concentración bacteriana sin protección y en el producto granulado de 10^9 bacterias, a partir del día 7 del experimento; al finalizar el experimento las ratas fueron sedadas y fijadas en una tablilla de operaciones, para poder realizar la disección e identificar el corazón y el hígado para la obtención de la muestra sanguínea y de biopsia respectivamente. Tanto la bacteria sin protección, como el producto granulado, fueron administrados vía oral con apoyo de una cánula esofágica.

Tabla 5. Grupos experimentales, composición de dietas y dosis diaria de probiótico

Grupo	Tratamiento	Nomenclatura	Composición Dieta Normal
1	Dieta Normal	DN	Alimento: Lab Diets 5001
2	Dieta Normal + <i>Bifidobacterium sp</i>	DN+B	58% Carbohidratos, 14% Grasas, 23% Proteínas y 2% Vitaminas y Minerales
3	Dieta Normal + Producto granulado	DN+P	
Grupo	Tratamiento	Nomenclatura	Composición Dieta Alta en grasa *
4	Dieta Alta en Grasa	HFD	46% alimento Lab Diets 5001
5	Dieta Alta en Grasa + <i>Bifidobacterium sp</i>	HFD+B	16% Fructosa, 16% Manteca de cerdo, 22% Caseína y 0.1% Vitaminas y Minerales
6	Dieta Alta en Grasa + Producto granulado	HFD+P	
Dosis diaria de probiótico			
10^9 UFC (<i>Bifidobacterium sp.</i> sin protección y producto granulado)			

* Reynoso-Camacho, R. (2017)⁸⁰

Evaluación de la ganancia en peso corporal de las ratas

La evaluación del impacto que presentaron las dietas sobre el peso corporal de las ratas se realizó mediante el monitoreo diario del peso durante todo el experimento, utilizando una balanza granataria.

Evaluación de presencia de grasa, glucosa y enzimas de daño hepático en las bioquímicas sanguíneas de las ratas

Transcurridos los 14 días del experimento y una vez que las ratas se encontraban sedadas en una tablilla de operaciones, se aseptizó la piel y con apoyo de tijeras se realizó un corte en la cavidad abdominal, se realizó un corte al diafragma y se identificó el corazón, con apoyo de una jeringa se realizó punción y se tomaron aproximadamente 5 mL de sangre, los cuales fueron colocados en tubos Vacutainer para suero con gel separador (tubo dorado), con el cual se favorece la formación del coágulo y la separación del suero ayudando a tener una muestra libre de contaminación por células o fibrina.

Una vez obtenida la muestra, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, se obtuvo el suero y este fue transferido a microtubos de 1.5 mL, se rotularon y se enviaron a un laboratorio clínico para su análisis.

Evaluación de la formación de inclusiones lipídicas en el hígado

Después de realizar la extracción sanguínea, se realizó el corte de la vena cava inferior para inducir la muerte a la rata, se retiró el hígado, se realizaron cortes para obtener muestras del órgano que fueron colocadas en placas delgadas de corcho, dichas muestras fueron guardadas en un sistema criogénico para su traslado al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEM), en donde las muestras fueron embebidas en parafina y cortadas en láminas de 8 micras de grosor colocadas en placas para su posterior tinción con la técnica de hematoxilina-eosina.

Las placas teñidas con hematoxilina-eosina fueron observadas en un microscopio óptico Zeiss Axio Scope A1 a una magnificación óptica de 20x, se tomaron fotografías y con ayuda del programa de procesamiento de imagen digital "ImageJ"

se realizó el análisis de imagen para poder realizar el conteo de las inclusiones lipídicas.

Análisis de datos

El análisis de datos se realizó utilizando el software MiniTab versión 18. La evaluación de las diferencias significativas entre las dietas y tratamientos se realizó por análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor con un nivel de significancia < 0.05 para el rechazo de hipótesis de igualdad de medias, seguido de pruebas comparativas de Tukey. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar.

Resultados y discusión

Caracterización física

Análisis morfológico

El producto con protección entérica a simple vista mostró una apariencia granulada con partículas de color blanco, al observar el producto con microscopio digital (imagen 4-a) se aprecia con mayor claridad el color blanco brillante del producto, se observan gránulos irregulares y de gran tamaño.

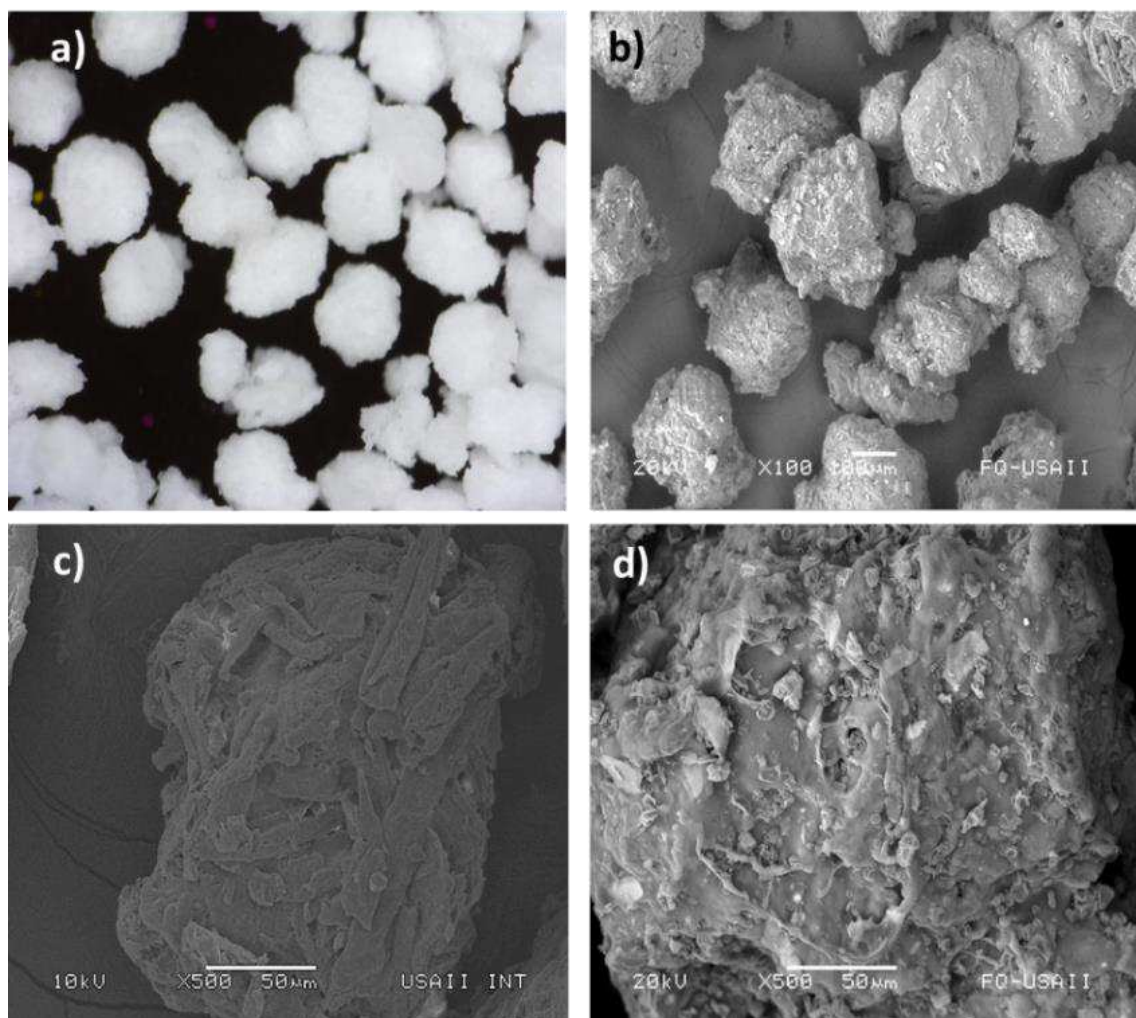


Imagen 4. Fotografías representativas de los 4 lotes evaluados a) producto granulada observado con microscopio digital 20x, b) producto granulada observado con microscopio electrónico de barrido 100x, c) núcleo observado con microscopio electrónico de barrido 500x y d) producto granulada observado con microscopio electrónico de barrido 500x.

Posteriormente las muestras fueron analizadas por microscopia electrónica de barrido, en donde se observa la formación de partículas aglomerados (gránulos) y una ligera capa que corresponde a los componentes de la suspensión de incorporación, así como del polímero entérico utilizado, se observan partículas de forma irregular, con tendencia a ser esféricas (imagen 4-b).

De igual manera, se analizó el núcleo utilizado (imagen 4-c) por microscopia electrónica de barrido, y se comparó con el producto granulado a una magnificación óptica de 500x (imagen 4-d) y se observa que el núcleo presenta porosidad y un menor tamaño con comparación con el producto en el cual se observa la capa de protección, componentes de la formulación, así como posible presencia de bacterias adheridas en la superficie, además de un tamaño grande.

Análisis de la distribución del tamaño de partícula del producto

La distribución del tamaño de partícula de los lotes elaborados se muestra en la tabla 6, en donde se observa que los lotes, presentan un tamaño promedio de aproximadamente $340 \mu\text{m} \pm 22$, valor promedio del D_{50} después de 3 repeticiones (color verde); el núcleo tiene un tamaño promedio de $250 \mu\text{m}$, por lo que se puede decir que este aumento en el tamaño fue el resultado tanto de la adición del polímero y de la suspensión de incorporación, así como del proceso de granulación aplicado, el cual por definición transforma pequeñas partículas en granulados uniformes y de mayor tamaño.

La grafica dada por el equipo analizador de tamaño de partícula, nos da una idea sobre la distribución normal del producto, la cual fue similar para los 4 lotes, las gráficas representativas de cada lote se encuentran en la **imagen I** en el anexo, pero para asegurar la distribución normal se utilizó el MGA-0890, el cual menciona que podemos asegurar una distribución normal cuando después de 3 repeticiones el producto presenta un porcentaje de coeficiente de variación menor al 10% para el D_{50} y menor al 15% para el D_{10} y D_{90} ; el producto granulado presenta una distribución normal del tamaño de partícula al presentar valores dentro de este rango tabla 6 (color amarillo).

Tabla 6. Coeficiente de variación expresado en porcentaje (%CV), de los diámetros acumulados D10, D50, D90, de los 4 lotes elaborados del producto granulado, obtenido en equipo de difracción laser Horiba LA-950.

	Lote 1 μm			Lote 2 μm			Lote 3 μm			Lote 4 μm		
Muestra	D50	D10	D90	D50	D10	D90	D50	D10	D90	D50	D10	D90
1	321.1	168.9	552.9	333.7	220.3	512.3	373.8	238.7	645.5	330.7	234.2	514.7
2	322.0	166.8	625.1	325.4	195.4	546.8	351.5	233.9	574.9	327.9	236.4	498.8
3	308.1	131.6	531.2	305.6	196.6	498.1	374.5	242.9	608.4	366.3	241.5	631.4
\bar{x}	317.1	155.8	569.7	321.6	204.1	519.1	366.6	238.5	609.6	341.6	237.4	548.3
σ	7.8	21.0	49.2	14.4	14.1	25.0	13.1	4.5	35.4	21.4	3.7	72.4
%CV	2.5	13.5	8.6	4.5	6.9	4.8	3.6	1.9	5.8	6.3	1.6	13.2

Determinación del porcentaje del contenido de humedad

En la figura 1 se presentan de manera gráfica los valores obtenidos del porcentaje del contenido de humedad en equilibrio después del proceso de protección, los cuales en promedio fueron del **4%**; dicha humedad en equilibrio se mantiene estable sin reducir de una manera significativa los valores del rango entre **3-4%** durante los 90 días de almacenamiento, los datos específicos de cada lote se pueden observar en la **tabla I** en anexo, tomando en cuenta las definiciones anteriores el producto presenta la humedad óptima para favorecer la estabilidad del producto durante su almacenamiento a temperatura ambiente.

