



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Optimización de la microencapsulación de *Bifidobacterium longum* (BAA-999) y su administración con licopeno sobre la modulación de IGF-1/IGF-1R/IGFBP3 en un modelo de carcinogénesis colorrectal**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**Presenta:**

M. en C. Nancy Valadez Bustos

**Dirigido por:**

Dr. Eleazar M. Escamilla Silva

**Co-Director:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

Querétaro, Qro. Noviembre 2019.



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

**Optimización de la microencapsulación de *Bifidobacterium longum* (BAA-999) y su administración con licopeno sobre la modulación de IGF-1/IGF-1R/IGFBP3 en un modelo de carcinogénesis colorrectal**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**Presenta:**

M. en C. Nancy Valadez Bustos

**Dirigido por:**

Dr. Eleazar M. Escamilla Silva

**Co-dirigido por:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

**Sinodales**

Dr. Eleazar Máximo Escamilla Silva  
Director

Dra. Minerva Ramos Gómez  
Co-Director

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Secretario

Dra. Blanca Estela García Almendárez  
Vocal

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Noviembre, 2019  
México

## DEDICATORIAS

### **A Dios**

Por darme la fuerza y el coraje para volverme a parar y vencer los obstáculos con la frente en alto.

### **A mi abuelita Clemen**

Por presumirme, por quererme, por preocuparte en cada viaje que realizaba y esperar ansiosamente mi regreso. Sé que ahora querrías estar a mi lado, pero me has dejado tu esencia.

### **A mis padres José y Clemen**

Este triunfo es un reconocimiento más, al gran esfuerzo de ustedes por anhelar el éxito de sus hijos, gracias por incondicionalmente quererme tanto, por siempre estar para mí, apoyarme, escucharme y creer en mí.

### **A mis hermanos Pepe, Lupita y Oscar**

Por siempre ser un ejemplo a seguir, cada uno posee cualidades y puntos de vista muy diferentes que me han ayudado a ver y afrontar la vida desde diversos ángulos, he aprendido con ustedes y de ustedes, los quiero mucho.

### **A mi esposo Charly**

Por impulsarme a realizar un Doctorado, por ser mi fan #1 y el primero en la fila de cada exposición, por alentarme a realizar cada viaje y estancia aunque preferías no alejarte, por acompañarme en esta montaña rusa llamada vida.

### **A Yara**

Por ayudarme a estudiar, distraerme en momentos complicados, mostrando siempre tu carisma y por verme con ojos de admiración.

### **Amigos y familiares**

Principalmente a mi tía Lety, Doraly, Sra. Gisela y amigos del TecNM, por preocuparse y ocuparse de mi salud física y emocional, gracias infinitas.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de este proyecto de investigación.

Al financiamiento por parte del Fondo de Fortalecimiento a la Investigación (FOFI-UAQ), folio: 1299 y el Instituto Nacional Tecnológico de México, folio: 6656.18-P.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por facilitarme sus instalaciones y ofrecer un alto nivel y rendimiento académico.

A mi segunda casa, el Tecnológico Nacional de México en Celaya por abrirme nuevamente sus puertas durante el periodo doctoral y brindarme un excelente ambiente de trabajo.

A mi comité evaluador Dr. Escamilla Silva Eleazar M., Dra. Ramos Gómez Minerva, Dra. Amaya Llano Silvia, Dra. García Almendárez Blanca y Dra. Hernández Iturriaga Montserrat, muchas gracias por sus grandes aportaciones, disponibilidad y ofrecerme sus instalaciones en sus respectivos laboratorios para la culminación de este trabajo.

Al Dr. Conde Barajas Eloy y Dr. Almendárez Camarillo Armando del TecNM por permitirme trabajar en las instalaciones de sus laboratorios y ofrecerme un gran apoyo y asesoría durante mi proyecto.

A mis chicos de residencias y servicio social Luna Wendy, Jaramillo Carlos y Valdes Tanya, por ser parte de mi equipo de trabajo e intégrame como miembro en su comité de titulación.

## ÍNDICE

	Página
Índice de cuadros	i
Índice de figuras	ii
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Cáncer	3
2.1.1 Factores etiológicos del cáncer	3
2.1.2 Carcinogénesis	3
2.1.3 Mecanismos de inducción de carcinogénesis colorrectal	5
2.1.4 Epidemiología del cáncer colorrectal (CCR)	6
2.1.5 Morfología y función del colon	7
2.2 Probióticos. Características y efectos	8
2.2.1 <i>Bifidobacterium longum</i> (ATCC BAA-999).	8
2.2.2 Efectos de BF en un hospedador	10
2.3 Licopeno (LYC)	12
2.3.1 Absorción y biodisponibilidad del LYC	12
2.3.2 Efectos biológicos del LYC	13
2.3.3 Efecto del LYC sobre el sistema insulínico/IGF	14
2.4 Microencapsulación	16
2.4.1 Principales técnicas en encapsulación probiótica: ventajas y desventajas	17
2.4.2 Secado por aspersión: sobrevivencia probiótica	19
2.4.3 Efecto de la composición de la matriz en el encapsulamiento de secado por aspersión sobre la sobrevivencia probiótica	21
2.4.4 Efecto de las propiedades fisicoquímicas, térmicas, mecánicas y dinámicas de microencapsulados en la industria	24

2.4.5 Productos alimenticios: sobrevivencia probiótica	29
2.5 Modelo de cáncer de colon	31
HIPÓTESIS	35
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 Materiales	36
3.1.1 Material biológico	36
3.1.2 Material químico	36
3.2 Modificación química del almidón	36
3.2.1 Fosfatación del almidón por método convencional	36
3.3 Caracterización de las matrices encapsulantes	37
3.3.1 Determinación de índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA)	37
3.3.2 Dispersiones de biopolímeros y mezclas	38
3.3.3 Determinación de densidad de los biopolímeros	39
3.3.4 Determinación de viscosidad	39
3.3.5 Determinación sólidos solubles	39
3.3.6 Determinación de pH	40
3.3.7 Cristalinidad de películas	40
3.3.8 Propiedades mecánicas de las películas de biopolímeros. Fuerza de corte y esfuerzo de deformación	40
3.4 <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC BAA-999 (BF)	41
3.4.1 Almacenamiento de BF	41
3.4.2 Activación de la cepa BF	41
3.4.3 Monitoreo del crecimiento de BF	42
3.5 Microencapsulación de células de BF. Secado por goteo y aspersión	42
3.5.1 Previa microencapsulación de BF	42
3.5.2 Preparación de materiales matriz	43
3.5.3 Microencapsulación de BF mediante la técnica de goteo	43
3.5.4 Microencapsulación de BF mediante la técnica de secado por aspersión	44

3.6 Evaluación del proceso de microencapsulado de BF	44
3.6.1 Determinación de humedad en las microcápsulas	44
3.6.2 Determinación de actividad de agua ( $A_w$ ) en las microcápsulas	44
3.6.3 Determinación de la difusividad efectiva mediante la caída de concentración	45
3.6.4 Viabilidad de BF posterior al proceso de encapsulación	46
3.6.5 Evaluación de la viabilidad de BF encapsulados a largo plazo.	46
3.6.6 Evaluación de la sobrevivencia de BF microencapsulados en sistema gastrointestinal simulado	47
3.6.7 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis dinámico mecánico (DMA)	47
3.6.8 Microscopía electrónica de barrido	49
3.7 Estudios <i>in vivo</i>	49
3.7.1 Pruebas de funcionalidad con probióticos	49
3.7.2 Diseño experimental <i>in vivo</i> . Modelo agudo de inflamación con dextrano sulfato de sodio (DSS)	50
3.7.3 Diseño experimental <i>in vivo</i> . Modelo de CCR	51
3.7.4 Sacrificio y obtención de muestras	53
3.7.5 Viabilidad de BF en estómago, intestino delgado, ciego, colon y heces de ratones CD-1	54
3.7.6 Determinación de pH en contenido cecal, colónico y fecal	54
3.7.7 Determinación de la actividad $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ -GA) en contenido cecal, colónico y fecal	55
3.7.8 Análisis macroscópico	55
3.7.9 Estudio histopatológico	56
3.7.10 Expresiones proteicas del sistema IGF por técnica de inmunohistoquímica	56
3.8 Análisis estadístico	58
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1 Grado de fosfatación del almidón	59
4.2 Caracterización fisicoquímica y mecánica de las matrices encapsulantes	60
4.2.1 Comportamiento en el proceso de encapsulamiento mediante la técnica de goteo	60
4.2.2 Comportamiento en el proceso de encapsulamiento mediante secado por aspersión I	62

4.2.3 Comportamiento en el proceso de encapsulamiento mediante secado por aspersión II	66
4.3 Cinética de crecimiento de BF	67
4.4 Impacto de las técnicas de secado por aspersión y goteo en la viabilidad bacteriana	69
4.5 Viabilidad de BF encapsulados a largo plazo.	70
4.6 Viabilidad de BF posterior a condiciones gastrointestinales simuladas.	72
4.7 Difusividad efectiva de BF microencapsulados en matriz óptima e inferior.	74
4.7.1 Análisis Matemático: Difusividad efectiva y perfil de concentraciones a través del tiempo	76
4.8 Microscopía electrónica de barrido de microencapsulados mediante la técnica de secado por aspersión I.	84
4.9 Caracterización de microencapsulados por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis dinámico mecánico (DMA)	87
4.10 Modelo agudo de inflamación con dextrano sulfato de sodio (DSS)	90
4.10.1 Determinación de pH en contenido cecal, colónico y fecal	91
4.10.2 Determinación de $\beta$ -GA en el contenido cecal, colónico y fecal	94
4.10.3 Colonización de BF en estómago, intestino delgado, y contenidos cecal, colónico y fecal	95
4.10.4 Estudio histopatológico	99
4.11 Observaciones generales en el modelo carcinogénico pre-inflamatorio (AOM + DSS)	102
4.11.1 Viabilidad de BF microencapsulada y su distribución a través del GIT durante el estudio carcinogénico AOM + DSS de 16 semanas	103
4.11.2 Evaluación macroscópica y clasificación histopatológica	107
4.11.3 Modulación de los componentes del sistema IGF en tejido colorrectal	112
V. CONCLUSIONES	119
REFERENCIAS	121
ANEXOS	134

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Efectos antiproliferativos/pro-apoptóticos de probióticos sobre células en humanos.	11
2	Tasas de sobrevivencia para Lactobacillus y Bifidobacterias.	20
3	Categorías de alimentos propuestas para la adición de BF	30
4	Grado de fosfatación del almidón, utilizando tripolifosfato de sodio comparado con trisodio trimetafosfato.	60
5	Caracterización fisicoquímica y mecánica de la mezcla encapsulante óptima por la técnica de goteo, secado por aspersión I y secado por aspersión II	68
6	Caracterización de humedad, actividad de agua y difusividad efectiva de BF microencapsulado utilizando mezclas óptimas e inferiores mediante técnicas de goteo y secado por aspersión.	75
7	Peso corporal, aumento de peso corporal, pH, $\beta$ -GA y población de BF en heces durante periodo de experimentación en un modelo agudo de inflamación murino inducido por DSS.	92
8	Peso corporal final, ganancia de peso corporal final, pH y $\beta$ -GA en ciego, colon y heces durante periodo de experimentación en un modelo agudo de inflamación murino inducido por DSS.	93
9	Peso final, ganancia de peso, pH y $\beta$ -GA en contenido cecal, colónico y fecal en la semana 16 del tratamiento AOM-DSS.	105
10	Efecto anticancerígeno de BF microencapsulado en la clasificación cuantitativa macroscópica de lesiones colónicas inducidas con AOM y DSS en ratones CD-1 macho.	109
11	Caracterización histológica y clasificación cuantitativa acorde a la infiltración linfocitaria, células caliciformes, crestas epiteliales, placas de Peyer, necrosis, mitosis, grado de inflamación y adenocarcinomas inducidos con AOM + DSS en ratones macho CD-1.	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Secuencia colorrectal adenoma-carcinoma.	4
2.2	Mecanismos de inducción de carcinogénesis en colon.	6
2.3	Imagen al microscopio de BF.	9
2.4	Efectos ejercidos por probióticos en un hospedador.	11
2.5	Isómeros mono-cis estéricamente impedidos del licopeno	13
2.6	Posible(s) mecanismo(s) de los carotenoides y sus metabolitos oxidativos sobre sus efectos benéficos y perjudiciales en la salud humana.	14
2.7	Principio de encapsulación: aislamiento de células del sistema inmune del huésped permitiendo el transporte de metabolitos extracelulares.	16
2.8	Rango de tamaños de cápsulas por tecnología de encapsulación.	17
2.9	Diagrama sistemático: encapsulación del secado por aspersión.	19
3.1	Diseño experimental del pre-modelo animal de CCR.	51
3.2	Diseño experimental del modelo animal de CCR.	53
4.1	Caracterización de agentes encapsulantes mediante la técnica de goteo (constituido por goma arábica, alginato de sodio y caseína).	63
4.2	Caracterización de mezclas encapsulantes utilizando la técnica de secado por aspersión I (constituido por goma arábica, alginato de sodio y almidón de fosfato).	65
4.3	Gráfica de superficie de respuesta pH. Secado por aspersión II, mezcla 80:20.	67
4.4	Cinética de crecimiento de BF. Viabilidad de las células mL <sup>-1</sup> en un tiempo total de 74 h.	69
4.5	Viabilidad celular de BF a largo plazo.	71
4.6	Cuantificación de células de BF mL <sup>-1</sup> durante la digestión gastrointestinal simulada (GI).	73
4.7	Efecto comparativo en la difusividad efectiva de BF microencapsulado con intervalos de temperatura y pH.	77
4.8	Análisis matemático: difusividad efectiva y perfil de concentraciones a través del tiempo.	83
4.9	Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de BF microencapsulados mediante secado por aspersión.	86
4.10	Caracterización de microencapsulados, mediante secado por aspersión, medida en un intervalo de temperatura por la Calorimetría Diferencial de barrido (DSC).	88
4.11	Caracterización por Análisis Mecánico Dinámico (DMA)	90

4.12	de BF microencapsulado, mediante secado por aspersión Disminución durante 20 horas en la población de BF en heces de ratones CD-1 en el día 14.	97
4.13	Población de BF en estómago, intestino delgado, ciego, colon y heces de ratones CD-1 en el día 14.	98
4.14	Características histológicas y clasificación cuantitativa, acorde al número de criptas, neutrófilos, mitosis, apoptosis, células caliciformes, alargadas, estratificadas e infiltradas en tejidos de colon de ratones CD-1 con inflamación inducida por DSS.	101
4.15	Viabilidad de BF en heces de ratón CD-1 durante 16 semanas. Los valores se representan como Log UFC/g de heces.	106
4.16	Población de BF en estómago, intestino delgado, ciego, colon y heces de ratones CD-1 en la semana 16 del tratamiento.	108
4.17	Caracterización histológica, expresión proteica IGF-I, IGF-2, IGF-IR y expresión de proteínas de unión a IGF (IGFBP) en tejidos colónicos de ratones tratados con AOM-DSS.	115
4.18	Modulación del sistema IGF por BF + LYC 20 en ratones tratados con AOM-DSS.	118

## RESUMEN

El sistema factor de crecimiento similar a la insulina I/receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1/IGF-1R) es un determinante en la patogénesis del cáncer colorrectal (CCR). Los probióticos (*Bifidobacterium longum*, BF) y los compuestos bioactivos como el licopeno (LYC) se han investigado individualmente por sus efectos en la prevención del CCR. Por lo tanto, buscamos demostrar un efecto sinérgico en la suplementación combinada de BF-LYC sobre la expresión de diversos componentes del sistema IGF como una estrategia para la quimioprevención del CCR. Primeramente, se realizaron estudios de microencapsulación como sistema de protección garantizando una efectividad celular. El criterio para la selección del material microencapsulante se basó en la caracterización fisicoquímica, térmica y dinámica de 72 mezclas encapsulantes. Satisfactoriamente, el microencapsulado de alginato de sodio-almidón fosfatado-goma arábiga (1.6, 0.8 y 2.5%, respectivamente) mediante la técnica de secado por aspersión I, proporcionó un óptimo sistema de microencapsulación para la protección de BF e incrementó un 70% la sobrevivencia celular, comparado con 7% de sobrevivencia mediante la técnica de goteo. Como resultado, se obtuvo un sistema de liberación celular con una excelente difusión efectiva y un contenido máximo de  $1.311E+11$  células  $mL^{-1}$  con 99.8% de viabilidad, lo anterior promovió su resistencia 105 días posteriores a la microencapsulación y en condiciones gastrointestinales simuladas con una concentración final de  $1.51E+10$  células  $mL^{-1}$ . La efectividad de BF microencapsulado, utilizando un modelo de inflamación agudo inducido con dextrano sulfato de sodio (DSS), proporcionó una colonización significativa en contenido luminal y adheridas al tracto gastrointestinal, con disminuciones en pH y actividad de  $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ -GA) cecal, colónico y fecal, en comparación con el grupo DSS. En el modelo de CCR inducido con azoximetano (AOM)-DSS, los grupos tratados con BF y BF+LYC tuvieron una incidencia significativamente menor en grado de inflamación, tumores (13-38%) y adenocarcinomas (13-14%) comparados con el grupo AOM + DSS (80%), lo cual fue asociado a la normalización de pH y  $\beta$ -GA cecal, colónico y fecal. Acorde a los parámetros intestinales, la suplementación probiótica combinada de BF-LYC resultó en un potencial quimiopreventivo significativo a través de la modulación del sistema IGF-1/IGF-1R/IGFBPs en CCR.

**Palabras clave:** Microencapsulados de *Bifidobacterium longum*, distribución bacteriana gastrointestinal; licopeno; sistema IGF-1/IGF-1R/IGFBPs; cáncer colorrectal.

## ABSTRACT

The insulin system-like growth factor I/insulin-like growth factor receptor (IGF-1/IGF-1R) is a determinant in the pathogenesis of colorectal cancer (CRC). Probiotics (*Bifidobacterium longum*, BF) and bioactive compounds such as lycopene (LYC) have been individually investigated for their beneficial effects in the prevention of CRC. Therefore, we pursued to demonstrate a synergistic effect of the combined probiotic BF–LYC supplementation on the expression of several IGF system components as an effective strategy for CRC chemoprevention. Hence, we first set out to conduct microencapsulation studies as a protection system that guarantees cellular effectiveness. The criterion for the selection of the microencapsulated material was based on the physicochemical, thermal and dynamic characterization of 72 encapsulating mixtures. Sodium alginate-phosphate starch-gum arabic microencapsulated (1.6, 0.8 and 2.5%, respectively) by the spray drying I technique, satisfactorily, provided an optimal microencapsulation system for BF protection and increased BF survival by 70%, compared to 7% survival by drip technique. As a result, we obtained a cell release system with excellent effective diffusivity and a maximum content of  $1.311\text{E}+11$  cells  $\text{mL}^{-1}$  with 99.8% cell viability, which provided a 105 days-resistance period after microencapsulation and  $1.51\text{E}+10$  cells  $\text{mL}^{-1}$  as final concentration after simulated gastrointestinal conditions. The microencapsulated BF effectiveness, using a model of acute inflammation induced with sodium dextran sulfate (DSS), provided a significant colonization in luminal content and adhered to the gastrointestinal tract, with significant decreases in pH and  $\beta$ -glucuronidase activity ( $\beta$ -GA) in caecal, colonic and fecal contents, in comparison with the DSS group. In the azoxymethane (AOM)-DSS-induced CRC model, BF- and BF+LYC-treated groups had significantly lower inflammation grade, tumor (13-38%) and adenocarcinoma (13-14%) incidence compared to the AOM + DSS group (80%), which was associated with normalization of caecal, colonic and fecal pH and  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -GA) values. Based on intestinal parameters, the combined probiotic BF–LYC supplementation resulted in a significant chemopreventive potential through the modulation of IGF-1/IGF-1R/IGFBPs system in CCR.

**Keywords:** *Bifidobacterium longum* microencapsulated; gastrointestinal bacterial distribution; lycopene; IGF-1/IGF-1R/IGFBPs system; colorectal cancer

## I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer colorrectal (CCR) ocupa el segundo lugar en términos de mortalidad. La mayoría de los factores de riesgo de CCR están relacionados con factores dietéticos y de estilo de vida (Vigneri *et al.*, 2015). Entre los componentes importantes en CRC, se ha reportado que el factor IGF-1 se expresa más altamente en adenocarcinomas en comparación con adenomas y muestras de colon normales de pacientes, mientras que IGFBP3 es más bajo en individuos sanos (Walfisch *et al.*, 2007; Vigneri *et al.*, 2015). Esto sugiere una asociación positiva y negativa de estas dos proteínas con el riesgo de CCR, respectivamente. Sin embargo, los enlaces fisiopatológicos subyacentes aún no se establecen y los mecanismos moleculares siguen sin resolverse.

El licopeno (LYC), es un compuesto bioactivo dietario que ejerce protección contra diferentes tipos de cáncer en modelos animales e intervenciones epidemiológicas con efectos pleiotrópicos. LYC tiene efectos quimiopreventivos prometedores sobre el CCR, al modular los componentes del sistema IGF-1 a través de las vías de señalización Ras/MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) y PI3K/AKT/Wnt (fosfoinositol 3-quinasa/proteína serina-treonina quinasa/sitio de integración relacionado con Wntless) (Dias *et al.*, 2010; Trejo-Solís *et al.*, 2013; Kasdagly *et al.*, 2014; Ono *et al.*, 2015).

La creciente evidencia sugiere que los probióticos, prebióticos y su combinación con compuestos bioactivos podrían modular la resistencia del huésped contra las infecciones intestinales. Los prebióticos estimulan selectivamente el crecimiento de probióticos en el colon y potencian los efectos benéficos de las bacterias (Dias *et al.*, 2010). No obstante, el tipo de respuesta inmunológica del huésped varía acorde al probiótico (Rodríguez, 2015); en este sentido, se ha sugerido el consumo de *Bifidobacterium longum* (BF). Los mecanismos anticancerígenos asociados con la administración de BF incluyen: control del crecimiento celular, fermentación de carbohidratos no digeribles, modulación del microbioma y pH intestinal, así como la inducción de apoptosis en células transformadas o cancerosas (Serban, 2014). Sin embargo, se ha afirmado

que varios factores afectan la viabilidad de los probióticos, incluido el procesamiento de calor y las condiciones del tracto gastrointestinal (GIT) (Eratte *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). Debido a esto, la microencapsulación se ha desarrollado para proteger y garantizar la efectividad celular (Shah *et al.*, 1995). La técnica de encapsulación de secado por aspersion es adecuada para materiales sensibles al calor y proporciona resultados satisfactorios con una pérdida mínima de viabilidad (De Vos *et al.*, 1996). Aunque estudios previos han reportado la microencapsulación de bacterias ácido lácticas (Shoji *et al.*, 2013), no existe información de estudios *in vivo* sobre el uso de mezclas de polisacáridos aniónicos como agentes encapsulantes, utilizados de forma independiente sin la necesidad de ser incorporados en sistemas alimentarios, y en conjunto con bacterias ácido lácticas sobre la carcinogénesis. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia quimiopreventiva de un sistema de microencapsulación termomecánicamente adecuado para BF mediante la optimización de los componentes de la matriz mediante técnicas de secado por aspersion y goteo administrado conjuntamente con LYC, a través de la modulación del sistema IGF-1/IGF-1R/IGFBPs y su relación con parámetros intestinales en un modelo de inflamación aguda y un modelo de CCR.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Cáncer**

El cáncer es un trastorno genético caracterizado por la alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos de muerte celular; como consecuencia se genera una clona que puede invadir tejidos adyacentes para posteriormente diseminarse hacia sitios distantes, generando nuevas colonias y una propagación metastásica. Lo anterior puede llevarse a cabo gracias a la desdiferenciación de la célula cancerosa y la independencia hacia factores de crecimiento para su proliferación, volviéndose autónoma y generando masas tumorales (Herrera y Andonegui, 2010).

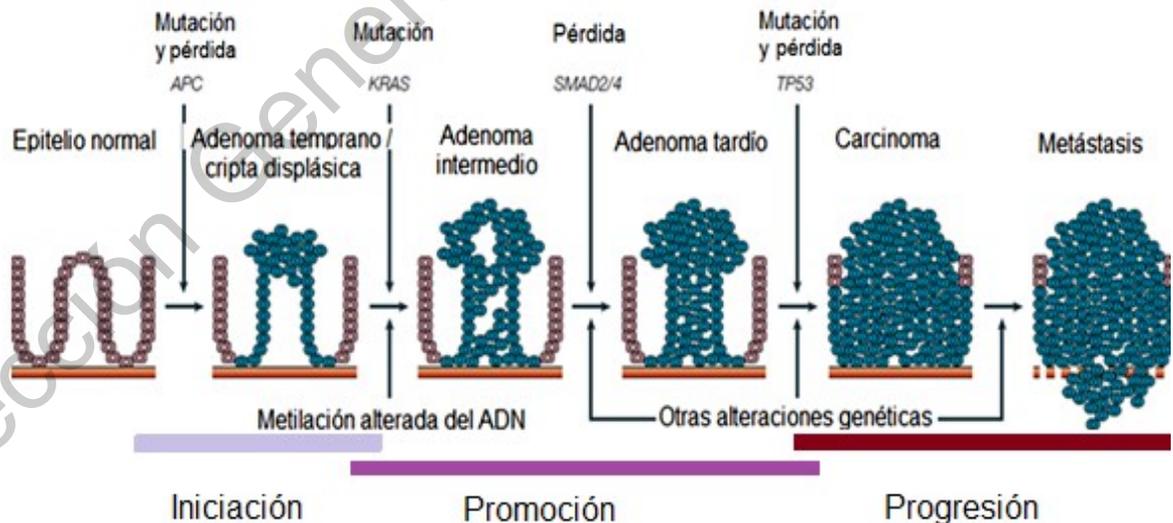
#### **2.1.1 Factores etiológicos del cáncer**

De forma introductoria, es importante conocer los factores etiológicos que causan el cáncer. Debido a que la molécula blanco del cáncer es el ADN, el cual por su característica nucleofílica es susceptible a mutaciones, la etiología del cáncer es extensa. Sin embargo, las causas del cáncer pueden dividirse en endógenas y exógenas; las primeras corresponden del 10-20 % de todos los cánceres padecidos por los seres humanos, incluyen las espontáneas y heredables; mientras que, las exógenas o ambientales asociadas al 80-90 % de todos tipos de cáncer, se incluyen las de origen químico, como el uso de medicamentos, aditivos alimenticios, cosméticos, pesticidas, productos industriales y del hogar, tabaquismo, ingestión de bebidas alcohólicas, exposición ocupacional y la dieta, así como las causas de tipo físico como lo son las radiaciones ionizantes y las causas de naturaleza biológica y aquellas causadas por virus. Otros factores descritos como sociales son el estrés, depresión y angustia (Torroella y Villa, 1998; Kim *et al.*, 2013).

#### **2.1.2 Carcinogénesis**

El proceso de carcinogénesis (fenómeno de transformación de una célula corporal normal en maligna) se caracteriza por requerir de múltiples mutaciones a

nivel somático, generalmente durante un periodo de años. Estas mutaciones pueden presentarse en proto-oncogenes que son genes encargados de regular de manera positiva la proliferación celular o bien se puede presentar en genes supresores de tumores que son los encargados de inhibir o controlar de manera negativa la proliferación celular y, por lo tanto, si se encuentran mutados, inactivan al gen y su copia, estimulando dicha proliferación (Alberts *et al.*, 2011). El proceso de carcinogénesis química comienza con la exposición a un agente mutagénico causando daño a un proto-oncogén, dando lugar a 3 etapas que son: iniciación, promoción y progresión (Figura 2.1). En la etapa de iniciación existe un cambio permanente y heredable que altera el ADN; sin embargo, aquí no se diferencia morfológicamente con facilidad una célula cancerosa y una normal. La promoción representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor (benigno). En esta etapa participan los factores de crecimiento y los receptores a los factores de crecimiento, como así también la angiogénesis y degradación de las matrices extracelulares. La progresión, como última etapa, implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna (Masakazu *et al.*, 1996).



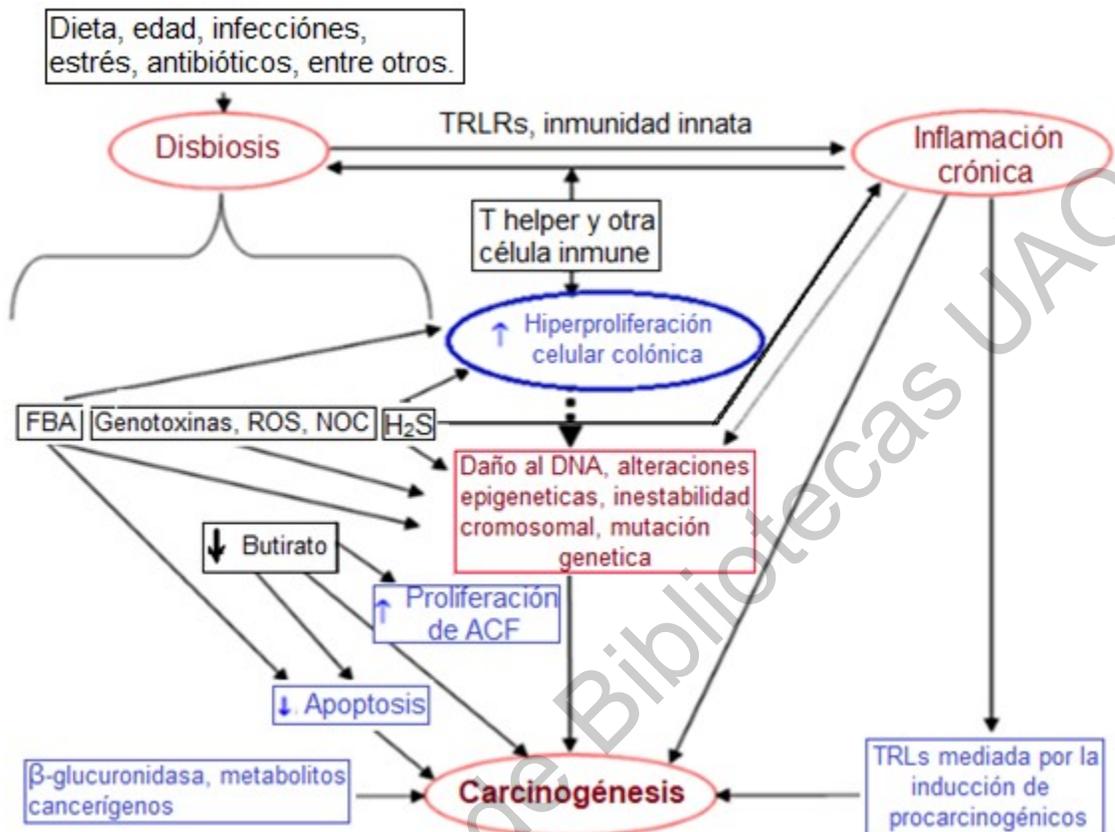
**Figura 2.1.** Secuencia colorrectal adenoma-carcinoma. La progresión del epitelio normal a través del adenoma al carcinoma colorrectal se caracteriza por anomalías acumuladas de genes particulares (Modificada de Davies *et al.*, 2005). APC (poliposis coli adenomatosa); KRAS (oncogén viral de sarcoma de rata de Kirsten); SMAD2/4 (Madres contra el homólogo Decapentaplegico); TP53 (proteína tumoral).

### 2.1.3 Mecanismos de inducción de carcinogénesis colorrectal

La microbiota tiene un papel fundamental para mantener condiciones saludables en el colon, incluyendo la prevención del cáncer. En el intestino grueso, la microbiota tiene la oportunidad de fermentar de forma anaeróbica compuestos no absorbidos por el intestino delgado (carbono y proteínas). Los principales productos de la fermentación de hidratos de carbono son los AGCC, los cuales tienen la función de proporcionar energía a los colonocitos además de impedir atrofia celular y apoptosis en colonocitos normales y, por el contrario, en células cancerosas inhibe proliferación celular, induce apoptosis e inhibe angiogénesis. En contraste, los productos finales de la fermentación proteolítica incluyen compuestos fenólicos, aminas y amoníaco, los cuales pueden ser tóxicos para huésped (Manning y Gibson, 2004; Kim *et al.*, 2013).

Las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa, nitrorreductasas, azorreductasas e hidrolasas producidas por la microbiota están involucradas en el desarrollo del CRC mediante la generación de metabolitos carcinogénicos, revirtiendo compuestos inactivos a los metabolitos activos y su posterior efecto inductor de tumores (Lee *et al.*, 2013). Los efectos anti-apoptóticos de estos metabolitos carcinogénicos y la generación de especies reactivas al oxígeno (ERO) aumentan el riesgo de padecer CCR. Así mismo, los altos niveles de ácidos biliares fecales (FBA) se han asociado con un mayor riesgo de CCR en los seres humanos (Serban, 2014).

Los mecanismos generales de inducción de carcinogénesis se muestran en la Figura 2.2. En base a este esquema, los mecanismos anticarcinogénicos más ampliamente reportados corresponden al uso del probiótico *Bifidobacterium longum* (BF), los cuales incluyen: las alteraciones cuantitativas y cualitativas de la microbiota, inactivación de compuestos mutagénicos, carcinogénicos y genotóxicos, mejoramiento de la respuesta inmune, producción de compuestos antimutagénicos, producción de AGCC, efectos celulares antiproliferativos (apoptosis, capacidad de adhesión de células cancerígenas, inhibición de la tirosina cinasa, simulación de diferenciación celular e inhibición de proliferación celular, y decremento de células cancerígenas), entre otros (Serban, 2014).



**Figura 2.2.** Mecanismos de inducción de carcinogénesis en colon. TLRs–receptores tipo Toll; FBA–ácidos biliares fecales; ROS–especies reactivas de oxígeno; NOC–compuestos N-nitroso; ACF–fosas de criptas anormales (Modificada de Serban, 2014).

#### 2.1.4 Epidemiología del cáncer colorrectal (CCR)

El cáncer gastrointestinal (GI) es una enfermedad multifactorial, el cual podría relacionarse con la microbiota GI, alterando los perfiles y funciones durante la génesis de tumores y su crecimiento (Orlando *et al.*, 2013). El cáncer del tracto GI es un importante problema de salud, representando el 25 % de todos los cánceres y el 9 % de todas las causas de muerte por cáncer en el mundo. El CCR es el tercer cáncer más frecuente en todo el mundo (más de 1 millón de nuevos casos/año) y la cuarta causa más común de muerte por cáncer. A nivel mundial, la tasa de incidencia es de 46/100,000, una media de edad de aparición de 69 años, sobrevivida a 5 años de 64 % y un riesgo acumulado de 5 %. En México, en el 2008 se reportó una incidencia de 6,437 casos (5 %) y una mortalidad 4,009 casos (5.2 %); mientras que, el INEGI reportó 74,685 muertes por cáncer en 2010 (13 %

de las muertes en México) de las cuales 5.4 % son por CCR (Correa, 2012; Orlando *et al.*, 2013).

### **2.1.5 Morfología y función del colon**

El colon es el último tramo del tubo digestivo, tiene una longitud aproximada de 1.5 metros y se extiende desde el final del intestino delgado hasta el ano. El colon se describe en cuatro partes, el primer segmento está situado en la parte inferior derecha del abdomen, es donde desemboca el intestino delgado y se llama ciego. Desde aquí el colon asciende hasta llegar a la zona del hígado (colon ascendente) y atraviesa el abdomen (colon transverso). El colon se dirige posteriormente hacia abajo, denominándose colon descendente, hasta llegar a una zona denominada sigma que desemboca en el recto y finalmente en el ano que se abre al exterior por el esfínter anal a través del cual se eliminan las heces (Moore y Dalley, 2005; Simons *et al.*, 2010).

La función específica del colon ascendente y transverso consiste en absorber agua y electrolitos (sodio, potasio, entre otros), procedentes del quimo para formar heces sólidas; mientras que, la función del colon descendente y recto consiste en almacenar las materias fecales hasta su expulsión por el ano. Los movimientos del colon suelen ser muy perezosos. Los principales movimientos que presenta son segmentales, los cuales dan lugar a la formación de haustras, movimientos anti-propulsivos para favorecer la absorción y movimientos peristálticos de propulsión, vaciando el contenido a partir del colon trasverso (Simons *et al.*, 2010).

Cualquier factor que obstaculice el vaciamiento favorece la interacción de los productos de desecho con la microbiota, interviniendo en la biodisponibilidad de los mismos para su reabsorción; además de aumentar el tiempo de contacto de estos desechos con el epitelio lo que puede dañarlo y ser causa de padecer cáncer de colon (Moore y Dalley, 2005; Simons *et al.*, 2010).

Las criptas de Lieberkühn, localizadas en la mucosa del colon, no contienen vellosidades y casi no poseen enzimas, a diferencia de las del intestino delgado, predominando en el colon las células secretoras de moco, el cual proporciona un

medio adherente que mantiene unida la materia fecal, también protege la pared del colon frente a excoriaciones y actividad microbiana (Guyton y Hall, 2001).

## **2.2 Probióticos. Características y efectos**

En los últimos años, el campo de los probióticos ha experimentado un gran auge, lográndose avances científicos y clínicos que han permitido el desarrollo y comercialización de diversos productos debidamente contrastados. Paralelamente ha aumentado la demanda de probióticos por parte de unos consumidores cada vez más conscientes de la estrecha relación entre nuestra microbiota y la salud (Rodríguez, 2015). En 2001, la FAO y la OMS propusieron una definición de probiótico que desde entonces ha sido la más ampliamente aceptada en todo el mundo: “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador”.

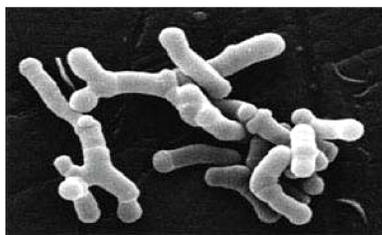
Los microorganismos utilizados como probióticos incluyen bacterias de los géneros *Lactobacillus spp* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *bulgaricus*, entre otros) y *Bifidobacterium spp* (*bifidum*, *breve*, *longum*, *lactis*, entre otros), así como algunas cepas de *Saccharomycesboulardi*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Escherichiacoli*.

El uso preferencial de Bifidobacterias es porque gozan del estatus GRAS (por sus siglas en inglés, Generally Recognized as Safe) de la FDA estadounidense; por otra parte, es uno de los organismos que más se han empleado en las pruebas de aptitud probiótica (Rodríguez, 2015).

### **2.2.1 *Bifidobacterium longum* (ATCC BAA-999).**

En el año 2002, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium suis* se unificaron en una sola especie, *Bifidobacterium longum* (BF), conservando los nombres de las especies anteriores mediante la creación de los tres biotipos *longum*, *suis* e *infantis*. En consecuencia, se interrumpió el uso de los nombres de las especies *B. suis* y *B. infantis* fue interrumpido. El reordenamiento taxonómico de BF se basó en hibridaciones de ADN-ADN y 16S

rRNA y análisis de la secuencia del gen Hsp60 donde BF fue descrito por Reuter (1963) para una cepa aislada de heces adultas en humanos. Ésta ha demostrado ser la especie más prevalente en el GIT de adultos humanos (Biavati *et al.*, 1984). Morfológicamente, BF se caracteriza por ser bacilos pleomórficos, de manera que pueden variar su morfología desde bacilos a formas ramificadas en “Y” o “V” (Figura 2.3), no móviles y Gram positivas. Las colonias son circulares, suaves, lisas, blancas de márgenes completos. Los cultivos líquidos son al principio turbios, después de 24-36 h se hacen claros con el sedimento dispersable por agitación. BF es una bacteria anaeróbica, catalasa-negativo, crecimiento óptimo de 38-39 °C (mínimo 19-20 °C y máximo 44.5-45 °C) y pH 7-8 pero sin crecimiento a pH menor de 5.0 ó 9.5. Manteniendo las condiciones anteriores, los azúcares fermentados por BF incluyen: arabinosa, xilosa, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa, melibiose y rafinosa. Mientras que, rhamnosa, melezitosa, celobiosa, trehalosa, dextrina, almidón, inulina, sorbitol, manitol, glicerol, salicina, gluconato y lactato no son fermentados por BF. En adición, BF no presenta crecimiento en los medios libres de carbohidratos. Los productos finales de la fermentación de la glucosa son el ácido láctico (LA) y acético (AA), en relación 1.0 (LA):1.7 (AA) a 1.0 (LA):2.0 (AA). Los extractos libres de células contienen fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa (enzima clave para su identificación fenotípica a nivel de género, debido a que son las únicas bacterias intestinales que son capaces de utilizar esta ruta metabólica) y aldolasa. El análisis bioinformático revela varios rasgos fisiológicos que podrían explicar parcialmente la adaptación exitosa de esta bacteria al colon (Reuter, 1963; Jiménez, 2011).