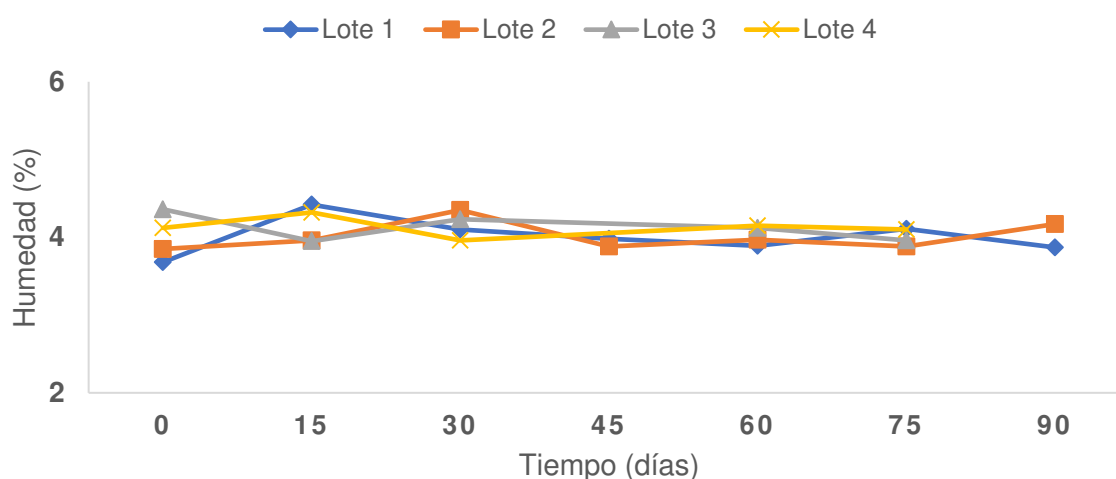


Figura 1. Representación gráfica del porcentaje de la cantidad de humedad presente en el

producto granulado con protección entérica, a base de *Bifidobacterium sp.* obtenido mediante lecho fluido durante 3 meses.

Viabilidad

Evaluación de la resistencia del producto granulado y la liberación de *Bifidobacterium sp.* a diferentes pH

El producto granulado muestra una concentración bacteriana promedio de 10^9 bacterias por gramo de producto (tabla 7), se sabe que la concentración inicial de las bacterias a recubrir era de 10^{10} bacterias por mililitro de medio, lo cual indica que las condiciones utilizadas para el proceso de protección de *Bifidobacterium sp.* mediante el uso de lecho fluido, afectan a la bacteria reduciendo un ciclo logarítmico su viabilidad.

La diferencia que existe entre cada una de las concentraciones de bacterias protegidas en cada lote, radican de la diferente concentración de biomasa bacteriana utilizada inicialmente para su protección, por lo que, durante el proceso de protección en lecho fluido, las variables como la temperatura y el oxígeno afectaron la viabilidad de la bacteria, sin embargo, aun cuando la bacteria es anaerobia, la concentración bacteriana que se ve afectada no es significativa.

Tabla 7. Concentración de *Bifidobacterium sp.* incorporada en el producto granulado con protección entérica.

<i>[Bifidobacterium sp.]</i>		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Inicial	Log ₁₀	10.21	9.10	10.69	10.54
	UFC/mL	(1.64×10^{10})	(1.26×10^{09})	(4.91×10^{10})	(3.45×10^{10})
Final	Log ₁₀	8.32	8.24	9.51	9.34
	UFC/g	(2.09×10^{08})	(1.74×10^{08})	(3.23×10^{09})	(2.18×10^{09})

El producto granulado con protección entérica, a base de *Bifidobacterium sp.* presentó una resistencia a pH 3, favoreciendo la liberación total de la bacteria en pH 7.5, pH de solubilidad del polímero utilizado como protección entérica (figura 2).

Se observó la presencia de bajas concentraciones de bacteria en pH 3, lo cual se cree que dicho fenómeno puede ser dado por las condiciones mecánicas con las que se evaluó dicho producto, ya que, al encontrarse en agitación constante, los gránulos pueden estar desprendiéndose, por lo que se estaría dejando sin protección cierta área del granulo, lo que favorecería la liberación de bacterias.

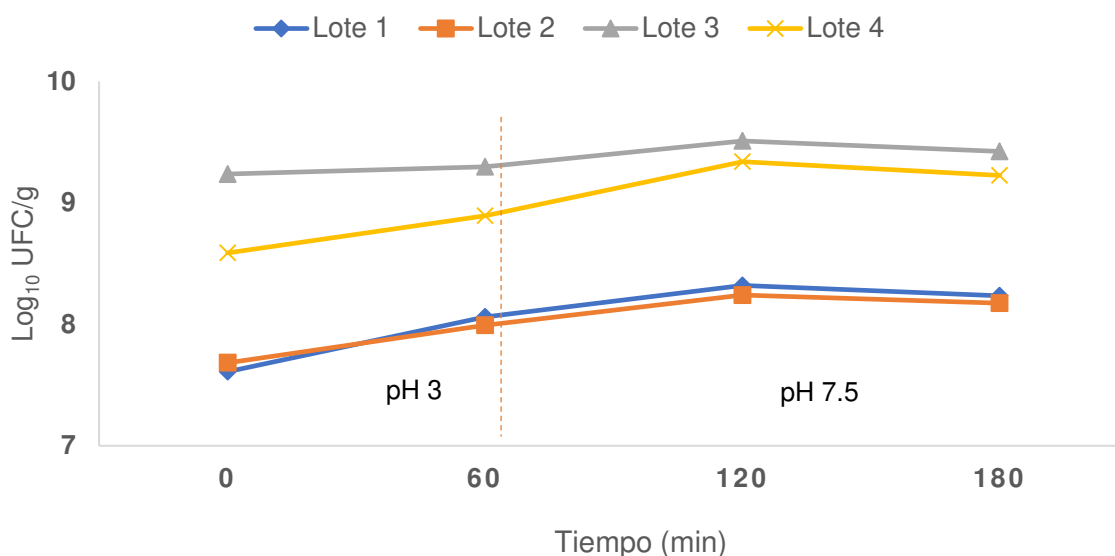


Figura 2. Representación gráfica de la resistencia del producto granulado con protección entérica, a base de *Bifidobacterium sp.* obtenido mediante lecho fluido a diferentes pH.

La concentración de *Bifidobacterium sp.* de 10^9 bacterias por gramo de producto se mantuvo constante durante 3 meses en condiciones de anaquel (figura 3), se registró la viabilidad a los seis y doce meses, mostrando concentración de 10^7 y 10^6 bacterias respectivamente, esto gracias, a que la protección, tal y como se observó en las microfotografías, se encuentra de manera homogénea sobre los gránulos, manteniendo aisladas a las bacterias de condiciones tales como el oxígeno y la humedad.

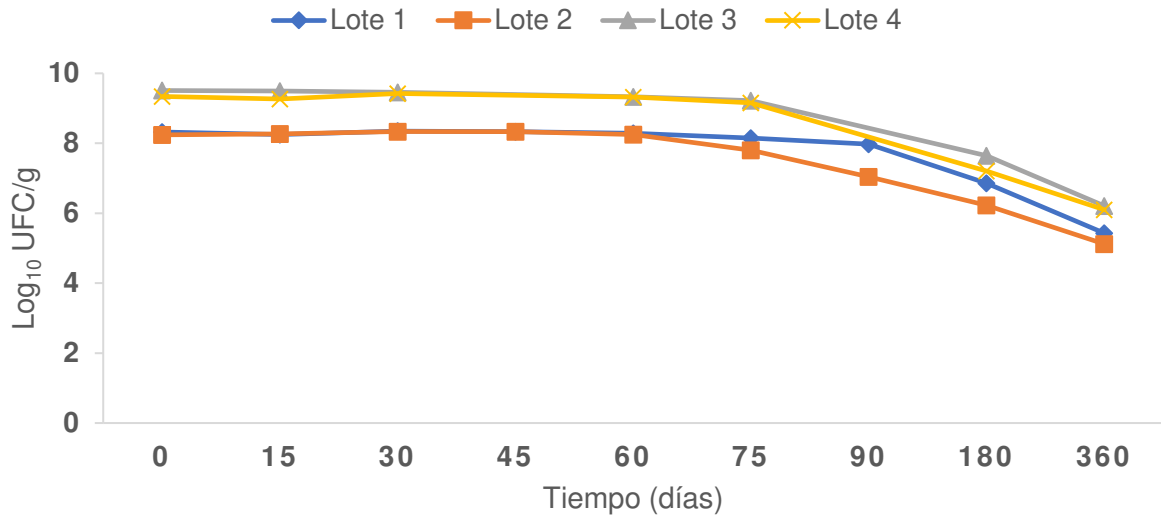


Figura 3. Representación gráfica de la viabilidad de *Bifidobacterium sp.* incorporada en el producto granulado con protección entérica, obtenido mediante lecho fluido durante 3 meses.

Los datos específicos de las concentraciones bacterianas durante los meses de almacenamiento en condiciones de anaquel se observan en la **tabla II** en anexo.

Evaluación del producto granulado a condiciones simuladas de fluidos gastrointestinales

El producto granulado con protección entérica presentó una resistencia a fluidos gástricos simulados pH 1.2 y a buffer pH 6, mostrando una liberación total de *Bifidobacterium sp.* después de 30 minutos de estar en contacto con el fluido intestinal simulado pH 7.5 (figura 4), dicho comportamiento, es similar, al resultado obtenido cuando el producto se sometió a condiciones de buffer pH 7.5.

De igual manera se observa una concentración baja de bacterias en los pH 1.2 y 6, dicho fenómeno sigue siendo respaldado por la teoría del desprendimiento de gránulos, dada por la agitación mecánica durante el desarrollo de dicha evaluación.

En la figura 4, y con el fin de observar, la ventaja de protección de la bacteria, podemos observar que *Bifidobacterium sp.* (línea punteada) no presentó una resistencia a condiciones simuladas de fluidos gastrointestinales, mostrando un decrecimiento en su viabilidad, perdiendo en promedio 3 órdenes de magnitud.

Dicho comportamiento resulta ser no favorable, ya que la bacteria no estaría llegando en un 100% de concentración al sitio de acción (colon) por lo que los efectos benéficos, podrían no ser visibles o podrían verse reflejados de manera lenta.

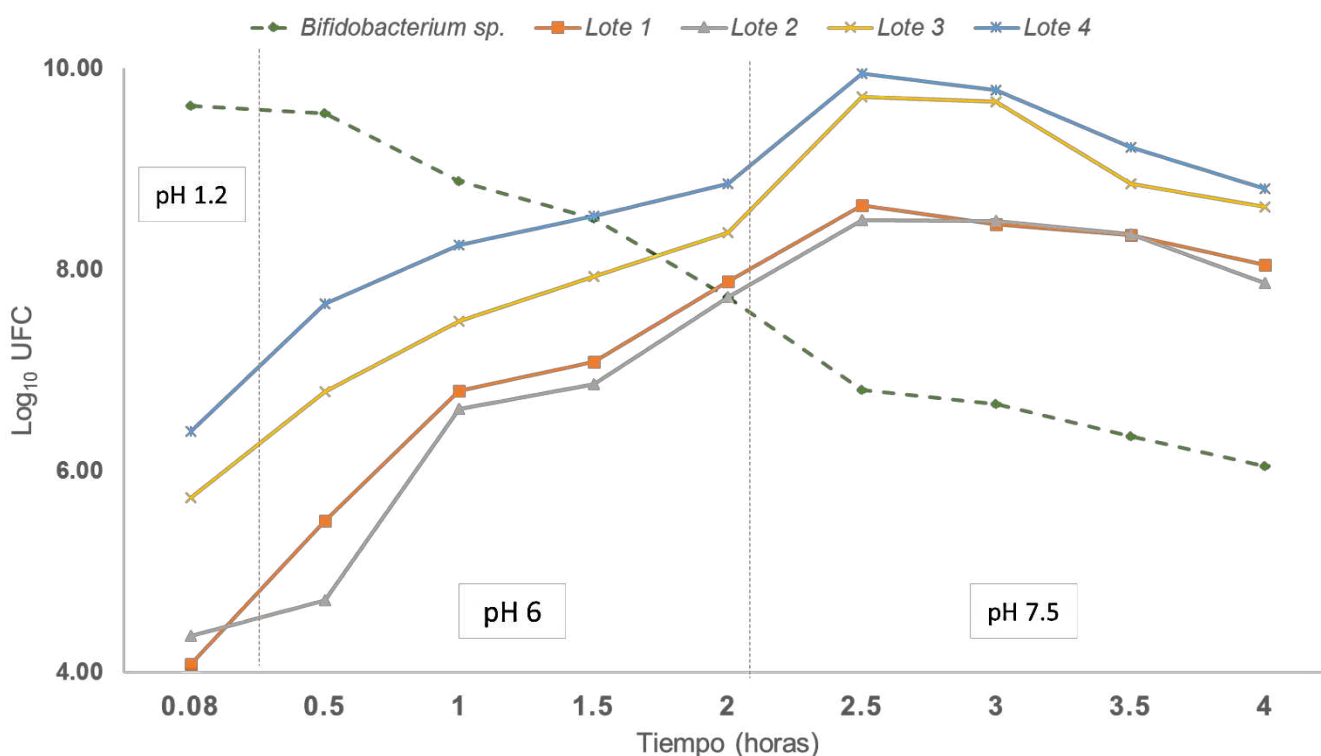


Figura 4. Representación gráfica de la resistencia del producto granulado con protección entérica, a base de *Bifidobacterium sp.* obtenido mediante lecho fluido a condiciones simuladas gastrointestinales.

Prueba funcional *In-vivo*

Evaluación de la ganancia en peso corporal de las ratas

La figura 5 muestra los resultados sobre el impacto de las dietas y los tratamientos en el peso de las ratas; donde podemos observar que al inicio del experimento las ratas pesaban entre 150-180 gramos, al cabo de 14 días las ratas alimentadas con dieta normal aumentaron un 55.4% de su peso y las ratas alimentadas con dieta alta en grasa aumentaron 69.9%, presentando entre ambas dietas una diferencia

significativa ($P < 0.05$) de 14.5%, esto es una clara respuesta del aumento de grasa presente en el alimento de las ratas.

En el caso específico de las ratas alimentadas con dieta normal y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (DN+B) y el producto granulado (DN+P), observamos que no existe una diferencia significativa en el aumento en peso entre tratamientos ni al compararlos con el control (DN) pues aquellas a las que se les administró DN+B aumentaron 51.9% y aquellas tratadas con DN+P aumentaron 54.3%, es decir un aumento homogéneo y similar respecto control (DN).

En el caso de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa (HFD) y tratadas con la cepa sin protección (HFD-B), se puede observar que no existe diferencia significativa al presentar un aumento en peso similar en promedio de 69.9% y 66.9% respectivamente.

Al comparar el grupo control (HFD) con las ratas tratadas con el producto granulado (HFD-P) se observa claramente una diferencia con respecto al peso, pues las ratas que no tuvieron tratamiento (HFD) aumentaron 69.9% y aquellas que recibieron el producto granulado (HFD-P) solo aumentaron 53.1%, representando una diferencia significativa ($P < 0.05$) de 16.8%.

La figura 6, representa únicamente el porcentaje de incremento en peso, lo cual permite visualizar de mejor manera el efecto del bajo aumento en peso de las ratas que consumieron una dieta alta en grasa y fueron tratadas con el producto granulado con protección entérica a base de *Bifidobacterium sp.*, el efecto es claro ya que se observa que dichas ratas (HFD-P) aumentaron solo un 53.1% de peso siendo este porcentaje similar que se observa en las ratas alimentadas con dieta normal (DN) y sus respectivos tratamiento (DN+B, DN+P), dicho fenómeno podría estar sucediendo ya que la protección entérica utilizada permite su liberación en colon, tal y como se observa en la prueba *in-vitro* "Evaluación del producto granulado a condiciones simuladas de fluidos gastrointestinales", favoreciendo así el efecto benéfico sobre el aumento en peso.

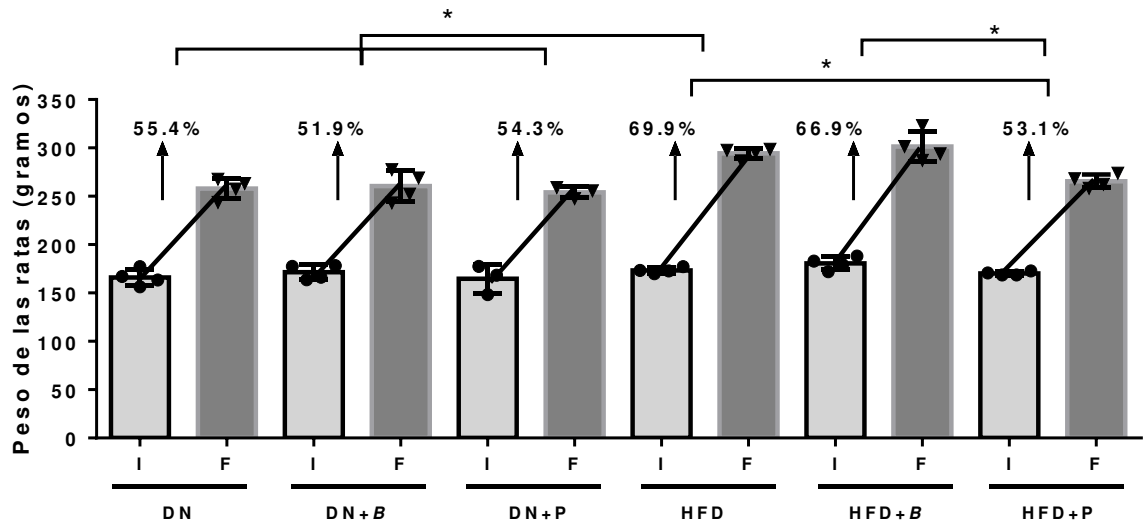


Figura 5. Gráfica de la diferencia porcentual del aumento en peso del peso inicial (I) entre el peso final (F) de las ratas alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD), y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (-B) y *Bifidobacterium sp.* protegida [producto granulado] (-P), las flechas representan el aumento en peso y los asteriscos representan diferencia significativa ($P < 0.05$).

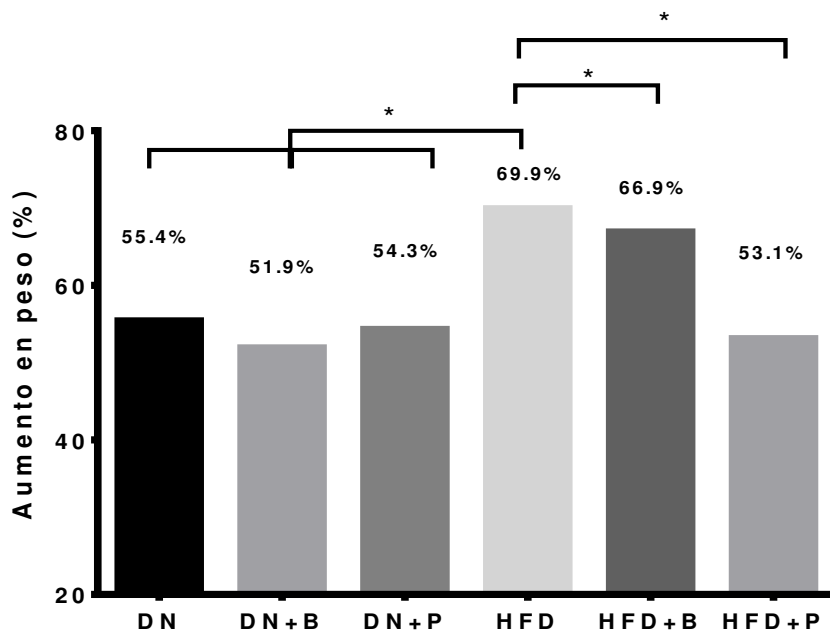


Figura 6. Gráfica del porcentaje de aumento en peso del peso de las ratas alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD), y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (-B) y *Bifidobacterium sp.* protegida [producto granulado] (-P), los asteriscos diferencia significativa ($P < 0.05$).

Evaluación de presencia de grasa, glucosa y enzimas de daño hepático en las bioquímicas sanguíneas de las ratas

Triglicéridos

En la figura 7 podemos observar que si bien no existe una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los valores comparando dietas vs tratamientos, es interesante mencionar que se observa una reducción de nivel sérico de triglicéridos cuando se administró el producto granulado en ambas dietas; el valor de triglicéridos para DN-P es de **60 mg/dL** y para HFD-P es de **65 mg/dL**, dicho valor es similar al que se muestra en la dieta normal (**60 mg/dL**), lo cual indica que las bifidobacterias logran su efecto probiótico, que en este caso se ve reflejado mediante la baja presencia de lípidos (triglicéridos) en sangre. Teniendo en cuenta que los triglicéridos son compuestos que apoyan la movilización bidireccional de grasa desde el hígado hasta el torrente sanguíneo y su síntesis principalmente se lleva a cabo en los hepatocitos, un nivel alto de triglicéridos en la sangre representaría una acumulación de grasa en el hígado provocando una exacerbada secreción de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) ricas en triglicéridos, lo cual no se observa de manera significativa en estudio serológico. Los valores séricos de triglicéridos de cada rata se muestran en la **tabla III** en anexo.

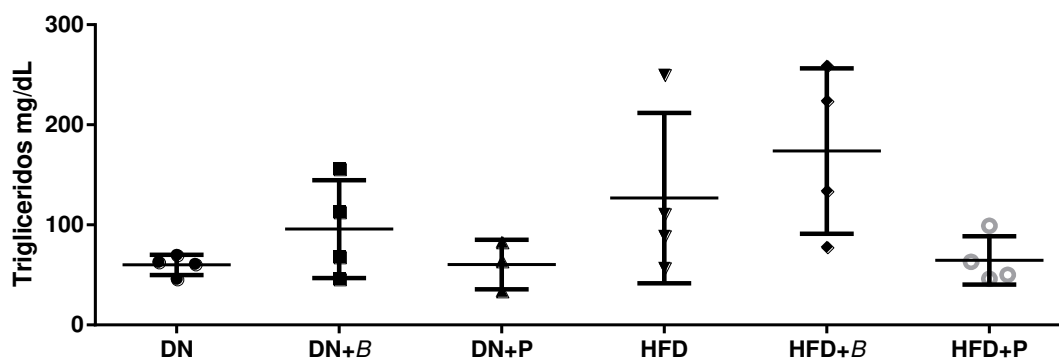


Figura 7. Gráfica de los valores séricos de triglicéridos en sangre de ratas Wistar alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD) y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (-B) y *Bifidobacterium sp.* protegida (-P).