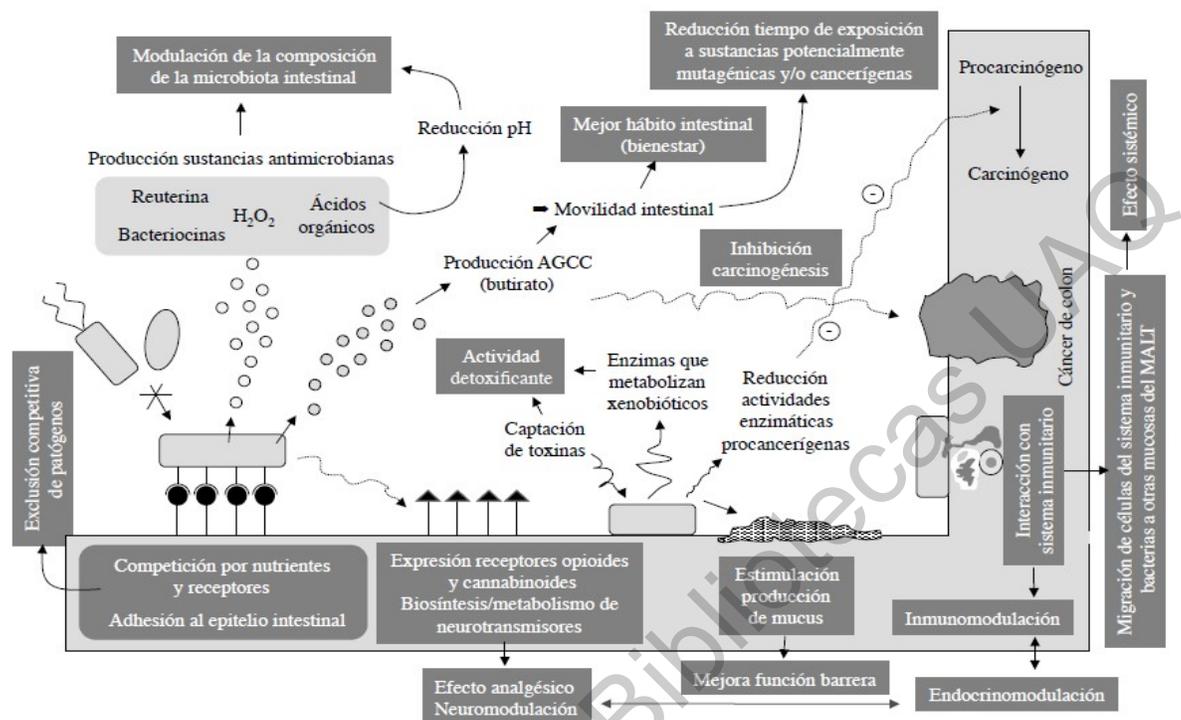


**Figura 2.3.** Imagen al microscopio de BF (Jiménez, 2011).

### 2.2.2 Efectos de BF en un hospedador

El efecto del probiótico se atribuye a la producción de ácido y bacteriocinas, la competitividad con patógenos y mejora del sistema inmunológico, presentando una ventaja en la producción de sustancias antimicrobianas, que permiten la exclusión competitiva de patógenos, así como la producción de AGCC y la estimulación de la síntesis de mucinas y determinados compuestos bioactivos, la neutralización o destoxificación de carcinógenos, inmunomodulación, endocrinomodulación y neuromodulación, entre otras (Figura 2.4) (Hardy *et al.*, 2013).

Los síntomas clínicos que tienen potencial de ser tratados con BF son: gastroenteritis, diarrea, síndrome de intestino irritable, enfermedades inflamatorias del intestino, función inmune deprimida, digestión inadecuada de la lactosa, alergias, infecciones con *Helicobacter pylori* y CCR. Algunos estudios epidemiológicos han enfatizado el hecho de que la administración de microorganismos probióticos podría tener efectos antiproliferativos o pro-apoptóticos sobre células cancerosas, como se observa en el Cuadro 1, donde se muestra un aglomerado de cepas probióticas y su efecto reportado en humanos (Jiménez, 2011; Páez, 2013). Las recomendaciones nutricionales en los últimos años proponen además el incremento del consumo de alimentos que contienen fitoquímicos, debido a que éstos también proveen efectos benéficos para la salud humana y juegan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas. Por lo anterior, se propone el estudio y administración del licopeno en interacción con BF (ATCC BAA-999) en un modelo *in vivo* para el estudio de CCR.



**Figura 2.4.** Efectos ejercidos por probióticos en un hospedador (Rodríguez, 2015). AGCC: ácidos grasos de cadena corta. MALT: Tejido linfóide asociado a las mucosas.

**Cuadro 1.** Efectos antiproliferativos/pro-apoptóticos de probióticos sobre células en humanos.

Cepas probióticas/productos relacionados	Células derivadas de cáncer de:				
	Colon	Estómago	Tórax	Cerviz	Mieloide
<i>Lactobacillus acidophilus</i> / <i>Lactobacillus casei</i> / <i>Bifidobacterium longum</i>	√	√	ND	ND	√
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ND	√	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> / <i>Lactobacillus paracasei</i>	√	√	ND	ND	ND
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	√	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus polyfermenticus</i>	√	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	√	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> / <i>Bifidobacterium lactis</i> 12	√	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> / <i>Bifidobacterium animalis subsp. Lactis</i>	√	ND	ND	ND	ND
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	ND	√	ND	ND	ND
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ND	ND	ND	√	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> / <i>Lactobacillus crispatus</i>	ND	ND	√	ND	ND
<i>Lactobacillus kefir (P-IF)</i>	ND	ND	ND	ND	√

ND: no reportado. Fuente: Ai-Qun y Lianqin, 2016.

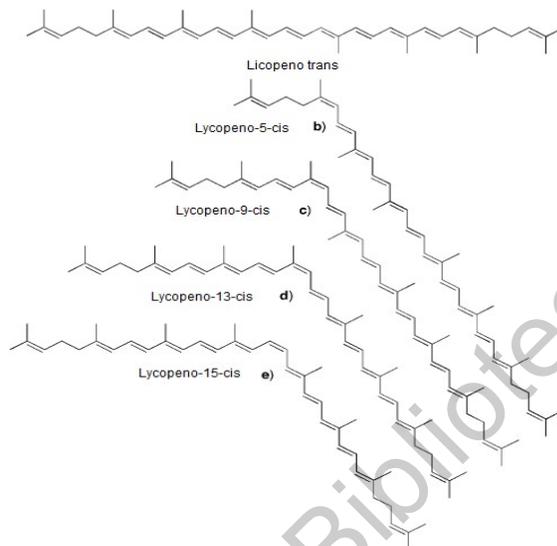
### 2.3 Licopeno (LYC)

El LYC es un carotenoide de estructura a cíclica, isómero del  $\beta$ -caroteno, que carece de actividad provitamina A (por no contar con el anillo de  $\beta$ -ionona), cuya fórmula es  $C_{40}H_{56}$ . Este caroteno cuenta con un sistema de doble enlace undecano conjugado largo, lo que da como resultado labilidad estérica (Figura 2.5). Se encuentra en la naturaleza como pigmento natural liposoluble responsable del color rojo y naranja de algunas frutas y verduras y se caracteriza por poseer una estructura química formada por cuarenta átomos de carbono con trece enlaces dobles de los cuales once son conjugados, por lo que es reactivo a la presencia de oxígeno. Una de sus fuentes principales es el tomate (80-90%), producto básico considerado saludable por su bajo contenido en kilocalorías y grasa, y contenido en fibra, proteínas, vitaminas E, A, C, y potasio. En los alimentos, el LYC se encuentra ligado a la matriz en su forma *trans*, lo que impide su liberación completa y lo hace menos susceptible para la digestión y absorción en el aparato digestivo humano. Se recomienda que para lograr un mejor aprovechamiento se consuma procesado, debido a que el procesamiento mediante el calor rompe las paredes celulares, debilitando las fuerzas de enlace entre el LYC y la matriz del tejido, lo que aumenta el área superficial disponible para la digestión debido a que el tratamiento térmico de la cocción transforma las formas isoméricas *trans* del LYC a *cis* (5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* y 15-*cis*) mejorando su biodisponibilidad (Figura 2.5 b – e) (Waliszewski y Blasco, 2010).

#### 2.3.1 Absorción y biodisponibilidad del LYC

Después de unos treinta minutos de su ingestión, el LYC se incorpora dentro de las micelas de los lípidos que forman parte de la dieta y se absorbe por difusión pasiva en la mucosa intestinal, donde se incorpora a los quilomicrones y luego se libera para ser transportado por las lipoproteínas de baja densidad y muy baja densidad (LDL y VLDL, respectivamente) a través del sistema linfático hacia el hígado y otros órganos (glándulas suprarrenales, próstata y testículos). Sólo entre el 10 y 30 % del LYC es absorbido, el resto se excreta en una cantidad que

depende de algunos factores biológicos y de estilo de vida tales como el sexo, la edad, la composición corporal, el estado hormonal, los niveles de lípidos en sangre, el consumo de alcohol y de tabaco, entre otros (Galhardo y Ferraz, 2009).



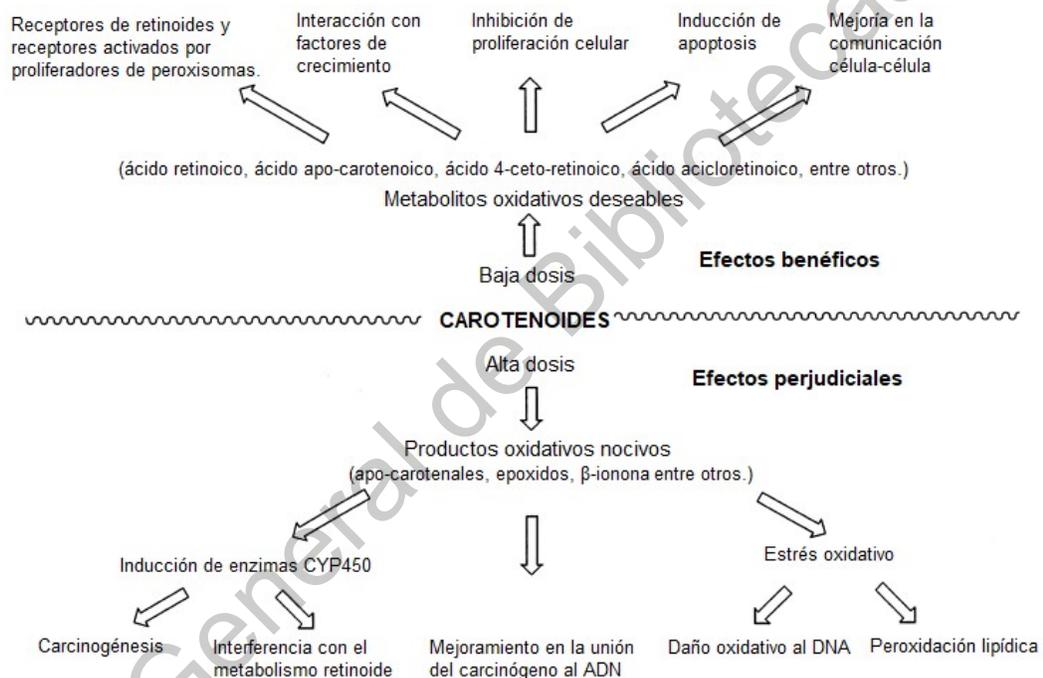
**Figura 2.5.** Isómeros mono-cis estéricamente impedidos del licopeno (LYC) (Wang, 2004).

### 2.3.2 Efectos biológicos del LYC

El mecanismo propuesto del papel del LYC en la prevención de enfermedades crónicas es el que se presenta en el esquema de la Figura 2.6. La ingesta de LYC ha mostrado actuar como un antioxidante, el cual puede atrapar especies reactivas de oxígeno (EROS) y reducir el estrés oxidativo y el peligro de oxidación de los componentes celulares, incluyendo lípidos, proteínas y ADN (Agarwal y Rao, 2000). Mientras que, el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ADN está implicado en el desarrollo de las enfermedades crónicas, tales como las cardiovasculares, el cáncer y la osteoporosis (Wertz *et al.*, 2004).

Respecto a los estudios reportados sobre los efectos del LYC en modelos *in vivo*, Dias y colaboradores (2010) evaluaron un tratamiento combinado con LYC y su interacción con *Bifidobacterium lactis* sobre biomarcadores tempranos en carcinogénesis colorrectal; las ratas macho Wistar recibieron una dieta que

contenía 300 mg kg<sup>-1</sup> de LYC y *Bifidobacterium lactis* más oligofruktosa, por un periodo de 2 semanas antes y durante el tratamiento carcinógeno con 1,2-dimetilhidrazina (DMH); el estudio reportó que el tratamiento con LYC y su interacción incrementó la apoptosis y el número de criptas aberrantes (ACs). Estos resultados indican que la combinación de prebiótico y el probiótico co-administrados en la fase de iniciación de la carcinogénesis del colon, pueden ejercer un factor positivo en la reducción de lesiones preneoplásticas.



**Figura 2.6.** Posible(s) mecanismo(s) de los carotenoides y sus metabolitos oxidativos (entre ellos LYC) sobre sus efectos beneficiosos y perjudiciales en la salud humana (Wang, 2004).

### 2.3.3 Efecto del LYC sobre el sistema insulínico/IGF

El factor IGF-1 y su receptor (IGF-1R) promueven tanto el crecimiento como la transformación maligna de pólipos adenomatosos. Aunado a lo anterior, IGF-1R se sobre expresa frecuentemente en las células cancerosas, lo que inhibe la apoptosis y mejora la progresión del ciclo celular (Han *et al.*, 2016). Se considera que las proteínas de unión a IGF (IGFBPs) inhiben y estimulan la interacción de

IGF-I con el receptor de IGF-I. Se ha reportado que la administración de suplementos de LYC disminuye significativamente la expresión tumoral de IGF-1 en ratas. Una menor concentración de IGF-1 respecto a IGFBP-3 se considera beneficiosa debido a que IGFBP-3 se une a IGF-1, impidiendo así que IGF-1 estimule la proliferación celular. En este sentido, tanto el LYC como los flavonoides quercetina, kaempferol y rutina, interfieren con la señalización de IGF-1 *in vitro*, evitando así que el factor de crecimiento estimule la proliferación celular (Siler *et al.*, 2004).

En lo que respecta al CRC, diversos estudios han examinado los efectos quimiopreventivos de los carotenoides, como la fucoxantina, el LYC y la luteína, así como la curcumina y su derivado tetrahidrocurcumina (THC) sobre el desarrollo de tumores inducidos con DMH. Se evaluó también la influencia sobre la proliferación de focos de criptas aberrantes (FCA) colónicas en términos de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). La reducción de ACs en ratón fueron significativos después del tratamiento con los carotenoides ( $79.9 \pm 34.7$ ) que en el grupo control ( $115.1 \pm 37.1$ ) (Kim *et al.*, 1998).

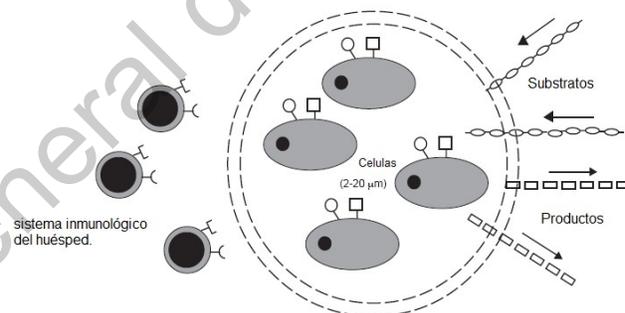
Investigadores han reportado que, la concentración plasmática de IGF-I disminuyó significativamente en alrededor de 25% posterior a la administración de extracto de tomate (LYC) a pacientes con cáncer de colon ( $n = 56$ , candidatos a colectomía), reclutados pocos días a unas pocas semanas antes de la cirugía, en comparación con el grupo tratado con placebo. No se observó cambio significativo alguno en la unión de IGFBP-3 con IGF-1 o con IGF-2; mientras que, la relación molar de IGF-I/IGFBP-3 disminuyó significativamente (Wal`sch *et al.*, 2007).

En general, la concentración y la relación entre los componentes del sistema IGF desempeñan un papel central en la progresión, diferenciación y proliferación del ciclo celular en el CCR. Por lo anterior, las técnicas de encapsulación están cobrando cada día más atención para proteger a los microorganismos probióticos y compuestos como el LYC, a fin de reducir la reactividad del núcleo en relación con el ambiente exterior (luz, oxígeno, agua y solventes), disminuir la evaporación o velocidad de transferencia del material del núcleo hacia el ambiente, promover

un manejo más fácil del material del núcleo como prevenir agregación, convertir un líquido en una forma sólida, controlar la liberación del material del núcleo (proporcionando una liberación sostenida y controlada), alterar las propiedades de superficie del material, enmascarar o conservar sabores y aromas, entre otras (Hill *et al.*, 2014).

## 2.4 Microencapsulación

La encapsulación es el proceso de formación de un revestimiento continuo alrededor de una matriz interna. Una microcápsula está constituida por una película fuerte, delgada, esférica y semipermeable, posee un rango que comprende desde varios sub-micrones a varios milímetros en tamaño (Figura 2.7). El tamaño de los microorganismos probióticos (1-20  $\mu\text{m}$ ) elimina la posibilidad de emplear nanotecnologías en su encapsulación. Es por ello que de manera general se realiza la microencapsulación de probióticos (De Vos *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2014).



**Figura 2.7.** Principio de encapsulación: aislamiento de células del sistema inmune del huésped permitiendo el transporte de metabolitos extracelulares (Hill *et al.*, 2014).

La liberación del compuesto bio-activo se puede producir mediante diversos mecanismos, como ruptura mecánica de la pared de la cápsula, disolución de la misma, fusión de la pared o difusión del contenido a través de la pared (Rokka, 2010). La tecnología de encapsulación se ejecuta normalmente en tres etapas: la incorporación del compuesto bio-activo (núcleo) mediante disolución o dispersión (en una matriz líquida) o aglomeración o adsorción (matriz sólida), la dispersión de la matriz líquida y por último la estabilización mediante procesos físicos

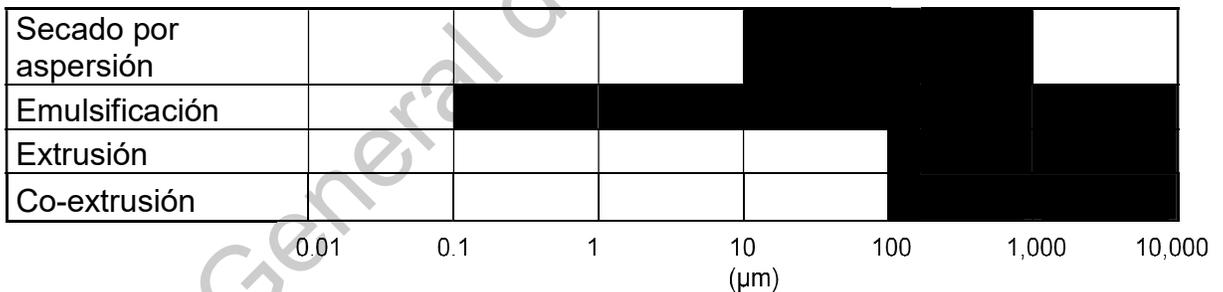
(evaporación, solidificación), químicos (polimerización), o fisicoquímicos (gelificación) (Burgain *et al.*, 2011).

#### 2.4.1 Principales técnicas en encapsulación probiótica: ventajas y desventajas

Existen una gran variedad de métodos de encapsulación aplicables en diversos campos: medicina, industria alimentaria, industria farmacéutica, agricultura, cosmética, entre otros. Los métodos de mayor aplicación se clasifican a continuación (Pérez *et al.*, 2013), donde cada tecnología de encapsulación genera microcápsulas de diferentes tamaños y tipos (Figura 2.8) (Páez, 2013).

- Métodos físicos: Secado por aspersión, aspersión con enfriamiento, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión, co-extrusión, extrusión, fusión y co-cristalización.

- Métodos físico-químicos: Coalescencia, inclusión molecular, encapsulación por liposomas, entre otros.



**Figura 2.8.** Rango de tamaños de cápsulas por tecnología de encapsulación (Páez, 2013).

El método de extrusión consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado forzando el paso de una solución a través de una aguja en los dispositivos generadores de goteo. Los microorganismos se adicionan a una solución hidrocoloide, cuya suspensión se hace gotear sobre una solución de endurecimiento, la cual va a variar en dependencia del material empleado, mientras menor sea el diámetro de la aguja o boquilla menor será el tamaño de las cápsulas (De Vos *et al.*, 2010).

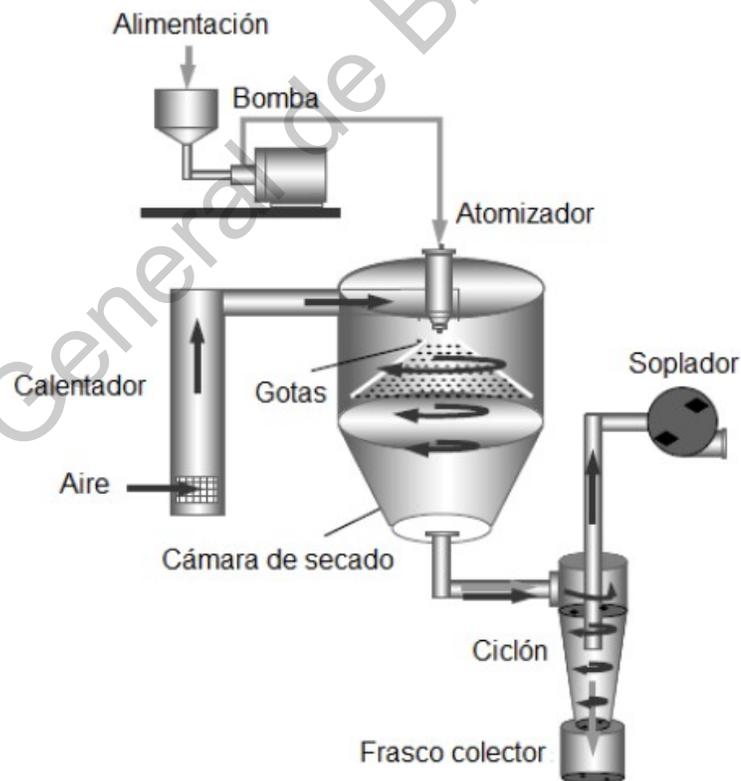
En contraparte, el método de emulsión utiliza una fase dispersa que consiste en un volumen pequeño de una solución polimérica con células microbianas en suspensión, el cual se añade a un volumen mayor de aceite vegetal (aceite de soya, girasol o maíz) para formar la fase continua y esta mezcla se homogeniza hasta desarrollar una emulsión de agua en aceite. El polímero hidrosoluble en esta emulsión se hace insoluble, producto del entrecruzamiento estructural, para formar las cápsulas dentro de la fase oleosa (Jiménez, 2011).

Al respecto, se ha publicado el empleo de una solución de cloruro cálcico cuando el polímero es alginato y el entre cruzante cloruro potásico para el polímero  $\kappa$ -carrageno (De Vos *et al.*, 2010). Este método presenta desventajas debido a que el aceite residual presente en las cápsulas perjudica la textura y propiedades organolépticas del alimento; además, el aceite residual, los emulsionantes y surfactantes pueden ser tóxicos para determinadas células (Jiménez, 2011). A diferencia de las anteriores, una técnica óptima es la de secado por aspersión, la cual consiste en atomizar aire caliente (un recipiente con una sola boquilla de fluido) directamente en una suspensión o emulsión homogenizada de probióticos en la matriz del material encapsulante, para lograr una rápida evaporación del solvente (agua) y obtener los probióticos encapsulados en forma de partículas de polvo (Figura 2.9). El disolvente es comúnmente un hidrocoloide como gelatina, goma vegetal, almidón modificado, dextrina o proteína no gelificante (Cal, 2010; Furuta *et al.*, 2011). Esta técnica permite establecer un proceso continuo, su facilidad de manejo y su bajo costo son características idóneas. La mayoría de los autores de estos artículos señalaban un mayor daño a las bacterias probióticas y, por lo tanto, una reducción notable en el número de células viables cuando la temperatura de salida del secador es más elevada (Espina y Packard, 1979; Gardiner *et al.*, 2000; Desmond *et al.*, 2002; Fávaro-Trindade y Grosso, 2002; Lian *et al.*, 2002; Mosihiley, 2003). Por lo tanto, existen dos factores determinantes para el éxito de la técnica: tipo de materiales utilizados para encapsular y proteger a los microorganismos probióticos que involucran sus propiedades físico-químicas y la optimización de los parámetros utilizados en el

secado. Adicionalmente, se ha demostrado una mayor estabilidad de los cultivos probióticos encapsulados durante el almacenamiento prolongado (Rokka, 2010).

#### 2.4.2 Secado por aspersión: sobrevivencia probiótica

El proceso de secado (Figura 2.9) puede causar daño a las células y disminución de la viabilidad debido al estrés mecánico y térmico (por las temperaturas elevadas), la presión osmótica y las fuerzas capilares (por la eliminación de agua), el estrés oxidativo (por el contacto con el oxígeno del aire y el incremento del pH intracelular) y la concentración de sales (por la pérdida de agua). Estos daños se traducen en la reducción de la velocidad del metabolismo bacteriano o su detención por completo, después de los cuales las bacterias entran en estado latente (Paéz, 2013). Sin embargo, los tiempos de residencia en los cuales están en contacto los probióticos con el calor son a razón de segundos.



**Figura 2.9.** Diagrama sistemático: encapsulación del secado por aspersión (Furuta *et al.*, 2011).

En un estudio realizado por O’Riordan y colaboradores (2001) se demostró un método válido para la encapsulación de Bifidobacterias con almidón modificado, observándose que éstas eran muy sensibles a las altas temperaturas de entrada. Temperaturas por encima de los 60 °C daban como resultado un secado deficiente y con frecuencia una acumulación de productos pegajosos en el ciclón; mientras que, temperaturas de entrada mayores a 120 °C estaban asociadas con altas temperaturas de salida (>60 °C) y con una reducción significativa de la viabilidad de las Bifidobacterias encapsuladas. En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre la optimización del secado por aspersión aplicado a los probióticos, tratando de modificar los parámetros del proceso para mejorar los rendimientos de células viables en los polvos (Cuadro 2) (Paéz, 2013).

**Cuadro 2.** Tasas de sobrevivencia para *Lactobacillus* y Bifidobacterias.

Microorganismo	Supervi- vencia (%)	T° salida	T° entrada	Solución alimentación	Observación	Referencia
<i>B. breve</i> / <i>B. longum</i>	25.67/1.44	80	180	DWPI	Tamaño de partícula 3–75 µm	Picot and Lacroix, 2004
<i>Bifidobacterium spp</i>	12-80	85-90	170	LPD (20 % p/v) ó PLD (10 % p/v) y goma acacia (10 % p/v)	HR: 2.7-4.2 %	Simpson <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactobacillus plantarum</i> CFR 2191/ <i>Lactobacillus salivarius</i> CFR 2158/ <i>Pediococcus acidilactici</i> CFR 2193	80/90	40	140	LPD (10 % p/p) ó maltodextrina (10 % p/p)		Reddy <i>et al.</i> , 2009
<i>Lactobacillus kefir</i> CIDCA 8348/ <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114/ <i>Saccharomyces lipolyti</i> ca CIDCA 812	2/10/0.52	70-85	180	LPD al 11 % p/v	Aw de 0.22 a 0.44	Golowczyc <i>et al.</i> , 2010
<i>L. acidophilus</i>	69.9±4.3	80	180	Maltodextrina/gluco sa	Tamaño de partícula 10.96±0.63 µm	Behboudi- Jobbehdar <i>et al.</i> , 2013

**BetL:** Transportador secundario, glicina betaína. **MSG:** Glutamato monosódico. **RSM:** Leche reconstituida descremada. **LPD:** Leche descremada en polvo. **HR:** Humedad residual. **Aw:** actividad de agua. Fuente: Paéz, 2013.

### 2.4.3 Efecto de la composición de la matriz en el encapsulamiento de secado por aspersión sobre la sobrevivencia probiótica

Un factor importante para la sobrevivencia de bacterias probióticas es el sustrato o matriz con el que se vehiculan. Durante el secado por aspersión los soportes líquidos tienen dos mecanismos protectores sobre las células. Uno de ellos consiste en actuar como una coraza, aliviando el estrés térmico y osmótico durante el secado, así como el estrés osmótico durante la rehidratación. El otro mecanismo implica la capacidad de algunos compuestos de reaccionar y estabilizar las estructuras celulares durante los procesos de secado y rehidratación (Peighambardoust *et al.*, 2011). A continuación, se enlistan las características principales de diferentes materiales usados para el encapsulamiento, su asociación en la unión con otros materiales encapsulantes e investigaciones en el uso de éstas (Pérez *et al.*, 2013):

- **Alginato de sodio:** Polisacárido aniónico, formado por residuos de los ácidos  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico. Sus ventajas son que forman fácilmente matrices alrededor de las células de probiótico, seguro, biocompatible con el organismo, económico y flexible en solución. Tiene un aumento de la viscosidad dependiente del número de unidades monoméricas. Sus desventajas son la susceptibilidad al ambiente ácido, pérdida de integridad y estabilidad mecánica, formación de poros en la superficie de la cápsulas y difusión relativamente rápida de la humedad. Posee compatibilidad al unirse con compuestos poliméricos como el almidón y quitosano. Al modificar su estructura con varios aditivos (glicerol) (Krasaekoopt *et al.*, 2006). Rodrigues y colaboradores (2011) evaluaron alginato, quitosano, goma xantana, proteína aislada de leche, carragenina y acetato de celulosa a 2 concentraciones (2 y 4 %) con *L. acidophilus*, *B. animalis* y *B. lactis*, mostrando que las matrices de alginato son las que poseen una alta biocompatibilidad, inmovilización y viabilidad de los probióticos.
- **Almidón:** Constituido por unidades de  $\alpha$ -D-glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos, en una proporción de 25 % de amilosa y 75 % de amilopectina.

Algunas de sus ventajas son que, la amilosa forma una cubierta que es resistente a los ácidos gástricos y a las enzimas pancreáticas; almidones con alto contenido de amilosa forman películas fuertes, resistentes y más flexibles; presenta adherencia de las células probióticas al almidón granular, logrando llegar al colon donde es fermentado. Sus desventajas son que es difícil de dispersar en agua y puede gelificar muy rápidamente (Krishnan *et al.*, 2005). La técnica de secado por aspersión posee compatibilidad al unirse con alginato de sodio, maltodextrinas y ciclodextrinas. Crittenden y colaboradores (2006) utilizaron 19 cepas del género BF, demostrando que estas cepas son capaces de adherirse a un tipo de almidón de maíz alto en amilosa.

- **Almidón fosfatado:** En la modificación del almidón, el fósforo se encuentra unido mediante enlaces covalentes. El entrecruzamiento se realiza con reactivos multifuncionales capaces de formar enlaces éter o éster con los grupos hidroxilos del almidón. Posee buenas propiedades emulsificantes y de estabilidad a proceso de congelamiento-descongelamiento; resistente a hidrólisis exhaustiva, *in vitro* con  $\alpha$ -amilasa; escapa a la digestión en el intestino delgado, puede comportarse como sustrato de fermentación y promover el crecimiento de microorganismos probióticos del género BF (Brown *et al.*, 1996). Posee compatibilidad al unirse con alginato de sodio y maltodextrinas. Durante la fosfatación el pH es un factor significativamente representativo para la determinación de la proporción de enlaces mono o diéster formados, según lo reportado por Lim y Seib (1993).
- **Goma arábica:** Mezcla de polisacáridos, formada por una cadena principal de  $\beta$ -D galactopiranosilo. Sus ventajas son que la viscosidad de las soluciones varía fuertemente con el tipo de goma arábica, pH y la fuerza iónica; alcanzando una viscosidad máxima a pH entre 6 y 7; coloide protector y excelente emulsificador. Su principal desventaja es que el polímero es extremadamente soluble en agua. Posee compatibilidad al unirse con maltodextrinas (Krishnan *et al.*, 2005). Rascon y colaboradores (2011) utilizaron la goma arábica para retener y estabilizar carotenoides de paprika,

por el método de secado por aspersión, mostrando que un polvo con una  $A_w$  de 0.274 posee la máxima estabilidad al prevenir la oxidación de los carotenoides.

- **Malto-dextrinas:** Se elaboran por métodos de hidrólisis ácida o enzimática de los almidones (oligómeros de glucosa de 5 a 10 unidades). Se caracterizan por ser inodoras, incoloras y baja viscosidad a alta proporción de sólidos. Permiten la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original. Sin embargo, el grado de hidrólisis es un factor a considerar, debido a que equivalentes de dextrosa muy bajos no tienen el efecto positivo del encapsulamiento (Krishnan *et al.*, 2005). Poseen compatibilidad al unirse con goma arábiga. Lim y Seib (1993) microencapsularon oleoresina de cardamomo utilizando mezclas binarias de goma arábiga (GA), maltodextrina (MD) y almidón (AL), encontrando que las mezclas de GA:MD 75:25 y 25:75 fueron las que presentaron una mejor estabilidad en comparación con la relación AL:MD 75:25 durante 6 semanas.
- **Caseína:** Conjunto heterogéneo de aminoácidos, principalmente fosfoproteína, en la fase soluble asociada al calcio (fosfato de calcio), en un complejo que se ha denominado caseínogeno. A un pH de 7, las micelas de caseína se encuentran muy hidratadas. Sus desventajas son que se desestabilizan por la acidez (bajando el pH se van desestabilizando los enlaces entre los grupos fosfato y el ion calcio), y por la proteólisis de la caseína  $\kappa$  en el tratamiento con quimosina, la caseína  $\kappa$  pierde por proteólisis su región hidrófila, dirigida hacia el exterior de las micelas. La reducción de la hidrofobicidad facilita la agregación. La caseína se utilizó como agente encapsulante para proteger aceites esenciales (canela y jengibre) del vapor de agua y la oxidación; sin embargo, no fue posible mejorar su estabilidad (Atarés *et al.*, 2010).

La viabilidad de las bacterias probióticas es altamente dependiente del tipo y concentración de la matriz encapsulante usada y varía con la cepa. Existe una concentración por encima de la cual la viabilidad es afectada. Es decir, al pasar de 10 a 20 % de almidón soluble o goma arábica existe una reducción en la sobrevivencia (Peighambardoust *et al.*, 2011). Según Atarés y colaboradores (2010), las combinaciones de una fuente de proteínas con carbohidratos se utilizan para proporcionar una matriz de encapsulación compatible (leche descremada en polvo, maltodextrina y goma arábica).

La formulación del alimento con un rango de pH adecuado y alta capacidad amortiguadora puede incrementar el pH del tracto gástrico y, por lo tanto, la estabilidad del probiótico. Desde hace varios años se trabaja activamente en sistemas que permitan la máxima protección de las cepas probióticas durante su paso por el estómago y el duodeno, de tal manera que este criterio no suponga una limitación real (Rodríguez, 2015). Como material de encapsulación de microorganismos probióticos normalmente se emplean polisacáridos de diferente origen: algas marinas (k-carragenato, κ-carrageno y alginato), plantas (almidón y sus derivados, goma arábica), animales (quitosano) o bacterias (galano y xantano), y proteínas animales (leche, concentrados de proteínas de suero y gelatina) (De Vos *et al.*, 2010). Yang y colaboradores (2010) reportaron la incorporación de oligofruktosa en formulaciones probióticas permitiendo una sobrevivencia mayor al 60 % de *Lactobacillus* y del 100 % de *Bifidobacterium lactis*.

#### **2.4.4 Efecto de las propiedades fisicoquímicas, térmicas, mecánicas y dinámicas de microencapsulados en la industria**

Los materiales de encapsulamiento poseen un excelente potencial para la aplicación industrial alimentaria, puesto que sus características físicas (grado de hidratación, porosidad, densidad de entrecruzamiento, resistencia mecánica, entre otros) pueden alterarse y controlarse fácilmente, con el fin de modificar la velocidad de liberación de un antioxidante, prebiótico y probiótico determinado debido a su principal función de estos microencapsulados como vehículos para

inmovilizar, encapsular y liberar de manera controlada un gran número de sustancias con actividad fisiológica (Katime *et al.*, 2004).

Una de las maneras de evaluar la calidad de un producto alimenticio es a través de la caracterización reológica, la cual es correlacionada con la textura, los atributos sensoriales y los cambios microestructurales que tienen lugar en los productos alimenticios (Fangary, 1999; Karoui, 2003). Existen varias razones para justificar el estudio del comportamiento reológico de los alimentos, entre las cuales se encuentran la contribución al conocimiento de la estructura de los alimentos, control de procesos y ayuda al diseño de máquinas (Méndez, 2001).

En reología, los métodos para determinar las funciones viscoelásticas lineales son estáticos y dinámicos, los cuales se caracterizan por ser de bajo esfuerzo o deformación. En los ensayos reológicos dinámicos se aplica de forma oscilatoria una velocidad de corte sobre un material y se mide la respuesta del esfuerzo y del ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación. Esta prueba corresponde al estado de la viscoelasticidad lineal (Barnes, 2000). Para el caso de un sólido elástico la onda está en fase con la velocidad de corte aplicada. En el caso de un líquido ideal existe un desfase de  $90^\circ$ ; mientras que, en los fluidos viscoelásticos el ángulo de desfase comprende entre  $0$  y  $90^\circ$  (Munizaga y Cánovas, 2005).

Los parámetros reológicos, en general, pueden verse afectados por el crecimiento de las bacterias utilizadas durante la fermentación; debido a que, en esta etapa se producen cambios en la composición nutricional de, por ejemplo, un producto lácteo fermentado (consumo de lactosa y producción de ácidos) originándose metabolitos tales como acetaldehído, diacetilos, ácido láctico y otros compuestos orgánicos que contribuyen con las características sensoriales de un producto alimenticio fermentado, pero afectando la viabilidad de la bacteria de interés, conllevando a una disminución en las actividades enzimáticas de la bacteria probiótica por efecto de la acumulación de dichos metabolitos (González *et al.*, 2014).

La sobrevivencia de probióticos ácido lácticos (Krasaekoopt y Watcharapoka, 2014) depende de las condiciones de estrés ambiental tales como producción de peróxidos, producción de ácido láctico y acético, disponibilidad de nutrientes y temperatura de incubación (Gregurek, 1999). Otro aspecto importante es la velocidad de liberación de la sustancia deseada o bien, la difusividad efectiva del sistema, el cual está prácticamente controlado por las propiedades del polímero; por otra parte, existen otros factores de menor influencia, tales como el pH del medio en el que se va a realizar la liberación. Teniendo en cuenta estos factores, es posible conseguir sistemas de liberación que actúen lentamente y de forma continua durante largos periodos de tiempo. Para que la sustancia a liberar alcance el lugar deseado, en primer lugar, se tiene que producir la difusión de la misma desde la superficie de su transportador hasta el medio que lo rodea y a partir de ahí alcanzará el lugar sobre el que deberá ejercer su efecto (González *et al.*, 2014), en otras palabras, resultado del fenómeno de difusión en el polímero y de restricciones de transferencia de masa en la interface polímero-líquido.

Una de las tareas más laboriosas en el campo de la tecnología de la liberación controlada reside en el desarrollo de formulaciones de polímeros (tipo matriz) capaces de liberar probióticos a velocidad constante durante un tiempo determinado. Una aproximación es la utilización de polímeros hidrófilos que presenten la capacidad de hincharse en un medio acuoso, sin disolverse, y de liberar el probiótico disuelto o disperso en ellos, proporcionando una velocidad prácticamente constante. La migración del probiótico al medio acuoso desde un sistema de esta naturaleza, implica un proceso de absorción de agua o fluido biológico y otro proceso simultáneo de desabsorción del probiótico, mediante un mecanismo de difusión, controlado por el hinchamiento que sufre el material polimérico. Los sistemas poliméricos de liberación de probióticos se pueden clasificar según la forma de incorporación del probiótico, distinguiéndose transportadores químicos y físicos (Katime *et al.*, 2004).

En el caso de sistemas con unión física entre el polímero y el agente bioactivo, los tipos más representativos en función del mecanismo de actuación son los sistemas controlados por difusión, bien en depósitos o reservorios (películas), en matrices (monolíticos) y aquellos sistemas controlados por el disolvente (sistemas osmóticos y sistemas controlados por hinchamiento). En los sistemas controlados por difusión, la cantidad de producto bioactivo que llega a una zona determinada de aplicación se controla mediante un fenómeno de difusión del compuesto: directamente a través de la estructura molecular del polímero o a través de macro o microporos. Sin embargo, el caso más frecuente es una combinación de ambos mecanismos (Katime *et al.*, 2004).

Los sistemas con un núcleo interno que contiene el probiótico consisten en un núcleo de agente activo rodeado por una película delgada, homogénea y no porosa. El principio activo está contenido dentro de una capa de polímero, la cual puede hincharse o no en el medio biológico donde se aplica. El transporte del probiótico al exterior se da por la disolución del soluto en la interface soluto-polímero y su posterior difusión hacia el exterior a través de la película (Katime *et al.*, 2004). En el sistema de matrices o dispositivos monolíticos, el compuesto bioactivo se encuentra uniformemente distribuido en un soporte de polímero sólido. El probiótico puede encontrarse disuelto en la matriz polimérica o disperso, si su contenido es mayor que el límite de solubilidad. La migración del probiótico al medio se produce por difusión molecular a través del soporte o por difusión a través de microporos existentes en la matriz polimérica (Katime *et al.*, 2004).

Los sistemas controlados por el disolvente son matrices poliméricas o sistemas con depósito donde la liberación es controlada por la penetración de un disolvente, vía ósmosis o hinchamiento. Por su parte, los sistemas controlados por hinchamiento son sistemas monolíticos en los que el compuesto activo se encuentra disuelto o disperso en un soporte de polímero hidrófilo, entrecruzado o no, el cual se hincha sin disolverse cuando se pone en contacto con un medio acuoso. En estos sistemas el grado de hinchamiento (y, por tanto, la cantidad de

probiótico liberada) depende del balance hidrófilo/hidrófobo de la matriz polimérica y del grado de entrecruzamiento (Katime *et al.*, 2004); mientras que, los sistemas osmóticos son sistemas compuestos por un núcleo de probiótico rodeado por una película polimérica selectiva al agua, donde la película permite el paso del agua, pero no el del probiótico. La película polimérica presenta una pequeña apertura a través de la cual se libera el probiótico como consecuencia del aumento de la presión hidrostática (Katime *et al.*, 2004).

Temperaturas altas generan menor densidad volumétrica. La densidad volumétrica está estrechamente relacionada con el tamaño de partícula y sus dimensiones, un mayor número de partículas pequeñas permite reducir los espacios entre las partículas; de acuerdo a ello, las bajas densidades volumétricas asociadas a altas temperaturas de secado se deben al incremento del tamaño de partículas (Goula *et al.*, 2004). Diferentes estudios han verificado que altas temperaturas de secado obtienen partículas de gran tamaño, resultando en menor densidad volumétrica (Cai y Corke, 2000; Tonon *et al.*, 2011). La influencia del contenido de sólidos en la emulsión de alimentación al secador se encuentra directamente asociada con su viscosidad (Reineccius, 2004); ésta puede influir en la atomización, alterando la velocidad de formación de una película semipermeable alrededor de las gotas durante el secado.

Por lo mencionado anteriormente, la microencapsulación puede utilizarse para disminuir las pérdidas celulares durante el procesamiento de alimentos, así como reforzar la viabilidad de las bacterias de interés (Capela, 2006). Aunque existen estudios sobre la microencapsulación de bacterias ácido lácticas (Shoji, 2013), no existe información concerniente al uso de mezclas de polisacáridos aniónicos como agentes encapsulantes, sin ser incorporados en sistemas alimentarios evaluando los cambios reológicos y fisicoquímicos que tengan lugar por efecto de la microencapsulación.