Colesterol

En la figura 8 podemos observar que no existe una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los valores comparando dietas vs tratamientos, si notamos una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los controles de las dietas, la dieta normal (DN) presentó un valor de **53 mg/dL** mientras que la dieta alta en grasa (HFD) presentó un valor de **73 mg/dL**, este fenómeno es una clara respuesta de la ingesta de grasas saturadas, que en este caso son provenientes de la manteca de cerdo.

Es interesante mencionar que en la población que fue alimentada con dieta normal (DN), los valores de colesterol cuando se administró DN-P fueron similares a los de su control, teniendo **52 mg/dL** para el tratamiento y **53 mg/dL** para el control.

En el caso de la dieta alta en grasa observamos una disminución en los valores séricos de colesterol cuando se administró el producto en comparación con su control y el otro tratamiento; el valor obtenido para HFD-P fue de **67 mg/dL** vs los **73 mg/dL** del control y los **69 mg/dL** de HFD-B, dicho fenómeno es resultado de la actividad de cepa al favorecer la regulación de la lipogénesis en el hígado. Los valores séricos de colesterol de cada rata se muestran en la **tabla IV** en anexo.

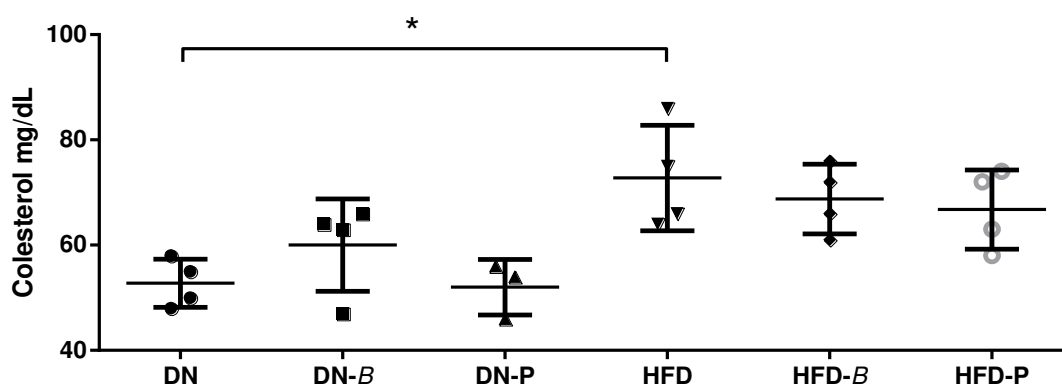


Figura 8. Gráfica de los valores séricos de colesterol en sangre de ratas Wistar alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD) y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (-B) y *Bifidobacterium sp.* protegida (-P), el asterisco representa diferencia significativa ($P < 0.05$).

Glucosa

En la figura 9 podemos observar que no existe una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los valores comparando dietas vs tratamientos, sin embargo si notamos una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los controles de las dietas, la dieta normal (DN) presentó un valor de **116 mg/dL** mientras que la dieta alta en grasa (HFD) presentó un valor de **175 mg/dL**, este fenómeno es una clara respuesta de la ingesta de azúcares, que en este caso son provenientes de la fructosa utilizada para la dieta alta en grasa, debido al corto periodo del experimento no es posible observar efecto benéfico del probiótico para este estudio serológico.

Los valores séricos de glucosa de cada rata se muestran en la **tabla V** en anexo.

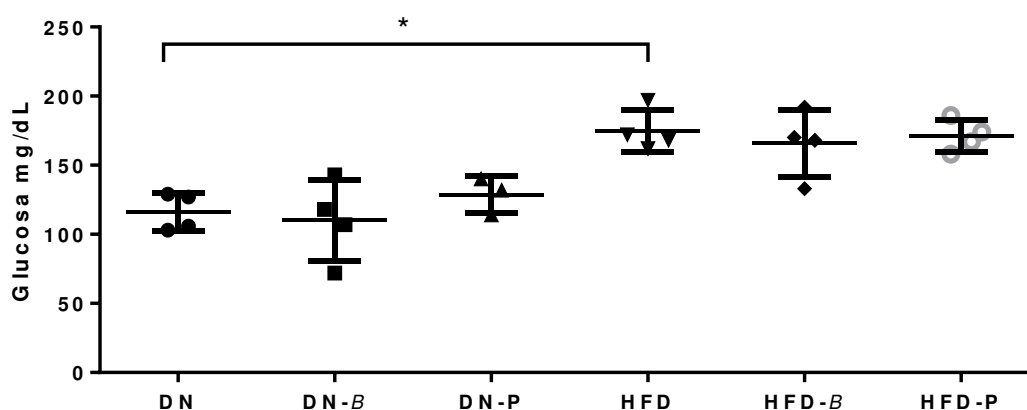


Figura 9. Gráfica de los valores séricos de glucosa en sangre de ratas Wistar alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD) y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (-B) y *Bifidobacterium sp.* protegida (-P), el asterisco representa diferencia significativa ($P < 0.05$)

Enzimas de daño hepático

Las pruebas de función hepática se utilizan en general para determinar la presencia o ausencia de daño hepático; determinar severidad de enfermedades hepáticas y monitorizar el curso de la enfermedad, de entre las enzimas destacadas para detectar una mala función se encuentran, la Aspartato aminotransferasa (AST), la Alanina aminotransferasa (ALT) y la Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGT), las cuales son expresadas cuando el hígado presenta daños a nivel de inflamación, en

los resultados de este trabajo se muestra que dichas enzimas no se encuentran sobre expresadas lo cual descarta una inflamación en el hígado de las ratas, en seguida se muestran los resultados obtenidos para cada enzima.

Aspartato aminotransferasa (AST)

En la figura 10 podemos observar que entre las dietas y los tratamientos no existe diferencia significativa ($P>0.05$), sin embargo, podemos observar una elevación en la concentración de la enzima en las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa, esto es resultado de la acumulación de grasa en el hígado debido a la alta ingesta de grasa consumida. Los valores séricos de Aspartato aminotransferasa de cada rata se muestran en la tabla VI en anexo.

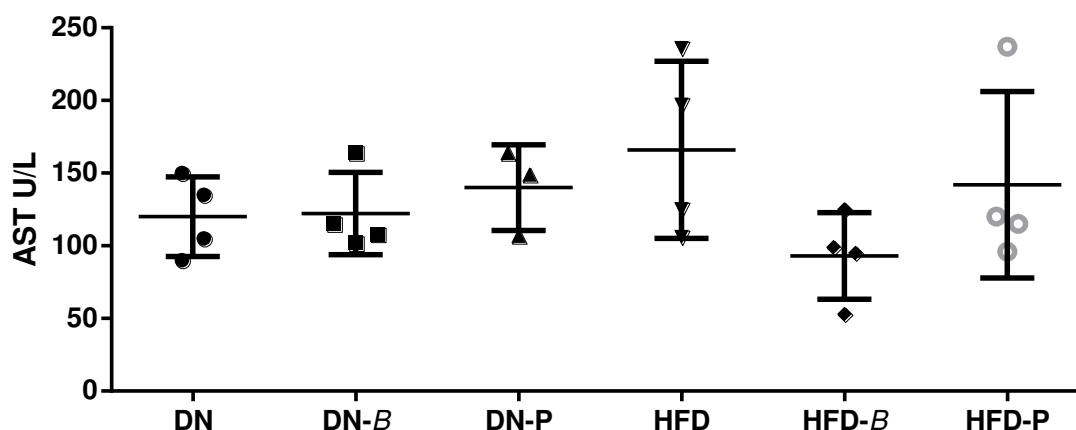


Figura 10. Gráfica de los valores séricos de aspartato aminotransferasa en sangre de las ratas Wistar alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD) y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (-B) y *Bifidobacterium sp.* protegida (-P).

Alanina aminotransferasa (ALT)

En la figura 11 podemos observar que entre las dietas y los tratamientos no existe diferencia significativa ($P>0.05$), lo cual nos indica que no hay evidencia de inflamación o algún daño hepático. Los valores séricos de Alanina aminotransferasa de cada rata se muestran en la tabla VII en anexo.

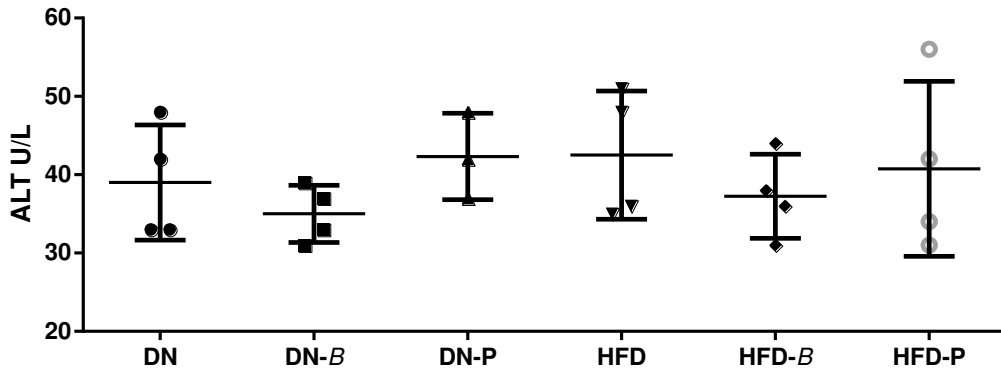


Figura 11. Gráfica de los valores séricos de alanina aminotransferasa en sangre de las ratas Wistar alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD) y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (-B) y *Bifidobacterium sp.* protegida (-P).

Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGT)

Una elevación en los valores de GGT puede reflejar colestasia, mecanismo presente en la cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante y otras enfermedades hepáticas; en la figura 12 podemos observar que los valores no presentan ninguna elevación por lo que se descarta daño hepático a nivel cirrótico. Los valores séricos de Gamma Glutamil Transpeptidasa de cada rata se muestran en la **tabla VIII** en anexo.

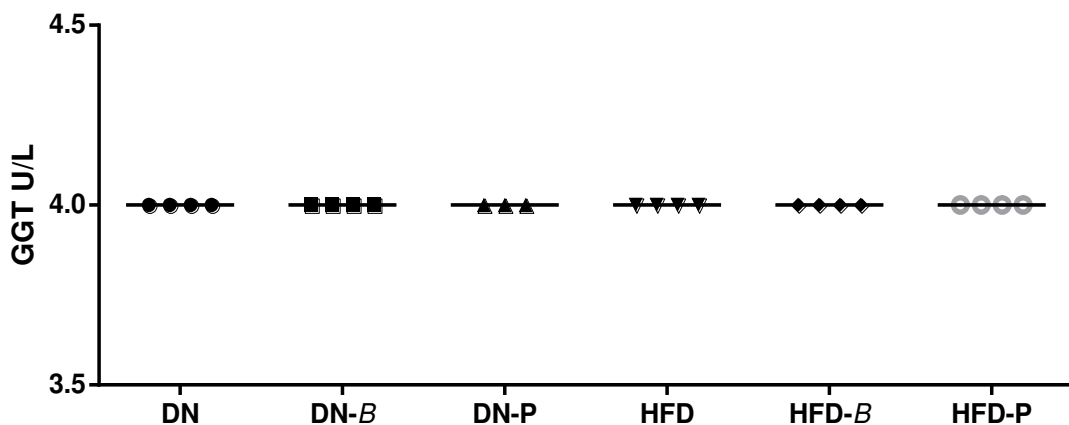


Figura 12. Gráfica de los valores séricos de Gamma Glutamil Transpeptidasa en sangre de las ratas Wistar alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD) y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (-B) y *Bifidobacterium sp.* protegida (-P).