#### 2.4.5 Productos alimenticios: sobrevivencia probiótica.

Los productos que contienen probióticos presentan retos únicos para los fabricantes, debido a que sus cultivos activos se ven considerablemente reducidos antes de que el consumidor los ingiera. En el Cuadro 3 se observan las diferentes categorías de alimentos propuestas para la adición de BF (ATCC BAA-999). Diferentes factores afectan la sobrevivencia de *Bifidobacterium spp.* en los alimentos lácteos; éstos incluyen el tipo de cepa, pH, presencia de peróxido de hidrógeno, atmósfera de almacenamiento, concentración de metabolitos tales como los ácidos láctico y acético, oxígeno disuelto y la presencia de amortiguadores tales como las proteínas de suero de leche (Lakkis, 2007; Espinoza, 2008; Jiménez, 2011). Para garantizar su eficacia y su capacidad para inducir en el hospedador sus efectos benéficos una vez que se encuentra en la formulación final, se sugiere un “mínimo terapéutico” de  $10E+07$  células  $mL^{-1}$  de probióticos viables recomendado como dosis terapéutica mínima (Páez, 2013).

Aunado a lo anterior, la microencapsulación promueve la viabilidad de los microorganismos en productos; sin embargo, existen investigaciones que reportaron matrices de encapsulamiento conformada por leche descremada reconstituida, las cuales no proporcionaron protección a *Lactobacillus paracasei*, en condiciones gastrointestinales, en un rango de temperaturas entre 4-30 °C por 4 semanas; en comparación con los microencapsulados de *Lactobacillus paracasei* compuestos por goma arábica, reportando una sobrevivencia 20 veces mayor. En contraparte, en el queso se reportó una viabilidad aceptable del encapsulamiento de BF y *L. paracasei* mantenida por 6 y 3 meses, respectivamente (Desmond *et al.*, 2002). Otro de los productos analizados son los postres congelados, en los cuales se ha observado sobrevivencia de probióticos sin afectar las características sensoriales.

**Cuadro 3.** Categorías de alimentos propuestas para la adición de BF

<b>Clasificación</b>	<b>Producto</b>
<b>Productos de panadería</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Barras</li><li>· Galletas</li><li>· Panes/rollos (levadura)</li><li>· Pasteles</li></ul>
<b>Cereales</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Cereales de desayuno, cocinados; Incluye granos, avena, crema de trigo, cereales de trigo</li><li>· Pastas para queso</li><li>· Queso procesado</li><li>· Crema y sustitutos de crema</li></ul>
<b>Productos lácteos y sustitutos lácteos</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Leche fermentada; Incluye el suero de leche</li><li>· Postres congelados; incluye helado, leche helada, yogurt congelado, novedades congeladas, batidos de leche</li><li>· Fórmula de seguimiento para lactantes</li><li>· Leche pura y aromatizada; Incluye cacao, leche con chocolate, leches de frutas, bebidas de café</li><li>· Batidos y coberturas</li><li>· Yogurt</li><li>· Jugos y néctares; incluye cítricos, no cítricos, vegetales y</li></ul>
<b>Productos de frutas</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· mezclas</li><li>· Frutas congeladas</li><li>· Barras de jugo congeladas, helados</li><li>· Dulces; incluye caramelos duros, mentas, chocolate.</li><li>· Polvo de cacao</li><li>· Jarabes de bebidas aromatizadas</li></ul>
<b>Diversos</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Salsas</li><li>· Margarina</li><li>· Mantequilla de cacahuete y otras nueces</li></ul>

Fuente: GRAS, 2008.

## 2.5 Modelo de cáncer de colon

El empleo de modelos animales permite estudiar diversas muestras, tejidos y órganos a los que es imposible acceder en ensayos clínicos humanos, por lo que siguen siendo “imprescindibles para determinar mecanismos de acción y marcadores biomédicos”. La sobrevivencia de los probióticos se puede estudiar *in vivo* usando técnicas de intubación intestinal, biopsias del colon, velocidad de degradación gastrointestinal, translocación positiva/negativa a través de la pared intestinal, entre otras, recurriendo a técnicas moleculares que permitan reconocerlas entre los miembros de la microbiota autóctona. Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) son un grupo de trastornos gastrointestinales crónicos que se caracterizan por la reincidente inflamación del tracto gastrointestinal.

Existen numerosos modelos experimentales para las EII en animales pequeños, incluida la colitis aguda en cepas de ratones susceptibles, animales modificados genéticamente, y modelos de colitis inducidos químicamente (Elson *et al.*, 2005). Uno de los modelos más utilizados de inflamación intestinal crónica es la colitis inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS) en roedores (Geier *et al.*, 2007). La colitis inducida por DSS se caracteriza por diarrea con sangre, ulceraciones e infiltración intensa de células inflamatorias en la mucosa, muy probablemente como consecuencia de la interrupción de la barrera epitelial por DSS (Elson *et al.*, 2005). Además, la microbiota intestinal muestra alteraciones prominentes durante la colitis inducida por DSS (Gkouskou *et al.*, 2014).

Varias cepas de Bifidobacterias han mostrado prometedores efectos antiinflamatorios (Heuvelin *et al.*, 2009; Veiga *et al.*, 2010). Una de estas cepas es BF, que inicialmente se aisló de las heces de un lactante alimentado con leche materna. La adhesión a células epiteliales intestinales se discute como una característica que apoya la colonización y la persistencia de Bifidobacterias en el tracto gastrointestinal (Philippe *et al.*, 2011) y, por lo tanto, es uno de los criterios de selección para probióticos. Referente al cáncer GI, si el probiótico microencapsulado se administra antes del carcinógeno o a sus inicios, se obtienen

mejores resultados. Sin embargo, hay una zona gris o no definida entre la prevención y primeras etapas del CCR, lo que podría beneficiarse del tratamiento con cepas de probióticos seleccionados. Las bacterias *BF longum*, *BF lactis*, *L. acidophilus*, *L. casei Shirota*, *Bacillus polyfermenticus* y *L. plantarum*, han sido eficaces en la disminución de la incidencia de tumores; algunos de estos microorganismos también inducen efectos anti-inflamatorios, lo que resulta de gran relevancia debido al papel que juegan los procesos inflamatorios en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, entre otras (Rodríguez, 2015).

Wu y colaboradores (2016) reportaron efectos positivos al utilizar *Bifidobacterium 536* sobre el establecimiento de una microbiota intestinal saludable en recién nacidos, así como la mejora de la respuesta inmunitaria. Lee y colaboradores (2007) observaron que la administración *Bacillus polyfermenticus* vía oral inhibe la aparición de células cancerosas en el colon de Ratas machos F344 en base al desarrollo de ACs preneoplásicas. Baldwin y colaboradores (2010) demostraron que la combinación de *L. acidophilus* y *L. casei* logró sensibilizar células tumorales colorrectales a la apoptosis inducida por el compuesto 5-fluorouracilo. La co-administración de 4 probióticos, entre los que se incluyeron *Pediococcus pentosaceus FP3*, *Lactobacillus salivarius FP25*, *L. salivarius FP35* y *Enterococcus faecium FP5*, disminuyó la capacidad de adhesión de las células de cáncer de colon y aumentó en la producción de AGCC (Thirabunyanon *et al.*, 2013). Se han usado una variedad de agentes químicos para inducir tumores de colon en animales. Éstos se clasifican como agentes directos e indirectos, de acuerdo con el requisito de biotransformación enzimática para formar la especie reactiva definitiva. A diferencia de los agentes de acción directa, los carcinógenos que actúan indirectamente requieren acción enzimática para convertirse en las especies activas que pueden alterar las macromoléculas celulares tales como el ADN y las proteínas. Dentro de los químicos utilizados para inducir cáncer de colon se encuentra la DMH y su metabolito azoximetano (AOM), la metilnitrosourea y el 2-amino-1-metil-6,6-fenilimidazol-(4, 5-b)-piridina (Persê y Cerar, 2011).

La DMH produce una alta incidencia de adenomas y adenocarcinomas en el colon de ratas y ratones. Después de administrarse, el pre-carcinógeno se absorbe rápidamente vía subcutánea y es metabolizado en el hígado por acción de las enzimas flavin monooxigenasas (FMO); posteriormente, este metabolito sufre otra oxidación formando el azoximetano (AOM), el cual por medio de una N-hidroxilación es convertido a metilazometanol (MAOM). En colon, este compuesto es muy inestable y puede descomponerse en formaldehído, agua y nitrógeno (Persê y Cerar, 2011).

Aunado a lo anterior, el metabolito MAOM es glucuronidado en el hígado por enzimas de fase dos de detoxificación para su posterior excreción por vía biliar hacia colon. Sin embargo, las  $\beta$ -glucuronidasas de la microbiota liberan el conjugado y el MAOM, que es inestable, se re-arregla para formar iones metil carbono que le permite formar aductos con el ADN de los colonocitos (Persê y Cerar, 2011). En la última década se han desarrollado varios modelos murinos de CRC en la última década, incluidos los modelos de CRC inducidos químicamente, modelos de ratones modificados genéticamente y xenoplantes. Entre los modelos CRC inducidos químicamente, la combinación de una sola dosis de AOM con una exposición de 1 semana al agente inflamatorio dextrano sulfato de sodio (DSS) en roedores ha demostrado acortar drásticamente el tiempo de latencia para la inducción de CRC y recapitular rápidamente la secuencia de fosa cripta aberrante-adenoma-carcinoma que ocurre en el CRC humano (De Robertis *et al.*, 2011).

Dichos tumores muestran evidencia de la desregulación de la ruta de señalización coli poliposis adenomatosa (APC)/ $\beta$ -catenina, como la expresión de la proteína aberrante de APC y la alteración celular de  $\beta$ -catenina. Adicionalmente, también se ha demostrado que los genes diana de la ruta de APC/ $\beta$ -catenina, representada por los oncogenes cMyc, ciclina D1 y ciclina dependiente de cinasa 4 (Cdk4), están desregulados. De acuerdo con los hallazgos en CRC humano, los tumores inducidos por AOM/DSS también presentan mutaciones en el gen *K-ras* y

niveles elevados de enzimas implicadas en la síntesis de prostaglandinas y óxido nítrico, como la ciclooxigenasa (COX2) y el óxido nítrico sintasa (iNOS) inducible, respectivamente. Debido a su alta reproducibilidad y potencia, así como al modo de aplicación, el AOM/DSS se ha convertido en un modelo sobresaliente para estudiar la carcinogénesis de colon y una plataforma poderosa para los estudios de intervención quimiopreventiva (De Robertis *et al.*, 2011).

Kohno y colaboradores (2005) administraron antiinflamatorios como nimesulida, troglitazona y bezafibrato y observaron una inhibición en la incidencia y multiplicidad de adenocarcinomas en colon inducidos por AOM/DSS como única dosis de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de AOM, posterior a una semana de dosificación de DSS 2 % (v/v) en agua para beber por 7 días. Relacionando al inhibidor de la enzima COX2 como un agente eficaz contra el desarrollo del cáncer de colon.

Por lo tanto, existe un amplio camino por estudiar en lo referente a las propiedades fisicoquímicas de los constituyentes de las películas encapsulantes, su comportamiento antes y después del proceso seleccionado para tal fin, así como a las relaciones de mezclas de varios componentes para incorporar características funcionales, de tal forma que cumplan su objetivo de llegar al punto de acción colorrectal. Para ello se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

## **HIPÓTESIS**

Mediante la aplicación de microencapsulados de *Bifidobacterium longum* (ATCC BAA-999) de liberación controlada, y su co-administración con LYC, se obtendrá un efecto quimioprotector en un modelo de cáncer de colon *in vivo*, a través de la regulación y grado de expresión proteica del sistema IGF1/IGF-1R.

Para probar esta hipótesis de trabajo, se plantearon los siguientes objetivos:

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar y optimizar un sistema de microencapsulación termomecánicamente adecuado para BF y su evaluación en el GIT administrado conjuntamente con LYC, a través de la expresión del sistema IGF-1/IGF-1R/IGFBPs y su relación quimiopreventiva en un modelo de inflamación aguda y un modelo de CCR.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer el tiempo de incubación con la máxima producción celular de BF para su posterior microencapsulación y su resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas.
- Seleccionar las mejores proporciones de los componentes de la matriz encapsulante, la evaluación de propiedades físicas, mecánicas, térmicas y dinámicas mediante técnicas de goteo y secado por aspersión.
- Evaluar el impacto de la difusión de BF microencapsulados en la matriz encapsulante óptima, con variación de temperatura y pH mediante el establecimiento de un modelo matemático.
- Evaluar la efectividad de BF microencapsulado sobre la colonización gastrointestinal en roedores en un modelo agudo inducido con dextrano sulfato de sodio (DSS).
- Evaluar el efecto quimiopreventivo de microencapsulados de BF y su interacción con LYC en un modelo murino de cáncer de colon inducido por AOM-DSS, en base a la tasa de expresión proteica IGF-1/IGF-2/IGF-1R/IGFBP1/IGF2BP1/IGFBP3.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1. Material biológico**

El cultivo utilizado fue la cepa *Bifidobacterium longum* BAA-999 (BF) adquirida de ATCC (American type culture collection, Manassas, VA, EE.UU). La cepa liofilizada por medio del CINVESTAV, unidad de Zacatenco (Cd. de México).

Para el estudio de carcinogénesis se utilizaron 88 ratones machos (UNAM, Juriquilla, México) de 5 a 6 semanas de edad (28–30 g) clínicamente sanos.

##### **3.1.2. Material químico**

Se utilizó almidón alto en amilosa, goma acacia, alginato de sodio, caseína y malto dextrina como materia prima para las cápsulas (KEM, León, Gto., México). Como sal fosfatante para la modificación química del almidón se utilizaron trimetafosfato trisódico y polifosfato de sodio (KEM, León, Gto.) Licopeno (LYC) (Lyc-O-Mato™, Pittsburgh, EE. UU.), el cual consiste en 11.45 % LYC total: 77 % trans y 23 % cis. Para la inducción de cáncer de colon se utilizó azoximetano (AOM, Sigma, St. Louis, MO, EUA), y como agente promotor dextrano sulfato de sodio (DSS, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.). El resto de los químicos utilizados fueron de grado reactivo a menos que se especifique lo contrario.

#### **3.2. Modificación química del almidón**

##### **3.2.1. Fosfatación del almidón por método convencional**

El contenido de fósforo es directamente proporcional a la cantidad de sal fosfatante que se utiliza en la modificación. En un almidón fosfatado, los entrecruzamientos inhiben la hinchazón y la hidratación del gránulo de almidón. Cuando se lleva a cabo el entrecruzamiento con trimetafosfato trisódico (STMP), el número de grupos fosfato incorporados en el almidón es mayor que cuando se emplean otras sales, los grupos fosfato se introducen en la molécula, mientras que, con oxiclورو de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ) la fosfatación se lleva a cabo en el exterior del mismo (Carmona *et al.*, 2009).

Con la finalidad de proporcionar mejores características fisicoquímicas aptas para utilizar el almidón como sustituyente de la matriz encapsulante se llevó a cabo un proceso de fosfatación. Una suspensión de almidón (56 g/100 mL de agua destilada) se adicionaron 2.5 g y 8 g de sal de STMP y tripolifosfato de sodio (STPP) por 100 g de almidón en base seca, respectivamente, y se ajustó el pH a 8 utilizando una solución de NaOH al 5 %. La suspensión se colocó hasta sequedad a 45 °C en una estufa y posteriormente se aumentó a 130 °C durante 2 h y finalmente las muestras procedieron a molerse (Paschall, 1964 y modificado por Castro, 2010). El contenido de fósforo del material modificado se determinó de acuerdo al método propuesto por Smith y Caroso (1964) y la determinación del contenido de fosfatos solubles en una muestra de agua se realizó mediante espectrofotometría ultravioleta-visible. Se aplicó el método de adiciones estándar para eliminar interferencias con otros compuestos, lo anterior fue propuesto por Harris (2006) (Anexo C), el grado de sustitución se calculó con la ecuación:

$$GS = \frac{162 \times P}{(3100 - (124 \times P))}$$

Donde:

GS: Grado de sustitución

P: Contenido de % fósforo (mg/100 mL) en el almidón fosfatado.

% fósforo:  $(P \times \text{volumen de dilución} \times 100) / (\text{volumen de la alícuota} \times \text{peso de la muestra (g)} \times 1000)$ .

### **3.3. Caracterización de las matrices encapsulantes**

#### **3.3.1 Determinación de índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA)**

El ISA depende de la disponibilidad de los grupos hidrofílicos que se unen a las moléculas de agua y es un parámetro que refleja la degradación de los componentes del almidón durante un proceso de modificación química, es decir, se incrementa con condiciones severas de procesamiento (Larrea *et al.*, 2005). El IAA es el volumen que ocupa el almidón después que se hincha debido a un exceso de agua; al obtener valores altos en IAA se debe a que los gránulos de

almidón pierden su integridad durante el proceso de extrusión provocando un incremento de compuestos solubles (Mansson y Hosney, 1986).

Ambos índices se determinaron a las tres mezclas de los materiales encapsulantes siguiendo el método Anderson y colaboradores (1969), modificado por Castro (2010). En base a los diseños experimentales planteados para este proyecto (Anexo B). Para cada muestra, se pesaron 0.25 g de las mezclas encapsulantes en un tubo de centrífuga y se adicionaron 3 mL de agua destilada. Los tubos se mantuvieron a 30 °C y en agitación constante por 30 min. Posteriormente, se centrifugaron a 6,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se decantó en un crisol, puesto previamente a peso constante, se evaporó en una estufa a 105 °C durante 2 h y el peso del residuo en el crisol se registró como residuo de evaporación. Por otra parte, el peso del pellet que queda en el tubo de centrífuga se registró como residuo de centrifugación.

Los índices de absorción de agua (IAA) y de solubilidad en agua (ISA) se calcularon de acuerdo a las siguientes relaciones:

$$ISA = \frac{\text{Peso del residuo de evaporación}}{\text{Peso seco de la muestra}} \times 100$$

$$IAA = \frac{\text{Peso del residuo de centrifugación}}{\text{Peso de la muestra} - \text{Peso del residuo de evaporación}}$$

### 3.3.2 Dispersiones de biopolímeros y mezclas

Los biopolímeros se dispersaron en agua en concentraciones de acuerdo al diseño experimental (Anexo B) a temperatura ambiente (~25 °C). Las dispersiones se almacenaron a 4 °C durante 24 h según lo reportado por Rodd (2000), para minimizar el crecimiento de bacterias y al mismo tiempo tener una mejor hidratación del material.

### 3.3.3 Determinación de densidad de biopolímeros

Cuanto mayor sea el peso molecular, las partículas se acomodan y ordenan de forma más fácil entre ellas, ocupando así un menor espacio (volumen), lo que resulta en una mayor densidad volumétrica. La densidad aparente se determinó utilizando la relación entre el peso de la mezcla de la matriz encapsulante y el volumen que esta ocupa, de acuerdo a lo reportado por Smith (1967). La técnica consistió en pesar la probeta graduada vacía, adicionar la mezcla cuidadosamente con una espátula la mezcla de la matriz encapsulante a la probeta de 250 mL por medio de un embudo hasta que el volumen total sea libremente completado. El cálculo de densidad aparente se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad aparente (g/mL)} = \frac{\text{probeta (g)} + \text{muestra(g)} - \text{probeta vacía (g)}}{250 \text{ mL}}$$

### 3.3.4 Determinación de viscosidad

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro rotacional analógico modelo 801 de Nahita (Grases, Barcelona, España) a una velocidad de 30 rpm y utilizando el husillo no. 3.

### 3.3.5 Determinación sólidos solubles

Los sólidos solubles totales se determinaron mediante el índice de refracción y los °Brix a una temperatura promedio de 20 °C; si la temperatura es menor, la medición de °Brix disminuye (Fernandes *et al.*, 2008). Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la norma NMX-F-103 (1965). La técnica consistió en tomar una alícuota (1 mL aproximadamente) de muestra para determinar la lectura de °Brix en un refractómetro digital ATAGO OA53%; las muestras se analizaron por cuadruplicado.

### **3.3.6 Determinación pH**

Su determinación se llevó a cabo según lo reportado por Lenntech (2009), lo cual consistió en tomar una alícuota de 5-10 mL de muestra y, una vez calentado y calibrado un pH/mv metro *Denver Ultrabasic UB-10*. Las muestras se analizaron por cuadruplicado.

### **3.3.7 Cristalinidad de películas**

Se prepararon dispersiones acuosas de acuerdo al diseño experimental (Anexo B) de diferentes materiales biopoliméricas, utilizando un Shaker (Lumistell IRO-65. México) a 10,000 rpm y temperaturas idóneas para su solubilidad, de acuerdo a lo reportado por Espinoza (2008). Para formar las películas, en todos los casos se vació la misma cantidad de dispersión de cada mezcla según el diseño estadístico (10 mL) en una charola de 5 cm x 5 cm, cubierta con una película hidrofóbica. Se procedió a dejar secar a temperatura ambiente, aproximadamente 24 h, en una superficie nivelada. Una vez formadas, las películas se separaron de la charola y se almacenaron en bolsas de polietileno.

### **3.3.8 Propiedades mecánicas de películas de biopolímeros. Fuerza de corte y esfuerzo de deformación**

Esta prueba corresponde al estado de visco-elasticidad lineal; para el caso de un sólido elástico, la onda está en fase con la velocidad de corte aplicada (Munizaga y Cánovas, 2005).

Las muestras de películas libres de defectos se evaluaron en un analizador de textura TMS-Pro. FTC. ILC Load Cell de 250N (Aname, Quijorna, Madrid) de acuerdo al método ASTM D882-97 (1997). Para la determinación de la fuerza de tensión y del porcentaje de elongación de cada película, la medición se realizó axialmente aplicando fuerza en un punto de la película hasta el punto de ruptura. El módulo de Young se calculó a partir de los datos obtenidos. Las condiciones de operación fueron a una velocidad de 10 mm/min y una fuerza de 15 gf programando un espesor de 1.5 mm como valor de desplazamiento.

### **3.4. *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 (BF)**

#### **3.4.1 Almacenamiento de BF**

La cepa probiótica se conservó a -80 °C sin hidratar. Una vez hidratada se almacenó en placas de Agar MRS.

#### **3.4.2 Activación de la cepa BF**

La cepa de BF fue activada en 3 mL de caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) (Difco, Detroit, MI, EE. UU.), suplementado con clorhidrato monohidrato de L-cisteína al 0.05% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) a 37 °C durante 24 h, acorde a lo reportado por Dobrowolski (1993). Todo material utilizado para la manipulación de BF (medios de cultivo, frascos de dilución, diluyentes, soluciones, varillas de cristal, puntas para pipeta, entre otros) se esterilizaron por medio de calor húmedo a 121 °C durante 15 min en autoclave. El medio se empleó en forma sólida para enumeración de microorganismos por el método de vaciado en placa y en forma líquida para la obtención de masa bacteriana (Castro, 2010).

##### **a. Cultivo en medio líquido. Generación de biomasa de BF (ATCC BAA-999)**

Para la obtención de biomasa se inocularon los 3 mL anteriormente activados, colocando 2 mL del cultivo activado en 100 mL de caldo MRSC (MRS suplementado con L-cisteína) a 37 °C durante 72 h. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo anaeróbico (modelo 855-ABC, MI, EE. UU.), para el estudio de la cinética de crecimiento.

##### **b. Cultivo en medio sólido. Conteo de BF**

Previo a la siembra de las bacterias, se realizaron diluciones decimales, colocando en un tubo de ensaye 1 mL del cultivo celular en 9 mL de solución de peptona al 0.1 %, posteriormente se continuó realizando diluciones seriadas hasta una dilución de 1E-05. Como técnica para contar las unidades formadoras de colonia (UFC) de BF se utilizó el método de vaciado en placa.

Se colocó 1 mL de cada dilución sobre una caja Petri; posteriormente, se agregó aproximadamente 15-20 mL de Agar MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) (Difco, Detroit, MI, EE. UU.), suplementado con clorhidrato monohidrato de L-cisteína al 0.05% (*p/v*) (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.). El proceso se llevó a cabo en una cámara de cultivo anaerobio (modelo 855-ABC, MI, EE. UU.), recirculando una mezcla de gases de CO<sub>2</sub> 5 % + hidrógeno 10 % + nitrógeno); las placas sembradas se incubaron a 37 °C por 48 h. El monitoreo de su estructura se realizó mediante la tinción de Gram de acuerdo a lo reportado por Henry y Sanford (1988) (Anexo C).

### **3.4.3 Monitoreo del crecimiento de BF**

El crecimiento de las BF se llevó a cabo con el objetivo de determinar el tiempo cuando el microorganismo alcanzó la etapa final de la fase logarítmica tardía y principio de la estacionaria de su ciclo de vida. Para ello se utilizó la técnica de vaciado en placa utilizando agar MRS (*De Man, Rogosa, Sharpe*) (Difco, Detroit, MI, EE. UU.), suplementado con clorhidrato monohidrato de L-cisteína al 0.05% (*p/v*) (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.). Se cultivaron 3 azadas en 1 matraz con 100 mL de medio MRS y se determinó la biomasa de BF. La viabilidad celular se determinó en una cámara de Neubauer (Marienfeld, Brightline 0.0025 mm<sup>2</sup>, profundidad 0.100 mm, AUS) con azul tripán como colorante de contraste. Se realizaron monitoreos periódicos de la viabilidad de las células, UFC y producción de biomasa por un total de 74 h (horas 0, 4, 14, 18, 22, 26, 30, 42, 46, 50, 54, 66, 70 y 74) para el estudio de la dinámica crecimiento (Castro, 2010).

## **3.5 Microencapsulación de células de BF. Secado por goteo y aspersión**

### **3.5.1 Previa microencapsulación de BF**

La cepa probiótica activada se inoculó en 100 mL de caldo MRS (Difco, Detroit, MI, EE. UU.), suplementado con clorhidrato monohidrato de L-cisteína al 0.05% (*p/v*) (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), posteriormente se incubó a 37 °C durante el tiempo óptimo para obtener su máxima producción de UFC mL<sup>-1</sup> en fase

logarítmica tardía. Las bacterias se colectaron del medio por centrifugación a 4,500 rpm por 15 min y posteriormente se lavaron dos veces en solución salina al 0.085 % bajo las mismas condiciones de centrifugación. Posterior a los dos lavados se desechó la solución salina y se conservó la pastilla de bacterias que se emplearon en el proceso de microencapsulación.

### **3.5.2 Preparación de materiales matriz**

En cada suspensión del material matriz se dispersó aproximadamente  $1.0E+10$  células viables  $mL^{-1}$  de BF previamente activadas con una relación final de 10 % de sólidos en la solución matriz.

### **3.5.3 Microencapsulación de BF mediante la técnica de goteo**

Se empleó el método descrito por Escamilla y colaboradores (2000), con modificaciones. Dentro de una cámara de flujo laminar se inmovilizó aproximadamente 15 mL de la solución de polímeros microbianos pre-calentada a 58 °C (Anexo B), la cual consistió en una mezcla de alginato de sodio, caseína pancreática y goma arábiga pre-calentada a 37 °C con características fisicoquímicas y mecánicas idóneas para su microencapsulación, añadiendo células viables  $mL^{-1}$ , teniendo un volumen total de 10 % (p/v) solución matriz y se agitó por 10 min. La mezcla se forzó a pasar a través de una aguja (8 mm de largo 5/16" y 31G de grosor) con una bomba peristáltica (Crode, México) con un flujo de  $10 mL \cdot min^{-1}$ , donde las gotas bajaban a un recipiente estéril de cloruro cálcico 0.1 M. Posteriormente, una vez formadas las perlas se dejaron endurecer en cloruro cálcico durante 3 h; transcurrido este tiempo, se separaron por filtración y las perlas esféricas se lavaron con  $H_2O$  destilada estéril para finalmente almacenarse a 4 °C durante 24 h. El diámetro de las perlas se determinó en un microscopio (Leica, LMDS) con una rejilla micrométrica, donde se seleccionaron esferas de aproximadamente 3-5 mm.

### **3.5.4 Microencapsulación de BF mediante la técnica de secado por aspersión**

De cada diseño de mezclas, de acuerdo a lo observado en el Anexo B, se seleccionó la que mostró un mejor índice de solubilidad en agua, índice de absorción de agua, formación, microestructura, pH, sólidos solubles, densidad, cristalinidad y resistencia. Éstas se llevaron a cabo aplicando dos diseños experimentales: Diseño experimental 1: Alginato + almidón fosfatado + goma arábica. Diseño experimental 2: Goma arábica + maltodextrina. La mejor mezcla seleccionada se preparó dispersando los biopolímeros en agua destilada y añadiendo la dispersión de probióticos elaborada previamente.

La técnica de microencapsulación se realizó utilizando un secador por aspersión Büchi B-290 (Flawil, SWT), según Lian y colaboradores (2002), con las siguientes modificaciones en las condiciones de operación: 120 °C aire de entrada, 50 °C aire de salida, 95% de aspiración, una velocidad de flujo de alimentación de  $9.6 \times 10^{-04} \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$  y flujo de aire atomizado de  $1.3 \times 10^{-04} \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$  con un diámetro de boquilla de suministro de 0.7 mm. Los BF microencapsulados se almacenaron en tubos falcon® estériles (Taizhou, Zhejiang, China) a 4 °C.

## **3.6 Evaluación del proceso de microencapsulado de BF**

### **3.6.1 Determinación de humedad en las microcápsulas**

El contenido de humedad de las microcápsulas se determinó gravimétricamente mediante secado en estufa con circulación forzada marca Felisa, Modelo: FE-147 (México, D.F. México) a 105 °C durante 2 h (AOAC, 1990).

### **3.6.2 Determinación de actividad de agua ( $A_w$ ) en las microcápsulas**

La actividad de agua de las microcápsulas se determinó utilizando un higrometro de punto de rocío marca mediante el equipo marca AquaLab Pre. Dewpoint Water Activity Meter (Washington, USA) a 26 °C (AOAC, 1995).

### 3.6.3 Determinación de difusividad efectiva mediante la caída de concentración

Las propiedades fisicoquímicas del interior de los geles tienen un efecto en la actividad biológica de enzimas, microorganismos, células animales y vegetales inmovilizadas. La difusión está controlada por el movimiento aleatorio de las moléculas y el flujo está descrito por la ley de Fick.

$$F_i = -D_{\text{eff}} \nabla C_i$$

Donde  $F_i$  = flujo del componente  $i$  en una posición espacial;  $\nabla C_i$  = el gradiente volumétrico de concentración de  $i$ ;  $D_{\text{eff}}$  = difusividad efectiva incluyendo la contribución de fases convectivas.

El análisis de la resistencia a la transferencia de masa en la intrapartícula requiere el conocimiento de la difusividad del sustrato en la matriz del sistema inmovilizado, como agar o alginato. Los geles son semisólidos porosos, los cuales están compuestos de macromoléculas y agua. Los geles incrementan el trayecto del sustrato y provocan una reducción de la velocidad de difusión. Estudios del fenómeno de difusión han sido realizados en alginato de calcio, difundiendo sacarosa y registrando los cambios de concentración a lo largo del tiempo (Pu y Yang, 1988).

La determinación de la caída de concentración del medio hacia el sistema inmovilizado se determinó mediante azul de dextrano en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer (Lambda 2) a una longitud de onda de 617 nm, de acuerdo a lo reportado por Parra (2000). Para la determinación de la difusión efectiva, se preparó una solución con una concentración de  $145 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $C_0$ ), y se determinó la caída de concentración en el medio. Se registró el diámetro de la esfera. Posteriormente, se depositó una cantidad determinada en una celda de cuarzo de 4 cm x 1 cm x 1 cm y se agregó 3 mL de la solución de azul de dextrano en flujo laminar y se determinó la absorbancia contra tiempo a una longitud de onda de 617 nm con intervalos de 5 min. La caída de concentración llegó al equilibrio en 1

h. Respecto al encapsulamiento por goteo y secado por aspersión, las esferas contenían BF. El análisis se determinó a las mezclas óptimas de encapsulantes comparadas con las mezclas no óptimas de encapsulantes, ambos microencapsulados mediante la técnica de secado por aspersión y goteo. Esta determinación se realizó a 6.27 pH y a una temperatura ambiente de 23 °C (Temperatura registrada en la ciudad de Celaya, Gto.).

Con la finalidad de evaluar el efecto del pH y la temperatura en la velocidad de difusividad del sistema de microencapsulación, se estructuró un nuevo diseño estadístico (Anexo B), en el cual se realizó el estudio de BF microencapsulados mediante la técnica de goteo comparado con la técnica de secado por aspersión en ambos sistemas se utilizó la mejor mezcla encapsulante.

#### **3.6.4 Viabilidad de BF posterior al proceso de encapsulación.**

El conteo se realizó mediante la técnica de células viables (Anexo C) utilizando una cámara de Neubauer (Marienfeld, Brightline 0.0025 mm<sup>2</sup>, profundidad 0.100 mm, AUS) con azul tripán como colorante de contraste (Dobrowolski, 1993).

#### **3.6.5 Evaluación de la viabilidad de BF encapsulados a largo plazo.**

La viabilidad de BF (ATCC BAA-999) se evaluó con la finalidad de verificar una correcta inmovilización de polímeros, preservando una alta viabilidad a través del tiempo. Para ello, se prepararon alícuotas de 1 g de microencapsulados (obtenidos mediante la técnica de goteo, secado por aspersión I y II) y 1 mL de concentrado probiótico (células libres), que se almacenaron en microtubos de 1.5 mL estériles a 4 °C. En el día de muestreo, se tomaron 100 µL de las alícuotas de concentrado bacteriano e igualmente se tomó 1 g alícuota de microencapsulados; en todos los casos, se determinó la viabilidad de BF mediante el uso de la cámara de Neubauer con azul de tripano como se ha descrito anteriormente. El tiempo de monitoreo se realizó cada 15 días durante 105 días (Modificado de Castro, 2010).

### **3.6.6 Evaluación de la sobrevivencia de BF microencapsulados en sistema gastrointestinal simulado**

Se evaluó *in vitro* la sobrevivencia de las células de BF encapsuladas y en su forma libre de acuerdo a lo reportado por Sánchez (2012). Se adicionaron 3 mL de saliva artificial (Anexo A) y 24 mL de jugo gástrico simulado (Anexo A) a 3 g del encapsulado bacteriano, se homogenizaron las muestras manualmente por 1 min y se colocaron a 37 °C durante 2 h. Se monitoreó la cuenta viable posterior al contacto con la muestra en saliva y jugo gástrico simulado y a las 2 h siguientes. A continuación, las mismas muestras fueron expuestas a las condiciones intestinales simuladas. Para ello se tomaron 25 mL de las suspensiones y se centrifugaron a 5,000 rpm por 3 min. Se procedió a decantar el sobrenadante y sobre la pastilla se adicionó 1 mL del sobrenadante recién decantado más 9 mL de jugo intestinal simulado (Anexo A), las muestras se colocaron a 37 °C durante 4 h. La cuenta viable de estas suspensiones se determinó recién agregado el jugo intestinal simulado, posteriormente a las 2 h y finalmente a las 4 h.

### **3.6.7 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis dinámico mecánico (DMA)**

Para la determinación de la calorimetría diferencial de barrido (DSC), en el microencapsulado óptimo mediante la técnica de secado por aspersión, se empleó el equipo Mettler Toledo DSC-Q2000 con una precisión de  $\pm 0.05$  %, sensibilidad 0.2  $\mu$ W y  $\pm 0.01$  °C temperatura de precisión, acoplado a una unidad de control de enfriamiento (Refrigerated Cooling Systems-RCS90), bajo la modalidad de corrección por sustracción de línea base antes de cada ensayo, empleando crisoles vacíos. Los ensayos se realizaron con 10.41 mg y 10.45 mg de muestra, correspondiente a microencapsulados sin BF y microencapsulados con BF. Los ensayos se realizaron en atmósfera inerte, con un flujo constante de 50 mL/min de nitrógeno y frecuencia de 1 Hz (Modificado de Villacrez, 2013). El programa utilizado se describe a continuación:

- Rampa constante de temperatura, de 25 a 250 °C (5 °C/min).
- Periodo isoterma, a 250 °C (5 min).
- Rampa constante de temperatura, de 250 a 25 °C (5 °C/min).
- Periodo isoterma, a 25 °C (5 min).

De las correspondientes curvas se obtuvieron los parámetros característicos de cada una de las transiciones térmicas observadas usando el software del equipo. El calor específico ( $C_p$ ) es determinado como el gradiente de la entalpía entre el gradiente de la temperatura de fusión:

$$C_p (\text{J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}) = \frac{\Delta H (\text{J/g})}{\Delta T (^\circ\text{C})}$$

Para la determinación del análisis dinámico mecánico (DMA), en el microencapsulado óptimo mediante la técnica de secado por aspersión, se empleó el equipo de DMA-8000 de Perkin Elmer con  $\pm 1\%$  módulo de precisión,  $\pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$  de estabilidad isotérmica y 0.0001-18 N rango de fuerza. Los ensayos se realizaron con microencapsulados con BF con una masa de aproximadamente 50 mg. Para la determinación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de los materiales encapsulantes se utilizó el modo de ensayo multifrecuencia, manteniendo la frecuencia constante y provocando una rampa de temperatura. Parámetros introducidos en el software del equipo para la realización del ensayo:

- Dimensiones del bolsillo: 30.02 mm largo, 7.60 mm ancho y 0.950 mm espesor.
- Tiempo de estabilización de la temperatura: 15 min.
- Rango de temperaturas: 30 – 250 °C (5 °C/min).
- Frecuencia: 1 Hz.
- Coeficiente de Poisson: 0.3.

La temperatura de transición vítrea ha sido determinada mediante el comienzo de la curva del módulo de almacenamiento, máximo del módulo de pérdida y máximo del factor de pérdida (Gómez, 2012).

### **3.6.8 Microscopía electrónica de barrido**

Las microcápsulas de BF (ATCC BAA-999) por el método y la matriz de encapsulamiento óptimos de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas, se analizaron en un microscopio electrónico de barrido. Para ello, los microencapsulados se prepararon, fijando aproximadamente 0.01 g en una tira de carbón, que posteriormente se fijó a un “pin metálico”. A continuación, la muestra se colocó en una cámara DENTON VACUUM y se cubrió con oro por 1 min a una presión de cabina de  $9.344E+02$  Torr y 30 mAmps. Como último paso, la muestra se trasladó al microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-6510 LV para su observación a diferentes magnificaciones (750X, 2700X, 4000X y 6500X) (Modificado de Espinoza, 2008).

## **3.7 Estudios *in vivo***

### **3.7.1 Pruebas de funcionalidad con probióticos**

Se trabajó con un total de 24 ratones para el modelo agudo con dextrano sulfato de sodio y un total de 64 ratones para el modelo de CCR cepa ICR/CD-1 (UNAM, Juriquilla, México); los ratones de ambos modelos de 5 a 6 semanas de edad clínicamente sanos, con un peso aproximado de 28-30 g. Se alojaron de 2-3 ratones por jaula ( $187 \text{ cm}^2$  de ancho y 18 cm de alto); las dimensiones permitieron la entrada de aire y luz. Antes de iniciar el tratamiento, los animales se aclimataron una semana, manteniéndose bajo las 12 h convencionales: 12 h ciclo claro/oscuro, temperatura adecuada ( $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), ventilación constante, lavado diario de bebederos, comederos, pisos, charolas de recolección y cada tercer día jaulas y paredes de acuerdo a la NOM-062-ZOO (1999). A los animales se les administró *ad libitum* agua potable y la dieta estándar Rodent LabChow 5001 (Nupec, Querétaro, México), la cual consiste de 13.5 % lípidos, 28.5 % proteína, 58.0 % carbohidratos, de los cuales un 6.0 % incluye fibra (NOM-062-ZOO, 1999; Lozano, 2014). Los experimentos en animales se realizaron de acuerdo con el protocolo de Cuidado y Uso de Animales, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro (código de identificación del

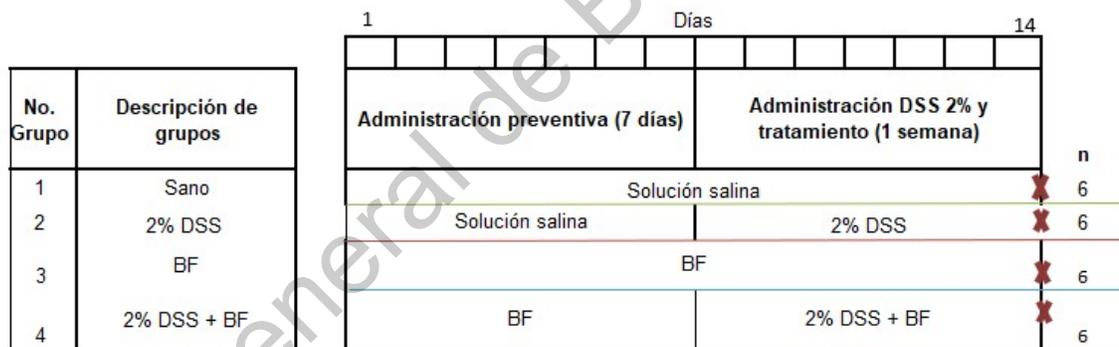
proyecto CBQ17/097-a 18/005, aprobado el 21 de febrero de 2018). Después de una semana de aclimatación, los animales se colocaron aleatoriamente en grupos de acuerdo al diseño experimental. Cada tercer día y semanalmente se pesaron los animales (acorde al diseño experimental); así mismo, en caso de que un animal hubiera perdido más del 20 % de su peso, se sacrificaría de acuerdo a lo recomendado por la NOM-062-ZOO (1999).

Debido a que la mayoría de anestésicos se utilizan en sobredosis como agentes eutanásicos, estos pueden comprometer algunos órganos del roedor. Sin embargo, los métodos físicos son los más útiles cuando los métodos farmacológicos puedan interferir en el propósito del experimento (Derr, 1991). Por lo anterior, se concluyó realizar el sacrificio en el modelo de inflamación por dislocación cervical y en el modelo de CCR por decapitación con ayuda de una guillotina. El método de dislocación cervical se caracteriza por una inconsciencia instantánea; sin embargo, éste dificulta la obtención de un volumen significativo de sangre para futuros análisis. En contra parte, la decapitación es distinguido por ser un medio para obtener tejidos y fluidos corporales libre de contaminación química, en adición es rápido y efectivo sin ocasionar dolor o sufrimiento al animal; lo anterior es debido a una falta inmediata de riego sanguíneo al cerebro y la anoxia subsiguiente, ocasionando una pérdida inmediata de consciencia a través del trauma físico de acuerdo a lo reportado por Derr (1991).

### **3.7.2 Diseño experimental *in vivo*. Modelo agudo de inflamación con dextrano sulfato de sodio (DSS)**

Con la finalidad de identificar la concentración de células viables de BF (BBA-999) microencapsulado en diferentes secciones del tracto gastrointestinal (estómago, intestino delgado, ciego, colon) y heces en los ratones, así como la sobrevivencia y la adaptación de BF ante un inductor de inflamación, se propuso realizar un modelo agudo de inflamación con dextrano sulfato de sodio al 2% (DSS, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU) *ad libitum*. En este estudio se formaron 4 grupos experimentales ( $n = 6$ ), incluyendo un grupo control sin DSS, los grupos con los

probióticos y el grupo control DSS (Figura 3.1). Se administró diariamente una dosis de  $8.99E+10$  células viables  $mL^{-1}$  de BF en 0.2 mL de solución salina durante 2 semanas a los grupos 3 y 4, mediante el uso de una cánula. Cabe resaltar que la BF se administró como microencapsulado, el cual está constituido por una mezcla de 1.6 % alginato/0.8 % goma arábica/2.5 % almidón fosfatado mediante la técnica de secado por aspersión I. Posterior a 7 días de administración de BF, al grupo 4 se suplementó una solución del inductor de inflamación (DSS) al 2 % *ad libitum* junto con la administración intragástrica de BF microencapsulado (Figura 3.1). Cada tercer día se registró el peso corporal de los grupos en estudio, así como la recolección de heces (días consecutivos de monitoreo: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). Al final de 14 días de experimentación se procedió al sacrificio por dislocación de acuerdo a lo recomendado por NOM-062-ZOO (1999).



**Figura 3.1.** Diseño experimental del pre-modelo animal de CCR.

### 3.7.3 Diseño experimental *in vivo*. Modelo de CCR

Después de una semana de aclimatación, los animales se colocaron aleatoriamente a ocho grupos experimentales (Figura 3.2). En primer lugar, los animales de los grupos 1–2 (Sano y el control AOM + DSS,  $n = 10$ ) recibieron sólo NaCl estéril al 0.9%; el grupo 3 (BF,  $n = 7$ ) y los grupos 4–5 (BF + LYC 20 y BF + LYC 50,  $n = 8$ ) recibieron  $8.992E+10$  cells· $mL^{-1}$  de BF microencapsulado disuelto en NaCl 0.9% o LYC (Lyc-O-Mato™, Pittsburgh, EE. UU.). El LYC se extrajo de cápsulas blandas y se homogeneizó con NaCl al 0.9% para proporcionar la

concentración correspondiente; los grupos 6–7 (LYC 20 y LYC 50,  $n = 7$ ) recibieron 20 y 50  $\text{mg kg}^{-1}$  de LYC, respectivamente. Se ha informado que la metformina (clorhidrato de 1, 1-dimetilbiguanida) proporciona efectos antiinflamatorios *in vivo* e *in vitro* a través de la inhibición de la señalización de NF- $\kappa$ B (Wang *et al.*, 2019; Yancu *et al.*, 2017; Hosono *et al.*, 2010); por lo tanto, se incluyó un grupo de control positivo y los animales del grupo 8 (Metformina,  $n = 7$ ) recibieron 600  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de metformina (Merck company, Naucalpan de Juárez, Edo de México, MEX), disueltos en NaCl 0.9%. Los tratamientos correspondientes se prepararon diariamente y se administraron cada mañana (0.2 mL de volumen total) a todos los ratones durante las 16 semanas, con la excepción de las semanas 5 y 6.

Después de 4 semanas, los animales en los grupos 2-8 se les administró una única inyección subcutánea de azoximetano (AOM, Sigma, St. Louis, MO, EUA) 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , disuelto en NaCl 0.9% (v/v) grado farmacológico; luego, en la semana 5, se administró *ad libitum* 2.0% de dextrano sulfato de sodio (DSS, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 7 días (Tanaka, 2012). Se registraron los pesos corporales y se colectaron heces una vez por semana durante el período experimental (16 semanas). Todo el material punzocortante utilizado se colocó en bote rojo de polipropileno con la leyenda “residuos punzocortantes biológico-infecciosos” en un periodo máximo de 15 días hasta su debido transporte por la empresa Servicios Especializados en residuos S.A. de C.V., quienes tendrán que garantizar que el tratamiento a realizar sobre los residuos, eliminará microorganismos que puedan causar daños a la salud, así mismo tendrán a cargo la disposición final (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

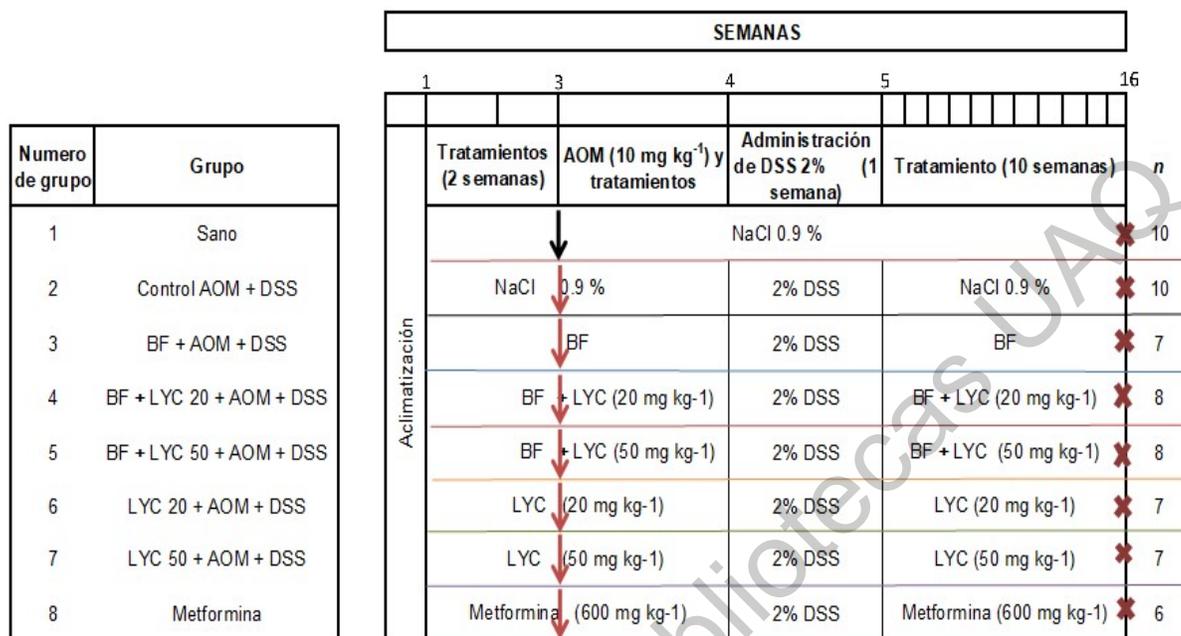


Figura 3.2. Diseño experimental del modelo animal de CCR

### 3.7.4 Sacrificio y obtención de muestras

Al término del tratamiento, los animales tanto del modelo agudo de inflamación como del modelo de CCR se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación, respectivamente, de acuerdo a lo recomendado por Derr (1991) y NOM-062-ZOO (1999). Posteriormente, se realizó una incisión desde el tórax hasta el ano separando la piel y el músculo (Lozano, 2014). Se extirparon inmediatamente estómago, intestino delgado, ciego y colon; el colon se extrajo realizando una apertura longitudinal por el borde anti mesentérico, y lavando con solución fisiológica; posteriormente se tomó una muestra de contenido distal dividiéndose en sección proximal (colon ascendente) y sección distal (colon descendente). Los contenidos internos se recogieron por separado para cada zona y se almacenaron a -70 °C para análisis de pH,  $\beta$ -GA y para evaluar la viabilidad de BF.

Los cadáveres de las ratas destinadas a desecho se almacenaron en una bolsa grande color amarillo, cuidando de no rebasar el 80 % de su capacidad en un congelador (temperatura máxima 4 °C) con la leyenda “desechos patológicos”

hasta su debido transporte e incineración, los cuales se dispondrán a cargo de la empresa Planta Incineradora de Residuos Bio-Infecciosos S.A. de C.V. autorizada por la SEMARNAT (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

### **3.7.5 Viabilidad de BF en estómago, intestino delgado, ciego, colon y heces de ratones CD-1**

La cepa BF se aisló de muestras fecales o de tejido de animales experimentales. Para este propósito, las heces y el contenido luminal del estómago, intestino delgado, ciego y colon se pesaron y homogeneizaron en 1 mL de solución reguladora de fosfato (PBS, 10%) mediante agitación mediante Vortex. Para la cuantificación de BF adherente a tejidos en el estómago, intestino delgado, ciego y colon, cada sección se trituró usando un pistilo de polipropileno y se homogeneizó en 1 mL de PBS. Las unidades formadoras por colonia en escala logarítmica base 10 (Log UFC) se determinaron colocando diluciones en serie de PBS sobre placas de Agar BSM (Bifidus, Agar Selectivo). La idoneidad del medio BSM para *Bifidobacterium* fue probada por la exitosa amplificación género-específica mediante qPCR de aislados (Quartieri *et al.*, 2016). Además, investigaciones previas respaldan el uso propuesto de BSM como medio selectivo para la enumeración de *B. longum* spp. para modelos *in vivo* (Atlas, 2010). La incubación se llevó a cabo en una cámara de cultivo anaeróbico (modelo 855-ABC, MI, EE.UU.) a 37 °C durante 72 h, acorde a lo reportado por Dobrowolski (1993). Los resultados se expresan como Log CFU/g de contenido en zona luminal, heces o adherentes al tejido.

### **3.7.6 Determinación de pH en contenido cecal, colónico y fecal**

Las muestras fecales recolectadas durante el periodo experimental del modelo de inflamación agudo y el modelo de CCR, así como el contenido cecal y colónico se suspendieron en agua (5 veces su volumen) y se homogenizaron con ayuda de un vortex para posteriormente determinar el pH mediante un pH-metro (Nakanishi *et al.*, 2003).

### **3.7.7 Determinación de la actividad $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ -GA) en contenido cecal, colónico y fecal**

Se determinó  $\beta$ -GA del contenido cecal, colónico y fecal de acuerdo al método de Fishman y colaboradores (1948). Se homogenizaron 0.05 g de muestra con un pistilo. Posteriormente, la muestra se sometió 3 min a 4 °C en un sonicador ultrasónico y se centrifugó a 500 rpm por 15 min. Se recolectó el sobrenadante y se determinó la actividad enzimática. Para la reacción se tomaron 0.8 mL de PBS, 0.1 mL del sustrato  $\beta$ -glucorónido-fenolftaleína 1 mM y 0.1 mL de extracto cecal, colónico o de muestras fecales. Se incubaron por 1 h a 37 °C y la reacción se detuvo con 2.5 mL de glicina alcalina y 1.5 mL de agua HPLC. Posteriormente, se registró la lectura a 540 nm y se determinó la cantidad de fenolftaleína liberada interpolando concentraciones de la curva estándar (Anexo D).

### **3.7.8 Análisis macroscópico**

Posterior al sacrificio en los ratones del modelo de CCR, el colon se dividió en secciones proximales y distales y se inspeccionó para detectar lesiones patológicas macroscópicas; los tumores a identificar se basaron de acuerdo la morfología macroscópica descrita por Piñols (1998), los cuales se agrupan en:

- Sésiles: masas que protruyen sobre la superficie mucosa y con un diámetro mayor que el de su unión a la mucosa y muy cercanos a la misma.
- Pendiculados: pólipos con tallo claramente visible.
- Exofíticos: usualmente polipoides protruyendo hacia la luz, presentan margen elevado con una cavidad central y una masa subyacente lobulada.
- Endofíticos: en forma de meseta o ulcerativos con tendencia ligera o nula a abultar hacia la luz.
- Placas: lesiones con una superficie relativamente plana, ligeramente por encima del nivel de la mucosa.

### **3.7.9 Estudio histopatológico**

El colon y las lesiones macroscópicas en colon, correspondiente a los animales tanto del modelo de inflamación aguda como del modelo de CCR respectivamente, se colocaron en una solución amortiguadora de formaldehído al 4 % (formaldehído al 37 % y solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4) por 6 h. Los cortes se deshidrataron por medio de un gradiente de alcoholes (agua destilada, etanol al 70 %, etanol al 90 %, etanol absoluto y xilitol) para su conservación. Posteriormente, el tejido se sumergió en parafina por medio de un histoquinet. Al bloque de parafina se le realizaron cortes histológicos por medio de un micrótopo con grosor de 8  $\mu$ m, para fijar en un portaobjetos mediante un baño termostático y posteriormente los cortes fijados se re-hidrataron nuevamente colocándolos por el gradiente de alcoholes anteriormente mencionado. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para la observación microscópica a 10x, 40x y 100x (Perše y Cerar, 2011). Las lesiones del colon se clasificaron como sanas, inflamación (grado: +, ++ y ++++) y adenocarcinomas (Tanaka, 2009).

### **3.7.10 Expresiones proteicas del sistema IGF por técnica de inmunohistoquímica**

Para la cuantificación de la expresión proteica de IGF-1R (Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina), IGF-1 e IGF-2 (Factores de crecimiento similar a la insulina) e IGFbps (Proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina) en lesiones del colon del modelo de CCR, se determinaron mediante inmunohistoquímica.

Los tejidos de colon en bloques de parafina, obtenidos del análisis histopatológico, se cortaron en laminillas de 4  $\mu$ m de espesor. Expresiones de inmunotinción de IGF-1 (número de catálogo W18, SC-74116), IGF-2 (número de catálogo 8H1, SC-293176), IGF-1R (número de catálogo 2C8, SC-463), IGF2BP1 (número de catálogo D-9, SC- 166344), IGFBP2 (número de catálogo G-4, SC- 515134) e IGFBP3 (número de catálogo B-5, SC-365936) se determinaron con anticuerpos monoclonales de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EE. UU.),

acorde a lo reportado por Han y colaboradores (2016), con las siguientes modificaciones: mediante desparafinación a 60 °C, las muestras se sumergieron en EZ Prep (1X), solución al 10%, durante 5 min. Las muestras utilizadas para la expresión de IGF-1, IGF-1R, IGFBP2 e IGFBP3 se desenmascararon con citrato de sodio 10 mM (pH 6.0); las muestras utilizadas para las expresiones de IGF-2 e IGFBP1 se desenmascararon con Tris/EDTA (pH 9.0) con la finalidad de optimizar el desenmascaramiento. Todas las muestras se calentaron durante 5 minutos a 20 Lb de presión y 1 atm. Posteriormente, las muestras se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 0.9% durante 5 min para eliminar las actividades de la peroxidasa endógena y la recuperación de antígenos, posteriormente se enjuagaron con agua estéril y se sumergieron en PBS al 10 % durante 4 min. Inmediatamente, las muestras se incubaron con los anticuerpos monoclonales correspondientes (relación 1:50) a 37 °C durante 45 min, seguido de la adición del segundo anticuerpo biotinilado (Novocastra Post Primary, Leica, IL, EE. UU.) con una incubación a 37 °C por 30 min. Posteriormente, con la finalidad de detectar y visualizar los niveles de expresión de proteínas, las muestras se incubaron con Novolink Polymer (Leica, IL, EE. UU.) a 37 °C durante 20 min. Después de la coloración con el cromógeno de diaminobencidina (DAB) durante 1 min, las muestras se enjuagaron con PBS durante 2 min. Se añadió H&E como contraste de tinción durante 30 s. Para el control negativo, el anticuerpo primario se reemplazó con PBS. La clasificación se realizó según la proporción de células positivas de la siguiente manera: tinción de células individuales y células positivas <5 %, negativas (-); pequeños grupos de tinción y células positivas 5–24 %, débilmente positivas (+); tinción agrupada y células positivas 25–50 %, positivas (++); tinción en masa y células positivas > 50 %, fuertemente positivas (+++).

### 3.8 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para las determinaciones de humedad y difusividad efectiva de los microencapsulados de BF mediante las técnicas de goteo y secado por aspersion, usando diferencia de medias ( $\alpha=0.050$ ) y diferencia de medias (Tukey HSD  $\alpha=0.050$ ) para la comparación de los dos métodos de microencapsulamiento. Se desarrolló un diseño de mezclas para la determinación de ISA e IAA. La caracterización reológica y fisicoquímica de los microencapsulados se determinó mediante un diseño de Box-Behnken para la modelación de graficas de superficie de respuesta.

Respecto al modelo de inflamación y al modelo CRR, los datos categóricos se expresan como medias  $\pm$  SEM, utilizando el análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la comparación de medias mediante la prueba Tukey HSD o Dunnett. La prueba de chi-cuadrada analizó la incidencia y la clasificación histopatológica de las lesiones de colon, así como las tasas positivas de las expresiones del sistema IGF. Las correlaciones se evaluaron mediante el análisis del coeficiente de correlación de Pearson.

Los análisis estadísticos anteriores se realizaron con el software STATISTICA 7 StatSoft© 2005 (Tulsa, Oklahoma, EE. UU.), Con  $p < 0.05$  como diferencia significativa.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Grado de fosfatación del almidón

Como primera fase del estudio, el almidón se modificó estructuralmente por entrecruzamiento por el método convencional con ayuda de un mortero, utilizando trimetafosfato trisódico como agente fosfatante a una concentración de 2.5 g en 100 mL, teniendo como resultado 0.658 % de fósforo y un grado de sustitución de 0.0353. El porcentaje de fósforo del almidón alto en amilosa fosfatado y el grado de sustitución se obtuvieron mediante una curva de calibración de fósforo, en forma de fosfato monobásico de potasio con un coeficiente de regresión lineal de  $R^2 = 0.9986$  (Anexo D).

Acorde a lo reportado por Liu (2012), los enlaces moleculares en un almidón fosfatado inhiben la hidratación del almidón granular. Cuando el enlace se forma con sodio trimetafosfato, el número de grupos fosfatos incorporados en el almidón es más alto que otras sales; mientras que, al usar oxiclórico de fósforo, la fosfatación es en el exterior de la estructura del almidón. Los valores obtenidos en nuestro estudio muestran que el porcentaje de fósforo en el almidón es más alto que el obtenido por Lim y Seib (1993), quienes por el método convencional y al mismo pH fosfataron un almidón de maíz obteniendo 0.14 % de fósforo.

El contenido de fósforo es directamente proporcional a la cantidad de sal fosfatante (Haggag y Faheem, 2015). Como se observa en el Cuadro 4, el porcentaje de fósforo total al usar 8 mg/100 mL de tripolifosfato de sodio es estadísticamente mayor comparado con trisodiotrimetafosfato a la misma concentración, lo cual pudiera deberse al mayor número de grupos fosfato incorporados en el almidón. Sin embargo, el porcentaje de fósforo y su grado de sustitución no presentaron diferencias estadísticas tanto al utilizar tripolifosfato de sodio como trisodiotrimetafosfato a una concentración de 2.5 mg en 100 mL. La similitud al utilizar estas dos sales fosfatantes podría explicarse por el entrecruzamiento en el método convencional, debido a la baja concentración de fósforo y a la posible heterogeneidad que la muestra pudiera presentar.

El grado de sustitución del almidón alto en amilosa fosfatado en nuestro estudio se encuentra en un nivel permitido ( $0.035 \pm 0.01$ ); ya que, de acuerdo a la literatura existe un límite de 0.03 debido a la toxicidad que el fósforo pudiese aportar. Por lo anterior, y con la finalidad de preparar un almidón más estable a la temperatura y bajos valores de pH de acuerdo a lo reportado por Castro (2010), se seleccionó el uso del trisodio trimetafosfato a una concentración de 2.5 mg/100mL (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Grado de fosfatación del almidón, utilizando tripolifosfato de sodio comparado con trisodio trimetafosfato.

Muestra	Concentración PO <sub>4</sub> (PPM)	Fósforo (mg/100mL)	% Fósforo	Grado de sustitución
2.5 STTP (tripolifosfato de sodio)	237.891	1.96	0.78 ±0.04 <sup>C</sup>	0.042 ±0.002 <sup>C</sup>
8 STTP (tripolifosfato de sodio)	359.078	2.96	1.18 ±0.03 <sup>A</sup>	0.065 ±0.002 <sup>A</sup>
2.5 STMP (trisodiotrimetafosfato)	199.817	1.65	0.66 ±0.01 <sup>C</sup>	0.035 ±0.000 <sup>C</sup>
8 STMP (trisodiotrimetafosfato)	275.070	2.26	0.91 ±0.03 <sup>B</sup>	0.049 ±0.002 <sup>B</sup>

Valores promedio de tres repeticiones. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Diferencias de medias. Tukey  $\alpha=0.050$ ).

## 4.2 Caracterización fisicoquímica y mecánica de las matrices encapsulantes

Las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los biopolímeros ya que, dependen de la composición de sus mezclas y su proporción; permitieron entender y comprender la fenomenología de la relación entre matriz y probióticos.

### 4.2.1 Comportamiento en el proceso de encapsulamiento mediante la técnica de goteo

La Figura 4.1a muestra que las mezclas encapsuladas con porcentajes bajos de alginato de sodio (0.2-0.8%) y goma arábiga (0.4-1.2%), dentro de la relación de mezcla 40:20:40 tienen valores bajos de ISA (2.29). El alginato de sodio fue el factor más influyó y que favoreció la difusión relativamente rápida de la humedad y

podría compensar las propiedades fisicoquímicas de la caseína. La Figura 4.1b muestra que las mezclas encapsuladas con un alto porcentaje de caseína (0.2-0.6%), presentan altos valores de ISA (12.08), atribuibles a su conjunto heterogéneo de aminoácidos caracterizados por estar altamente hidratados (Smith, 1967). Las Figuras 1c y 1d muestran que el alginato de sodio podría considerarse el factor más significativo. Del mismo modo, Gupta y colaboradores (2012) afirmaron que, a medida que aumenta la concentración de alginato de sodio en las mezclas encapsuladas, se presentaba una mayor fuerza de ruptura sobre la película.

Lo anterior, aunado a un alto módulo de Young, es un comportamiento característico de los residuos de D-manurónico y L-gulurónico que conforman el alginato de sodio, debido a su gran flexibilidad en solución. De acuerdo al preliminar comportamiento preliminar, se puede deducir que, su estructura está compuesta por un alto número de unidades monoméricas y tiene una relación directamente proporcional que establece con su viscosidad (mayor viscosidad a mayor número de unidades monoméricas). Lo anterior es debido al estrés aplicado en enlaces iónicos dentro del gel de alginato conduciendo a la disociación y restructuración de los enlaces (Boontheekul *et al.*, 2005). Gupta y colaboradores (2012) reportaron que, desde el punto de vista de la estabilidad y completa liberación de los materiales bioactivos, el alginato de sodio es un agente de encapsulación adecuado por un método de emulsión, debido a que el alginato proporciona una mejor estabilidad de almacenamiento.

En la mezcla de goma arábica, alginato de sodio y caseína en relación 40:20:40, el análisis de varianza para la respuesta de la fuerza de película reportó una correlación  $R^2 = 0.998$  y un error de 0.00005, mostrando un rango de 1.0-2.5 en sólidos solubles, donde el factor lineal de goma arábica al 1.2 % fue significativamente representativo; para optimizar las proporciones de las mezclas la ecuación matemática permitió lograr este objetivo y se muestra en la Figura 4.1 junto a la superficie de respuesta. El rango de valores en fuerza de ruptura en esfera osciló de 0.03-0.07 N, fuerza de ruptura en película de 0.06-0.31 N con

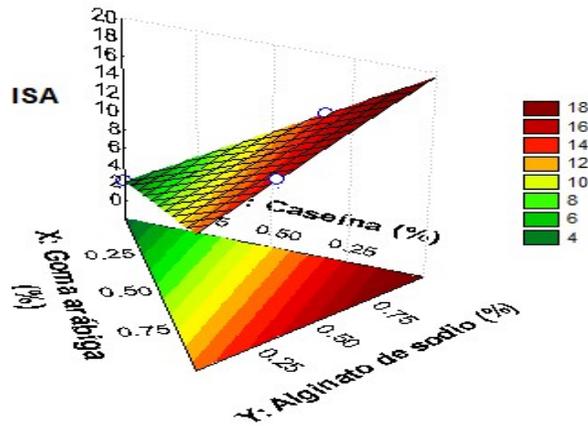
módulo de Young de 1.4-7.2 N mm<sup>-2</sup> como parámetros con diferencia significativa mayor al resto de las propiedades fisicoquímicas. En el Cuadro 5 se observa las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la mezcla 40:20:40 mediante el encapsulamiento por goteo. Los valores promedio de tres repeticiones muestran que la mejor concentración de los materiales encapsulantes corresponde a 1.2 % goma arábica, 0.8 % alginato y 0.2 % caseína. Se puede observar que, la fuerza aplicada para causar una ruptura en las películas es relativamente baja, factor no deseado que afecta directamente el módulo de Young; este factor que mide la viscoelasticidad lineal proporciona una relación entre la fuerza de ruptura y la flexibilidad que la película tiene en un área determinada (De Vos *et al.*, 2010). Por lo anterior, se requiere tener un valor mayor en el módulo de Young al reportado para aumentar su resistencia, posterior a las condiciones gastrointestinales.

#### **4.2.2 Comportamiento en el proceso de encapsulamiento mediante secado por aspersión I**

La mezcla encapsulada que contiene porcentajes de almidón fosfatado entre 0.5 y 2.5 % presentó un ISA bajo (4.48) (Figura 4.2a). El alginato de sodio fue el factor que tuvo un comportamiento inverso, respecto al ISA, a altas concentraciones de este polisacárido aniónico. Esta condición podría explicarse por su gran compatibilidad cuando se une con almidón (Larrea *et al.*, 2005). Por otro lado, las mezclas encapsuladas con un alto porcentaje de goma arábica (0.4-1.2 %) dan como resultado valores IAA altos (12.20) (Figura 4.2b). Esto es adecuado para un rendimiento óptimo. El almidón fosfatado es el factor que más influyó en IAA; debido al hecho de que los gránulos de almidón pierden integridad durante el proceso de extrusión, aumentando la liberación de compuestos solubles (Mason, 1986). Las mezclas con la relación 40:40:20 mostró un rango de pH de 5.92 a 6.47, siendo la goma arábica un factor representativo significativo para los valores de fuerza de ruptura de la película (Figura 4.2c). Se puede observar que la concentración de la goma arábica fue mayor, al mismo tiempo que aumentó el pH; debido a la mayor concentración de iones de hidrógeno presentes en la solución.

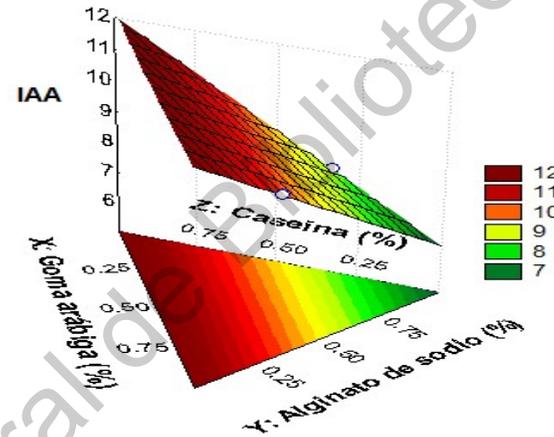
a

**Variable: ISA**  
**Modelo: Lineal**  
 $v = +12.497 * x + 19.555 * y + 2.290 * z.$



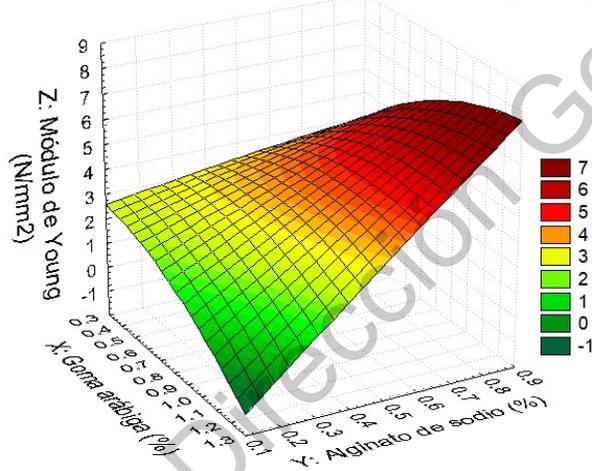
b

**Variable: IAA**  
**Modelo: Lineal**  
 $v = +11.820 * x + 6.540 * y + 12.084 * z.$



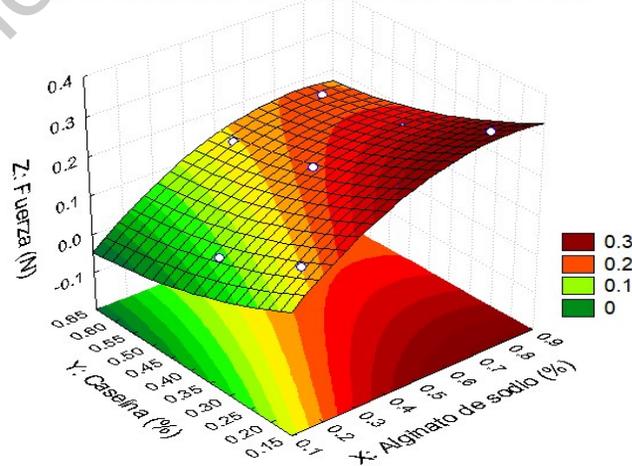
c

$Z = 2.607 + 0.050 * x - 0.550 * y - 2.949 * x^2 + 9.308 * x * y - 0.490 * y^2$



d

$Z = 0.143 + 0.752 * x - 0.483 * x^2 - 0.697 * y + 0.469 * y^2 - 0.004$



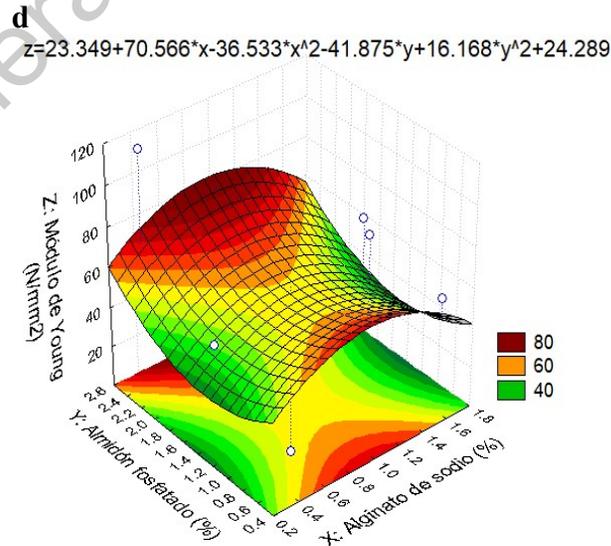
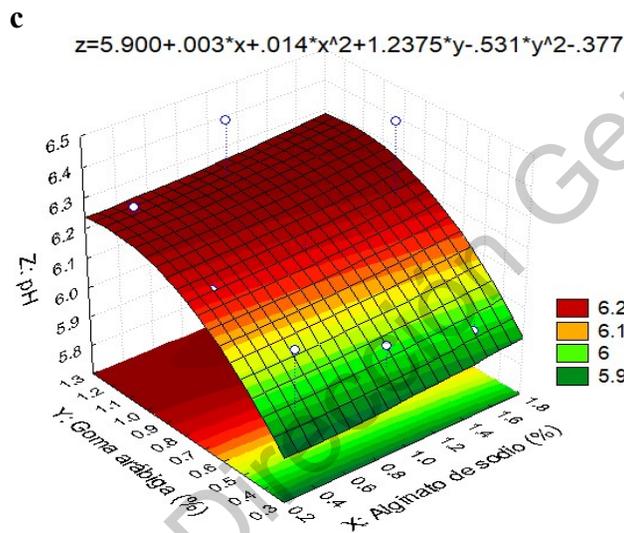
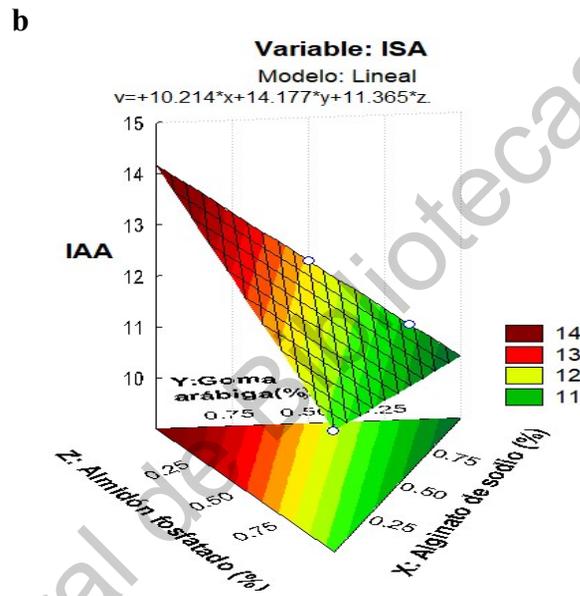
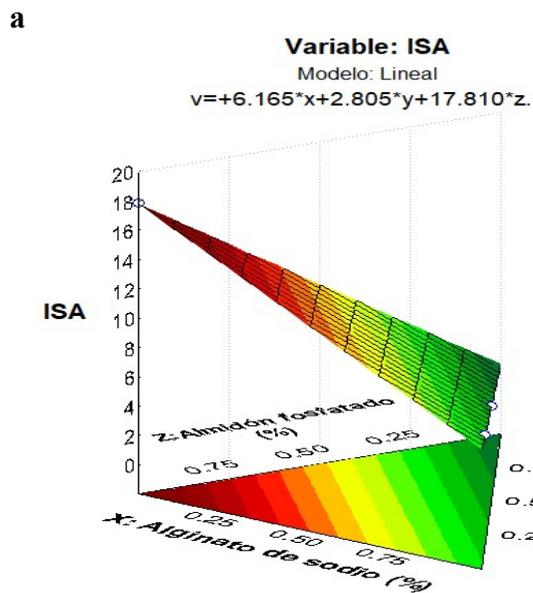
**Figura 4.1.**

Caracterización de agentes encapsulantes mediante la técnica de goteo (constituido por goma arábica, alginato de sodio y caseína). Diseño de mezclas expresado en porcentaje y su comportamiento para (a) ISA y (b) IAA. Los valores mostrados junto a cada eje indican la proporción de los agentes encapsulantes en la mezcla y su mejor ángulo de rotación. Gráficos de superficie de respuesta y su comportamiento reológico y fisicoquímico de (c) Módulo de Young y (d) Fuerza de ruptura. Los análisis corresponden a la mezcla óptima de material encapsulado (Anexo B). El área roja indica una combinación óptima.

Los resultados respecto a la fuerza de ruptura en la película fueron gratamente esperadas, reportando 0.88-4.27 N y con un módulo de Young de 22.00-114.58 N mm<sup>-2</sup> como variables con diferencia significativa al resto de las propiedades fisicoquímicas.

Con respecto al módulo de Young (Figura 4.2d), las películas con mayor flexibilidad se obtienen a concentraciones medias de alginato de sodio y altas de goma arábica; este comportamiento es debido a que el  $\beta$ -D-galactopiranosilo, cadena principal de la goma arábica, aumenta la viscosidad de la solución si se maneja a un pH entre 6 y 7. Fannon y colaboradores (1992) presentan resultados similares; quienes demostraron que, los polisacáridos de fosfato tienen una mayor viscosidad y flexibilidad que los almidones nativos debido a los altos valores del módulo de Young; debido a que el éster o éter se une con los grupos hidroxilo del almidón. Lo anterior relaciona la capacidad que tiene el material para resistir la fractura entre la deformación ocasionada, que es un parámetro importante para que el sistema inmovilizado posea las propiedades fisicoquímicas y reológicas para mantener su integridad física bajo las condiciones hidrodinámicas durante el encapsulamiento por la técnica de secado por aspersión.

Aunado a lo anterior, el Cuadro 5 resume la caracterización fisicoquímico-mecánica de las mezclas óptimas de material encapsulado mediante la técnica de secado por aspersión I (1.6% de alginato de sodio, 0.8% de goma arábica y 2.5% de fosfato de almidón). En este estudio, la densidad que se obtuvo fue cercana a 1 g cm<sup>-3</sup>, debido a que temperaturas bajas de secado por aspersión generan mayor densidad volumétrica, es decir, la densidad volumétrica está estrechamente relacionada con el tamaño de partícula y sus dimensiones (Lian *et al.*, 2002; Nayak *et al.*, 2010). Estudios similares fueron reportados por Kalkan y colaboradores (2017) demostrando que la densidad de microencapsulados disminuyó con el aumento de la temperatura de entrada del aire.



**Figura 4.2.**

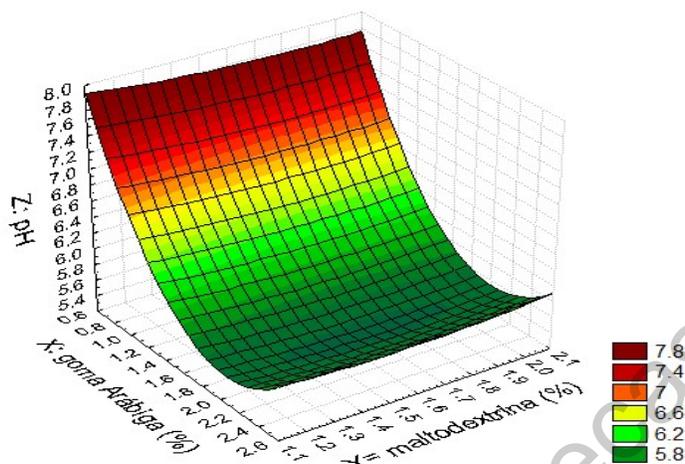
Caracterización de mezclas encapsulantes utilizando la técnica de secado por aspersión I (constituido por goma arábica, alginato de sodio y almidón de fosfato). Diseño de mezcla expresado en porcentaje y su comportamiento para (a) ISA y (b) IAA. Los valores mostrados junto a cada eje indican la proporción de los agentes encapsulantes en la mezcla y su mejor ángulo de rotación. Gráficos de superficie de respuesta y su comportamiento reológico y fisicoquímico de (c) pH y (d) Módulo de Young. Los análisis corresponden a la mezcla óptima de material encapsulado (Anexo B). El área roja indica una combinación óptima.

### 4.2.3 Comportamiento en el proceso de encapsulamiento mediante secado por aspersión II

Los modelos de encapsulación han usado tradicionalmente la conocida mezcla conformada por goma arábica y maltodextrina (proporciones 80:20 y 50:50). En consecuencia, se realizó un perfil fisicoquímico con estas proporciones de mezcla encapsulada (secado por aspersión II, Anexo B) con el fin de comparar su rendimiento con aquellas mezclas obtenidas por la técnica de secado por aspersión I. Los resultados del diseño experimental muestran que, las mezclas constituidas por goma arábica y maltodextrina en proporción 80:20 obtienen valores menores de ISA (74.71), en comparación con las proporciones de goma arábica y maltodextrina 50:50 con 78.22 de ISA. En general, las mezclas encapsuladas obtenidas por la técnica de secado por aspersión II muestran valores de ISA significativamente más altos que los obtenidos por las técnicas de encapsulamiento por goteo (2.29) y secado por aspersión I (4.48). De acuerdo a la ecuación de Stokes-Einstein, el coeficiente de difusión es inversamente proporcional a la viscosidad de la solución, el cual aumenta con la temperatura (Rey, 2016). La influencia que ejerce el factor de pH es visualizada en el diagrama de superficie de respuesta (Figura 4.3), donde a bajas concentraciones de goma arábica obtenemos mayor pH idóneo para el mantenimiento de la viabilidad y estabilidad de la cepa durante el encapsulamiento.

En el Cuadro 5 se observa que, la densidad es ligeramente superior a  $1 \text{ g cm}^{-3}$  debido al contenido de sólidos solubles en la mezcla de los polisacáridos; sin embargo, este parámetro no se vio afectado por la variación entre encapsulantes. Debido a la baja viscosidad de la goma arábica (Cuadro 5), cada material encapsulado genera nuevas propiedades funcionales en la mezcla final. En el presente estudio, todas las mezclas de goma arábica y maltodextrina mostraron la ausencia de cristalización de las películas. Por lo tanto, sus propiedades mecánicas y elásticas no se evaluaron debido a su alta tasa de solubilidad, un parámetro que refleja la degradación de los componentes químicos de la mezcla durante condiciones severas de microencapsulación (Kalkan *et al.*, 2017).

$$Z = 11.035 - 4.646 \cdot x - 1.017 \cdot y + 1.104 \cdot x^2 + 0.086 \cdot x \cdot y + 0.26 \cdot y^2$$



**Figura 4.3.** Gráfica de superficie de respuesta pH. Secado por aspersión II, mezcla 80:20. Maltodextrina (concentraciones: 1.2, 1.6 y 2 %) contra goma arábica (concentraciones: 0.8, 1.6 y 2.4 %).

### 4.3 Cinética de crecimiento de BF

Mediante a la cinética de crecimiento de BF se determinó las diversas etapas de crecimiento, a fin de, seleccionar las mejores condiciones en tiempo y concentración de BF y su posterior proceso de microencapsulación. En la Figura 4.4 se observa que, la etapa final de la fase logarítmica tardía y principio de la estacionaria del ciclo de vida de BF se alcanzó en un tiempo de 18 h posterior a la activación. En este tiempo se logró un total de  $1.3108E+11$  células  $mL^{-1}$  ( $9.216E+8$  UFC  $mL^{-1}$ ), de las cuales  $1.30944E+11$  fueron células viables  $mL^{-1}$  con una producción de  $0.38$  g  $mL^{-1}$ , mayor a lo reportado en la literatura (Berrada *et al.*, 1991; Shah *et al.*, 1995; Matsumoto *et al.*, 2004). Esta cinética de crecimiento de BF sugiere que el tiempo para alcanzar la fase estacionaria fue de tan sólo 3 h, comparado a las 25 h de la fase estacionaria de *Bifidobacterium breve* reportado por Castro (2010) bajo condiciones similares en la activación, siendo un gran logro en este trabajo, denotando un rápido y exponencial crecimiento dentro de las 18 h.