Evaluación de la formación de inclusiones lipídicas en el hígado

Para observar las inclusiones lipídicas presentes en el hígado de la rata, las muestras de hígado fueron colocadas en placas (portaobjeto) y teñidas con hematoxilina-eosina, con la finalidad de crear un contraste entre las células y las inclusiones lipídicas, las placas se observaron en un microscopio óptico Zeiss Axio Scope A1 con una magnificación óptica de 20x y se tomaron fotografías del corte histológico enfocando la vena central del lobulillo hepático (imagen 4 “DN-1” y “HFD-1”), posteriormente se realizó el análisis de las imágenes, se utilizó el programa “imageJ” y se realizó una binarización a las fotografías, para así poder identificar las vacuolas y poder realizar el conteo adecuado de las mismas, obteniendo una imagen punteada, en donde los puntos representan cada una de las inclusiones lipídicas encontradas; una vez que cada inclusión fue identificada, las imágenes fueron sobrepuestas sobre las fotografías para observar la interpolación de las vacuolas y posteriormente se procedió a realizar el conteo de partículas y los estadísticos requeridos (imagen 4 “DN” y “HFD”)

En la figura 13 y con apoyo de la **tabla IX** en anexo se muestran los resultados sobre el impacto de las dietas y los tratamientos sobre las inclusiones lipídicas generadas en los hígados de las ratas, donde se observa que en la dieta normal (DN) hay un promedio de 8 inclusiones lipídicas centrolobulillares, y en la dieta alta en grasa (HFD) claramente se observa un promedio aproximado de 140 inclusiones lipídicas centrolobulillares (imagen 4 “DN” y “HFD”), presentando una diferencia significativa ($P < 0.05$) de 132 vacuolas, este resultado es una respuesta a la ingesta alta de grasa que las ratas mantuvieron durante 14 días.

En el caso específico de las ratas alimentadas con dieta normal y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección y con protección, se observó que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el control y los tratamientos, aquellas a las que se les administró (DN-B) presentaron un promedio de 5 inclusiones lipídicas y aquellas tratadas con (DN-P) presentaron un promedio de 4 inclusiones lipídicas (imagen 4 “DN+B” y “DN+P”)

En el caso de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y tratadas con la bacteria con y sin protección, se puede observar que no existe diferencia significativa entre el control y las tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (imagen 4 “HFD” y “HFD+B”) ya que estas últimas presentaron un promedio aproximado de 94 inclusiones lipídicas, sin embargo, al comparar el control con las ratas tratadas con *Bifidobacterium sp.* protegida, se observa una diferencia significativa ($P<0.05$) en las inclusiones lipídicas, ya que éstas últimas presentaron un promedio aproximado de 14 inclusiones, dicho valor representa la reducción de aproximadamente el 90% de inclusiones lipídicas; de igual manera se presenta una diferencia significativa ($P<0.05$) entre los tratamientos, la administración de *Bifidobacterium sp.* protegida presenta una baja formación de aproximadamente del 85% inclusiones lipídicas.

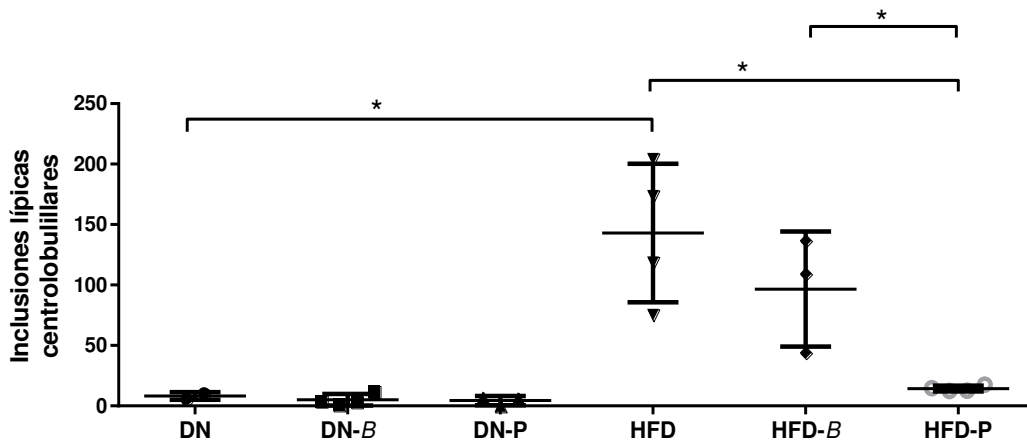


Figura 13. Gráfica de las inclusiones lipídicas centrolobulillares presentes en los cortes histológicos de las muestras de hígados de las ratas Wistar alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD) y tratadas con *Bifidobacterium sp.* sin protección (-B) y *Bifidobacterias sp.* protegida (-P), y los asteriscos representan una diferencia significativa ($P<0.05$).

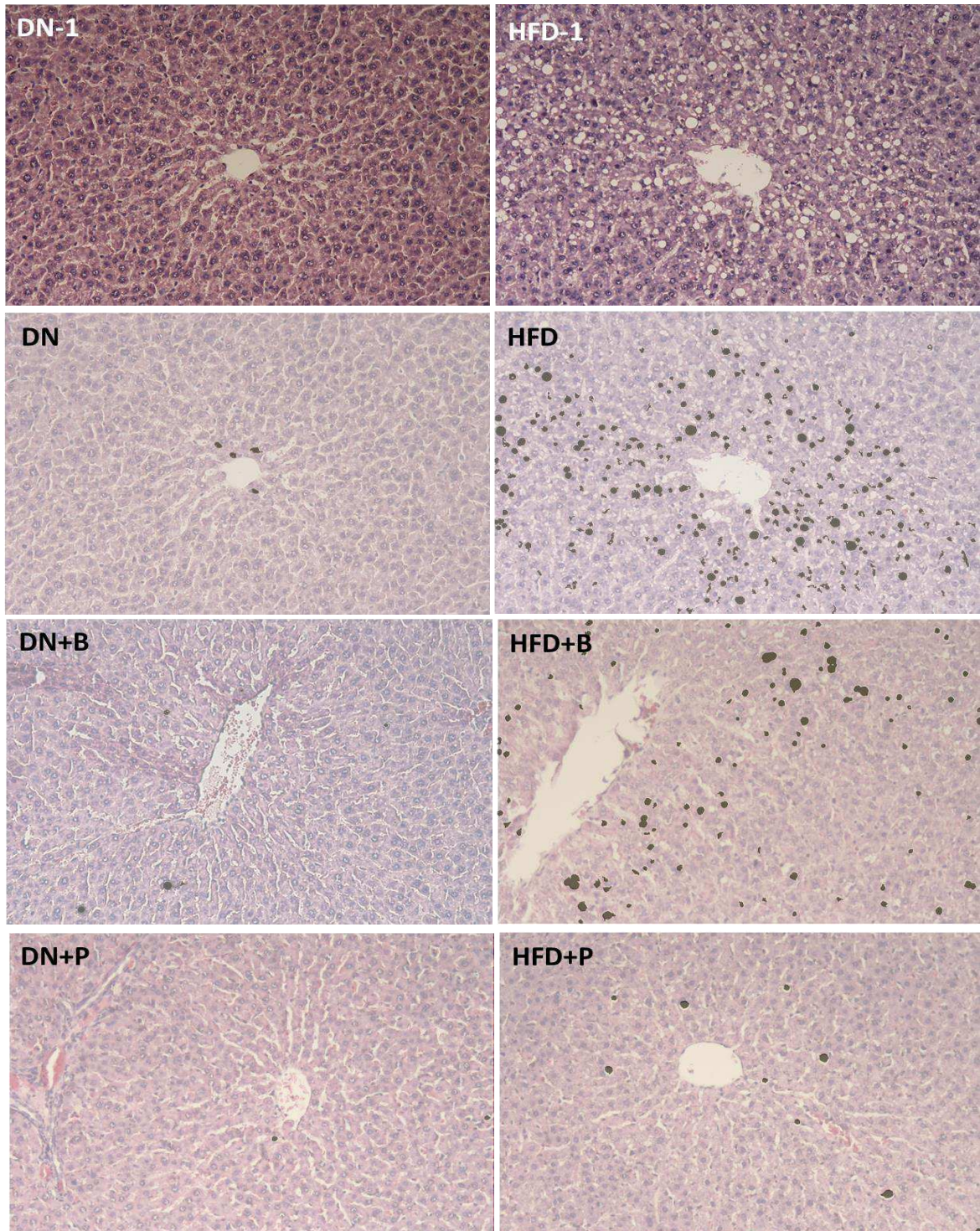


Imagen 5. Fotografías de cortes histológicos sin análisis de imagen de la dieta normal (DN-1) y dieta alta en grasa (HFD-1), fotografías con análisis de imagen y punteo correspondiente al número de inclusiones centrolobulillares correspondientes a la dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD), dieta normal más *Bifidobacterium sp.* sin protección (DN+B), dieta normal más producto granulado (DN+P), dieta alta en grasa más *Bifidobacterium sp.* sin protección (HFD+B) y dieta alta en grasa más producto granulado (HFD+P).

Discusión

La hipótesis descrita para este producto, plantea que el producto granulado con capa entérica en el que se incorporó a *Bifidobacterium* sp. mediante lecho fluido, será estable a condiciones anaquel y que otorgará una protección al microorganismo a pH ácidos, dicha protección a nivel in-vivo favorecerá la entrega de la bacteria a su sitio de acción (colon) y será evidenciada por la actividad probiótica de la bacteria sobre la formación de inclusiones lipídicas en hígado, las cuales serían evaluadas en un modelo animal utilizando ratas que serían alimentadas con una dieta alta en grasas, para lo cual como primer objetivo se evaluaron las características físicas del producto en donde este presentó un tamaño de partícula promedio de 340 μm , el cual representa un aumento de tamaño dado por el aglomeramiento de las partículas iniciales (núcleo)⁸¹, así como por el polímero entérico aplicado⁸², también presentó un porcentaje de contenido de humedad del 4%, el cual se encuentra dentro del rango de 3 al 5%⁸³, reportado para gránulos obtenidos por lecho fluido, dicho porcentaje de humedad al ser bajo confiere una estabilidad a los gránulos⁸⁴. Posteriormente se determinó la concentración de bacterias incorporadas al producto granulado, y se observó una concentración promedio de 10^9 bacterias por gramo de producto, dicha concentración de bacteria se mantiene constante y viable durante 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, lo cual resulta de la estabilidad que confiere el bajo contenido de humedad presente en el producto, si bien no hay evidencia de trabajos en donde hayan incorporado bacterias en un sistema granular por lecho fluido, se han reportado incorporaciones de probióticos a sistemas de encapsulación mediante spray-dry⁸⁵⁻⁸⁶⁻⁸⁷, en donde se han observado incorporaciones en promedio de 10^6 a 10^8 bacterias por gramo de producto, con una estabilidad de 3 a 5 meses, en estos sistemas la baja incorporación radica por las altas temperaturas utilizadas que maneja el equipo aun cuando el proceso es corto, (en un lecho fluido éstos pueden manipularse y adecuarse), y la estabilidad a pesar de ser alta requiere en ocasiones que el producto se mantenga en refrigeración, además la mayoría de estos trabajos utiliza bacterias aerobias lo cual permite una mejor manipulación, en este caso la bacteria es anaerobia y aun cuando en lecho fluido ofrece un ambiente con