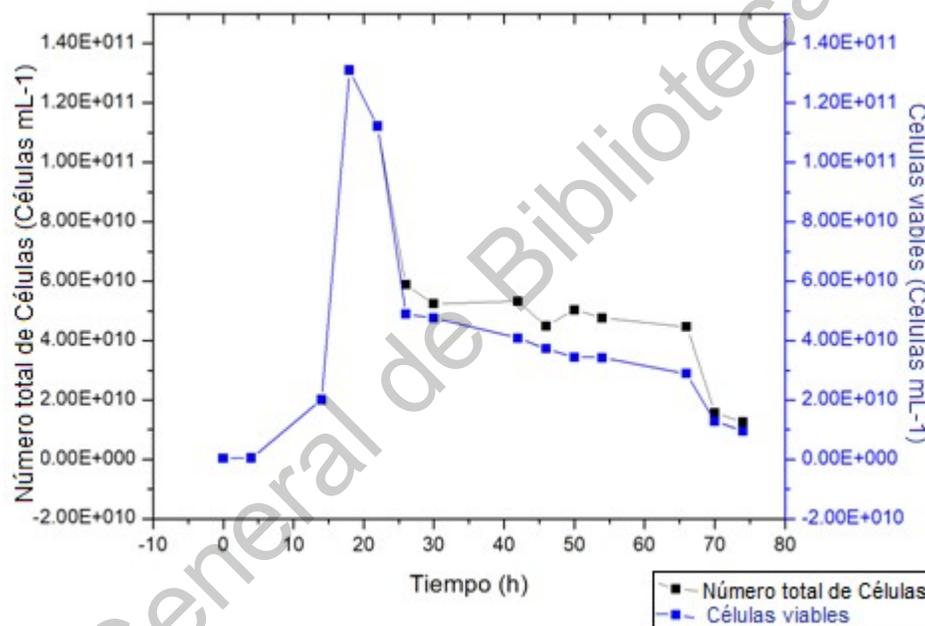
**Cuadro 5.** Caracterización fisicoquímica y mecánica de la mezcla encapsulante óptima por la técnica de goteo, secado por aspersión I y secado por aspersión II

Técnica	Material encapsulante	Densidad (g cm <sup>-3</sup> )	Viscosidad (mPa.s)	Sólidos solubles	pH	ISA	IAA	Fuerza (N)	Módulo de Young (N mm <sup>-2</sup> )
<b>Goteo</b>	1.2 % goma arábica/ 0.8 % alginato/ 0.2 % caseína	1.00±0.01	219.00±23.09	2.50±0.20	6.40± 0.24	2.29±0.48	12.08±0.01	0.21±0.02	5.64±0.52
<b>Secado por aspersión I</b>	1.6 % alginato/ 0.8 % goma arábica/ 2.5 % almidón fosfatado	0.99±0.01	58.66±18.45	3.10±0.23	6.27±0.07	4.48±1.32	12.20±0.03	4.40±0.34	114.58±8.79
<b>Secado por aspersión II</b>	0.8 % goma arábica/1.6 % maltodextrina	1.02±0.02	21.99±4.02	2.40±0.3	7.12±0.090	74.71±1.37	1.39±0.06	ND	ND

Las proporciones óptimas de cada mezcla de material encapsulado corresponden a 40:20:40 para la técnica de goteo; 40:40:20 para la técnica de secado por aspersión I y 80:20 para la técnica de secado por aspersión II (Anexo B). ISA (Índice de solubilidad en agua) representa el peso de sólidos secos, se expresa como el porcentaje del peso original de la muestra. IAA (Índice de absorción en agua) implica los sólidos originales (peso seco). ND: no detectado. Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

Las condiciones de crecimiento de BF (medio, temperatura y atmósfera anaerobia) participaron activamente para lograr una alta viabilidad de células (99.896 % de viabilidad) en las 18 h y una producción mayor a lo esperado de  $9.216E+8$  UFC  $mL^{-1}$  (máxima producción) comparado con  $1E+7$  UFC  $mL^{-1}$ , correspondiente al valor recomendado donde la cepa puede ejercer un efecto benéfico al hospedador.

Es importante añadir que al final de la cinética de crecimiento (posterior a las 74 h) se observa una excelente viabilidad final de 75 %.



**Figura 4.4.** Cinética de crecimiento de BF. Viabilidad de las células  $mL^{-1}$  en un tiempo total de 74 h.

#### 4.4 Impacto de las técnicas de secado por aspersión y goteo en la viabilidad bacteriana

La sobrevivencia de probióticos ácido lácticos depende de las condiciones de estrés ambiental, tales como: producción de peróxidos, producción de ácidos láctico y acético, disponibilidad de nutrientes y temperatura de incubación (Gregurek, 1999). Para esta evaluación, se realizó la microencapsulación correspondiente con la viabilidad inicial de  $1.30944E+11$  células  $mL^{-1}$  en forma libre. Se logró una viabilidad significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) de  $8.99E+10$

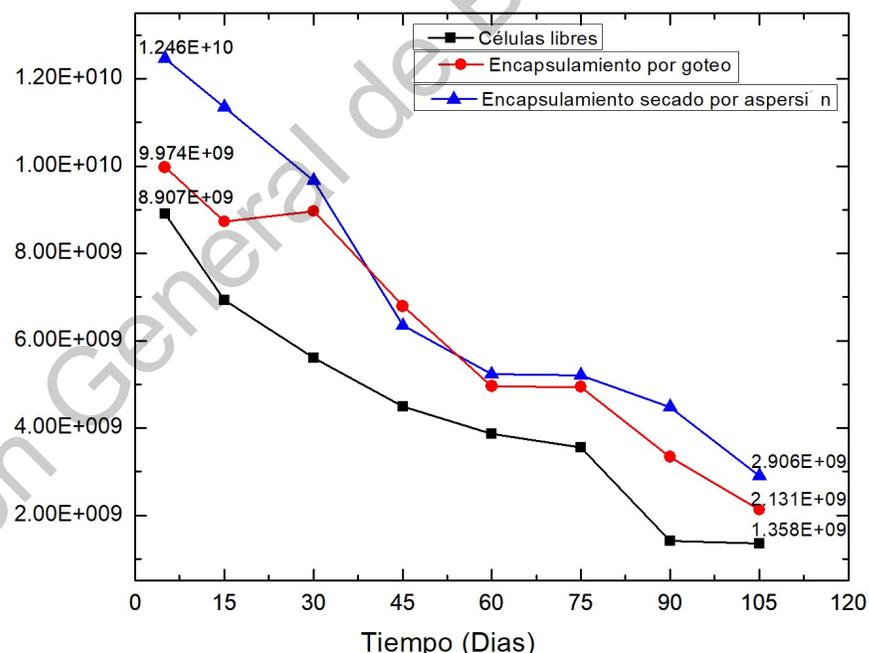
células mL<sup>-1</sup> mediante la técnica de secado por aspersión I en comparación con la de la técnica de microencapsulación por goteo (7.46E+09 células mL<sup>-1</sup>). Este resultado puede atribuirse a una alta tolerancia térmica de *B. longum*, además de la protección proporcionada por los materiales de microencapsulación, como lo fue el alginato de sodio, el cuál proporcionó mayor fuerza y estabilidad a pH altos en ambas técnicas de encapsulamiento, así como a las condiciones adecuadas de temperatura y velocidad de flujo durante el proceso de secado por aspersión. Este comportamiento no fue observado por Simpson y colaboradores (2005) para *B. longum* microencapsulado utilizando la técnica de goteo. En su estudio, tienen como resultado una viabilidad celular sólo con 20% al utilizar goma arábica como matriz encapsulante. Una posible causa es el sistema encapsulante dependiente del balance hidrófilo-hidrófobo de la matriz polimérica y del grado de entrecruzamiento.

#### **4.5 Viabilidad de BF encapsulados a largo plazo.**

Con la finalidad de poder comprenderla cinética de mortandad de BF se realizó la cuantificación de estos probióticos por un periodo de 105 días. Las mezclas evaluadas fueron las óptimas, correspondientes a los diferentes sistemas microencapsulantes comparado con su forma libre (sin matriz encapsulante). En la Figura 4.5 se puede observar la viabilidad inicial (5 días posteriores al almacenamiento a 4 °C) de 1.24E+10 células mL<sup>-1</sup> y una viabilidad final (105 días posteriores al almacenamiento) de 2.9E+09 células mL<sup>-1</sup> en los microencapsulados durante la técnica de secado por aspersión I (correspondiente a la mezcla: 1.6% alginato de sodio/0.8% goma arábica/2.5% almidón fosfatado). Esta técnica reportó mayor número de células viables, comparado con los microencapsulados de BF mediante la técnica de goteo (correspondiente a la mezcla: 1.2% goma arábica/0.8% alginato de sodio/0.2% caseína) y, estadísticamente, ambas técnicas reportaron mayor viabilidad en comparación con células en su forma libre. Cabe resaltar que, en este estudio, se obtuvo una alta

viabilidad final de BF microencapsulado mayor a las condiciones recomendadas de  $1E+07$  células  $mL^{-1}$  para microorganismos probióticos.

Hasta el momento se han reportado pocos estudios en relación a las condiciones de almacenamiento sin incorporar el microorganismo o las cápsulas en algún alimento (O'Riordan *et al.*, 2001; Crittenden *et al.*, 2006; Weinbreck *et al.*, 2010) y de ellos, algunos no realizaron las comparaciones con microorganismos sin encapsular. En estos experimentos se obtuvieron resultados dispares, dependiendo principalmente de la cepa inmobilizada y del material empleado como matriz encapsulante. Jiménez (2011) microencapsuló *B. longum* BAA-999 utilizando xantano-gelano (1:0.75%) y jamilano-gelano (1:1%), reduciendo significativamente el número de microorganismos a los 15 días de almacenarse, día a partir del cual los niveles bacterianos se mantuvieron por debajo de los límites de detección del estudio ( $1E+10$  UFC).

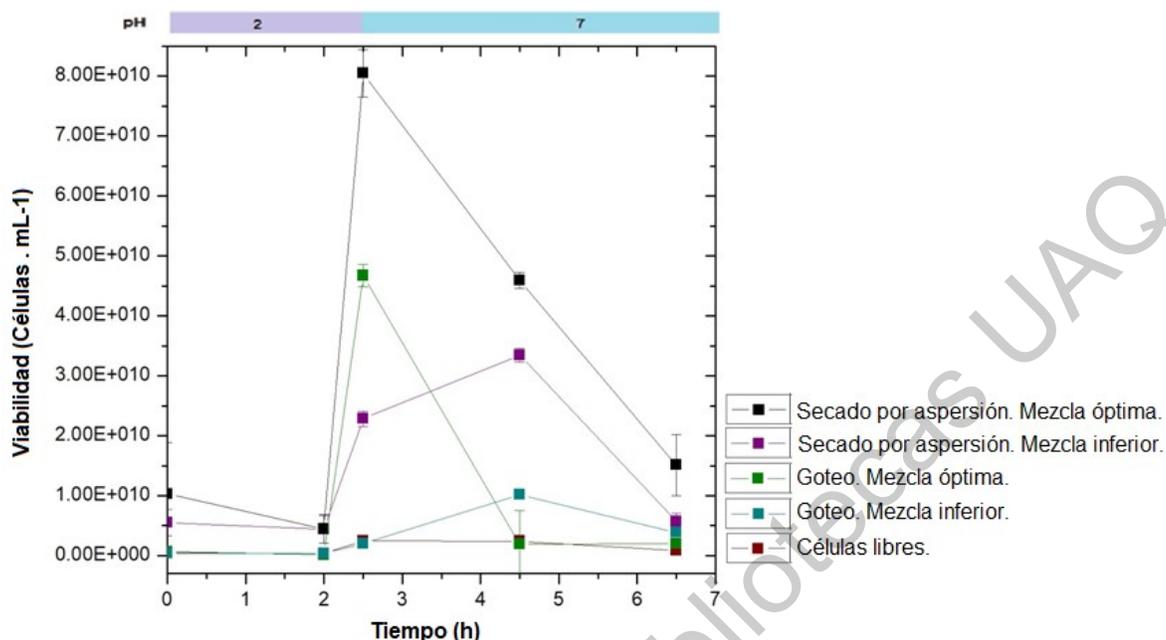


**Figura 4.5.** Viabilidad celular de BF a largo plazo. Comparación de microencapsulados de BF mediante la técnica de goteo (mezcla: 1.2 % goma arábica/0.8 % alginato de sodio/0.2 % caseína), microencapsulados de BF mediante la técnica de secado por aspersión I (mezcla: 1.6 % alginato de sodio/0.8 % goma arábica/2.5 % almidón fosfatado) y células en su forma libre. Muestras almacenadas a  $4^{\circ}C$ .

Aunado a lo anterior, la temperatura, velocidad en el encapsulamiento y las condiciones específicas de operación sugieren que el secado por aspersión I es la mejor técnica para proteger la Bifidobacteria. Debido a la liberación controlada de BF, lográndose producir un soporte con una alta resistencia mecánica con posibilidades de mantener la integridad del sistema inmovilizado a pesar de los elevados esfuerzos de corte, tiempo de almacenamiento y deformaciones provocadas por las condiciones gastrointestinales.

#### **4.6 Viabilidad de BF posterior a condiciones gastrointestinales simuladas.**

La capacidad individual de las Bifidobacterias a sobrevivir en condiciones ácidas depende de la especie y su origen (Marteau *et al.*, 1997). Para este análisis, se utilizó la viabilidad inicial de  $8.99E+10$  células  $mL^{-1}$  para la técnica de secado por aspersión, y de  $7.46E+09$  células  $mL^{-1}$  para la técnica de goteo. Se observó que las condiciones gastrointestinales simuladas no tuvieron un impacto negativo en la viabilidad (Figura 4.6). Mediante la técnica de secado por aspersión I, la viabilidad final de la mezcla óptima fue significativamente mayor ( $1.51E+10$  células  $mL^{-1}$ ) en comparación con la inferior ( $5.67E+09$  células  $mL^{-1}$ ); y comparadas con la mezcla óptima ( $1.98E+09$  células  $mL^{-1}$ ), y la inferior ( $3.85E+09$  células  $mL^{-1}$ ), ambas obtenidas por la técnica de goteo (Figura 4.6). Estos resultados sugieren que la microencapsulación mejora la capacidad de *B. longum* para sobrevivir en condiciones ácidas. Matsumoto y colaboradores (2004) informaron que las cepas de *B. longum* y *B. adolescentis* tienen una tolerancia ácida muy limitada y después de 1 h de incubación a pH 3.0 se observó una disminución muy considerable en la viabilidad de ambas cepas. Del mismo modo, Berrada y colaboradores (1991) observaron la viabilidad dependiente del pH de dos cepas comerciales de *B. longum* y encontró una inhibición de 0.5 a 4 unidades logarítmicas. En este estudio, el crecimiento exponencial de *B. longum* fue influenciado significativamente por el pH cuando las bacterias fueron expuestas a condiciones ácidas, ya que el pH homeostático se mantiene comúnmente liberando  $H^+$  de la célula.



Método	Viabilidad inicial <sup>1</sup>	Viabilidad posterior al encapsulamiento <sup>1</sup>	Encapsulantes + BF	Relación en mezcla	Digestión GI simulada <sup>1</sup>
Goteo	1.30944E+11	7.46E+09 <sup>B</sup>	1.2%goma arábica/ 0.8%alginate de sodio/ 0.2%caseína	40:20:40	1.98E+09 <sup>B, d</sup>
			1.8%goma arábica/ 1.2%alginate de sodio/ 0.2%caseína	60:30:10	3.85E+09 <sup>A, c</sup>
Secado por aspersión I	1.30944E+11	8.99E+10 <sup>A</sup>	1.6%alginate de sodio/ 0.8%goma arábica/ 2.5%almidón fosfatado	40:40:20	1.51E+10 <sup>A, a</sup>
			0.4%alginate de sodio/ 0.2%goma arábica/ 10%almidón fosfatado	10:10:80	5.67E+09 <sup>B, b</sup>

**Figura 4.6.** Cuantificación de células de BF mL<sup>-1</sup> durante la digestión gastrointestinal (GI) simulada. Mezclas óptimas e inferiores en encapsulamiento por goteo y encapsulamiento del secado por aspersión I. Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes. (Diferencias de medias por método de encapsulamiento: Student's  $\alpha=0.050$ . Diferencias de medias comparando dos métodos de encapsulamiento: Tukey HSD  $\alpha=0.050$ ). Valores promedio de tres repeticiones. <sup>1</sup>Unidades de viabilidad celular: células mL<sup>-1</sup>.

Este efecto explica en nuestros resultados el crecimiento de BF durante la digestión GI simulada debido a que, las bacterias resistieron el estrés producido por el cambio de pH en las primeras 2.5 h, para posteriormente continuar creciendo en la fase logarítmica y finalmente disminuyeron a valores aún superiores a los valores de viabilidad inicial. La gran mayoría de estos reportes se han basado sobre exposiciones cortas de Bifidobacterias a condiciones de estrés sub letales, pero no se han reportado mejorías en la tolerancia a ambientes ácidos en tiempos prolongados (Booth, 1985).

En contraparte, la difusividad efectiva, evaluada como caída de concentración, fue un factor importante debido a la velocidad de difusión de las bacterias hacia el exterior, fenómeno que está relacionado con el comportamiento y cuantificación de células  $\text{mL}^{-1}$  durante la digestión GI simulada.

#### **4.7 Difusividad efectiva de BF microencapsulados en matriz óptima e inferior**

Se observa en el Cuadro 6 que posterior al encapsulamiento, tanto en secado por aspersión como por la técnica de goteo, no existe diferencia significativa en porcentaje de humedad al comparar las mezclas de cada técnica de encapsulación. Sin embargo, debido a que en secado por aspersión se obtiene una humedad de 3.48% como característica idónea, conlleva a la disminución de una posible contaminación del producto posterior al encapsulamiento.

En lo que respecta a la actividad de agua ( $A_w$ ), se observa gran diferencia estadística comparando las dos técnicas de microencapsulación (Cuadro 6); sin embargo, las mejores e inferiores mezclas dentro de una misma técnica, no presentan diferencias estadísticas. La misma tendencia es reportada por Abe y colaboradores (2009), quienes estudiaron la estabilidad de dos cepas de Bifidobacterias en formulaciones en polvo. Los probióticos *B. longum* BB536 y *B. animalis* subsp. *Lactis* fueron microencapsulados mediante secado por aspersión, reportando que ambas bacterias fueron estables a una  $A_w$  de 0.02. Sin embargo, a

una  $A_w$  de 0.13 *B. animalis* disminuyó drásticamente mientras que la viabilidad de *B. longum* no se vio afectada.

Respecto a la caída de concentración (ver curva de calibración para la determinación de la velocidad de difusividad en Anexo D), los resultados obtenidos durante el secado por aspersión (mezcla 40:40:20) fueron estadísticamente menores a los obtenidos en la mezcla 10:10:80. Una de las explicaciones es debido a que los geles incrementan el trayecto del sustrato y provocan una reducción de la velocidad de difusión; esto contribuye a una mayor velocidad de difusividad del encapsulado, a medida que aumenta la densidad celular, la difusión disminuye (Katime *et al.*, 2004).

**Cuadro 6.** Caracterización de humedad, actividad de agua y difusividad efectiva de BF microencapsulado utilizando mezclas óptimas e inferiores mediante técnicas de goteo y secado por aspersión.

Método	Encapsulantes + BF	Mezcla	Humedad (%)	$A_w$	Difusividad efectiva (mg mL <sup>-2</sup> )
<b>Goteo</b>	1.2% goma arábica/0.8% alginato de sodio/0.2% caseína	40:20:40 <sup>1</sup>	97.3 ±1.94 <sup>A</sup>	1.02 ±0.007 <sup>A</sup>	3.33 ±6.29 <sup>A, a</sup>
	1.8% goma arábica/1.2% alginato de sodio/0.2% caseína	60:30:10 <sup>2</sup>	97.3 ±2.29 <sup>A</sup>	1.02 ±0.008 <sup>A</sup>	24.44 ±9.14 <sup>B, b</sup>
<b>Secado por aspersión</b>	1.6% alginato de sodio/0.8% goma arábica/2.5% almidón fosfatado	40:40:20 <sup>1</sup>	3.48 ±1.12 <sup>A</sup>	0.33 ±0.013 <sup>A</sup>	547.9 ±10.12 <sup>A, c</sup>
	0.4% alginato de sodio/0.2% goma arábica/10% almidón fosfatado	10:10:80 <sup>2</sup>	3.79 ±1.92 <sup>A</sup>	0.34 ±0.023 <sup>A</sup>	1124 ±11.74 <sup>B, d</sup>

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Diferencias de medias. Student's  $\alpha=0.050$ ). Diferencia de medias comparando dos métodos de encapsulación (letras minúsculas): Tukey HSD  $\alpha=0.050$ . <sup>1</sup>Mezclas óptimas. <sup>2</sup>Mezclas inferiores.  $A_w$ : Actividad de agua.

Resultados opuestos han sido reportados por Converti y colaboradores (1997), quienes estructuraron microencapsulados con diferentes diámetros, no encontrando diferencias en la difusión en sistemas inmobilizados. Mientras que, Toshimasa y colaboradores (1961) determinaron en condiciones de estado estable de transferencia de oxígeno que a medida en que aumenta el tamaño de las esferas se produce una considerable reducción de la difusión de oxígeno en sistemas de fermentación aeróbicos.

Aunado a los puntos anteriores, el microencapsulamiento de BF mantiene una alta viabilidad manteniendo una temperatura constante de 37 °C en anaerobiosis estricta. Lo anterior es debido a un sistema de encapsulamiento altamente efectivo al utilizar la técnica de secado por aspersión I correspondiente a la mezcla de 1.6% alginato de sodio/0.8% goma arábica/2.5% almidón fosfatado.

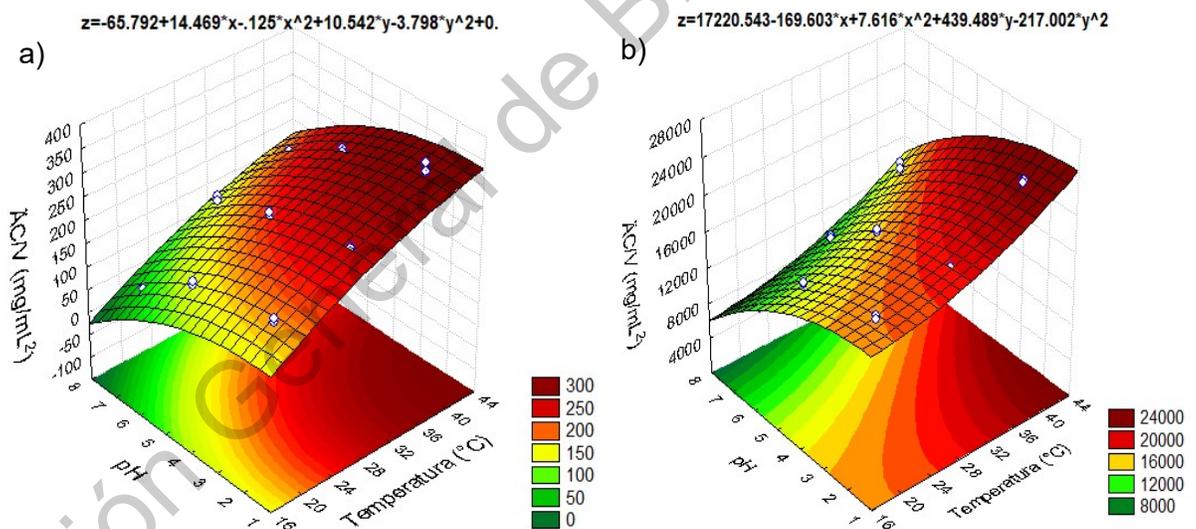
#### **4.7.1 Análisis matemático: Difusividad efectiva y perfil de concentraciones a través del tiempo**

En el cuadro 6, se presentan los resultados sobre el efecto de la difusividad efectiva en BF microencapsulados a un pH de 6.27 y a una temperatura ambiente de 23 °C (Temperatura registrada en la ciudad de Celaya, Gto.) utilizando mezclas óptimas y no óptimas mediante la técnica de goteo y secado por aspersión I como métodos de comparación.

En la difusividad efectiva de un sistema, el cual está estrechamente controlado por las propiedades del polímero, existen otros factores a considerar, tales como el pH del medio en el que se va a realizar la liberación y el gradiente de temperaturas. Teniendo en cuenta estos factores, es posible conseguir sistemas de liberación que actúen lentamente y de forma continua durante largos periodos de tiempo, para que la sustancia a liberar alcance el lugar deseado.

Con lo anterior, se propuso un nuevo diseño estadístico incorporando un rango de pH (2, 5 y 7) y temperaturas (20, 30 y 40 °C), para evaluar el impacto de la difusividad efectiva en los BF microencapsulados mediante las técnicas de goteo y secado por aspersión I, utilizando la mezcla 1.2% goma arábica/0.8%

alginate de sodio/0.2% caseína y la mezcla 1.6% alginato de sodio/0.8% goma arábica/2.5% almidón fosfatado como matrices óptimas del encapsulamiento por goteo y secado por aspersión, respectivamente (Anexo B). Para los cálculos correspondientes se tomó como referencia la curva de calibración para la determinación de la velocidad de difusividad (Anexo D). El comportamiento de la difusividad efectiva en los microencapsulados mediante la técnica de goteo fue influenciado principalmente por la temperatura. De igual manera, se puede percibir que a menor temperatura (20 °C) y mayor pH (7) existe una difusividad efectiva menor (45.21 mg mL<sup>-2</sup>) (Figura 4.7), lo cual es un factor deseable en un sistema de microencapsulamiento debido a que existe menor solubilidad de la matriz encapsulante. Mientras que, la mayor difusividad efectiva reportada en este sistema de microencapsulación fue de 333.96 mg mL<sup>-2</sup>, con un pH de 2 y 40 °C.



**Figura 4.7.** Efecto comparativo en la difusividad efectiva de BF microencapsulado con intervalos de temperatura y pH. Comportamiento de gráficos de superficie de respuesta de BF microencapsulado por (a) técnica de goteo, 1.2% goma arábica/0.8% alginato de sodio/0.2% caseína y (b) técnica de secado por aspersión I, 1.6% alginato de sodio/0.8% goma arábica/2.5% almidón fosfatado. Los valores a lado de cada eje indican el valor de cada variable y su mejor ángulo de rotación. La ecuación en la parte superior muestra el comportamiento en diferentes puntos del gráfico de superficie dependiendo de la interacción entre pH y temperatura.

El comportamiento de la difusividad efectiva en los microencapsulados mediante el secado por aspersión fue influenciado principalmente por el pH; así mismo, se puede percibir que a menor temperatura (20 °C) y mayor pH (7) existe una difusividad efectiva menor (8148.55 mg mL<sup>-2</sup>) (Figura 4.7), valor significativamente mayor a lo reportado mediante el microencapsulamiento por goteo. La mayor difusividad efectiva reportada en este sistema de microencapsulación fue de 23379.37 mg mL<sup>-2</sup>, con un pH de 2 y 40 °C.

Por lo anterior, el comportamiento de ambas técnicas de microencapsulación (goteo y secado por aspersión) es semejante, debido a que, el efecto de la temperatura es directamente proporcional al incremento de la velocidad de difusividad en un sistema de microencapsulado; mientras que, el pH tiene un comportamiento inversamente proporcional.

En este punto de nuestro estudio, se han optimizado las condiciones de microencapsulación de la cepa *Bifidobacterium longum* para predecir su potencial capacidad protectora. La mezcla encapsulada óptima por técnica de goteo se caracterizó por tener baja viscosidad, mayores propiedades elásticas pero una baja viabilidad. La mezcla encapsulada óptima mediante la técnica de secado por aspersión II mostró propiedades de baja viscosidad; por lo tanto, es un factor a considerar debido a que la muy baja viscosidad no tiene un efecto positivo en la microencapsulación. Alternativamente, la mezcla óptima encapsulada mediante la técnica de secado por aspersión I proporcionó una excelente protección a las células probióticas, formando películas fuertes y resistentes con mayor viscosidad y flexibilidad.

Basado en el estudio de las propiedades fisicoquímicas, condiciones gástricas con una serie de parámetros cinéticos de crecimiento y difusividad efectiva, se determinó trabajar con un sistema de encapsulamiento altamente efectivo al utilizar la técnica de secado por aspersión II, correspondiente a la mezcla de 1.6% alginato de sodio/0.8% goma arábiga/2.5% almidón fosfatado.

El modelo matemático se diseñó considerando una microesfera, obtenida mediante la mezcla óptima de secado por aspersión, la cual representa el sistema de microencapsulados en un sistema continuo, en donde la fase continua se comporta como una mezcla perfecta. La ecuación que gobierna el transporte en un sistema de dos fases ha sido reportada por Carbonell y Whitaker (1984) y Whitaker (1986) quienes usaron el método del promedio volumétrico para el estudio de difusión y reacción en sistemas con resistencia interfacial, transferencia de calor y flujo de líquidos. Éste método y otros problemas en sistemas de dos fases proveen definiciones específicas de la concentración promedio y de los coeficientes efectivos.

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \nabla \cdot (vC) = D: \nabla \nabla C + k_0 \rho \quad (1)$$

Las ecuaciones de transporte promedio impone las restricciones sobre la longitud y los parámetros fisicoquímicos del sistema (Whitaker, 1991). Basándose en lo anterior para la obtención del modelo de la esfera microbiana (BF microencapsulado), se tomaron las siguientes consideraciones:

- 1) La esfera se considera como un sistema efectivo, isotrópico con propiedades termodinámicas constantes. Por tanto, la microesfera se puede considerar como un sistema poroso considerando la difusividad efectiva, por consiguiente se reemplaza el tensor  $D$  en la ecuación (1) por el escalar  $D_{\text{eff}}$ . La difusividad efectiva contiene todos los efectos convectivos generados dentro de las microesferas.
- 2) La difusividad efectiva es función solamente de la fracción hueca como ha sido propuesta por diversos autores.
- 3) Las microesferas miceliales se consideran esféricas y el transporte ocurre solamente en la dirección radial.

4) La velocidad de consumo de sustrato sigue el modelo de Michaelis-Menten

$$k_o = \frac{(k_o)_{max} C}{K_m + C} \quad (2)$$

así la ecuación de transporte se reduce a:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{eff} \left[ \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \right] - k_o \rho \quad (3)$$

Donde, **C**: Concentración promedio de sustrato; **C<sub>s</sub>**: Concentración de sustrato inicial; **K<sub>o</sub>**: Velocidad de consumo de sustrato efectiva; **K<sub>m</sub>**: Cte. Michaelis-Menten; **D=Deff**: Difusividad efectiva; **v**: Volumen; **ρ**: Densidad; **r**: radio.

Las condiciones de frontera para la ecuación (3) son:

$$r = r_p \quad -D_{eff} \frac{\partial C}{\partial r} = k_p (C|_s - C_L) \quad t > 0 \quad (4 a)$$

$$r=0 \quad \frac{\partial C}{\partial r} = 0 \quad t > 0 \quad (4 b)$$

La condición inicial es:

$$\text{Cuando } t = 0 \quad C = C_0 \quad 0 \leq r \leq r_p \quad (4c)$$

Donde, **t**: Tiempo.

La concentración de sustrato durante el curso del proceso metabólico digestivo se puede expresar como:

$$C_L = C_o f(t)$$

Utilizando variables adimensionales:

$$u = \frac{C}{C_s} \quad \xi = \frac{r}{R} \quad \tau = t \frac{D_{eff}}{R^2} \quad (5)$$

La ecuación (3) en forma adimensional se reestructura de la siguiente forma:

$$\frac{\partial u}{\partial \tau} = \frac{1}{\xi^2} \frac{\partial}{\partial \xi} \left( \xi^2 \frac{\partial u}{\partial \xi} \right) - \phi^2 \frac{u}{\kappa_m + u} \quad (6)$$

Las condiciones de frontera son:

$$\text{A} \quad \xi = 1 \quad - \frac{\partial u}{\partial \xi} = N_{sh} (u - u_L) \quad \tau > 0 \quad (6a)$$

$$\xi = 0 \quad \text{a} \quad \frac{\partial u}{\partial \xi} = 0 \quad \tau > 0 \quad (7b)$$

$$\text{Cuando} \quad \tau = 0 \quad \text{a} \quad u = 1 \quad 0 \leq \xi \leq 1 \quad (7c)$$

En donde

$$\phi^2 = \frac{r_p^2 (k_0)_{max} \rho}{D_{eff} C_0} \quad N_{sh} = \frac{k_p r_p}{D_{eff}} \quad \kappa = \frac{K_m}{C_0} \quad (7d)$$

A partir de un balance de masa en la microesfera se obtiene:

$$\frac{\partial u}{\partial \tau} = \frac{1}{\xi^2} \frac{\partial}{\partial \xi} \left( \xi^2 \frac{\partial u}{\partial \xi} \right) - \mathfrak{R} \quad (8)$$

$$\mathfrak{R} = \phi^2 \frac{u}{\kappa_m + u}$$

en donde :

(9)

La función del promedio volumétrico definida por Whitaker (1986) es:

$$\bar{\Psi} = \frac{4 \pi}{\frac{4}{3} \pi r_p^3} \int_0^{r_p} \Psi r^2 dr = 3 \int_0^1 \Psi \xi^2 d\xi \quad (10)$$

Por tanto, la concentración promedio dentro de la microesfera estará representado por:

$$\bar{u} = 3 \int_0^1 u \xi^2 d\xi \quad (11)$$

Sustituyendo la ecuación (11) en la ecuación (8) se obtiene:

$$\frac{\partial \bar{u}}{\partial \tau} = 3 \int_{\xi=0}^{\xi=1} \partial \left( \xi^2 \frac{\partial u}{\partial \xi} \right) - \bar{\mathfrak{R}}$$

$$\frac{\partial \bar{u}}{\partial \tau} = 3 \xi^2 \frac{\partial u}{\partial \xi} \Big|_{\xi=0}^{\xi=1} - \bar{\mathfrak{R}} = 3 \frac{\partial u}{\partial \xi} \Big|_{\xi=1} - \bar{\mathfrak{R}} = \frac{\partial \bar{u}}{\partial \tau} \quad (12)$$

y

$$\bar{\mathfrak{R}} = 3 \int_0^1 \mathfrak{R} \xi^2 d\xi \quad (13)$$

Mientras que, el factor de efectividad está definido por:

$$\eta = \frac{4 \pi \int_0^1 \mathfrak{R} \xi^2 d\xi}{\frac{4}{3} \pi \mathfrak{R} \Big|_{u_s}} = \frac{4 \pi \int_0^{r_p} \mathfrak{R} r^2 dr}{\frac{4}{3} \pi r_p^3 \mathfrak{R} \Big|_{u_s}} \quad (14)$$

Por lo tanto

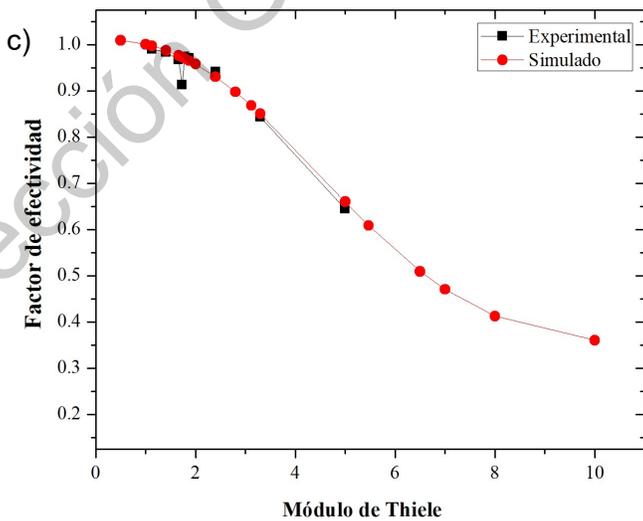
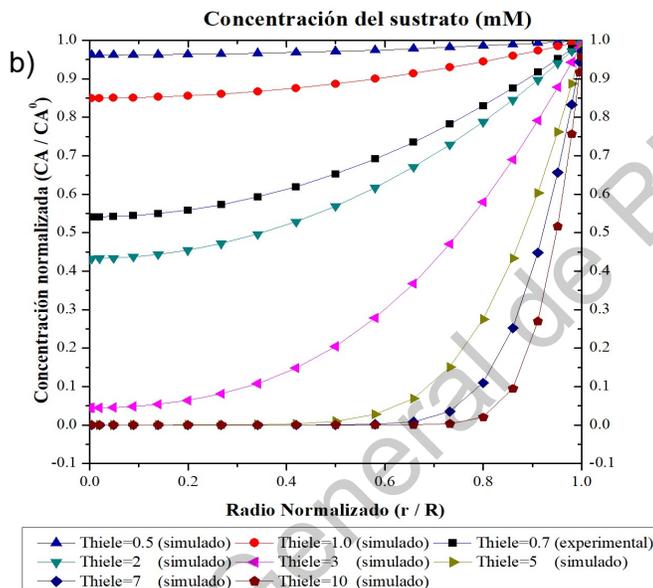
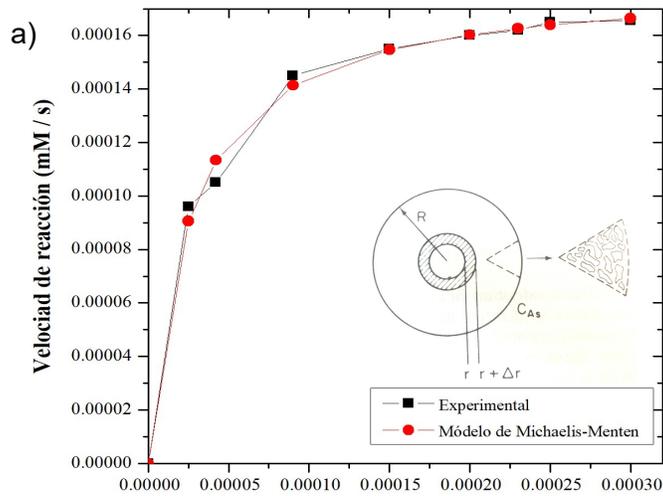
$$\eta = \frac{1}{\phi^2} \left( \frac{\kappa_m + u_s}{u_s} \right) \bar{\mathfrak{R}} \quad (15)$$

Donde,  $\eta$ : Factor de efectividad;  $\phi$ : Módulo de Tiel (Cinética de reacción/transporte);  $u_s$ : Concentración dentro de la partícula.

Combinando las ecuaciones (14) y (15) produce:

$$\eta = \frac{1}{\phi^2} \left( \frac{\kappa_m + u_s}{u_s} \right) \left( 3 \frac{\partial u}{\partial \xi} \Big|_{\xi=1} - \frac{\partial \bar{u}}{\partial \tau} \right) \quad (16)$$

Por solución de las ecuaciones (8) a (16),  $\partial u / \partial \tau$  puede evaluarse y usarse para determinar el factor de efectividad mediante la ecuación (16). Para este propósito se descartó la ecuación (8) en la dirección radial con 13 puntos de colocación ortogonal definidos por polinomios de Legendre. El sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias generadas se integró por el método de Runge-Kutta-Fehlberg con control adaptativo de etapas. Lo anterior puede verse representado en la Figura 4.8. Observando el comportamiento de la difusividad y la variación de la concentración de sustrato, dependiente del ratio en la microesfera. De manera adicional, se observa las dos variables de control sobre el proceso de transferencia de masa, el transporte y la reacción metabólica aplicando la cinética de Michaelis-Menten. En la Figura 4.8c, se observa el comportamiento de la mezcla encapsulante en un sistema continuo, reportando un idoneo factor de efectividad de 0.98.



**Figura 4.8.** Análisis matemático: difusividad efectiva y perfil de concentraciones a través del tiempo. **a)** Comportamiento de la velocidad de reacción según el modelo de Michaelis-Menten para la velocidad de consumo de sustrato por *B. longum* en la microesfera. **b)** Comportamiento de la concentración de sustrato consumida por *B. longum* dependiendo del radio en la microesfera. **c)** Factor de efectividad ( $\eta$ ) para diferentes módulos de Thiele ( $\phi$ ) y parámetro  $K_m$ , para una cinética de Michaelis-Menten en una geometría esférica.

#### **4.8 Microscopia electrónica de barrido de microencapsulados mediante la técnica de secado por aspersión I.**

Un análisis más detallado de la morfología del microencapsulado se logró con base en los análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM). Posterior al secado por aspersión I, utilizando la mezcla óptima compuesta por 1.6 % alginato de sodio, 0.8 % goma arábiga y 2.5 % almidón fosfatado, se obtuvieron esferas con un diámetro de 2.6 a 3  $\mu\text{m}$ . Estos resultados confirman la transformación morfológica del material microencapsulante después de la deshidratación a 120 °C, por la pérdida de agua.

En la Figura 4.9a se observa que, existe un reordenamiento morfológico de la goma arábiga después del proceso de encapsulación; antes del proceso de encapsulación, se ha reportado que, la goma arábiga tiene partículas irregulares de hasta 100  $\mu\text{m}$ . En nuestro estudio después del reordenamiento se obtienen microcápsulas muy regulares de un tamaño menor a 3  $\mu\text{m}$  (Figura 4.9b); posiblemente debido a variaciones estructurales, ocasionadas por descomposición parcial de la goma arábiga a corta exposición de 120 °C en el equipo de *spray drying* (temperatura de descomposición de la goma arábiga 90-95 °C) generando compuestos con sitios activos como hidroxilos y grupos metoxilos; estos a su vez, le permiten retener compuestos como las antocianinas, ácidos orgánicos, vitaminas, entre otros, generando puentes de hidrógeno intramoleculares que producen estructuras más simétricas (esferas) (Wrolstad, 2010).

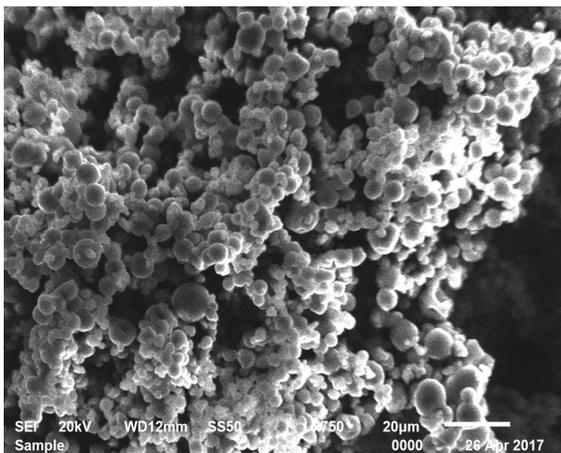
Los cambios en la morfología se pueden explicar por la influencia de los procesos hidrotérmicos en las características fisicoquímicas de los almidones, en donde a temperaturas menores de 20 °C el almidón es insoluble en agua, pero cuando la temperatura sube hasta 80 °C los enlaces de hidrógeno entre las cadenas del almidón se rompen aumentando la hidratación de los gránulos de almidón generalmente modificándose (hinchamiento). El hinchamiento es seguido por la filtración de la amilosa, lo que incrementa la viscosidad de la solución (Eliasson, 2004).

Finalmente, el paso de la gelatinización conlleva a la formación de una pasta de almidón. Este estado de desorganización es una función de la temperatura de gelatinización y varía según el origen del almidón y depende de la proporción de amilosa/amilopectina (Eliasson, 2004).

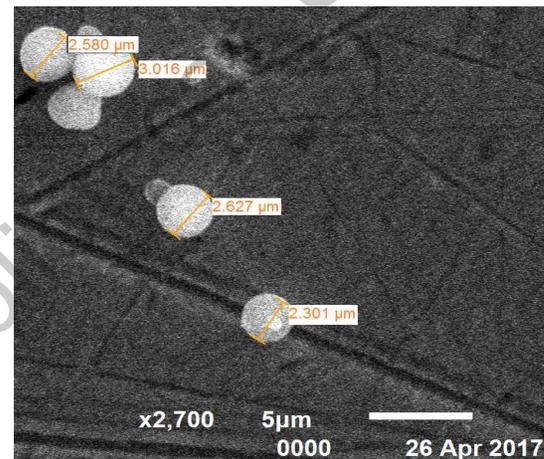
Con la disminución de temperatura se va formando progresivamente un gel que envuelve los gránulos de almidón enriquecidos en amilopectina, seguido de la inmersión en un contenido grande de amilosa. Este paso es llamado gelificación, la cual produce una reestructuración entre las cadenas de almidón y una red tridimensional se forma rápidamente. Con la cadena de almidón reestructurada, los enlaces de hidrógeno reaparecen y unen las cadenas, generando una nueva estructura (fenómeno de retrogradado). Con el tiempo, la retrogradación del gel de almidón aumenta (Eliasson, 2004).

El impacto en los BF microencapsulados ocasionados por el alginato de sodio se encuentra estrechamente ligado con la flexibilidad. Este polisacárido aniónico biocompatible con el organismo, aumenta su flexibilidad en solución dependiente del número de unidades monoméricas. Sus desventajas son la formación de poros en la superficie de cápsulas (Rodrigues *et al.*, 2011); sin embargo, cabe destacar que, al tener alta compatibilidad al unirse con compuestos poliméricos como el almidón fosfatado y la goma arábiga, no presentó en los microencapsulados ninguna evidencia de formación de poros en la superficie de los microencapsulados, caracterizándolos por una superficie totalmente lisa y un tamaño uniforme, proporcionando mayor estabilidad (Figura 4.9c-d).

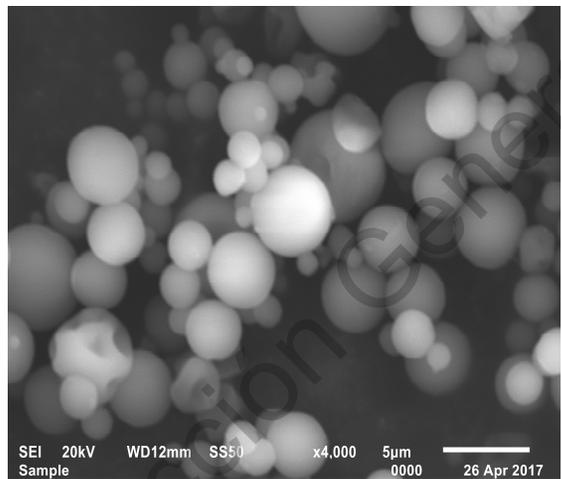
a)



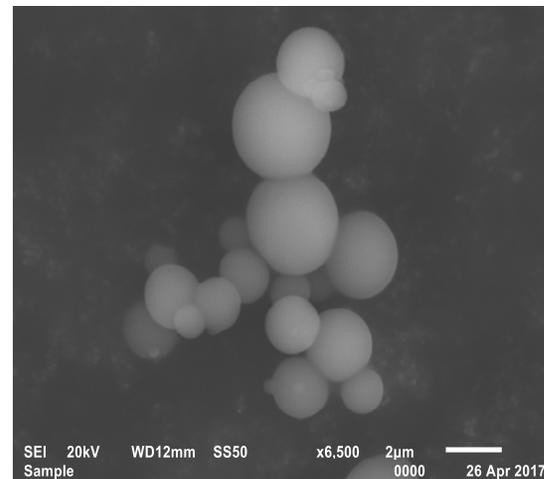
b)



c)



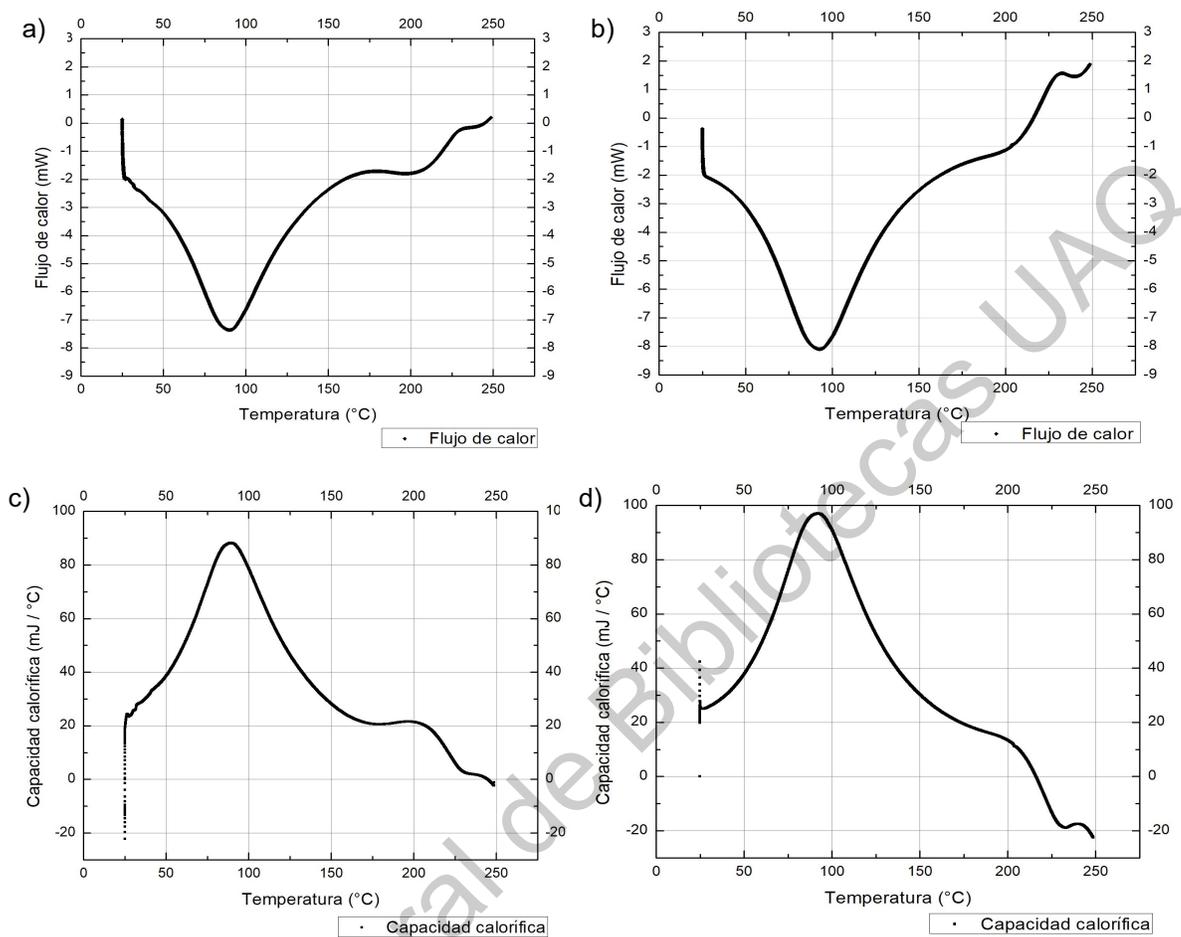
d)



**Figura 4.9.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de BF microencapsulados mediante secado por aspersión I, mezcla: 1.6 % alginato de sodio/0.8 % goma arábiga/2.5 % almidón fosfatado a diferentes resoluciones: **a)** x750, 20 µm; **b)** x2700, 5 µm; **c)** x4000, 5 µm; **d)** x6500, 2 µm.

#### **4.9 Caracterización de microencapsulados por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis dinámico mecánico (DMA)**

Se analizó calorimetría diferencial de barrido (DSC) en microencapsulados obtenidos mediante la técnica de secado por aspersion I (mezcla: 1.6% alginato de sodio/0.8% goma arábica/2.5% almidón fosfatado). DSC se rige bajo el principio de la determinación de diferencias en la cantidad de calor, entre una sustancia y una referencia en función de temperatura, en donde se puede observar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) correspondiente a 25 °C (Figura 4.10 a-b). El descenso de la temperatura de transición vítrea del material inyectado es un indicativo del aumento en el porcentaje de cristalinidad del material, lo que se traduce en un aumento de las temperaturas pico de fusión. Los termogramas muestran una temperatura máxima de fusión de 90 °C y temperatura de descomposición a partir de los 200 °C, sin presentar diferencia significativa entre microencapsulados sin BF y aquellos que tienen en su interior BF. Así mismo, en la Figura 4.10 c-b se observa en microencapsulados con BF la capacidad calorífica ( $C_p$ ) de  $2.54 \text{ J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  a una máxima temperatura de fusión (90 °C), la cual no es significativamente diferente a aquellos microencapsulados sin BF ( $C_p = 2.94 \text{ J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ). Sin embargo, esta última  $C_p$  es ligeramente mayor, debido a que en su interior se encuentra el material encapsulante, en otras palabras, evaluamos un microencapsulado sólido en su totalidad y no hueco o poroso, lo anterior explicaría una mayor resistencia al calor debido a la composición y grosor del microencapsulado. Cabe resaltar que, las características de estos microencapsulados con BF y sin BF mostraron una resistencia al calor mayor a lo reportado en otras investigaciones (Villacrez *et al.*, 2013). Por otra parte, al utilizar una mezcla de componentes en la matriz encapsulante, presentan propiedades que le proporcionan una mejor estabilidad debido a que, la maltodextrina y los almidones modificados al ser polisacáridos, como se muestran en las curvas de DSC, presentan un pico endotérmico entre 60 y 76 °C (Eliasson, 2004). Este pico en todos los casos es bastante ancho por el efecto de gelatinización, el cual es un fenómeno característico de esta clase de materiales.

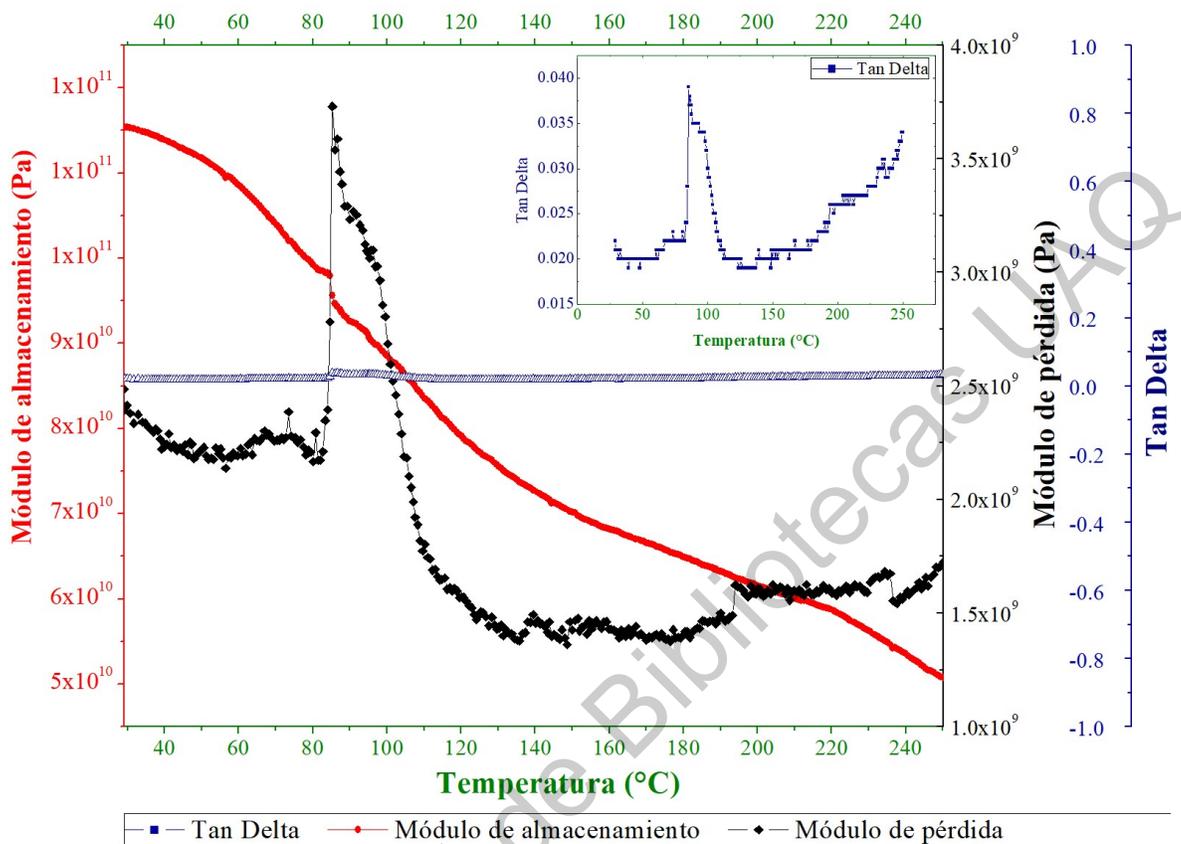


**Figura 4.10.** Caracterización de microencapsulados, mediante secado por aspersión I, medida en un intervalo de temperatura por la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en un ciclo de calentamiento típico, fenómeno de transición vítrea. **a)** Flujo de calor microencapsulados con BF. **b)** Flujo de calor microencapsulados sin BF. **c)** Capacidad calorífica de microencapsulados con BF. **d)** Capacidad calorífica de microencapsulados sin BF.

Villacrez y colaboradores (2013) reportaron una estabilidad de microencapsulados de mora de castilla a 140 °C, utilizando maltodextrina como encapsulante. Los análisis dinámico-mecánicos (DMA) permiten determinar las propiedades mecánicas de un material viscoelástico en función del tiempo, la temperatura, o bien, la frecuencia; mientras que, el material está sometido a una fuerza oscilatoria periódica (Royall *et al.*, 2005).

En base a lo anterior, se observa en el termograma DMA (Figura 4.11) la caracterización de los microencapsulados con BF, reportando un módulo de

almacenamiento al inicio de ensayo de  $1E+11$  Pa en un rango de temperaturas de 30 a 40 °C, este módulo muestra pérdida de rigidez significativa a los 100 °C. El pico entre 80-100 °C muestra la capacidad de disipar la energía mecánica a través del movimiento molecular de la matriz microencapsulante. A esta temperatura el material microencapsulante alcanzó una máxima viscosidad; mientras que, en el rango de 80 a 250 °C presenta un módulo de pérdida de  $2E+09$  Pa y una Tan Delta (Tan  $\delta$ ) de 0.04. En una medida típica, la fuerza se descompone en el módulo de almacenamiento (parte real) y el módulo de pérdida (parte imaginaria). El primero de ellos tiene en cuenta la parte elástica del material; mientras que, el segundo tiene en cuenta la parte viscosa lo cual se traduce en que, la deformación no esté en fase con el esfuerzo aplicado. Royall y colaboradores (2005) reportaron en microencapsulados de sacarosa una pérdida de rigidez a 70 °C y una Tan  $\delta$  de 0.08. Royall y colaboradores (2005) observaron una tendencia clara en la plastificación del material como una disminución de Tan  $\delta$  en función de la exposición al agua, es decir, a medida que incrementaba la exposición del microencapsulado a la humedad relativa, el Tan  $\delta$  disminuía. También mostró que el pico de re cristalización disminuye la función del agua a una temperatura de 120 °C. En la Figura 4.11, no sólo se puede observar que la temperatura de pérdida de rigidez es superior a lo reportado con anterioridad con otras matrices encapsulantes además, además se observa que a 250 °C aún no se presenta el pico de re cristalización, lo que concluye como una alta resistencia a las temperaturas de la mezcla encapsulante reportadas en nuestro trabajo.



**Figura 4.11.** Caracterización por Análisis Mecánico Dinámico (DMA) de BF microencapsulado, mediante secado por aspersión I. Variación del módulo de almacenamiento, módulo de pérdida y factor de pérdida respecto a la variación de temperatura. Determinación de la temperatura de transición vítrea por el punto de inflexión de la curva y el máximo del módulo de pérdida (1 Hz).

#### 4.10 Modelo agudo de inflamación con dextrano sulfato de sodio (DSS)

Acorde al reporte por el comité Charles River Research Models (2016), el roedor sano de la cepa CD-1 registra un peso estándar de 28-30 g a las 5 semanas de edad, mientras que a las 7 semanas de edad registran un peso de 31-33 g. De acuerdo al peso corporal registrado durante el periodo de tratamiento por 14 días, el grupo con DSS presenta una ganancia de peso de 2.5 gramos, mostrando una incrementada tendencia durante todo el tratamiento (Cuadro 7). Por lo anterior, en el Cuadro 7 se observa que el grupo sano se encuentra dentro del rango de peso estándar; así mismo, a partir del sexto día de tratamiento se confirma una ganancia de peso significativa de los grupos administrados con BF

microencapsulado (3 g) comparado con el grupo con DSS (0.8 g) ambos manteniendo la tendencia hasta el día del sacrificio. Una tendencia en la ganancia de peso por la administración de probióticos, es reportada por Bernardeau y colaboradores (2002), quienes estudiaron el aumento de peso en ratones suizos tratados con una administración de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* por 4 semanas en agua para beber, leche fermentada, suero y leche cuajada, observando una ganancia de peso significativamente inferior del grupo sano respecto al tratamiento con +28.9% y +31.7% para *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*, respectivamente. Como peso basal el grupo sano (Cuadro 7) observamos que, al finalizar el tratamiento de 14 días, el peso del grupo con DSS fue significativamente inferior con una pérdida de peso del -12.5%, mientras que el grupo administrado con BF obtuvo una ganancia del +62.5%. Estos resultados indican que la administración de BF microencapsulado disminuyó el efecto adverso causado por el DSS en el peso corporal de los animales bajo estudio.

#### **4.10.1 Determinación de pH en contenido cecal, colónico y fecal**

Diferentes estudios avalan que un pH básico predispone a un mayor número de tumores que un pH ácido (Samelson *et al.*, 1985). En el Cuadro 7 se observa que el grupo con DSS presenta un pH alcalino, con una tendencia creciente, la cual comienza de 7.5 y concluye en 8.3. Este grupo comienza a tener un comportamiento distintivo en comparación del resto de los grupos a partir de la administración con DSS en el día 7. En el presente estudio se observa que a partir del sexto día de tratamiento con BF microencapsulado, el pH fecal disminuye significativamente; mismo comportamiento se observa en el grupo administrado con BF microencapsulado más DSS, mientras que el grupo control DSS 2% presenta un incremento. La misma tendencia reporta Lozano (2014) en un modelo de cáncer de colon, observando que en el grupo enfermo el pH oscila entre 8.16, estadísticamente más básico en comparación con los grupos que recibieron tratamiento con tortillas por diferentes procesos de nixtamalización.

**Cuadro 7.** Peso corporal, aumento de peso corporal, pH,  $\beta$ -GA y población de BF en heces durante periodo de experimentación en un modelo agudo de inflamación murino inducido por DSS.

Características																					
Grupos	Día	Peso corporal (g)				Ganancia de peso corporal (g)				pH		$\beta$ -GA <sup>1</sup>		Viabilidad de BF <sup>2</sup>							
Sano	1	30.78	±0.6	b	A	0.00	±0.0			7.56	±0.0	a	A	5.69	±0.0	ab	B	5.73	± 0.01	a	A
	2	31.28	±0.5	ab	A	0.50	±0.2	c	A	7.49	±0.0	a	A	5.56	±0.0	b	B	5.58	± 0.02	b	BC
	4	31.61	±0.6	ab	A	0.83	±0.3	c	A	7.67	±0.0	a	A	5.56	±0.0	b	D	5.64	± 0.03	ab	AB
	6	31.76	±0.7	ab	B	1.00	±0.4	bc	B	7.66	±0.0	a	AB	4.97	±0.0	c	D	5.55	± 0.06	b	A
	8	32.29	±0.5	ab	B	1.50	±0.2	abc	B	7.76	±0.0	a	A	5.71	±0.0	a	D	5.67	± 0.04	ab	A
	10	33.11	±0.6	ab	A	2.33	±0.3	ab	A	7.61	±0.1	a	B	5.07	±0.0	c	BC	5.64	± 0.01	ab	C
	12	33.46	±0.5	a	AB	2.67	±0.4	a	AB	7.74	±0.1	a	A	5.55	±0.0	b	B	5.68	± 0.01	ab	B
DSS 2% control	1	31.11	±0.6	a	A	0.00	±0.0			7.46	±0.2	b	A	5.89	±0.0	e	A	5.73	± 0.04	a	A
	2	31.42	±0.7	a	A	0.33	±0.2	a	A	7.51	±0.0	b	A	6.34	±0.0	cd	A	5.55	± 0.03	abc	C
	4	31.79	±0.5	a	A	0.67	±0.4	a	A	7.65	±0.0	b	A	6.29	±0.0	d	A	5.60	± 0.03	ab	B
	6	31.95	±0.6	a	B	0.83	±0.5	a	B	7.77	±0.1	b	A	6.43	±0.0	c	A	5.59	± 0.01	ab	A
	8	32.28	±0.5	a	B	1.17	±0.4	a	B	7.93	±0.1	ab	A	7.03	±0.0	a	A	5.35	± 0.07	d	B
	10	32.76	±0.7	a	A	1.67	±0.6	a	A	7.97	±0.0	ab	A	7.00	±0.0	a	A	5.40	± 0.04	cd	D
	12	33.04	±0.9	a	B	2.00	±0.6	a	B	8.34	±0.0	a	A	6.65	±0.0	b	A	5.49	± 0.01	cd	C
BF	1	31.40	±0.8	b	A	0.00	±0.0			7.63	±0.2	ab	A	6.15	±0.3	a	AB	5.74	± 0.02	abc	A
	2	33.39	±0.8	ab	A	2.00	±0.2	d	A	7.24	±0.1	b	A	5.87	±0.3	a	AB	5.66	± 0.03	c	AB
	4	33.76	±0.7	ab	A	2.33	±0.2	cd	A	7.57	±0.0	ab	A	5.76	±0.0	a	C	5.82	± 0.05	abc	A
	6	34.44	±0.6	a	A	3.00	±0.2	bcd	A	7.50	±0.0	ab	B	5.62	±0.0	a	B	5.70	± 0.06	bc	A
	8	34.96	±0.5	a	A	3.50	±0.4	abc	A	7.66	±0.1	a	A	6.14	±0.0	a	C	5.66	± 0.06	c	A
	10	35.29	±0.5	a	A	3.83	±0.4	ab	A	7.56	±0.0	ab	B	4.43	±0.3	b	C	5.88	± 0.02	ab	A

	12	35.94 ±0.6	a	A	4.50 ±0.3	a	A	7.64 ±0.0	ab	A	3.81 ±0.0	b	D	5.94 ± 0.03	a	A
	1	31.47 ±0.4	b	A	0.00 ±0.0			7.54 ±0.1	a	A	6.39 ±0.0	b	A	5.76 ± 0.01	ab	A
	2	33.31 ±0.4	ab	A	1.83 ±0.4	a	A	7.27 ±0.0	a	A	6.31 ±0.0	b	A	5.73 ± 0.01	ab	A
	4	33.48 ±0.3	ab	A	2.00 ±0.4	a	A	7.58 ±0.0	a	A	5.94 ±0.0	c	B	5.81 ± 0.05	a	A
<b>BF + DSS 2%</b>	6	33.97 ±0.4	a	AB	2.50 ±0.6	a	AB	7.55 ±0.0	a	B	5.24 ±0.0	d	C	5.69 ± 0.06	ab	A
	8	34.44 ±0.7	a	AB	3.00 ±0.6	a	AB	7.60 ±0.0	a	A	6.83 ±0.0	a	B	5.60 ± 0.05	b	A
	10	34.57 ±0.8	a	A	3.17 ±0.7	a	A	7.67 ±0.1	a	B	5.36 ±0.0	d	B	5.73 ± 0.01	ab	B
	12	35.12 ±0.5	a	AB	3.67 ±0.4	a	AB	7.84 ±0.0	a	A	4.52 ±0.0	e	C	5.77 ± 0.06	ab	B

El análisis se realiza en heces de ratones alimentados con BF microencapsulado. Los valores son la media ± error estándar de la media (n = 6 animales por grupo). <sup>1</sup>µg de fenolftaleína por hora por g de heces. <sup>2</sup>Log CFU por g de heces. Las diferencias de medias que comparan los doce días dentro de cada grupo experimental se expresan en letras minúsculas. Cada día se compara con el mismo día del grupo experimental respectivo y las diferencias de medias se expresan en mayúsculas. Los valores con letra(s) diferente(s) dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey α <0.05).

**Cuadro 8.** Peso corporal final, ganancia de peso corporal final, pH y β-GA en ciego, colon y heces durante periodo de experimentación en un modelo agudo de inflamación murino inducido por DSS.

Grupos	Peso final corporal (g)	Ganancia de peso corporal final (g)	Ciego		Colon		Heces	
			pH	β-GA <sup>1</sup>	pH	β-GA <sup>1</sup>	pH	β-GA <sup>1</sup>
Sano	34.1±0.1	3.3±0.8	7.2±0.0	2.5±0.2	7.4±0.1	2.0±0.2	7.7±0.1	5.5±0.0
DSS 2% control	33.6±0.8	2.5±0.6	7.4±0.0	5.7±0.3	7.6±0.0	3.9±0.6	8.1±0.1	6.6±0.0
BF	36.3±0.6	4.8±0.3	7.2±0.1	3.4±0.3	7.3±0.1	2.1±0.1	7.6±0.0	3.8±0.0
BF + DSS 2%	35.5±0.5	4.0±0.6	7.4±0.1	3.7±0.2	7.5±0.1	3.1±0.6	7.7±0.2	4.5±0.0

Los valores son la media ± error estándar de la media (n = 6 animales por grupo). <sup>1</sup>µg de fenolftaleína por hora por g de contenido. Los valores con letra(s) diferente(s) dentro de una columna son significativamente diferentes (Tukey HSD α <0.05).

En el Cuadro 8 se aprecia que, el grupo control DSS 2% exhibe en contenido cecal, colónico y fecal altos valores de pH (7.4, 7.6 y 8.1, respectivamente). El pH en contenido cecal, colónico y fecal del grupo administrado con BF microencapsulado, así como el contenido cecal del grupo sano son estadísticamente diferentes respecto al grupo con DSS; atribuyendo así la asociación de un bajo pH al consumo de BF. Así mismo, se observa que un pH ligeramente básico se presenta en el ciego, seguido del colon y posteriormente un pH mayormente básico en heces, exhibiendo la misma tendencia para todos los grupos. Resultados contrarios han sido reportados por Lozano (2014), donde no presentaron diferencia estadística en pH cecal (7.6) y fecal (8) en todos sus grupos en un modelo de CCR inducido con DSS, lo anterior fue asociado al aporte de calcio por nixtamalización, teniendo como consecuencia el incremento del pH.

#### **4.10.2 Determinación de $\beta$ -GA en el contenido cecal, colónico y fecal**

La inhibición de algunas enzimas como la  $\beta$ -GA de la microbiota colónica se ha relacionado con un menor riesgo de padecer cáncer de colon, ya que esta enzima hidroliza compuestos que ya han sido excretados en forma conjugada vía hepatobiliar; por lo que promueve la reabsorción de los mismos a nivel de colon, los cuales en su mayoría son tóxicos o carcinogénicos. Los resultados de la actividad de esta enzima muestran que los grupos sano, BF y BF + DSS son estadísticamente inferiores comparados con el grupo control DSS 2%, presentando una baja actividad de  $\beta$ -GA; los resultados anteriores exhiben un mismo comportamiento a partir de la administración del DSS y hasta finalizar el tratamiento (Cuadro 7). Cabe resaltar que el microencapsulado de BF está constituido por la mezcla de 1.6 % alginato/0.8 % goma arábica/2.5 % almidón fosfatado. La anterior mezcla se asocia al decremento en los niveles de  $\beta$ -GA en el grupo con BF, debido a que la fermentación de la goma arábica y el almidón fosfatado por acción de la microbiota puede ejercer un efecto directo en la disminución de esta enzima, y con ello reducir el riesgo a inflamación y

posteriormente el riesgo a padecer cáncer de colon, como ya se ha reportado anteriormente (Ohashi *et al.*, 2012).

En lo que respecta a la actividad de  $\beta$ -GA en las diferentes secciones del tracto GI, se observa una alta actividad (rango de 2-7  $\mu$ g de fenolftaleína liberada/h/g de contenido) en el grupo administrado con DSS; por consecuencia, una menor actividad de esta enzima estadísticamente diferente en contenido cecal y fecal del grupo sano, con BF y BF + DSS, comparados con el grupo DSS (Cuadro 8); De igual manera, se observa que la mayor actividad de esta enzima se concentra en el contenido fecal y cecal de todos los grupos. Los resultados anteriores difieren de lo reportado por Lozano (2014) en un modelo de CCR, debido a que, el grupo control y sano presentan mayores niveles de  $\beta$ -glucuronidasa en contenido colónico, lo cual pudo ser influenciado por el pH básico en dicho estudio.

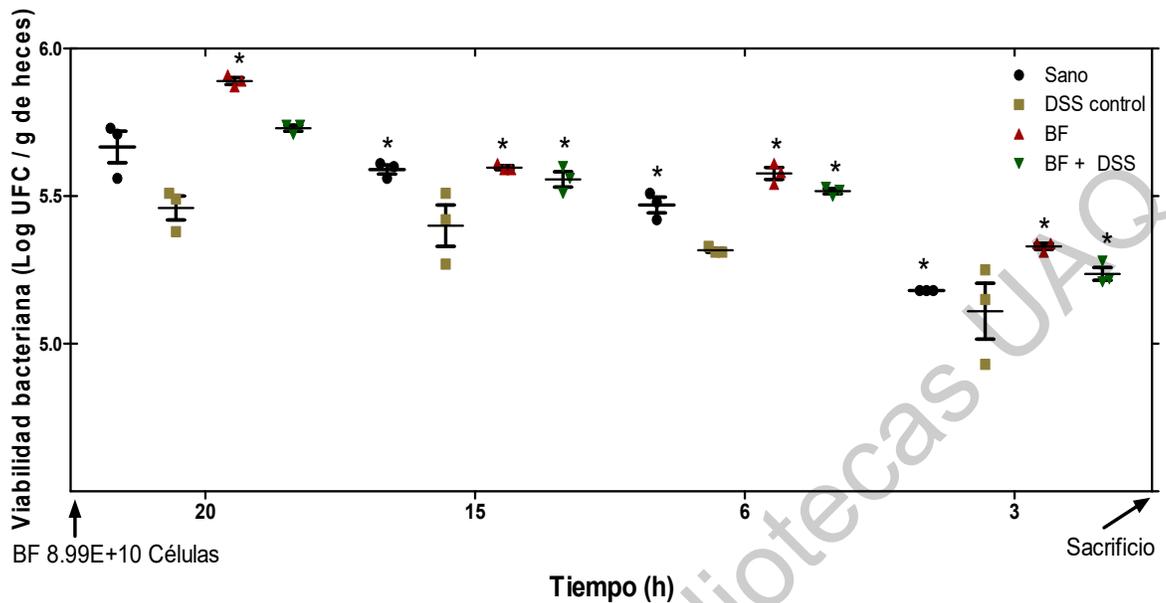
#### **4.10.3 Colonización de BF en estómago, intestino delgado, y contenidos cecal, colónico y fecal**

En el modelo de inflamación aguda se monitoreó la colonización de BF durante los 14 días, con la finalidad de observar la adaptabilidad y la modificación de los niveles basales en heces. A partir del segundo día de administración se observa una mayor colonización estadísticamente significativa, en aquellos grupos con tratamiento intragástrico de BF microencapsulado, siguiendo esta misma tendencia hasta el último día de tratamiento (Cuadro 7). También se observa la baja colonización de BF en el grupo control DSS 2%, donde los niveles basales de BF decremetan significativamente a partir de su administración en el séptimo día. Cabe resaltar que el grupo con BF + DSS 2% presenta un rango superior al grupo sano, pese a que recibe el DSS a partir del séptimo día de tratamiento. Lo anterior confirma una gran adaptación y, por consecuencia, una alta colonización de esta bacteria con y sin DSS. Rangos inferiores reportó Grimm y colaboradores (2015) en un modelo de inflamación, donde el tratamiento con *B. bifidum* durante 5 días antes y 5 días durante la administración del DDS 2% mostró una colonización en

heces de  $1E+04$  a  $1E+05$  UFC. El anterior estudio reportó una tendencia a restablecerse los niveles basales de esta bacteria una vez que se suspendió la administración con DSS.

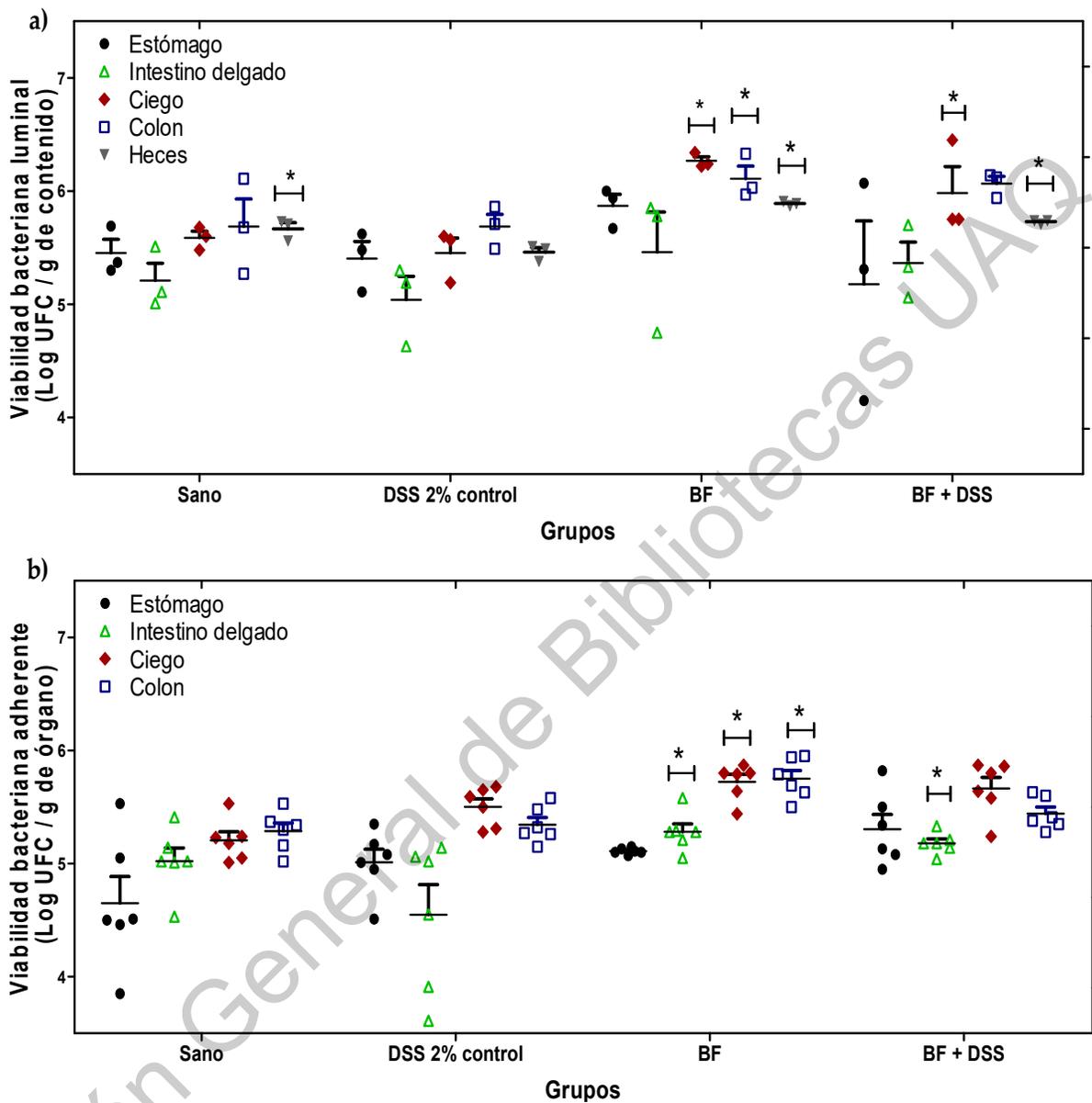
En el modelo de inflamación aguda se realizó un segundo monitoreo de la colonización de BF en contenido fecal de los ratones, 24 h posteriores a la última administración del día 14 (Figura 4.12). Lo anterior con la finalidad de establecer el tiempo necesario para regresar a los niveles basales, una vez suspendida la administración de BF. En la cinética se observa que, el grupo con control DSS 2% mantiene valores de BF inferiores al resto de los grupos entre el intervalo de 20 h a 6 h antes del sacrificio, una posible relación es debido a la administración de DSS, asociado en gran medida al pH básico del intestino delgado y colon, lo cual impide la colonización de BF. Así mismo, el grupo BF y el grupo BF + DSS se mantienen a partir de las 15 h hasta las 6 h antes de su sacrificio, con una disminución de  $0.4 \text{ Log}_{10}$  y  $0.2 \text{ log}_{10}$  respectivamente, presentando estadísticamente mayor UFC en heces comparado con el grupo con DSS. Los grupos con BF reportan niveles bacterianos similares al grupo sano partir de las 15 h, lo que posiblemente conlleva a una mayor adhesión y colonización por BF en la microbiota, cuando la administración de la bacteria es dentro de un periodo de 24 h. Los anteriores resultados difieren de lo reportado por Singh y colaboradores (2013) quienes, a las 20 h posteriores de la última administración de *B. bifidum*, observaron una disminución de  $2 \text{ log}_{10}$  en heces de ratones sanos. Así mismo, Grimm y colaboradores (2015) reportaron una disminución inferior a  $5 \text{ log}_{10}$ , y posteriormente valores no detectables al 3 día posterior a la suspensión de *B. bifidum* en un modelo de colitis inducido con DSS.

En nuestro estudio, posterior al sacrificio, se llevó a cabo el conteo de UFC de BF presente en estómago, intestino delgado, ciego y colon, tanto en contenido luminal (Figura 4.13 a) como adheridas en órganos (Figura 4.13 b).



**Figura 4.12.** Disminución durante 20 h en la población de BF en heces de ratones CD-1 en el día 14. La barra es la media  $\pm$  el error estándar. Los asteriscos (\*) indican diferencia significativa en comparación con el grupo con DSS 2% (Dunnett  $\alpha= 0.050$ ).

Lo anterior se realizó con la finalidad de observar la distribución de BF dependiente del pH, las enzimas proteolíticas, la competencia microbiana que afectan el equilibrio y colonización bacteriana, ya sea en ratones sanos o aquellos que fueron administrados con DSS. La Figura 4.13a muestra el comportamiento de BF al colonizar al interior del GIT, teniendo una mayor predisposición al ciego y colon en contenido luminal. En esta figura se puede observar que, el grupo control DSS 2% presenta una colonización inferior en comparación con el resto de los grupos en el GIT; mientras el grupo administrado con BF microencapsulado presenta una alta colonización de 1.6 Log<sub>10</sub> en ciego, 1 Log<sub>10</sub> en colon y 0.4 Log<sub>10</sub> en heces, significativamente mayor al grupo con DSS. Por su parte, el grupo administrado con BF + DSS muestra un incremento significativo de 0.6 Log<sub>10</sub> en colon y 0.2 Log<sub>10</sub> en heces comparado con el grupo con DSS. Lo anterior evidencia la concentración de BF principalmente en ciego y colon, para su futura protección en un modelo de CCR. Hudault y colaboradores (1997) reportaron que la colonización por *L. casei* en ratones C3H/He/Oujco es mayoritaria en el contenido intestinal del estómago, ciego y colon.



**Figura 4.13.** Población de BF en estómago, intestino delgado, ciego, colon y heces de ratones CD-1 en el día 14. Los valores son Log CFU/g de (a) contenido luminal, heces o (b) adherente al tejido, en diferentes secciones gastrointestinales como se indica. Los asteriscos (\*) indican diferencia significativa en comparación con el grupo control DSS 2% (Dunnett  $\alpha=0.050$ ). Cada barra vertical representa la media  $\pm$  error estándar de la media (n = 6 animales por grupo).

Resultados similares reporta Singh y colaboradores (2013) mostrando una alta colonización de *B. bifidum* en ciego y heces, ambos estudios se realizaron en ratones sanos; mientras que, Grimm y colaboradores (2015) observaron una

concentración de *B. bifidum* únicamente en ciego. El comportamiento bacteriano se puede atribuir a la competencia microbiana y variación del pH que hace posible un mejor establecimiento de dichas bacterias. Diversos estudios han reportado una mayor colonización en contenido luminal en comparación con la colonización adherida a los órganos del GIT; ejemplo de ello reporta Hudault y colaboradores (1997), quienes realizaron un estudio exhaustivo en la comparación de la colonización por *L. casei* en estómago, duodeno, jejunio, íleo, ciego, colon y nódulos mesentéricos linfoides, tanto en contenido luminal, contenido adherido en órgano realizando únicamente un lavado y contenido adherido en órgano al decimo lavado, evidenciando la mayor prevalencia en ciego y colon luminal con diferencia inferior de 1 Log<sub>10</sub> adheridas en los mismos órganos.