presencia de oxígeno, la bacteria presenta una viabilidad alta, la cual se mantiene aun cuando el almacenamiento es a temperatura ambiente. Para el caso de la evaluación del polímero de protección, se observó una liberación total de la bacteria recubierta después de someterse a condiciones de pH 7, este fenómeno observado es similar a lo reportado en la ficha técnica del polímero⁸⁸ así como en perfiles de desintegración de tabletas con recubrimiento entérico⁸⁹, ya que el pH 7 corresponde al pH de solubilidad del polímero, teniendo en mente este resultado se diseñó un experimento en donde se simulara el tracto gastrointestinal de rata utilizando fluidos gastrointestinales simulados, para evaluar la resistencia del producto durante el trayecto gastrointestinal y se observó el mismo fenómeno, la liberación total de la bacteria se dio en el fluido intestinal simulado con pH de 7.5, lo cual nos da pauta para asegurar en un modelo in-vivo, que la bacteria será entregada en su sitio de acción en una concentración alta gracias a la ventaja tecnológica que le confiere el recubrimiento entérico. Para poder corroborar la protección entérica del microorganismo probiótico de manera *in-vivo* mediante la evaluación de la actividad probiótica, el producto se administró durante una semana a ratas que se encontraban consumiendo una dieta alta en grasa, y se observó que dichos animales no aumentaron de manera considerable su peso corporal, al comparar su peso con el de las ratas a las que no se les proporcionó el producto, estas solo aumentaron un 53% su peso, mientras que las no tratadas aumentaron un 69.9%, los niveles de colesterol y triglicéridos así como de las enzimas de daño hepático AST y ALT que presentaron los animales resultaron ser bajos en aquellos que consumieron el producto, y para el caso de la glucosa y la enzima GGT no se observó una baja ni tampoco una alta presencia en sangre de las ratas, esto dado a que el experimento duró un total de 2 semanas con una semana de tratamiento, por lo que el tiempo tanto de administración de la dieta como del tratamiento permite observar un cambio en estos parámetros, sin embargo, aun cuando el tiempo de experimentación es corto, a nivel histológico se pudo observar que las ratas que fueron tratadas con el producto presentaron una baja formación de aproximadamente 90% menos que las que no consumieron el producto, es decir, las ratas que consumieron la dieta alta en grasa sin la administración del producto

presentaron un promedio de 200 inclusiones lipídicas por lobulillo hepático, mientras que las que si fueron tratadas con el producto y consumían la dieta alta en grasa solo presentaron una formación promedio de 17 inclusiones lipídicas por lobulillo hepático. Los resultados observados para el peso corporal, las grasas, las enzimas de daño hepático y las inclusiones lipídicas resultan ser similares a los reportados en diferentes investigaciones, tales como es el caso de lo reportado por Kim, H. y col (2019)⁹⁰ quienes administraron durante 4 semanas vía oral una mezcla de *L. plantarum* LC27 y *B. longum* LC26 en suspensión a ratones que fueron alimentados con una dieta alta en grasa y observaron que los ratones que fueron tratados con la mezcla probiótica suprimió significativamente (aproximadamente 10% menos que el control) el aumento en peso corporal de los ratones, también disminuyeron significativamente los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, y la baja formación de inclusiones lipídicas fue aproximadamente 30% menos que el grupo control; otro estudio reportado por Roselli, M. y col (2018)⁹¹ describe que la administración de una mezcla de *B. lactis*, *B. brave*, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus* vía oral en suspensión durante 10 semanas a ratones alimentados con una dieta alta en grasa suprimió un 60% el aumento en peso, y los niveles de triglicéridos y colesterol disminuyeron significativamente respecto al control; por otro lado Ma, X. y colaboradores (2008)⁹² reportan que la administración de la mezcla probiótica multicepa llamada #VSL3 (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* y *Streptococcus salivarius*) durante 8 semanas en suspensión a ratas alimentadas con una dieta alta en grasa presenta una baja formación de inclusiones lipídicas de aproximadamente 70% menos. Podemos observar que los modelos experimentales reportados en la bibliografía tienen una duración aproximadamente de entre 4 a 10 semanas, la administración de los microorganismos probióticos es vía oral en forma de suspensión y los resultados presentados son similares a los que presente el producto evaluado en este proyecto, aun cuando el experimento solo duro dos semanas, lo cual nos indica que la ventaja tecnológica que aporta no solo el recubrimiento si no el sistema completo en que se encuentran las bacterias incorporadas, favorece la entrega de la bacteria a su sitio

de acción en una concentración alta y por ende la evidencia de los efectos benéficos es alta y menor tiempo comparado con lo ya reportado, cumpliéndose así la hipótesis.

Conclusiones

- El producto granulado con protección entérica, a base de *Bifidobacterium sp.*, presentó un tamaño de partícula promedio de **340 $\mu\text{m} \pm 22$** , lo que permitió su administración a ratas por vía oral con apoyo de una cánula esofágica, el producto granulado presentó una concentración bacteriana promedio de **10^9** bacterias por gramo de producto y una estabilidad a condiciones de anaquel al mantener la concentración bacteriana y viabilidad, así como un porcentaje de contenido de humedad del **4%** durante **3 meses**.
- El desempeño del producto bajo condiciones pH ácidas y condiciones de fluidos gástricos intestinales simulados, presentó resultados favorables al resistir dichas condiciones y mostrar liberación total de la concentración *Bifidobacterium sp.* en condiciones simuladas *in-vivo* que corresponderían al colon.
- La administración del producto granulado a ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (HFD+P) evitó el aumento elevado de peso mostrado por las ratas alimentadas con dieta alta en grasa sin tratamiento (HFD), el cual fue de 53.1% vs 69.9% respectivamente.
- Debido a la duración del experimento no fue posible observar diferencias significativas en la presencia de grasa o glucosa en sangre, así como la sobre expresión de enzimas de daño hepático.
- Con referente a las inclusiones lipídicas centrolobulillares, la administración del producto granulado con protección entérica a base de *Bifidobacterium sp.* a ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (HFD+P), evitó la formación de inclusiones lipídicas en un 90% menos que las que no fueron tratadas con el producto (HFD).

Referencias

1. Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.
2. Rodríguez, Y. A., Rojas, A. F., & Rodríguez, S. (2016). Encapsulation of probiotics for food applications. *Biosalud*, 15(2), 106-115.
3. Fåk, F., & Bäckhed, F. (2012). *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe^{-/-} mice. *PloS one*, 7(10), e46837
4. Angelakis E, Bastelica D, Ben Amara A, El Filali A, Dutour A, Mege JL, et al. An evaluation of the effects of *Lactobacillus ingluviei* on body weight, the intestinal microbiome and metabolism in mice. *Microb Pathog* 2012;52:61e8.
5. Chen J, Wang R, Li XF, Wang RL. *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2011;107:1429e34.
6. An, H. M., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, J. R., Cha, M. K., Lee, S. W., ... & Ha, N. J. (2011). Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium spp.* in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in health and disease*, 10(1), 116.
7. Gauffin P, Santacruz A, Trejo FM, Sanz Y. (2013). *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet fed mice. *Obesity*. doi:10.1002/oby.20330.
8. Rodríguez-Barona, S., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos. *Información tecnológica*, 27(6), 135-144.
9. Menezes, C. R. D., Barin, J. S., Chicoski, A. J., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Fries, L. L. M., & Terra, N. N. (2013). Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciência Rural*, 43(7), 1309-1316.

10. Mendoza Villanueva, K. (2015). Situación actual y perspectivas de las aplicaciones de los probióticos en la industria alimentaria y sus efectos en la salud humana.
11. Mayorga-Reyes, L., Azaola-Espinosa, A., & Gutiérrez-Nava, A. (2010). Revisión Bibliográfica. Probióticos y su potencial en la prevención del cáncer de colon. *ContactoS*, 77, 10-15.
12. Agudelo, N. D. M., Torres, J. S. S., Cerón, L. F. Z., & Salguero, C. (2016). Los probióticos: microorganismos vivos que previenen enfermedades en adultos y niños. *Medicina*, 38(3), 247-263.
13. Morelli, L., & Capurso, L. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of clinical gastroenterology*, 46, S1-S2.
14. Tormo Carnicé, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. In *Anales de Pediatría* (Vol. 65, No. Monogr 4, pp. 30-41).
15. Modesto, M. (2018). Isolation, Cultivation, and Storage of Bifidobacteria. In *The Bifidobacteria and Related Organisms* (pp. 67-98). Academic Press.
16. Turróni, F., Milani, C., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2018). Bifidobacteria: Ecology and Coevolution With the Host. In *The Bifidobacteria and Related Organisms* (pp. 213-220). Academic Press.
17. Cueto-Vigil, M. C., Acuña-Monsalve, Y., & Valenzuela-Riaño, J. (2010). In vitro evaluation of probiotic potential of lactic bacteria acid isolated from coastal serum. *Actualidades Biológicas*, 32(93), 129-138.
18. Sebastián, J., (2017). Review of the role of probiotics in gastrointestinal diseases in adults. *Gastroenterol Hepatol*, 40 (6), 417-429.
19. González, R.M, Ruiseco, G. (2017) La microbiota del humano. *ciencia volumen 68 número 2*. Pp. 60-66.
20. Castañeda Guillot, C. (2018). Actualización en prebióticos. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(3), e648.

21. Mackowiak, P. A. (2013). Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in public health*, 1, 52.
22. Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular nutrition & food research*, 61(1), 1600240.
23. Balakrishnan, M., & Floch, M. H. (2012). Prebiotics, probiotics and digestive health. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 15(6), 580-585.
24. World Gastroenterology Organisation, (2011), *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos*.
25. Olmeda, C. L., de la Luz Santón, J., & Martínez, C. U. (2006). Uso potencial de los probióticos. *FMC-Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 13(10), 622-627.
26. Viscarra, C. R., Zabaleta, A. S. P., & Condori, C. A. P. (2006). Alimentos Funcionales: Prebióticos y probióticos, una nueva alternativa para la salud. *Revista Científica Ciencia Médica*, 9(1), 49-52.
27. Larkin, D., & Martin, C. R. (2018). Introduction: Probiotics and Psychopathology. In *Probiotics in Mental Health* (pp. 17-24). CRC Press.
28. Academia Nacional de Medicina. Enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Boletín de Información Clínica y Terapéutica*. 2015;24(5):7-8.
29. Hickman I, Jonsson J, Prins J, Ash S, Purdie D, Clouston A, et al. Modest weight loss and physical activity in over- weight patients with chronic liver disease results in sus- tained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut* 2004;53:413-9.
30. Huang MA, Greenson JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, et al. One-year intense nutritional counsel- ing results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Am J Gastroen- terol* 2005;100:1072-81.

31. Masterton G, Plevris J, Hayes P. (2010) Review article: omega-3 fatty acids—a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*;31:679- 92.
32. Adams, L. A., & Angulo, P. (2006). Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgraduate medical journal*, 82(967), 315-322.
33. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. (2003), Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*;98:2485-90.
34. Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, Sotoudeh M, Rakhshani N, Sohrabpour AA, et al. Probuco1 in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study. *J Hepatol* 2003;38:414-8.
35. Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, et al. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* 2004;39:770-8.
36. Emel Pamuk G, Sonsuz A. N-Acetylcysteine in The Treatment Of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1220-1.
37. Fassio E, Álvarez E, Domínguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steathepatitis: A longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004;40:820- 6.
38. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005;42:132-8.
39. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003;37:343-50.
40. Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol* 2008;49:821-30.

41. Esposito E, Iacono A, Bianco G, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P, et al. Probiotics Reduce the Inflammatory Response Induced by a High-Fat Diet in the Liver of Young Rats. *J Nutr* 2009;139:905-11.
42. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, Petrasek J, Kodys K, Mandrekar P, et al. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology* 2009;49:989-97.
43. Mencarelli A, Distrutti E, Renga B, D'Amore C, Cipriani S, Palladino G, et al. Probiotics Modulate Intestinal Expression of Nuclear Receptor and Provide Counter-Regulatory Signals to Inflammation-Driven Adipose Tissue Activation. *PLoS One* 2011;6:e22978.
44. Chen J, Wang R, Li XF, Wang RL. *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2011;107:1429e34.
45. AnHM, ParkSY, LeedoK, KimJR, ChaMK, LeeSW, et al. Anti-obesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis* 2011;10:116.
46. Gauffin P, Santacruz A, Trejo FM, Sanz Y. *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet fed mice. *Obesity* 2013. doi:10.1002/oby.20330.
47. Kim M, Kim M, Kang M, Yoo HJ, Kim MS, Ahn YT, et al. Effects of weight loss using supplementation with *Lactobacillus* strains on body fat and mediumchain acylcarnitines in overweight individuals. *Food Funct* 2017;8(1): 250e61. <https://doi.org/10.1039/c6fo00993j>.
48. Madjd A, Taylor MA, Mousavi N, Delavari A, Malekzadeh R, Macdonald IA, et al. Comparison of the effect of daily consumption of probiotic compared with low-fat conventional yogurt on weight loss in healthy obese women following an energy-restricted diet: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2016;103(2):323e9. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120170>.

49. Compare D, Coccoli P, Rocco A, Nardone OM, De Maria S, Carteni M, et al. Gut-liver axis: the impact of gut microbiota on non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:471e6.
50. Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther* 2011;130:202e12.
51. Evia, J. R. B., & Roberto, J. (2008). Esteatosis hepática, esteatohepatitis y marcadores de lesión hepática. *Rev Mex Patol Clin*, 55(4), 216-232.
52. OCDE. Actualización sobre la obesidad 2017. París, Francia: OCDE, 2017. Disponible en: <http://www.oecd.org/health/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf>
53. Lizardi-Cervera, J., Laparra, I. B., Chávez-Tapia, N. C., Ostos, M. E. R., & Uribe Esquivel, M. (2006). Prevalencia de hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico en población asintomática. *Revista de Gastroenterología de México*, 71(4), 453-459.
54. Aguilera-Méndez, A. (2019). Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silente. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(6), 544-549.
55. Carazo, A., & Salmeron, J. (2014). Obesity-related non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A multifactorial process. *Revista española de enfermedades digestivas: órgano oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*, 106(8), 501.
56. Hernandez-Perez, E., León, P. G., López-Díazguerrero, N. E., Rivera-Cabrera, F., & Del, E. Á. B. (2016). Liver steatosis and nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to therapy. *Medwave*, 16(8), e6535-e6535.
57. Carrillo Esper, R., & Muciño Bermejo, J. (2011). Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica: Conceptos Actuales. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 54(3), 29-45.
58. Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutrición hospitalaria*, 31(1).

59. Reyna, E. N., Álvarez, G. M., Iliná, A., & Hernández, J. L. M. (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia*, 23(66), 64-70.
60. Arana Cañedo-Argüelles C. Los probióticos en las infecciones (v.2/2011). Guía-ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico. Disponible en <http://www.guia-abe.es>
61. Sinuberase® Disponible en <https://www.sinuberase.com.mx>
62. Floratil® Disponible en <https://floratil.mx/>
63. Sutula, J., Coulthwaite, L., Thomas, L., & Verran, J. (2012). The effect of a commercial probiotic drink on oral microbiota in healthy complete denture wearers. *Microbial ecology in health and disease*, 23(1), 18404.
64. Laboratorio Profeco reporta: Yogur y otros lácteos fermentados. 2006. Revista el consumidor Disponible en <https://es.scribd.com/doc/98565067/Estudio-Yogur-Profeco>
65. Villena, M. M., Hernández, M. M., Lara, V. G., & Martínez, M. R. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 50(1), 43-50.
66. Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., & Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(1), 14-25.
67. Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed research international*, 2013.
68. Yadav, N. R., Bhitre, M. J., & Ansari, I. K. (2013). Probiotic delivery systems: applications, challenges and prospective. *Int Res J Pharm*, 4, 1-9.

69. Saez, V., Hernández, J. R., & Peniche, C. (2007). Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnol Apl*, 24, 98-107.
70. Melgoza, L. M., Rocha, A., Plata, F., Mendoza, G., & Sandoval, H. (2007). Recubrimiento pelicular de comprimidos matriciales de alta densidad y pellets para la liberación modificada de urea en rumiantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(4).
71. Evonik: Polímeros funcionales Eudragit® para formas de dosificación sólidas orales (consultado 2018) Disponible en: <https://healthcare.evonik.com/product/health-care/en/products/pharmaceutical-excipients/EUDRAGIT/>
72. Parra Huertas, R. A. (2010). Food microencapsulation: a review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5684.
73. Prada Díaz, Á. D. (2014). Estudio experimental de la aglomeración de partículas en un lecho fluidizado (Master's thesis).
74. Chen, H., Liu, X., Bishop, C., & Glasser, B. J. (2017). Fluidized bed drying of a pharmaceutical powder: A parametric investigation of drying of dibasic calcium phosphate. *Drying technology*, 35(13), 1602-1618.
75. Hurtado, T. L. T., & Huertas, C. E. M. (2010). Aplicación de la microscopía electrónica de barrido en la evaluación de dos materias primas cosméticas como restauradoras de la cutícula capilar. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 39(1).
76. Suárez, Ó. L., Martínez, M. P. P., & Cortizas, A. M. (2011). Aplicación de la Microscopía Electrónica de Barrido al estudio de los acabados de cerámica antigua de Galicia. *Gallaecia*, (30), 117-125.
77. MGA 0890 Determinación de tamaño de partícula en sistemas dispersos por difracción láser

78. Frías, M., Luxán, M. P. D., & Sánchez de Rojas, M. I. (1988). Espectrometría de difracción por rayos láser.
79. Marjanović-Balaban, Ž., Jelić, D., Antunović, V., & Gojković, V. (2013). Determination of water content in pharmaceutical substances.
80. Reynoso-Camacho, R. (2017). Effect of *Ocimum sanctum* and *Crataegus pubescens* aqueous extracts on obesity, inflammation, and glucose metabolism. *Journal of functional foods*, 35, 24-31.
81. Vengateson, U., & Mohan, R. (2016). Experimental and modeling study of fluidized bed granulation: Effect of binder flow rate and fluidizing air velocity. *Resource-Efficient Technologies*, 2, S124-S135.
82. Kaur, G., Singh, M., Matsoukas, T., Kumar, J., De Beer, T., & Nopens, I. (2019). Two-compartment modeling and dynamics of top-sprayed fluidized bed granulator. *Applied Mathematical Modelling*, 68, 267-280.
83. Takasaki, H., Sakurai, A., Katayama, T., Matsuura, Y., Ohyagi, N., Mizoguchi, M., ... & Ishikawa, A. (2019). Importance of Free Water in Controlling Granule and Tablet Properties in a Novel Granulation Method, Green Fluidized Bed Granulation (GFBG). *International journal of pharmaceutics*, 118647.
84. De Leersnyder, F., Vanhoorne, V., Bekaert, H., Vercruyssen, J., Ghijs, M., Bostijn, N., ... & Ziemons, E. (2018). Breakage and drying behaviour of granules in a continuous fluid bed dryer: Influence of process parameters and wet granule transfer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 115, 223-232.
85. Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *LWT*, 99, 583-593
86. Anekella, K., & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 17-24.

87. Liu, H., Gong, J., Chabot, D., Miller, S. S., Cui, S. W., Zhong, F., & Wang, Q. (2018). Improved survival of *Lactobacillus zeae* LB1 in a spray dried alginate-protein matrix. *Food Hydrocolloids*, 78, 100-108.
88. Thakral, S., Thakral, N. K., & Majumdar, D. K. (2013). Eudragit®: a technology evaluation. *Expert opinion on drug delivery*, 10(1), 131-149.
89. Alotaibi, H. F., Elsamaligy, S., Mahrous, G. M., Bayomi, M. A., & Mahmoud, H. A. (2019). Design of taste masked enteric orodispersible tablets of diclofenac sodium by applying fluid bed coating technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(3), 354-362.
90. Kim, H. I., Kim, J. K., Kim, J. Y., Jang, S. E., Han, M. J., & Kim, D. H. (2019). *Lactobacillus plantarum* LC27 and *Bifidobacterium longum* LC67 simultaneously alleviate high-fat diet-induced colitis, endotoxemia, liver steatosis, and obesity in mice. *Nutrition Research*, 67, 78-89.
91. Roselli, M., Finamore, A., Brasili, E., Rami, R., Nobili, F., Orsi, C., ... & Mengheri, E. (2018). Beneficial effects of a selected probiotic mixture administered to high fat-fed mice before and after the development of obesity. *Journal of functional foods*, 45, 321-329.
92. Ma, X., Hua, J., & Li, Z. (2008). Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *Journal of hepatology*, 49(5), 821-830.