En la Figura 4.13b podemos observar el comportamiento de BF al colonizar distintos órganos, mostrando la misma predisposición al ciego y colon como fue exhibido en contenido luminal. Se distingue que el grupo administrados con BF microencapsulado presenta alta colonización, con una diferencia de BF de 0.15 Log<sub>10</sub> en intestino delgado, 0.2 Log<sub>10</sub> en ciego y 0.35 Log<sub>10</sub> en colon, estadísticamente significativo comparados con el grupo con DSS. El grupo administrado con BF + DSS muestra diferencia significativa de 0.18 Log<sub>10</sub> en ciego comparado con el grupo control DSS 2%. Este último comportamiento es reportado por Lievin y colaboradores (2000), quienes expresaron comportamiento antagónico de *Infant bifidobacterium* en ratones C3H/He/Oujco contra patógenos, teniendo una mayor prevalencia de esta bacteria en ciego; sugiriendo su participación como efecto barrera en la microbiota.

#### 4.10.4 Estudio histopatológico

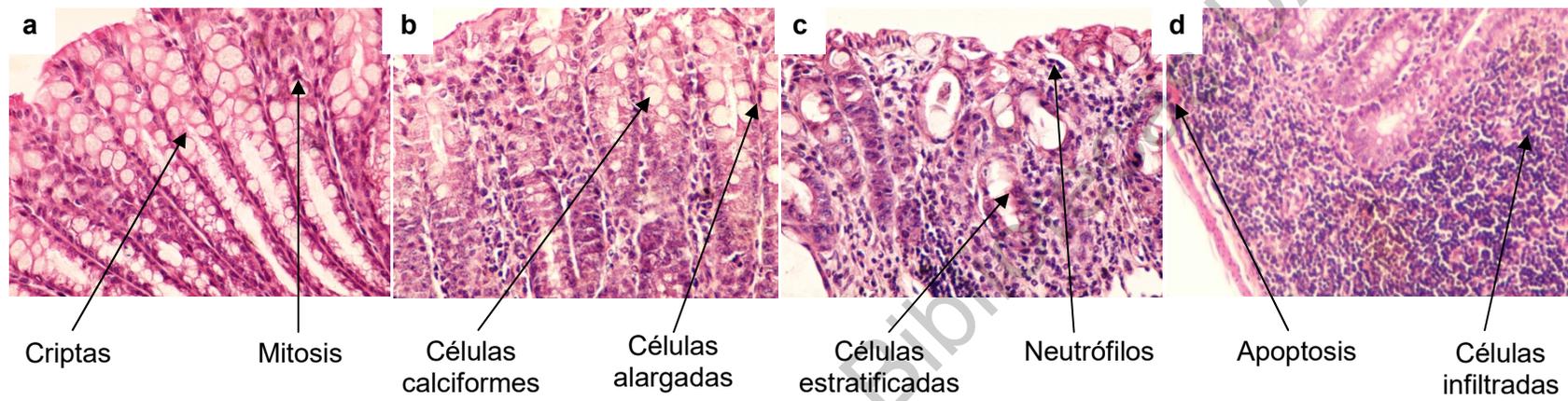
Se realizó una clasificación cuantitativa y descriptiva acorde al número de criptas, neutrófilos, mitosis, apoptosis, células caliciformes, alargadas, estratificadas e infiltradas en tejidos de colon de ratones CD-1 (Figura 4.14 panel superior e inferior) como una estrategia para caracterizar a detalle la inflamación del colon en los grupos tratados (Wirtz et al., 2007). Esto es de gran relevancia, ya

que Tanaka y colaboradores (2003) han demostrado que la cantidad de células inflamatorias infiltradas en las neoplasias del colon y la lámina propia de la mucosa, así como la formación de abscesos en criptas sugieren que estos análisis están estadísticamente correlacionados con el desarrollo de premalignidad a malignidad en el colon con inflamación. De acuerdo al estudio de histopatología, se encontraron diferentes grados de inflamación y displasia (Tanaka, 2012; Vigneri *et al.*, 2015); sin embargo, para nuestro estudio sólo se consideraron los grados de inflamación (Figura 4.14 panel inferior).

Como se esperaba, el 83% de los animales en el grupo Sano y el grupo administrado con BF no desarrollaron daños en el colon, solo un animal de cada grupo mostró inflamación grado + ( $p < 0.009$ ); mientras que, el 100% de los animales en el grupo control DSS mostraron grado de inflamación +, ++ y +++; caracterizándose por un incremento en el número de nódulos linfoides asociados a la mucosa, daño a nivel epitelial e infiltración de linfocitos. Por otro lado, en el grupo BF + DSS 2% se observaron bajos grados de inflamación (+ y ++) con una incidencia del 83%, caracterizándose por un aumento en el tejido linfoide, así como evidencia de cambios regenerativos en el tejido. Un roedor mostró una pérdida de continuidad del epitelio asociado a la generación de una úlcera y resultado de una infiltración de macrófagos y neutrófilos.

Estos resultados indican que la administración de BF microencapsulado disminuyó el efecto adverso causado por el DSS, sugiriendo un efecto protector ante una inflamación de los animales bajo estudio. Si bien, la administración de DSS 2% durante 7 días fue insuficiente para ocasionar colitis, si se presentó un daño epitelial importante en los animales de experimentación, el cual fue revertido por la administración de BF microencapsulado, principalmente a nivel de la mucosa y la lámina propia.

Es importante resaltar que se observó colonización de BF en contenido cecal y colónico estadísticamente diferente con el grupo con DSS pese a la administración de DSS. Esto confirma el efecto protector de BF sobre etapas tempranas de colitis.



Tratamiento	Grado de inflamación				
	Tejido sano	Bajo: 1	Medio: 2	Alto: 3	Total
Sano	5*	1	0	0	6
DSS 2% control	0	2	3*	1	6
BF	5*	1	0	0	6
BF + DSS 2%	1	2	3*	0	6
Total	11	6	6	1	24

**Figura 4.14.** Características histológicas y clasificación cuantitativa, acorde al número de criptas, neutrófilos, mitosis, apoptosis, células calciformes, alargadas, estratificadas e infiltradas en tejidos de colon de ratones CD-1 con inflamación inducida por DSS. **(a)** tejido Sano; **(b)** inflamación de bajo grado; **(c)** inflamación de grado medio; **(d)** Inflamación de alto grado. Tinción hematoxilina y eosina (H&E), imagen capturada en X100. n = 6 animales por grupo. \* Incidencia estadísticamente significativa mediante la prueba de Chi-cuadrado ( $P < 0.009$ ).

#### **4.11 Observaciones generales en el modelo carcinogénico pre-inflamatorio (AOM + DSS)**

Las bifidobacterias se usan ampliamente como probióticos. Alternativamente, LYC es un carotenoide que estimula selectivamente el crecimiento de probióticos en el GIT y potencia los efectos benéficos de estos microorganismos (Dias *et al.*, 2010). Usando un modelo de carcinogénesis pre-inflamatorio, inducido por AOM + DSS, investigamos una estrategia combinada de suplementación probiótica BF + LYC en el desarrollo de CRC, al proporcionar BF microencapsulado y mejorado termomecánicamente durante un período experimental de 16 semanas. Con la finalidad de evaluar el efecto quimiopreventivo de la suplementación BF-LYC en un modelo de AOM-DSS se determinó semanalmente peso corporal y fecal, pH,  $\beta$ -GA y cuenta viable de BF (Anexo E).

En los resultados se observa que, no hubo diferencias significativas en el peso corporal inicial y final después de 16 semanas de tratamiento entre los grupos experimentales (Cuadro 9). Aunque observamos ligeras diferencias en el aumento de peso, los resultados indicaron que ninguno de los tratamientos afectó negativamente el crecimiento de los animales. Sin embargo, observamos molestias anales en algunos ratones desde la semana 14. En el grupo control AOM + DSS, cuatro animales presentaron sangrado rectal y cinco animales desarrollaron prolapso anal; mientras que, sólo dos animales en el grupo LYC 20 + AOM + DSS y un animal en cada uno de los grupos BF + LYC 20 + AOM + DSS y Metformina + AOM + DSS desarrollaron sangrado anal y prolapso, respectivamente. Además, se observaron heces con sangre a partir de la semana 15 en el grupo control AOM + DSS. Los animales con estas condiciones se asignaron en jaulas de forma individual para su evaluación por un médico veterinario. En cuanto a la muerte de un roedor en el grupo Metformina + AOM + DSS (Cuadro 9), esta fatalidad ocurrió en la semana 12 y, de acuerdo a la evaluación del veterinario, ésta no estaba relacionada con el tratamiento con AOM + DSS.

El aumento del pH y los valores de  $\beta$ -GA en el colon se han reportado previamente en modelos de CCR inducida químicamente (Cuellar-Núñez *et al.*, 2018). En nuestro estudio, los valores de pH y  $\beta$ -GA fueron significativamente mayores en ciego, colon y heces del grupo control AOM + DSS (Cuadro 9). Es importante señalar que, los grupos tratados con BF + LYC tuvieron valores significativamente más bajos de pH y  $\beta$ -GA cecal, colónico y fecal, en comparación con los del grupo control AOM + DSS, excepto los valores de pH cecal. Los grupos tratados con BF y LYC mostraron valores similares de  $\beta$ -GA y pH cecal, colónico y fecal a los del grupo Sano con BF y BF + LYC 50. También observamos que el grupo tratado con metformina tenía valores de pH y  $\beta$ -GA cecal, colónico y fecal significativamente más bajos que los del grupo control AOM + DSS, pero similares a los valores del grupo Sano. En general, los resultados indicaron una mejora por los tratamientos BF y LYC, así como por la administración de metformina, en los parámetros intestinales relacionados con la carcinogénesis de colon específica en el modelo AOM-DSS.

#### **4.11.1 Viabilidad de BF microencapsulada y su distribución a través del GIT durante el estudio carcinogénico AOM + DSS de 16 semanas**

Diferentes autores han reportado que, algunos factores afectan la viabilidad de los probióticos, como las afecciones en el GIT (Eratte *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). Por lo tanto, la viabilidad de BF en heces se cuantificó durante 16 semanas mediante la técnica de vaciado en placa con agar BSM, como un medio de enumeración selectiva de Bifidobacterias.

En la Figura 4.15 podemos observar que, los niveles de BF en las primeras cuatro semanas para el grupo Sano, grupo control AOM + DSS y el grupo Metformina oscilaron entre 5.7-5.9 Log UFC/g. En los grupos tratados con BF y BF + LYC, las bacterias oscilaron entre 6.0-6.5 Log UFC/g; mientras tanto, en los grupos tratados con LYC la viabilidad de BF se encontraba entre 5.5-6.2 log UFC/g. Sin embargo, después de la administración de AOM y DSS, en todos los grupos tratados con BF, los niveles bacterianos se redujeron significativamente a

partir de la quinta semana ( $\approx 5.1$  Log UFC/g), y posteriormente de la 7° a la 16° semana, el rango de BF se mantuvo estable entre 4.3-5.0 Log UFC/g, valores significativamente superiores con respecto al grupo control AOM + DSS.

Una de las posibles explicaciones es la alteración (adaptación o desequilibrio) de la microbiota intestinal, debido a la inducción de inflamación por el tratamiento con DSS, el cual, no promovió la colonización de BF en el GIT a partir de la 5° semana. Lo anterior puede estar asociado con la disrupción de la barrera epitelial del colon, generación de úlceras e infiltración de linfocitos en mucosa (Tanaka, 2009; Grimm *et al.*, 2015).

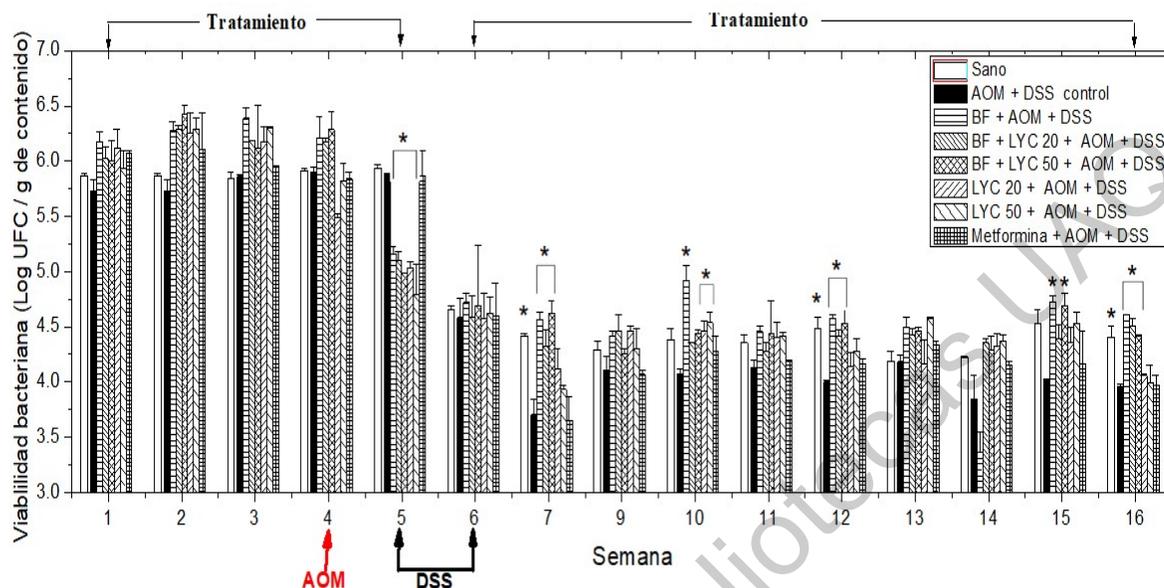
A pesar de la menor colonización de BF en el GIT de ratones, BF mostró un efecto protector cuando se administra diariamente, manteniendo un recuento estable de BF desde la 5° a 16° semana sin diferencia estadística en cada grupo (Tukey  $\alpha < 0.05$ ) (Anexo E); confirmando que, una dosis constante de BF microencapsulado ( $8.992E+10$  células viables  $\text{mL}^{-1}$ ) puede ejercer protección en un modelo de CCR, manteniendo los niveles de dicha bacteria de forma constante. Por el contrario, Singh y colaboradores (2013) reportaron una disminución significativa en una cepa de *Bifidobacterium*, de 2 Log células/g de heces en sólo 24 h después de la última administración intragástrica en condiciones saludables.

Para obtener mayor información sobre el sitio de colonización preferencial de BF, se cuantificaron las bacterias viables en zona luminal (Figura 4.16a) y adherentes a tejidos (Figura 4.16b) en diferentes segmentos del GIT de ratones. Interesantemente, las concentraciones más altas de BF tanto en la zona luminal como adherentes a los tejidos, fueron asociadas a los grupos tratados con BF, BF + LYC 20 y BF + LYC 50. La adhesión a las células epiteliales intestinales y al moco es una característica que apoya la colonización y la persistencia de las BF en el GIT; los componentes de la superficie celular que promueven la colonización y la adhesión al epitelio intestinal incluyen proteínas sortasa-dependientes, exopolisacáridos y lipoproteínas, así como, los *pili* de las BF, las cuales demostraron modular la respuesta inmune.

**Cuadro 9.** Peso final, ganancia de peso, pH y  $\beta$ -GA en contenido cecal, colónico y fecal en la semana 16 del tratamiento con AOM-DSS.

Grupos	Peso final (g)	Ganancia de peso final (g)	Ciego		Colon		Heces	
			pH	$\beta$ -GA <sup>1</sup>	pH	$\beta$ -GA <sup>1</sup>	pH	$\beta$ -GA <sup>1</sup>
Sano	39.56 ± 1.01 <sup>a</sup>	8.41 ± 0.95 <sup>b</sup>	7.12 ± 0.04 <sup>b</sup>	3.22 ± 0.33 <sup>c</sup>	7.21 ± 0.07 <sup>ab</sup>	2.61 ± 0.16 <sup>bc</sup>	6.99 ± 0.10 <sup>b</sup>	5.72 ± 0.03 <sup>de</sup>
AOM + DSS control	40.46 ± 1.01 <sup>a</sup>	9.85 ± 0.68 <sup>b</sup>	7.47 ± 0.04 <sup>a</sup>	6.56 ± 0.35 <sup>a</sup>	7.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.34 ± 0.53 <sup>a</sup>	8.08 ± 0.13 <sup>a</sup>	9.52 ± 0.08 <sup>a</sup>
BF + AOM + DSS	41.76 ± 1.29 <sup>a</sup>	12.05 ± 1.03 <sup>a</sup>	7.20 ± 0.14 <sup>ab</sup>	3.32 ± 0.34 <sup>bc</sup>	7.20 ± 0.06 <sup>ab</sup>	1.85 ± 0.15 <sup>bc</sup>	6.96 ± 0.10 <sup>b</sup>	4.88 ± 0.14 <sup>ef</sup>
BF + LYC 20 + AOM + DSS	41.71 ± 0.97 <sup>a</sup>	11.71 ± 0.65 <sup>ab</sup>	7.24 ± 0.04 <sup>ab</sup>	2.68 ± 0.25 <sup>c</sup>	7.20 ± 0.06 <sup>ab</sup>	1.66 ± 0.09 <sup>c</sup>	7.07 ± 0.20 <sup>b</sup>	6.71 ± 0.26 <sup>c</sup>
BF + LYC 50 + AOM + DSS	41.42 ± 0.97 <sup>a</sup>	11.61 ± 0.71 <sup>ab</sup>	7.17 ± 0.06 <sup>ab</sup>	2.37 ± 0.24 <sup>c</sup>	7.19 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.44 ± 0.27 <sup>bc</sup>	7.04 ± 0.11 <sup>b</sup>	4.71 ± 0.12 <sup>f</sup>
LYC 20 + AOM + DSS	39.78 ± 0.70 <sup>a</sup>	10.01 ± 0.44 <sup>ab</sup>	7.39 ± 0.09 <sup>ab</sup>	3.65 ± 0.24 <sup>bc</sup>	7.36 ± 0.09 <sup>ab</sup>	2.73 ± 0.21 <sup>bc</sup>	7.19 ± 0.13 <sup>b</sup>	6.26 ± 0.27 <sup>cd</sup>
LYC 50 + AOM + DSS	41.19 ± 1.29 <sup>a</sup>	12.10 ± 1.08 <sup>a</sup>	7.29 ± 0.09 <sup>ab</sup>	4.74 ± 0.22 <sup>b</sup>	7.18 ± 0.07 <sup>b</sup>	3.01 ± 0.31 <sup>b</sup>	7.18 ± 0.16 <sup>b</sup>	6.20 ± 0.10 <sup>cd</sup>
Metformina + AOM + DSS	39.03 ± 1.01 <sup>a</sup>	9.74 ± 1.14 <sup>b</sup>	7.27 ± 0.11 <sup>ab</sup>	2.99 ± 0.31 <sup>c</sup>	7.28 ± 0.04 <sup>ab</sup>	2.46 ± 0.27 <sup>bc</sup>	7.02 ± 0.25 <sup>b</sup>	7.62 ± 0.33 <sup>b</sup>

Los valores son la media ± SEM ( $n = 6-10$  animales por grupo). <sup>1</sup>µg fenoltaleína por hora por g de contenido. Valores con diferente(s) letra(s) dentro de una misma columna son significativamente diferentes (Tukey HSD  $\alpha < 0.05$ ). AOM: azoximetano; DSS: Dextrano sulfato de sodio; BF: *Bifidobacterium longum*; LYC: licopeno.



**Figura 4.15.** Viabilidad de BF en heces de ratón CD-1 durante 16 semanas. Los valores se representan como Log UFC/g de heces. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparadas con el grupo control AOM + DSS (Dunnett  $\alpha = 0.050$ ). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 6-10$  animales por grupo).

Otro aspecto que contribuye a la capacidad (alta o baja) de BF para colonizar el IGT de manera estable podría ser, una mejor adaptación a su hábitat original, es decir en el intestino humano, debido a que, la adaptación de las Bifidobacterias al huésped se ha demostrado a medida que utilizan los carbohidratos, ya que, BF tiene la capacidad de utilizar oligo- y polisacáridos vegetales que se derivan de la dieta del huésped (Grimm *et al.*, 2015).

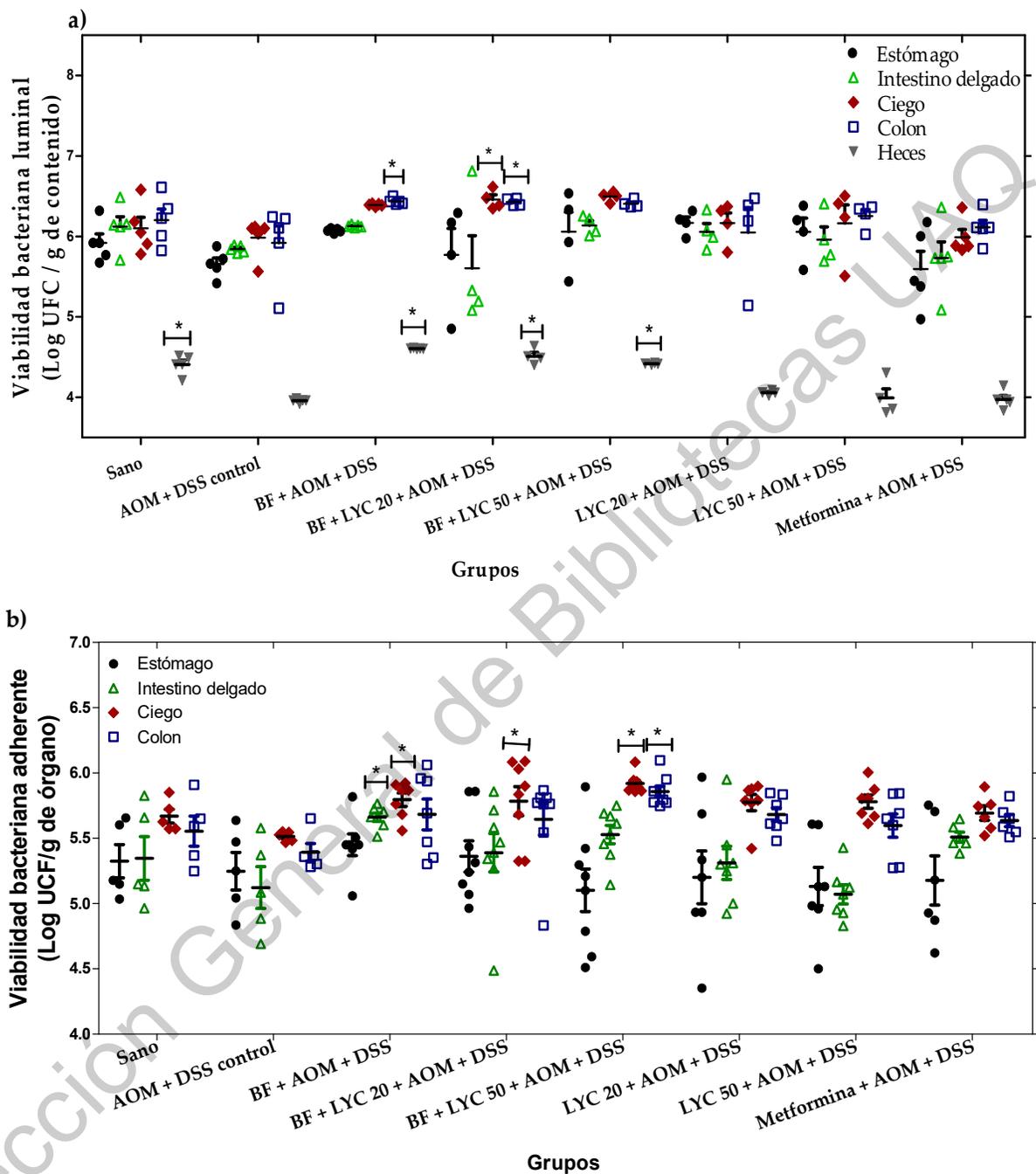
Como se esperaba, las zonas de colonización preferencial de BF fueron el ciego y colon, con una mayor concentración bacteriana en la zona luminal (Lievin, 2000). En este sentido, nuestros resultados mostraron una correlación negativa entre  $\beta$ -GA, pH y la colonización bacteriana (Anexo E); por lo tanto, la sobreactividad de la enzima  $\beta$ -GA y la basicidad del pH contribuyen a una menor colonización bacteriana en la zona luminal ( $p < 0.05$ ); mientras que, en la zona adherente al tejido, la colonización de BF sólo se correlacionó negativamente con la sobreactividad de  $\beta$ -GA en ciego, colon y heces (Anexo E). Nuestros resultados concuerdan con los mecanismos anticancerígenos asociados a la administración

de BF (Serban, 2014; Wong *et al.*, 2019). Sin embargo, este es el primer informe que demuestra que, los tratamientos con LYC y metformina disminuyen el pH y  $\beta$ -GA en ratones con CCR, lo que confirma su aplicación como objetivos intestinales terapéuticos en el modelo AOM-DSS.

#### **4.11.2 Evaluación macroscópica y clasificación histopatológica**

La examinación morfológica de las mucosas del colon, en roedores tratados con AOM + DSS, mostraron la formación de protuberancias en zona luminal. Se observaron en el colon proximal y distal lesiones de tipo plano (denominadas lesiones tempranas), lesiones pedunculadas, sésiles, exofíticas y endofíticas (denominados tumores) (Cuadro 10). Como se esperaba, el grupo Sano mostró la menor incidencia de lesiones tempranas (10 %), y ninguno de los animales desarrolló tumores ( $p < 0.05$ ); mientras tanto, el grupo control AOM + DSS mostró 60 % y 80 % de lesiones tempranas e incidencia tumoral, respectivamente. Aunque se encontró un mayor porcentaje de animales con lesiones de tipo plano en los grupos tratados con BF, LYC y metformina (71-88 %), estos grupos mostraron una menor incidencia de tumoral (13-38 %, 43-71 % y 50 %, respectivamente), valores estadísticamente significativos sólo para los grupos tratados con BF ( $p < 0.05$ ).

El grupo de Metformina mostró una reducción estadísticamente significativa en el número de tumores, en comparación con el grupo control AOM + DSS. Significativamente, la mayoría de las lesiones tempranas y tumores en los grupos tratados con AOM + DSS se encontraron en la zona distal del colon (67-100 %), confirmando que, este modelo de iniciación-promoción genera predominantemente tumores en la zona distal (Kohno *et al.*, 2005; Tanaka, 2012), a excepción del grupo Metformina + AOM + DSS, donde se encontraron predominantemente lesiones tempranas y tumores en la zona proximal del colon (85 % y 67 %, respectivamente).



**Figura 4.16.** Población de BF en estómago, intestino delgado, ciego, colon y heces de ratones CD-1 en la semana 16 del tratamiento. Los valores son Log UFC/g de contenido en **(a)** el área luminal, heces o **(b)** adherentes al tejido, en diferentes secciones del GIT, como es indicado. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas en comparación con el grupo control AOM + DSS (Dunnett  $\alpha=0.050$ ). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 6-10$  animales por grupo).

**Cuadro 10.** Efecto anticancerígeno de BF microencapsulado en la clasificación macroscópica de lesiones colónicas, inducidas con AOM + DSS en ratones CD-1 macho.

Grupo	n	Incidencia de lesiones tempranas <sup>a</sup> (%)	Media <sup>b</sup>	Distribución de lesiones tempranas en colon <sup>a</sup>		Incidencia de tumores <sup>c</sup> (%)	Media <sup>b</sup>	Distribución de tumores en colon <sup>c</sup>	
				Proximal	Distal			Proximal	Distal
Sano	10	10% *	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	1 (100%)	0 (0%)	0% *	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0 (0%)	0 (0%)
AOM + DSS control	10	60%	1.2 ± 0.4 <sup>ab</sup>	2 (17%)	10 (83%)	80%	4.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	0 (0%)	42 (100%)
BF + AOM + DSS	7	86%	2.4 ± 0.7 <sup>ab</sup>	1 (6%)	16 (94%)	14% *	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0 (0%)	1 (100%)
BF + LYC 20 AOM + DSS	8	88%	3.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	4 (17%)	20 (83%)	13% *	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0 (0%)	1 (100%)
BF + LYC 50 AOM + DSS	8	75%	2.3 ± 0.7 <sup>ab</sup>	4 (25%)	12 (75%)	38% *	0.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	1 (33%)	2 (67%)
LYC 20 + AOM + DSS	7	71%	1.1 ± 0.5 <sup>ab</sup>	0 (0%)	8 (100%)	43%	1.7 ± 1.0 <sup>ab</sup>	0 (0%)	12 (100%)
LYC 50 + AOM + DSS	7	71%	1.3 ± 0.4 <sup>ab</sup>	3 (33%)	6 (67%)	71%	1.6 ± 0.6 <sup>ab</sup>	1 (9%)	10 (91%)
Metformina + AOM +DSS	6	83%	2.2 ± 0.9 <sup>ab</sup>	11 (85%)	2 (15%)	50%	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	2 (67%)	1 (33%)

<sup>a</sup> Evaluación cuantitativa macroscópica de lesiones tempranas. <sup>b</sup> Tipo de lesión/número de ratones por grupo. <sup>c</sup> Evaluación cuantitativa macroscópica de lesiones protuberantes (pedunculadas, sésiles, exofíticas y endofíticas). Los valores son la media ± SEM. Valores con diferente letra (s) dentro de una columna son significativamente diferentes acorde a la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). \*La incidencia es estadísticamente significativa por la prueba de Chi-cuadrado ( $p < 0.05$ ).

De acuerdo al estudio histopatológico para el modelo de CCR sólo se consideraron los grados de inflamación y los adenocarcinomas (Cuadro 11) (Tanaka, 2012). Como se esperaba, ninguno de los animales del grupo Sano desarrollaron adenocarcinomas, sólo un animal mostró grado de inflamación ++ ( $p < 0.00002$ ); mientras que, el 80 % de los animales del grupo control AOM + DSS desarrollaron adenocarcinomas, y dos animales mostraron grado de inflamación +++. En este estudio, la incidencia tumoral (evaluación cuantitativa macroscópica) y la incidencia de adenocarcinomas (evaluación histopatológica), inducidas por AOM + DSS, fueron significativamente correlacionadas ( $p < 0.05$ ), lo que confirma que, las masas circunscritas celulares proyectadas sobre la superficie colónica (pólipos), podrían desarrollarse en carcinomas colorrectales (Tanaka, 2009). Los grupos tratados con BF, BF + LYC y Metformina mostraron una menor incidencia de adenocarcinomas (14 %, 13 % y 50 %, respectivamente), pero una mayor incidencia en inflamación (75-88 %; excepto para el grupo tratado con metformina). Si bien, la administración de BF y su combinación con LYC mostraron grados de inflamación más bajos (+ y ++), y significativamente se observó la protección contra adenocarcinomas ( $p < 0.00002$ ), la administración conjunta con LYC no ejerció protección anticancerígena de forma sinérgica. Sin embargo, protegió contra la inflamación ( $p < 0.00002$ ).

Curiosamente, la colitis estaba prácticamente ausente en ratones tratados con AOM + DSS, después de las 16 semanas de tratamiento. Sin embargo, la inflamación todavía estaba presente al final de las 16 semanas. Por este motivo, como una estrategia para caracterizar en detenimiento la inflamación del colon en los grupos tratados con BF y LYC, se realizó una clasificación cuantitativa y descriptiva del daño colónico, de acuerdo con la infiltración de linfocitos, células calciformes, crestas epiteliales, placas de Peyer, necrosis y la presencia de mitosis (Cuadro 11). Esto es de gran relevancia ya que, Tanaka y colaboradores (2003) han demostrado que, la cantidad de linfocitos infiltrados en neoplasias y la lámina propia de la mucosa en colon; así como la formación de abscesos en criptas, sugieren que, estos análisis están estadísticamente correlacionados con el

desarrollo de pre malignidad a malignidad en el colon con inflamación. Del mismo modo, Doulberis y colaboradores (2015) observaron que, en ratones BALB/cJ tratados con AOM y DSS (1%, tres ciclos) no mostraron signos clínicos de colitis después de 3.5 meses de período experimental. Sin embargo, persistió un mayor número de células inflamatorias en el colon de ratones, posterior a los episodios de colitis inducidos por DSS. Este hallazgo es consistente con nuestra observación debido a que, al final de las 16 semanas de período experimental, los ratones en los grupos tratados con BF y LYC aún presentaban células inflamatorias residentes. En adición, los grupos tratados con BF y metformina mostraron comportamientos similares al grupo Sano. Por el contrario, los grupos tratados sólo con LYC mostraron una alta infiltración de linfocitos, pocas células calciformes, la ausencia de crestas epiteliales y placas de Peyer y la presencia de necrosis (Cuadro 11). En general, nuestros resultados sugieren que la administración de BF y metformina fue efectiva para reducir el número de tumores y la incidencia de adenocarcinomas en el colon de ratones tratados con AOM + DSS.

El papel protector de LYC en la prevención de enfermedades crónicas, incluido el cáncer, ha sido reportado anteriormente (Trejo-Solís *et al.*, 2013; Kasdagly *et al.*, 2014; Ono *et al.*, 2015), y su co-administración con *B. lactis* + oligofruktosa/inulina mostrando un efecto sinérgico en la fase de iniciación de CCR, inducido por 1,2-dimetilhidrazina (DMH), al incrementar significativamente la apoptosis en comparación con los grupos tratados con LYC y oligofruktosa + *B. lactis* (Dias *et al.*, 2010). Sin embargo, se concluyó previamente que, el LYC en la dieta se absorbe y posteriormente se distribuye en diversos órganos y tejidos, incluidos el hígado, pulmón y tejido adiposo, lo que desvía su papel protector contra el desarrollo de lesiones tempranas y protuberantes en el colon (Ono *et al.*, 2015; Takasuka *et al.*, 2002). Este hallazgo es consistente con nuestros resultados debido a que, al final del período experimental, la administración de LYC + BF no mejoró aún más el efecto protector del BF microencapsulado. Por otro lado, la

administración de metformina fue efectiva para reducir el número de tumores, infiltración de linfocitos y otras características inflamatorias, así como, la incidencia de adenocarcinomas en colon de ratones tratados con AOM + DSS. Del mismo modo, el efecto quimiopreventivo de la metformina se ha demostrado previamente en modelos murinos, principalmente sobre la reducción de colitis ulcerosa y la regulación en la expresión proteica de IGFBP3 (Yancu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019).

#### **4.11.3 Modulación de los componentes del sistema IGF en tejido colorrectal**

Dado que el sistema IGF-1/IGF-1R desempeña un papel fundamental en el desarrollo, proliferación, invasión y supervivencia de células de CCR en pacientes (Han *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2018) y en modelos de CCR inducidos por AOM-DSS (Josse *et al.*, 2013), se procedió a demostrar el efecto sinérgico de la coadministración de BF + LYC, sobre la expresión de diversos componentes del sistema IGF, como una estrategia efectiva para la quimiopreención del CCR.

En la Figura 4.17 (f-l, j-m, n-q) se muestran expresiones representativas de las proteínas IGF-1, IGF-1R e IGFBP3, respectivamente, mediante la técnica de inmunohistoquímica, observándose una expresión positiva de color amarillo a color amarillo oscuro; donde, las tasas positivas son en relación a cada expresión proteica, respecto al grupo control AOM + DSS. Como se muestra en el panel inferior de la Figura 4.17, las tasas positivas de expresión en IGF-1, IGF-2 e IGF-1R del grupo Sano fueron 60 %, 50 % y 33 % más bajas, respectivamente, en comparación con el grupo control AOM + DSS (prueba de Chi-cuadrada,  $p < 0.05$ ).

Similar al análisis histopatológico, sólo la administración de BF y BF + LYC redujeron significativamente tanto la tasa positiva, como el grado de expresión de las proteínas IGF-1 e IGF-2. Sin embargo, la administración conjunta de LYC no disminuyó aún más estos valores. En adición, los grupos tratados con BF + LYC mostraron una menor expresión de IGF-1R (prueba de Chi-cuadrada,  $p < 0.05$ ). Mientras que, la administración de metformina de igual manera fue

significativamente efectiva para reducir las expresiones de IGF-1, IGF-2 e IGF-1R (Figura 4.17, panel inferior).

Así mismo, se ha reportado que las expresiones de IGF-1 e IGF-1R se correlacionan con la incidencia de tumores y adenocarcinomas, así como altos valores de pH cecal, fecal y  $\beta$ -GA ( $p < 0.05$ ). En este estudio, se observó una correlación negativa entre las expresiones IGF-1 e IGF-1R y la viabilidad de BF en contenido cecal, colónico y fecal ( $p < 0.05$ ) (Anexo E). En adición, las tasas positivas más bajas de IGF-1, en los grupos tratados con BF + LYC (hasta 50 %) y tratados con metformina (67 %) podrían ser de gran relevancia en nuestro estudio ya que, en un estudio anterior, la incidencia de tumores en ciego fue significativamente menor en ratones con deficiencia de IGF-1, ortotópicamente trasplantados con 38 fragmentos de tejido de adenocarcinoma de colon (Wu *et al.*, 2002).

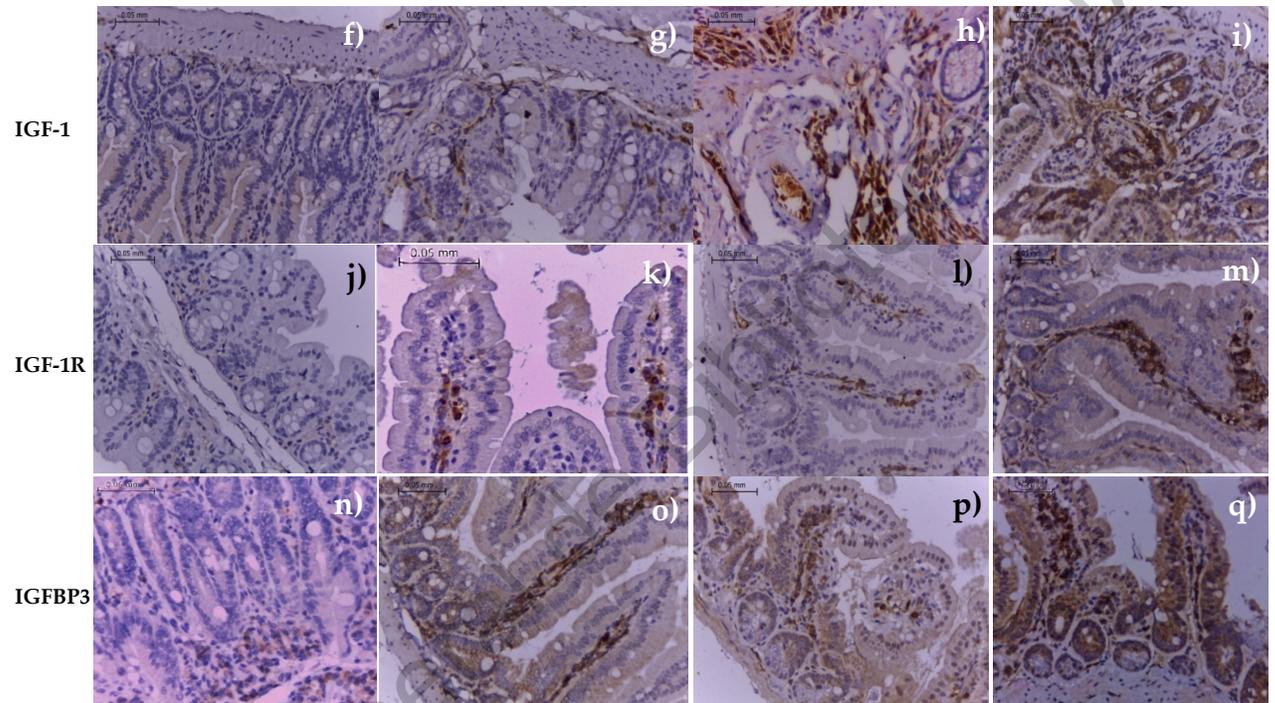
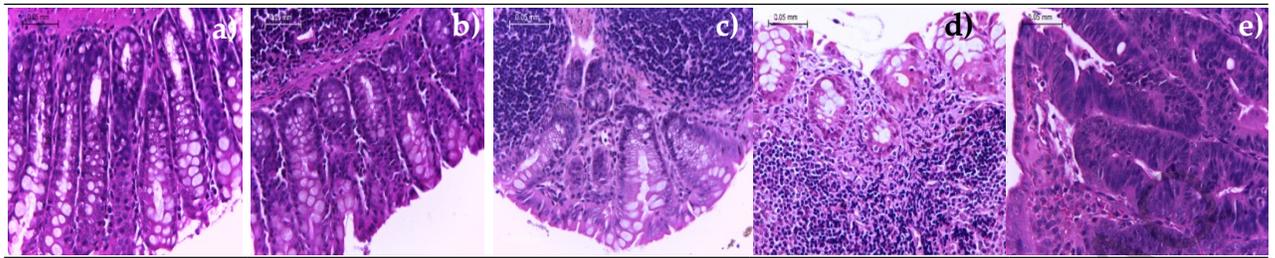
Las proteínas de unión (IGFBP) a IGF modulan la cantidad de IGFs biodisponibles de manera positiva o negativa (Sipos *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). Tanto la tasa positiva como el grado de expresión de IGFBPs se muestran en el panel inferior de la Figura 4.17. En el grupo Sano, las tasas positivas de expresión de IGF2BP1 e IGFBP2 en muestras de colon fueron significativamente más bajas (33 y 40 %, respectivamente), mientras que la expresión de IGFBP3 fue significativamente más alta (43%,  $p < 0.05$ ), comparados con el grupo de control AOM + DSS.

Debido a que, actualmente está bien establecido que IGF-1 se une principalmente a IGFBP3; en el grupo control AOM + DSS, la tasa positiva de IGFBP3 fue menor y la expresión de IGF-1 fue mayor, ambas en comparación con el grupo Sano, confirmando la correlación positiva y negativa de estas dos proteínas, respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Anexo E). Nuestros hallazgos concuerdan con los observados previamente en pacientes con CCR (Han *et al.*, 2016; Yücel *et al.*, 2018). Por el contrario, en nuestro estudio, las expresiones IGF2BP1 e IGFBP2 se correlacionaron significativamente con las expresiones IGF-1 e IGF-2 y la incidencia de adenocarcinomas ( $p < 0.05$ ) (Anexo E).

**Cuadro 11.** Caracterización histológica y clasificación cuantitativa acorde a la infiltración linfocitaria, células caliciformes, crestas epiteliales, placas de Peyser, necrosis, mitosis, grado de inflamación y adenocarcinomas, inducidos con AOM + DSS en ratones macho CD-1.