Anexo

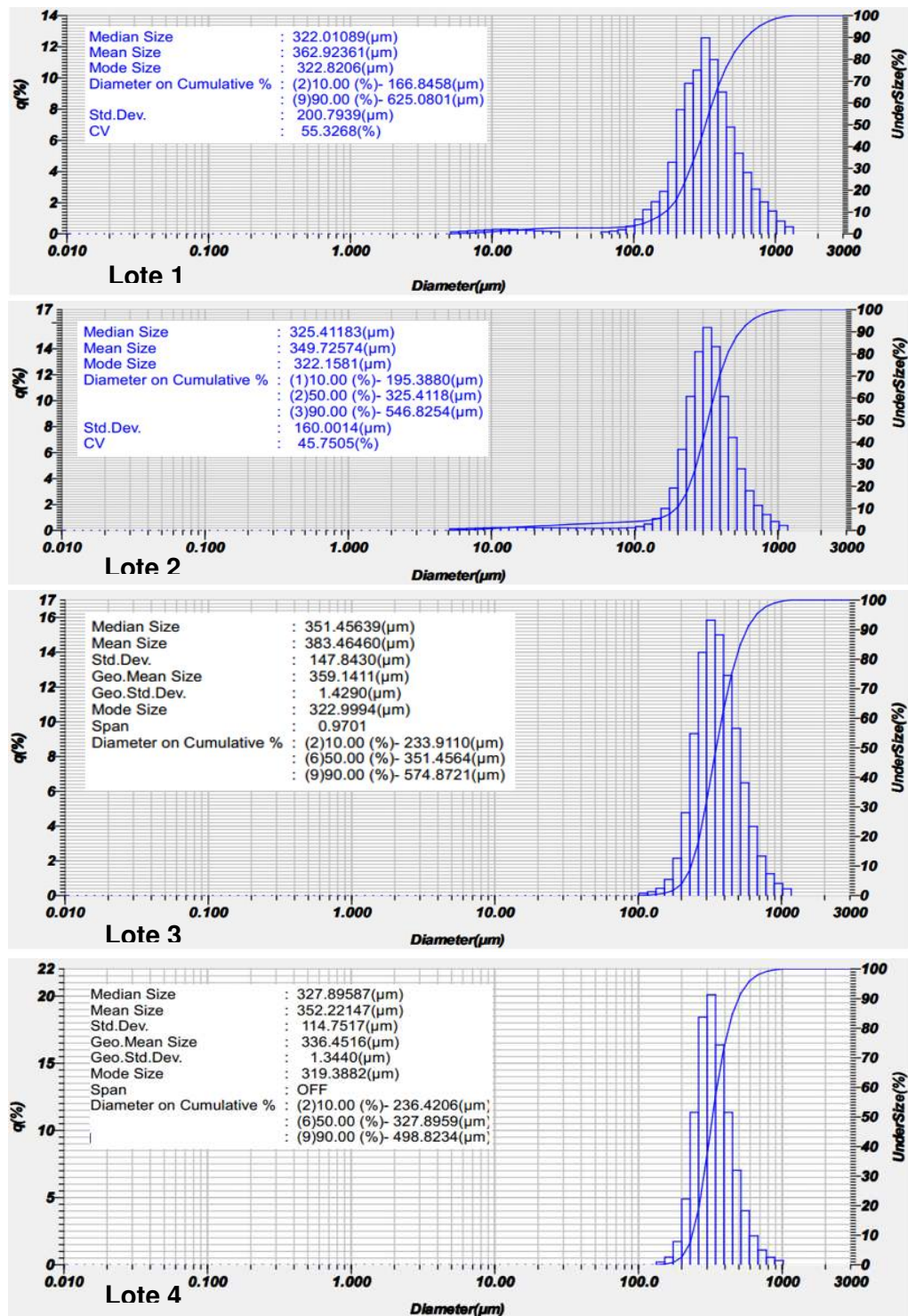


Imagen VI. Imagen I. Histogramas de la distribución de tamaño de partícula de los lotes (1, 2, 3 y 4) de producto realizado. Las gráficas y los datos de los recuadros corresponden a la réplica número 2, que se presenta en la Tabla 6. En las gráficas se muestran los estadísticos: la mediana, la media, la moda y los diámetros acumulados D_{10} , D_{50} y D_{90} expresados en μm .

Tabla VII. Valores obtenidos de la humedad relativa de cada lote después del proceso de protección y durante el periodo de almacenamiento.

Días	0	15	30	45	60	75	90
Lote 1	3.68	4.42	4.1	3.98	3.89	4.11	3.87
Lote 2	3.85	3.96	4.35	3.88	3.97	3.88	4.17
Lote 3	4.36	3.95	4.23	*	4.12	3.96	*
Lote 4	4.12	4.32	3.96	*	4.15	4.1	*

Tabla VIII. Concentración de *Bifidobacterium sp.* viable incorporada en el producto granulado con protección entérica.

Días	UFC			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
0	2.09x10 ⁸	1.74x10 ⁸	3.23x10 ⁹	2.18x10 ⁹
15	1.77x10 ⁸	1.86x10 ⁸	3.13x10 ⁹	1.85x10 ⁹
30	2.23x10 ⁸	2.17x10 ⁸	2.87x10 ⁹	2.65x10 ⁹
45	2.16x10 ⁸	2.15x10 ⁸	*	*
60	1.95x10 ⁸	1.77x10 ⁸	2.15x10 ⁹	2.10x10 ⁹
75	1.41x10 ⁸	9.30x10 ⁷	1.65x10 ⁹	1.43x10 ⁹
90	9.48x10 ⁷	6.11x10 ⁷	*	*
180	7.20x10 ⁶	1.69x10 ⁶	4.45x10 ⁷	1.63x10 ⁷
360	2.72x10 ⁵	1.33x10 ⁵	1.63x10 ⁶	1.25x10 ⁶

Tabla IX. Resultados de los valores séricos de triglicéridos (mg/dL) en sangre para cada uno de los controles y tratamientos.

Rata	Triglicéridos mg/dL					
	DN	DN-B	DN-P	HFD	HFD-B	HFD-P
1	70	156	83	57	259	99
2	46	113	64	111	224	46
3	61	68	34	250	134	50
4	63	46	*	89	78	63
Promedio	60	96	60	127	174	65

(*) Este valor no se tiene debido a que la rata falleció.

Tabla X. Resultados de los valores séricos de colesterol (mg/dL) en sangre para cada uno de los controles y tratamientos.

Colesterol total mg/dL						
Rata	DN	DN-B	DN-P	HFD	HFD-B	HFD-P
1	55	64	54	66	72	63
2	58	63	46	75	76	74
3	48	66	56	86	61	58
4	50	47	*	64	66	72
Promedio	53	60	52	73	69	67

(*) Este valor no se tiene debido a que la rata falleció.

Tabla XI. Resultados de los valores séricos de Glucosa (mg/dL) en sangre para cada uno de los controles y tratamientos.

Glucosa mg/dL						
Rata	DN	DN-B	DN-P	HFD	HFD-B	HFD-P
1	127	143	114	172	133	158
2	129	72	140	162	192	186
3	106	118	132	197	168	174
4	103	107	*	168	170	167
Promedio	116	110	129	175	166	171

(*) Este valor no se tiene debido a que la rata falleció.

Tabla XII. Resultados de los valores séricos de aspartato aminotransferasa (mg/dL) en sangre para cada uno de los controles y tratamientos.

Aspartato aminotransferasa U/L						
Rata	DN	DN-B	DN-P	HFD	HFD-B	HFD-P
1	150	102	164	125	125	237
2	135	164	149	106	99	96
3	90	115	107	197	53	120
4	105	108	*	236	95	115
Promedio	120	122	140	166	93	142

(*) Este valor no se tiene debido a que la rata falleció.

Tabla XIII. Resultados de los valores séricos de alanina aminotransferasa (mg/dL) en sangre para cada uno de los controles y tratamientos.

<i>Alanina aminotransferasa U/L</i>						
<i>Rata</i>	DN	DN-B	DN-P	HFD	HFD-B	HFD-P
1	42	33	48	35	38	42
2	33	39	37	36	31	31
3	48	37	42	51	36	56
4	33	31	*	48	44	34
<i>Promedio</i>	39	35	42	43	37	41

(*) Este valor no se tiene debido a que la rata falleció.

Tabla XIV. Resultados de los valores séricos de Gamma Glutamil Transpeptidasa U/L en sangre para cada uno de los controles y tratamientos.

<i>Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGT) U/L</i>						
<i>Rata</i>	DN	DN-B	DN-P	HFD	HFD-B	HFD-P
1	4	4	4	4	4	4
2	4	4	4	4	4	4
3	4	4	4	4	4	4
4	4	4	*	4	4	4
<i>Promedio</i>	4	4	4	4	4	4

(*) Este valor no se tiene debido a que la rata falleció.

Tabla XV. Resultados de las inclusiones lipídicas centrolobulillares presentes en los cortes histológicos de las muestras de hígados de las ratas (controles y tratamientos).

<i>rata</i>	<i>DN</i>	<i>DN+B</i>	<i>DN+P</i>	<i>HFD</i>	<i>HFD+B</i>	<i>HFD+P</i>
1	*	12	*	75.3	*	14.7
2	*	3.5	0	173.7	44.0	17.7
3	6	4	6.3	204.3	109.3	12.7
4	10.5	1	7	118.7	136.7	12.3
<i>Promedio</i>	8.25	5.13	4.43	143.0	96.7	14.3

(*) Este valor no se tiene debido a que los cortes previos a la tinción no se realizaron de la manera correcta y no pudieron ser teñidos.



INTERNATIONAL
SCIENTIFIC
CONFERENCE
PROBIOTICS,
PREBIOTICS,
GUT MICROBIOTA
AND HEALTH

18th – 21st June 2018
Budapest, Hungary

www.probiotic-conference.net

Certificate

THIS CERTIFICATE IS PROUDLY PRESENTED TO



Cynthia Garfias Noguez

that has participated in International Scientific Conference on Probiotics,
Prebiotics, Gut Microbiota and Health

18th-21st June 2018, Budapest, Hungary

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sin-Hyeog Im'.

Sin-Hyeog Im, Ph.D.,
President of IPC2018
Scientific Committee

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Kürti'.

Peter Kürti
Executive Director of IPC2018
Organising Committee

EVALUATION OF TWO ENTERIC POLYMERS ON THE RELEASE OF *B. LONGUM* INCORPORATED IN INULIN BY FLUID BED DRYING

Garfias Noguez C.¹; Sánchez Portilla Z.¹; Carreón Peréz J.²; Melgoza Contreras L.¹; Gutiérrez Nava M.¹

¹ Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, Mexico

² Instituto Nacional de Medicina Genómica. México

Introduction:

Use of enteric polymers has increased in pursuit of new products which target active ingredients release towards a specific site in the digestive tract. It is well known that the benefits of probiotics on human health are due to its effect in the colon, therefore the use of this type of polymers is a strategy to improve probiotic viability, target its release towards the colon and to include a prebiotic that stimulates the selective growth of such microorganisms.

Methods:

B. longum was incorporated in inulin-GR by fluid bed drying. Afterwards, this product was coated with two different enteric polymers (Eudragit® S12.5 and Eudragit® FS30D), with a weight gain of 20%. Enteric release products were evaluated by determining cell viability in buffers simulating gastric and intestinal pH in different times of test.

Results:

From a culture of *B. longum* with an initial concentration of 108 CFU/mL, we obtained two products; the first product was coated with Eudragit® S12.5 presenting a concentration of 1.47x 10⁷ CFU/g, with a total bifidobacteria release at 60 minutes in pH 7.5 (intestinal pH). The second product coated with Eudragit® FS30D has a concentration of 5.33x10⁶ CFU/g, a total bifidobacteria release at 120 minutes after starting the test. Both products maintain *B. longum* viability at 80 and 90% after two months in normal storage conditions.

Discussion:

The used polymers have as characteristic being able to solubilize at a pH above 7.0, therefore they are chosen to design colonic release systems. The difference between these polymers is the solubilization media since for Eudragit® FS30D is water and for Eudragit® S12.5 is isopropanol. The product weight gain with respect to polymer protection is a key issue that influences bifidobacteria release. A polymer that protects bifidobacteria and allows its complete release at pH 7.5 in a short time to avoid product elimination from the organism without releasing any bacteria.

Keywords: *B. longum*, Inulin, Enteric release, Fluidized bed drying, Viability

DEVELOPMENT OF A PROBIOTIC FOR TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF MIXED INTESTINAL INFECTIONS IN YOUNG FARM ANIMALS

Gavrilova N.¹; Ratnikova I.¹; Sadanov A.¹; Melnikov V.²; Bayakyshova K.¹; Chugai O.³

¹ Institute of Microbiology and Virology, Ministry of Education and Science, Almaty, Kazakhstan

² Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

³ Republican Clinical Hospital of Disabled People of the Great Patriotic War, Almaty, Kazakhstan

Introduction:

Infections are the most common cause of mortality of young farm animals and poultry and reduce livestock productivity. Due to severization of requirements to ecological safety of animal products, essential role is given to development of ecologically safe drugs for animal health protection, such as probiotics containing living bacteria isolated from the main species of the normal intestinal biocenosis, predominantly lactobacilli and *bifidus bacteria*. The purpose of the research was to develop a dried probiotic with a wide spectrum of action.

Methods:

We used generally accepted microbiological and biochemical methods in our work. The research was focused on *lactic acid bacteria (LAB)* isolated from intestines of healthy animals and humans that have a high antagonistic activity to the most common pathogens. Efficacy of the formulation for prophylaxis and treatment of intestinal diseases was studied in experimental animals (rabbits) at Kazakh Veterinary Research Institute vivarium and in newborn calves and sheep at a farm.