Grupo	n	Tejido sano	Infiltración linfocitaria			Células caliciformes			Crestas epiteliales		Placas de Peyser		Muscular definida	Necrosis	Mitosis	Grado de inflamación			Incidencia de inflamación (%)	Adenocarcinomas
			Baja	Media	Alta	Bajo	Moderado	Alto	Si	No	Si	No				+	++	+++		
Sano	10	9 (90%) *	N/A					X	X		X		Si	No	No	0	1	0	10% *	0 (0%) *
AOM + DSS control	10	0 (0%)			X	N/A					X	X	No	Si	1%	0	0	2	20% *	8 (80%)
BF + AOM + DSS	7	0 (0%)		X			X		X	X		Si	No	-1%	3	3	0	86%	1 (14%) *	
BF + LYC 20 AOM + DSS	8	1 (13%)	Focal				X		X	X		Si	Focal	-1%	2	4	0	75%	1 (13%) *	
BF + LYC 50 AOM + DSS	8	0 (0%)	X				X		X	X		Si	No	-1%	4	3	0	88%	1 (13%) *	
LYC 20 + AOM + DSS	7	0 (0%)			X	N/A				X	X	Focal	Focal	1%	0	2	1	43% *	4 (57%)	
LYC 50 + AOM + DSS	7	0 (0%)			X	X			X		X	No	Focal	-1%	0	2	1	43% *	4 (57%)	
Metformina + AOM + DSS	6	2 (33%)	X				X		X	X		Focal	Focal	-1%	1	0	0	17% *	3 (50%) *	

Clasificación cuantitativa histopatológica, acorde a la tinción con hematoxilina y eosina (H&E), en tejidos colónicos ( $\times 400$ ). Los valores son la media ( $n = 6-10$  animales por grupo). N/A: Ninguna. \* Incidencia estadísticamente significativa mediante Chi-cuadrada ( $p < 0.00002$ ).



Grupo	n	IGF-1 expresión				Tasa positiva (%)	IGF-2 expresión				Tasa positiva (%)	IGF-1R expresión				Tasa positiva (%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
Sano	10	6	4	0	0	40%	5	5	0	0	50%	4	6	0	0	67%
AOM + DSS grupo control	10	0	6	2	2	100% *	0	7	3	0	100% *	1	5	2	2	100% *
BF + AOM + DSS	7	3	4	0	0	57%	2	5	0	0	71%	1	6	0	0	95% *
BF + LYC 20 + AOM + DSS	8	4	4	0	0	50%	2	6	0	0	75%	2	6	0	0	83%
BF + LYC 50 + AOM + DSS	8	3	4	1	0	63%	2	2	3	1	75%	2	6	0	0	83%
LYC 20 + AOM + DSS	7	1	2	3	1	86% *	1	3	2	1	86%	1	4	2	0	95% *
LYC 50 + AOM + DSS	7	1	2	4	0	86% *	0	7	0	0	100% *	1	5	1	0	95% *
Metformina + AOM + DSS	6	2	3	1	0	67%	2	3	1	0	67%	2	3	1	0	74%

Grupo	n	IGF2BP1 expresión				Tasa positiva (%)	IGFBP2 expresión				Tasa positiva (%)	IGFBP3 expresión				Tasa positiva (%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
Sano	10	4	6	0	0	67%	4	6	0	0	60%	0	7	2	1	143% *
AOM + DSS grupo control	10	1	4	3	2	100% *	0	5	0	5	100% *	3	7	0	0	100%
BF + AOM + DSS	7	3	4	0	0	64%	1	4	2	0	86%	1	3	1	2	122% *
BF + LYC 20 + AOM + DSS	8	2	6	0	0	83%	3	5	0	0	63%	1	7	0	0	125% *
BF + LYC 50 + AOM + DSS	8	1	7	0	0	97% *	2	6	0	0	75%	1	5	0	2	125% *
LYC 20 + AOM + DSS	7	0	6	1	0	111% *	0	3	4	0	100% *	2	5	0	0	102%
LYC 50 + AOM + DSS	7	1	6	0	0	95% *	1	1	5	0	86%	1	5	1	0	122% *
Metformina + AOM + DSS	6	3	1	2	0	56%	2	1	3	0	67%	4	1	0	0	24%

**Figura 4.17.** Caracterización histológica, expresión proteica IGF-I, IGF-2, IGF-IR y expresión de proteínas de unión (IGFBP) a IGF en tejidos colónicos de ratones tratados con AOM-DSS. *Tinción H&E:* (a) Tejido sano; (b) Inflamación de bajo grado (+); (c) Inflamación de grado medio (++); (d) Inflamación de alto grado (+++); (e) Adenocarcinoma. *Inmunotinción:* (f, j, n) Expresión de proteínas negativas <5 % (-); (g, k, o) Expresión de proteínas débilmente positivas en el rango de 5–24 % (+); (h, l, p) Expresión positiva de proteínas en el rango de 25-50 % (++); (i, m, q) Expresión proteica fuertemente positiva > 50 % (+++). Imagen capturada a  $\times 400$ . Tasa positiva (porcentaje de grupo tratado/grupo control AOM + DSS).  $n = 6-10$  ratones por grupo. \* Incidencia estadísticamente significativa mediante la prueba de chi-cuadrada ( $p < 0.05$ ).

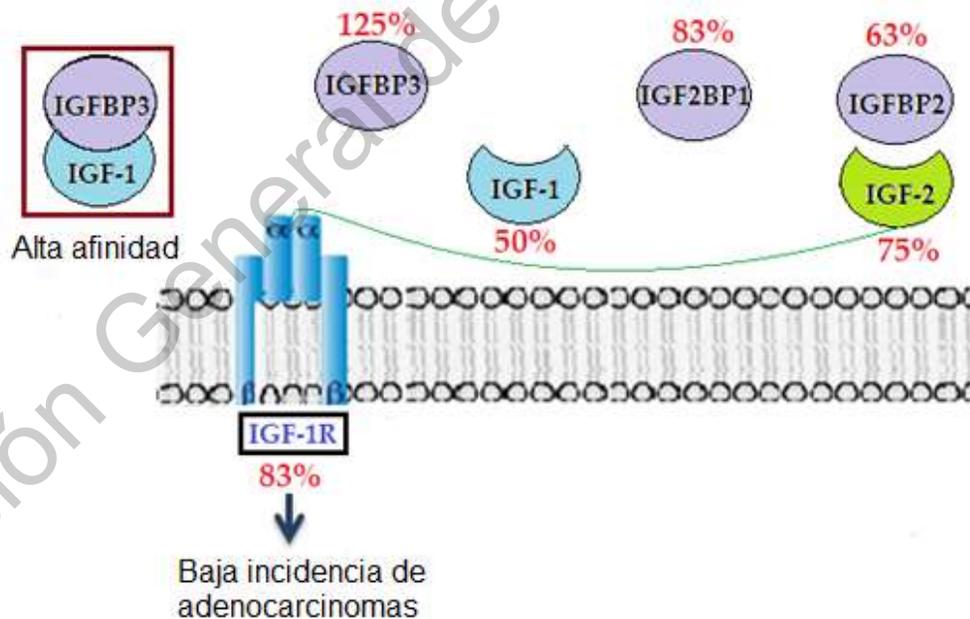
Lo anterior demuestra que, la co-administración de BF + LYC significativamente reducen tanto la tasa positiva como el grado de expresión de las proteínas IGF2BP1 e IGFBP2 (prueba de Chi-cuadrada,  $p < 0.05$ ). Asimismo, el grupo BF + AOM + DSS mostró menor grado de expresión de IGF2BP1, y su administración conjunta con LYC (50 mg kg<sup>-1</sup>) tuvo un efecto adicional, al disminuir la expresión de IGFBP2. Destacablemente, los grupos BF y BF + LYC aumentaron significativamente tanto la tasa positiva como el grado de expresión de la proteína IGFBP3. En contraparte, la administración de metformina fue efectiva para reducir las tasas positivas de expresión de IGF2BP1 (44 %) e IGFBP2 (33 %) (Figura 4.17, panel inferior); sin embargo, no tuvo efecto en la normalización de IGFBP3. Por el contrario, se observó una disminución drástica en la expresión de IGFBP3 en un 76 % (prueba de Chi-cuadrada,  $p < 0,05$ ) en el

grupo tratado con metformina. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Renehan y colaboradores (2000) y Šunderić y colaboradores (2014) ya que, las expresiones más altas de IGF-2 e IGFBP2 están representadas en pacientes con neoplasia de colon, en comparación con individuos sanos.

Vale la pena mencionar que, el grupo de tratamiento BF + LYC 20 mostró la mejor similitud con el grupo Sano ( $p < 0.05$ ) y una colonización relevante de BF en el GIT durante las 16 semanas de tratamiento. Además, se demostró que este grupo ejerce cambios benéficos en la fisiología del colon al disminuir el pH cecal, colónico y fecal, junto con la actividad  $\beta$ -GA. Por lo tanto, se ha evidenciado que, la modulación de la microbiota intestinal es un elemento clave de la actividad promotora de la salud del colon. Nuestros resultados, concuerdan con lo reportado por Amir y colaboradores (1999), quienes mostraron una supresión sinérgica del crecimiento celular HL-60 (células de leucemia promielocíticas) con una combinación de dosis bajas de LYC y ácido retinoico; sus resultados están directamente asociados con la inhibición en la progresión del ciclo celular, a través de la fase G1. Diferentes investigaciones (Sharoni *et al.*, 2000; Bhuvaneswari *et al.*, 2005) han reportado que, la absorción de LYC parece ser más eficiente a dosis más bajas debido a la disolución en quilomicrones mixtos, la absorción por el hígado, la distribución hacia los tejidos y la secreción en lipoproteínas de muy baja densidad. En adición, el LYC tiende a perder su capacidad de reducir el daño oxidativo y ejercer efectos anticancerígenos a concentraciones más altas. Debido a que, las altas concentraciones de un carotenoide pueden interferir con la biodisponibilidad de otros, provocando un desequilibrio, como ocurre en una asociación entre el  $\beta$ -caroteno y el LYC (Yin *et al.*, 2019). Aunque el mecanismo de tal respuesta aun no está claro, se presume que el LYC es tóxico a dosis altas (Wang, 2004) (Figura 2.6).

Sin embargo, habiendo mencionado que, los enlaces fisiopatológicos subyacentes con el sistema IGF-1/IGF-1R/IGFBPs y que los mecanismos moleculares aún permanecen sin resolver (Han *et al.*, 2016), la suplementación de BF + LYC 20 mostró expresiones fuertemente disminuidas de IGF-1 , IGFBP2 e

IGF-1R; mientras que, la expresión de la proteína IGFBP3 aumentó después del tratamiento con AOM + DSS (Figura 4.18), lo cual no se ha reportado previamente con BF microencapsulado utilizando la técnica de secado por aspersion. En base a lo anterior, en ausencia de IGFBP3, la bioactividad mejorada de IGF-1/2 y la unión a IGFBP2 podrían conducir a un aumento en la proliferación epitelial y la reparación de la barrera mucosa, disminuyendo así, la inflamación inducida por DSS (Vigneri *et al.*, 2015). Debido a esto, los niveles de expresión de IGFBP3 restaurados en los grupos tratados con BF + LYC podrían conducir a una unión con una alta afinidad a IGF-1 y posteriormente, la activación de las vías de señalización por IGF-2 unido a IGFBP2, pero a una proporción menor (Figura 4.18). Estos niveles de expresión restaurados operan como reguladores positivos de la actividad de IGF, al igual que, la estimulación del ciclo celular y la apoptosis inducida, inhibiendo así el CCR mediante la modulación de las vías PI3K/AKT y MAPK (Ono *et al.*, 2015; Vigneri *et al.*, 2015).



**Figura 4.18.** Modulación del sistema IGF por BF + LYC 20 en ratones tratados con AOM-DSS. Los niveles de expresión restaurados de IGFBP3 pueden unirse con alta afinidad a IGF-1, lo que conduce a la activación posterior de las vías de señalización por IGF-2 y su unión a IGFBP2, como resultado, se muestra la baja incidencia de adenocarcinomas. Los porcentajes en rojo representan las tasas positivas expresadas en la Figura 4.17.

## V. CONCLUSIONES

El estudio las propiedades fisicoquímicas y mecánicas, junto con una serie de parámetros cinéticos de crecimiento, permitió optimizar las condiciones de microencapsulación de BF para predecir su capacidad protectora a nivel intestinal. El encapsulamiento mediante el secado por aspersión I (mezcla: 1.6 % alginato/0.8 % goma arábica/2.5 % almidón fosfatado) mostró una alta protección a BF. Los termogramas DMA y DSC confirman la resistencia y estabilidad de los microencapsulados a una temperatura significativamente superior a la corporal una vez ingeridos, sin cambios estructurales que puedan afectar la protección a BF.

Respecto a la cinética de crecimiento de BF, se obtuvo una viabilidad de 4 log más alta que los estudios previamente reportados para microorganismos probióticos, con 99 % de viabilidad celular. En general, se aumentó significativamente la sobrevivencia de BF en un 70 % mediante secado por aspersión I en comparación con el 7 % de supervivencia mediante la técnica de goteo; manteniendo inclusive 105 días posteriores al microencapsulamiento una supervivencia bacteriana 2 log por encima del valor sugerido en la literatura.

En un modelo de inflamación aguda, la administración de BF microencapsulado promovió de manera significativa la colonización de BF en contenido luminal y adherente al GIT en los grupos tratados con esta bacteria. Estos cambios, aunados a una correlación negativa en pH y  $\beta$ -GA en el GIT, promovieron una microbiota intestinal más favorable relacionándose con un efecto anti-inflamatorio.

Logrando cumplir con la hipótesis planteada, la suplementación con LYC en el modelo de CCR no impidió el efecto benéfico del BF microencapsulado. De mayor relevancia es el hecho que, la administración de BF microencapsulado + LYC 20 fue efectiva para reducir el número de tumores y otros marcadores inflamatorios, así como la incidencia de adenocarcinomas.

En base a los resultados de nuestro estudio podemos sugerir que, el tratamiento con BF microencapsulado previene o controla la progresión de lesiones colónicas a adenocarcinomas promovidos por un ambiente inflamatorio

con DSS, estableciendo así un efecto quimioprotector. Además, se evidencia que la modulación exitosa de la expresión proteica de IGF-1/IGF-1R/IGFBP3 puede estar involucrada en mecanismos supresores y subyacentes a la evolución a adenocarcinomas en un modelo de CCR inducido por AOM-DSS.

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta Tesis Doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones. En primera instancia estarían los trabajos destinados a enriquecer la caracterización del microencapsulado y su comportamiento reológico, mediante estudios de microscopía de fuerza atómica, DMA, DSC y compatibilidad del microencapsulado dentro de productos alimenticios para su potencial aplicación industrial. En segunda instancia, se propone un análisis del balance y competitividad microbiana mediante un estudio metagenómico dirigido a poblaciones bacterianas.

Finalmente, como limitante en el proyecto sólo se evaluaron niveles de expresión del sistema IGF-1/IGF-1R/IGFBPs, por lo cual, se propone el estudio de la modulación en las vías PI3K/AKT y MAPK para el establecimiento de los mecanismos supresores a la evolución a adenocarcinomas.

## REFERENCIAS

- Abe, F.; Miyauchi, H.; Uchijima, A.; Yaeshima, T. y Iwatsuki, K. 2009. Stability of bifidobacteria in powdered formula. *International Journal of Food Science and Technology*. 44(4): 718-724.
- Agarwal, S. y Rao, V. 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*. 163: 739-744.
- Ai-Qun, Y. y Lianqin L. 2016. The Potential Role of Probiotics in Cancer Prevention and Treatment. *Nutrition and Cancer*. 68 (4): 535-544.
- Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Walter, P. 2011. Introducción a la Biología Celular. 3a. Edición. Ed. Médica Panamericana. México. pp. 718.
- Amir, H.; Karas, M.; Giat, J.; Danilenko, M.; Levy, R.; Yermiahu, T. y Sharoni, Y. 1999. Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutrition and Cancer-an International Journal* 33: 105-112.
- Anderson, R. A.; Conway, H. F.; Pfeifer, V. F. y Griffin, E. L. 1969. Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today*. 14(4-7): 10-12.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Helrich Kenneth. Ed. Association of Official Analytical Chemists. Fifteenth. Washington, D.C. USA. I (II): 43-63.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Water Activity of Canned Vegetables. 1 edition. Ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD. method number 978.18.
- ASTM. 1997. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual book of ASTM standards. American society for testing and materials. Philadelphia. PA. Designation D 882-97.
- Atarés, L.; Bonilla, J. y Chiralt, A. 2010. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*. 100(4): 678-687.
- Atlas, R. M. 2010. Handbook of Microbiological Media. 4th edition. Ed. CRC Press. Washington D.C., USA. pp. 216-217.
- Baldwin, C.; Millette, M.; Oth, D.; Ruiz, M. T.; Luquet, F. y Lacroix. M. 2010. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Nutrients Cancer*. 62: 371-378.
- Barnes, H. 2000. A handbook of elementary rheology. 1th edition. Ed. University of wales, Institute of non-Newtonian fluid mechanics, Cardiff, Wales, UK. pp. 83-88.
- Behboudi-Jobbehdar, S.; Soukoulis, C.; Yonekura, L. y Fisk, I. 2013. Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology*. 31(11): 1274-1283.

- Bernardeau, M.; Vernoux, J. P. y Gueguen, M. 2002. Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *International Journal of Food Microbiology*. 77(1-2):19-27.
- Berrada, N.; Lemeland, J.; Laroche, G.; Thouvenot, P. y Piaia, M. 1991. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal of Dairy Science*. 74: 409-413.
- Bhuvaneswari, V. y Nagini, S. 2005. Lycopene: A review of its potential as an anticancer agent. *Current Medicinal Chemistry-Anticancer Agents*. 5: 627-635.
- Biavati, B.; Castagnoli, P.; Crociani, F. y Trovatielli, L. D. 1984. Species of the *Bifidobacterium* in the feces of infants. *Microbiological*. 7: 341-345.
- Boonthekul, T.; Kong, H. J. y Mooney, D. J. 2005. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. *Biomaterials*. 26(15): 2455-2465.
- Booth, I. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 49: 359-378.
- Brown, I. L. 1996. Complex carbohydrates and resistant starch. *Nutrition Review*. 54: 115-119.
- Burgain, J.; Gaiani C.; Linder M. y Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 10(4): 467-483.
- Cai, Y. Z. y Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried *amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*. 65(7): 1248-1252.
- Cal, K. y Sollohub, K. 2010. Spray-drying Characteristics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99: 587.
- Capela, P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*. 39(1): 203-211.
- Carbonell, R. G. y Whitaker, S. 1984. Heat and mass transfer in porous media. In *Fundamentals of transport phenomena in porous media*. 1th edition. Ed. Springer, Dordrecht, Holanda. pp. 121-198.
- Carmona, R.; Sánchez, M.; Méndez, G.; Garza, B. y Bello, L. 2009. Effect of the cross-linked reagent type on some morphological, physicochemical and functional characteristics of banana starch (*Musa paradisiacal*). *Carbohydrate Polymers*. 76: 117-122.
- Castro, A. 2010. Efecto de la microencapsulación de *Bifidobacterium breve*, en matrices de almidón fosfatado y proteína de suero mediante secado por aspersión, sobre su viabilidad en yogurt y en condiciones gastrointestinales simuladas. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Tesis. pp. 28-40.
- Converti, A.; Borghi, M. y Zilli, M. 1997. Evaluation of phenol diffusivity through *Pseudomonas putida* biofilms: application to the study of mass velocity distribution in a biofilter. *Bioprocess Engineer*. 16: 105-114.
- Correa, P. y Piauelo, M. B. 2012. Evolutionary history of the *Helicobacter pylori* genome: implications for gastric carcinogenesis. *Gut and Liver*. 6(1): 21-28.

- Crittenden, R.; Weerakkody, R.; Sanguansri, L. y Augustin, M. 2006. Symbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Environmental Microbiology*. 72(3): 2280-2282.
- Cuellar-Nuñez, M.L.; Luzardo-Ocampo, I.; Campos-Vega, R.; Gallegos-Corona, M.A., De Mejía, E.G. y Loarca-Piña, G. 2018. Physicochemical and nutraceutical properties of moringa (*Moringa oleifera*) leaves and their effects in an in vivo AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis model. *Food Research International*. 105: 159-168.
- Charles River Research models Company. <https://www.criver.com/about-us>. (Accesado: 20 junio del 2016).
- Davies, R. J.; Miller, R. y Coleman, N. 2005. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews Cancer*. 5(3): 199.
- De Robertis, M.; Massi, E.; Poeta, M.; Carotti, S.; Morini, S.; Cecchetelli, L.; Signori, E. y Fazio, V. 2011. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis*. 10:9.
- De Vos, P.; De Haan, B.; Pater, J. y Van Schilfgaarde, R. 1996. Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation*. 62: 893-899.
- De Vos, P.; Faas, M. M.; Spasojevic, M. y Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 20(4): 292-302.
- Derr, R. 1991. Pain perception in decapitated rat brain. *Life Sciences*. 49 (19): 1399-1402.
- Desmond, C; R. P. Ross; E. O'Callaghan; G. Fitzgerald y C. Stanton. 2002. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 1003-1011.
- Dias, M.; Vieiralves, N.; Gomes, M.; Salvadori, D.; Rodrigues, M. y Barbisan, L. 2010. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 772-780.
- Dobrowolski, P. 1993. Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from "current protocols in molecular biology". Acta Biotechnologica. Ed. Wiley and Sons. ISBN 0-471-57735-9. 13(1):88-102.
- Doulberis, M.; Angelopoulou, K.; Kaldrymidou, E.; Tsingotjidou, A.; Abas, Z.; Erdman, S.E. y Poutahidis, T. 2015. Cholera-toxin suppresses carcinogenesis in a mouse model of inflammation-driven sporadic colon cancer. *Carcinogenesis*. 36: 280-290.
- Eliasson, A. 2004. Development of a range of industrialised cereal-based foodstuffs, high in slowly digestible starch. In: Starch in Food Structure, Function and Applications. 1th edition. Ed. Woodhead Publishing Limited. New York, North America. pp 491-493.
- Elson, C.O.; Cong, Y.; McCracken, V.J.; Dimmitt, R.A. y Lorenz, R.G. 2005. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive,

- and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Reviews*. 206: 260-276.
- Eratte, D.; Gengenbach, T.R.; Dowling, K.; Barrow, C.J. y Adhikari, B. 2016. Survival, oxidative stability, and surface characteristics of spray dried co-microcapsules containing omega-3 fatty acids and probiotic bacteria. *Drying Technology*. 34: 1926-1935.
- Escamilla, E. M.; Dendooven, L. I.; Plaza, M.; Parra, R. y De la Torre, M. J. 2000. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi*. *Biotechnology*. 76: 147-155.
- Espina, F. y Packard, V. S. 1979. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray drying process. *Journal of Food Protection*. 42: 149-152.
- Espinoza, N. L. 2008. Caracterización de biopolímeros y su aplicación en la microencapsulación de probióticos de liberación específica. Instituto Politécnico Nacional. Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada unidad legaría. México. D.F. TESIS. pp. 26-30.
- Fangary. 1999. Simulation of yogurt flow and prediction of its end of process properties using rheological measurements. *Food Bioprocess*. 77(1): 33-39.
- Fannon, J. E.; Hauber, R. J. y BeMiller, J. N. 1992. Surface pores of starch granules. *Cereal Chemistry*. 69(3): 284-288.
- Fávaro-Trindade, C. S. y Grosso, C. R. F. 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*. 19: 485-494.
- Fernandes, L.; Turatti, I.; Lopes, N.; Ferreira, J.; Candido, R. y Oliveira, W. 2008. Volatile retention and antifungal properties of spray dried microparticles of Lippiasidoides essential oil. *Drying Technology*. 26: 1534-1542.
- Fishman, W. H.; Springer, B. y Brunetti, R. 1948. Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood. *Journal Biology Chemical*. 173: 449.
- Food y Agricultural Organization of the United Nations (FAO) y World Health Organization (WHO). 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report from FAO/WHO Expert consultation. Cordoba, Argentina.
- Furuta, T.; Soottitantawat, A.; Neoh, T. L. y Yoshii, H. 2011. Effect of microencapsulation on food flavors and their releases. Ed. CRC Press. Boca Raton, FL. pp.3-40
- Galhardo, R. y Ferraz, E. 2009. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Review International*. 25: 313-325.
- Gardiner, G. E.; O'Sullivan, E.; Kelly, J.; Auty, M. A.; Fitzgerald, G. F.; Collins, J. K.; Ross, R. P. y Stanton, C. 2000. Comparative survival rates of human derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Journal Food Microbiology*. 66: 2605-2612.
- Geier, M.S.; Butler, R.N.; Giffard, P.M. y Howarth, G S. 2007. *Lactobacillus fermentum* BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis

- induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *International Journal Food Microbiology*. 114: 267-274.
- Generally Recognized As Safe (GRAS). 2008. Notification for the use of *Bifidobacterium longum* BB536 in Selected Foods. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Food and Drug Administration. Spherix Incorporated Claire L. Kruger, CEO. Vol.1. Bethesda, Maryland, United States. pp. 1-133. Manuscript.
- Gkouskou, K.K.; Deligianni, C.; Tsatsanis, C.; Eliopoulos, A.G. 2014. The gut microbiota in mouse models of inflammatory bowel disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4: 28.
- Golowczyc, M. A., Silva, J., Abraham, A. G., De Antoni, G. L., y Teixeira, P. 2010. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology*. 50(1): 7-12.
- Gómez, C. 2012. Caracterización térmica y mecánica de polibutilentereftalato (pbt) reforzado con fibra de vidrio. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena. pp 71-95. TESIS.
- González, R.; Mendoza, J. y Urbina, N. 2014. Efecto de la microencapsulación sobre las propiedades reológicas y fisicoquímicas del yogurt blando. *Información Tecnológica*. 25(6): 45-56.
- Goula, A.; Adamopoulos, K. y Kazakis, N. 2004. Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. *Drying Technology*. 22 (5): 1129-1151.
- Gregurek, L. 1999. Effect of level starter culture on viability of probiotics bacteria in yogurt. *Mljekarstvo*. 49(1): 3-8.
- Grimm, V.; Radulovic, K. y Riedel, C. 2015. Colonization of C57BL/6 mice by a potential probiotic *Bifidobacterium bifidum* strain under germ-free and specific pathogen-free conditions and during experimental colitis. *Plos One Journal*. 10:10.
- Gupta, S. S.; Ghosh, S.; Maiti, P. y Ghosh, M. 2012. Microencapsulation of conjugated linolenic acid-rich pomegranate seed oil by an emulsion method. *Food Science and Technology International*. 18(6): 549-558.
- Guyton, A. y Hall, J. 2001. Tratado de fisiología médica. 10th Edition. Ed. McGraw-Hill Interamericana. España. pp. 883.
- Haggag, Y. A. y Faheem, A. M. 2015. Evaluation of nano spray drying as a method for drying and formulation of therapeutic peptides and proteins. *Frontiers in Pharmacology*. 6: 140.
- Han, L.; Zhang, G.F.; Cheng, Y.H. y Zhao, Q.C. 2016. Correlations of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor I receptor with the clinicopathological features and prognosis of patients with colon cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 46: 1-8.
- Hardy, H.; Harris, J.; Lyon, E.; Beal, J. y Foey, A. D. 2013. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defenses: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 5: 1869-1912.
- Harris, D. 2006. Análisis químico cuantitativo. 2a edición. Ed. Reverte. Barcelona, España. ISBN: 8429172246. Chapters: 4, 5 y 19.
- Henry, J. B. y Sanford, T. 1988. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 8a Edición. Ed. Salvat. Syracuse, New York. Tomo I y II.

- Herrera, L. y Andonegui, M. 2010. Carcinogénesis: manual de oncología. Procedimientos médico quirúrgicos. 4a. Edición. Ed. cGraw-Hill. DF. México pp. 21.
- Heuvelin, E.; Lebreton, C.; Grangette, C.; Pot, B. y Cerf-Bensussan, N. 2009. Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by *Bifidobacterium breve* soluble factors. *PLoS One*. 4: e5184.
- Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Merenstein, D. J. y Pot, B. 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Gastroenterology Hepatology*. 11: 506-514.
- Hosono, K.; Endo, H. y Takahashi, H. 2010. Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. *Molecular Carcinogenesis*. 49: 662-671.
- Hudault, S.; Liévin, V.; Bernet-Camard, M. F. y Servin, A. L. 1997. Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(2): 513-518.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2010. Estadísticas Históricas de México. Recuperado el 16 de agosto de 2017, de: <http://www.beta.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825460792>. (Accesado: 02 octubre 2018).
- Jeon, S.G.; Kayama, H.; Ueda, Y.; Takahashi, T. y Asahara, T. 2012. Probiotic *Bifidobacterium breve* Induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathogens*. 8: e1002714Jeon.
- Jiménez, M. L. 2011. Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral. Universidad de Granada. Departamento de Microbiología. Granada, España. pp. 14-16.
- Jin, M.; Long, Z.W.; Yang, J. y Lin, X. 2018. Correlations of IGF-1R and COX-2 expressions with Ras and BRAF genetic mutations, clinicopathological features and prognosis of colorectal cancer patients. *Pathology & Oncology Research*. 24: 45-57.
- Josse, C.; Bouznad, N.; Geurts, P.; Irrthum, A.; Huynh-Thu, V.A.; Servais, L. y Oury, C. 2013. Identification of a microRNA landscape targeting the PI3K/Akt signaling pathway in inflammation-induced colorectal carcinogenesis. *American journal of physiologygastrointestinal and liver physiology*. 306: G229–G243.
- Kalkan, F.; Vanga, S.K.; Murugesan, R.; Orsat, V. y Raghavan, V. 2017. Microencapsulation of hazelnut oil through spray drying. *Drying Technology*. 35(5): 527-533.
- Karoui, R. 2003. Fluorescence spectroscopy: A tool for the investigation of cheese melting correlation with rheological characteristics. *Dairy Science and Technology*. 83(1): 251-264.
- Kasdagly, M.; Radhakrishnan, S.; Reddivari, L.; Veeramachaneni, D.R. y Vanamala, J. 2014. Colon carcinogenesis: Influence of Western diet-induced

- obesity and targeting stem cells using dietary bioactive compounds. *Nutrition Journal*. 30: 1242-1256.
- Katime, I.; Katime, O. y Katime, D. 2004. Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. 1edición. Ed. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). España. pp. 336.
- Kim, E.; Coelho, D. y Blachier, F. 2013. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutrition Research*. 12: 983-994.
- Kim, J.; Araki, S.; Kim, D.; Park, C.; Takasuka, N. y Baba, H. 1998. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis*. 19(1): 81-5.
- Kohno, H.; Suzuki, R.; Sugie, S. y Tanaka, T. 2005. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC Cancer Journal*. 5: 46.
- Krasaekoopt, W. y S. Watcharapoka. 2014. Effect of addition of inulin and galactosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yoghurt and fruit juice. *Food Science Technology*. 57: 761-766.
- Krasaekoopt, W.; Bhandari, B. y Deeth, H. C. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT and conventionally treated milk during storage. *LWT-Food Science and Technology*. 39 (2): 177-183.
- Krishnan, S.; Bhosale, R. y Singhal, R. S. 2005. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*. 61: 95-102.
- Lakkis, J. M. 2007. Encapsulation and controlled release technologies in food systems. Ed. Blackwell Pub. Ames, Iowa, USA. Chapter 4. pp. 83-112.
- Larrea, M.; Chang, Y. y Martínez, B. 2005. Some functional properties of extruded orange pulp and its effect on the quality of cookies. *Food Science and Technology*. 38: 213-220.
- Lee, H. W.; Cheng, J.; Kovbasnjuk, O.; Donowitz, M. y Guggino, W. B. 2013. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) enhances the protein expression of CFTR. *PLoS one*. 8(3): e59992.
- Lee, N. K.; Park, J. S.; Park, E. y Paik, H. D. 2007. Adherence and anticarcinogenic effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD in the large intestine. *Microbiology*. 44: 274-278.
- Lenntech, W. T. 2009. pH y alcalinidad. México. <https://www.lenntech.es/ph-y-alcalinidad.htm> (Accesado: 15 de junio 2016).
- Lian, W. C.; Hsiao, H.C. y Chou, C.C. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal Food Microbiology*. 74: 79-86.
- Lievin, V.; Peiffer, I.; Hudault, S.; Rochat, F.; Brassart, D.; Neeser, J. R. y Servin, A. L. 2000. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*. 47(5): 646-652.

- Lim, S. y Seib, P. A. 1993. Preparation and pasting properties of wheat and corn starch phosphates. *Cereal Chemistry*. 70: 137-137.
- Liu, Y. C. 2012. Effect of incorporating encapsulated and non-encapsulated probiotic cultures on culture survival and cheese quality of Gouda cheese. International conference on Food Factors, Food for Wellbeing from Function to Processing. Faculty of Graduate Studies of the University of Manitoba. Taipei, Taiwan. pp. 20-23.
- Lozano, S. 2014. Efecto quimioprotector de tortillas de maíz (*Zea mays L.*) elaboradas por procesos de nixtamalización tradicional y ecológico, con y sin aditivos, en un modelo de cáncer de colon. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Qro. México. pp. 27-60.
- Manning, T. y Gibson, G. 2004. Microbial-gut interaction in health and disease. Prebiotics Best Practice Research Clinical. *Gastroenterology*. 18: 287-298.
- Mansson, W. y Hosney, R. 1986. Factors affecting the viscosity of extrusion-cooked wheat starch. *Cereal Chemistry*. 63: 436-441.
- Marteau, P.; Minekus, M.; Havenaar, R. y Huis, J. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*. 80: 1031-1037.
- Masakazu, T.; Hideo, S.; Shinichi, K.; Yutaka, Y.; Kazuo, I.; Takashi, I.; Tadaaki, T. y Takeshi, T. 1996. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer*. 77(6): 1101-1106.
- Mason, W.R. y Hosney, R.C. 1986. Factors affecting the viscosity of extrusion-cooked wheat starch. *Cereal chemistry*. 63(5): 436-441.
- Matsumoto, M.; Ohishi, H. y Benno, Y. 2004. H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*. 93(1): 109-113.
- Méndez, M. 2001. Introducción a la reología. 1a edición. Ed. Iberoamericana. Instituto Politécnico Nacional, México D.F. pp. 79-90.
- Moore, K. y Dalley, A. 2005. Anatomía con orientación clínica. 4a Edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. pp. 253.
- Mosilhey, S. H. 2003. Influence of different materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. University of Bonn. Germany. Tesis. pp. 50-96.
- Munizaga, G. y Cánovas, G. 2005. Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*. 67: 147–156.
- Nakanishi, S.; Kataoka, K.; Kuwahara, T. y Ohnishi, Y. 2003. Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of Azoxymethane induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiology Immunology*. 47: 951-958.
- Nayak CA, Rastogi NK. 2010. Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying. *Drying Technology*. 28(12): 1396-1404.
- NMX-F-103. 1965. Norma Oficial de Método de Prueba para la Determinación de grados Brix. pp. 15-42.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *DOF*. 1999, 22.

[www.researchgate.net/profile/Aline\\_S\\_de\\_Aluja3/publication/11280294\\_Laboratory\\_animals\\_and\\_official\\_Mexican\\_norm\\_NOM-062-ZOO-1999](http://www.researchgate.net/profile/Aline_S_de_Aluja3/publication/11280294_Laboratory_animals_and_official_Mexican_norm_NOM-062-ZOO-1999) (accesado: 12 Febrero 2018).

- NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx). (Accesado: 25 mayo 2017).
- Ohashi, Y.; Harada, K.; Tokinaga, M.; Ishihara, N.; Okubo, T.; Ogasawara, Y.; Rajuneia, L. y Fujisawa, T. 2012. Faecal fermentation of partially hydrolyzed guar gum. *Journal of Functionals Foods*. 4: 398-4002.
- Ono, M.; Takeshima, M. y Nakano, S. Mechanism of the anticancer effect of lycopene (tetraterpenoids). 2015. In *The Enzymes*, 1st edition. Bathaie, S., Tamanoi, F. Ed. Academic Press. Waltham, MA, USA, 37: 139-166.
- O'Riordan, K.; Andrews, D.; Buckle, K. y Conway, P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*. 91(6): 1059-1066.
- Orlando, A. y Russo, F. 2013. Intestinal microbiota, probiotics and human gastrointestinal cancers. *Cancer*. 44: 121-131.
- Páez, R. B. 2013. Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para aplicación en alimentos. Estudios microbiológicos y tecnológicos. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. *International Journal of Dairy Technology*. 66 (2): 155-161.
- Parra, R. 2000. Optimización de parámetros ingenieriles de un reactor de lecho fluidizado para la producción de giberelinas por medio de *Giberella fujikuroi* inmovilizado en ácido poligalacturónico. Universidad Autónoma de Querétaro. Qro. México. TESIS. pp. 37-40.
- Paschall, E. F. 1964. Phosphation with inorganic phosphate salts. *Methods in carbohydrate chemistry*. 4: 294-298.
- Peighambardoust, S. H.; Tafti, A. G. y Hesari, J. 2011. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science and Technology*. 22: 215-224.
- Pérez, H.; Bueno, G.; Brizuela, M.; Tortoló, K. y Gastón, C. 2013. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 47 (1): 14-25
- Persê, M. y Cerar, A. 2011. Morphological and molecular alterations in 1, 2-dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *BioMed Research International*. 2011: 473964.
- Philippe, D.; Favre, L.; Foata, F.; Adolfsson, O.; Perruisseau-Carrier, G.; Vidal, K. y Blum, S. 2011. *Bifidobacterium lactis* attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 17(4): 459.
- Philippe, D.; Heupel, E.; Blum-Sperisen, S.; Riedel, CU. 2011. Treatment with *Bifidobacterium bifidum* 17 partially protects mice from Th1-driven inflammation in a chemically induced model of colitis. *International Journal of Food Microbiology*. 149: 45-49.

- Picot, A. y Lacroix, C. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions in yogurt. *Dairy Journal*. 14: 505-515.
- Piñols, F. C. 1998. Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-dimetilhidrazina. Universidad de Lleida. España. Tesis. pp. 155-171.
- Pu, H. y Yang, T. 1988. Diffusion of sucrose and Yohimbine in calcium alginate gel beads with or without entrapped plant cells. *Biotechnology and Bioengineer.* 32(7): 891-896.
- Quartieri, A.; Simone, M.; Gozzoli, C.; Popovic, M.; D'Auria, G.; Amaretti, A. y Rossi, M. 2016. Comparison of culture-dependent and independent approaches to characterize fecal bifidobacteria and lactobacilli. *Anaerobe*. 38: 130-137.
- Rascon, M. P.; Beristain, C. I.; Garcia, H. S. y Salgado, M. A. 2011. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum. Arabic and soy protein isolate as wall materials. *Food Science and Technology*. 44: 549-557.
- Reddy, K. B. P. K.; Madhu, A. N. y Prapulla, S. G. 2009. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Technology*. 62(2): 240-248.
- Reineccius, G. A. 2004. The spray drying of food flavors. *Drying Technology*. 22(6): 1289-1324.
- Renehan, A.G.; Jones, J.; Potten, C.S.; Shalet, S.M. y O'Dwyer, S.T. 2000. Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 83: 1344.
- Reuter, G. 1963. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *German. Zentralblatt Bakteriologie*. 191: 486-507.
- Rey L. 2016. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. 3th edition. Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, United states. pp. 115-165.
- Rodd, A. B.; Dunstan, D. E. y Boger, D. V. 2000. Characterization of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydrate Polymers*. 42: 159-174.
- Rodrigues, D.; Rocha, T.; Sousa, S.; Gomes, AM.; Pintado, M.; Malcata, F.; Lobo, J.; Silva, J.; Costa, P.; Amaral, M. y Freitas, A. 2011. On the viability of five probiotic strains when immobilized on various polymers. *Journal Dairy Technology*. 64: 137-144.
- Rodríguez, J. M. 2015. Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutrients*. 31(1): 33-47.
- Rokka, S. y Rantamaki, P. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*. 231(1): 1-12.
- Royall, P.G., Huang, C.H., Tang, S.W.J., Duncan, J., van de Velde, G., Brown, M.B. 2005. The development of DMA for the detection of amorphous content in pharmaceutical powdered materials. *International Journal of Pharmaceutics*. 301: 181-191.

- Samelson, S. L.; Nelson, R.L. y Nyhus, L.M. 1985. Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogenesis. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 78: 230-233.
- Sánchez, M. 2012. Efecto de la incorporación de organismos prebióticos encapsulados en queso tipo manchego. Universidad Autónoma de Querétaro. Qro. México. TESIS. pp. 37-65.
- Serban, D. E. 2014. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Letters*. 345: 258-270.
- Shah, N.P.; Lankaputhra, W.E.; Britz, M.L. y Kyle, W.S. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*. 5: 515-521.
- Sharoni, Y.; Danilenko, M. y Levy, J. 2000. Molecular mechanisms for the anticancer activity of the carotenoid lycopene. *Drug Development Research*. 50: 448-456.
- Shoji A. 2013. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. *Food and Bioprocess*. 91(1): 83-88.
- Siler, U.; Barella, L.; Spitzer, V.; Schnorr, J.; Lein, M. y Goralczyk, R. 2004. Lycopene and vitamin E interfere with autocrine/paracrine loops in the dunning prostate cancer model. *FASEB Journal*. 18(9): 1019-1021.
- Simons, C.; Schouten, L.; Weijenberg, M.; Goldbohm, R. y Van-DenBrandt, P. 2010. Bowel movement and constipation frequencies and the risk of colorectal cancer among men in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *American Journal of Epidemiology*. 12: 1404-1414.
- Simpson, P.J.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F. y Ross, R.P. 2005. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*. 99(3): 493-501.
- Singh, N.; Arioli, S.; Wang, A.; Villa, C.; Jahani, R.; Song, Y.; Mora, D.; Guglielmetti, S. y Comelli, E. 2013. Impact of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 on mouse intestinal microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*. 85(2): 369-375.
- Sipos, F.; Székely, H.; Kis, I.D.; Tulassay, Z. y Múzes, G. 2017. Relation of the IGF/IGF1R system to autophagy in colitis and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 23: 8109.
- Smith, R. J. 1967. Characterization and analysis of starches. In Whistler, R.L. and Paschall, E. Starch: Chemistry and Technology. Industrial Aspects. Ed. Academia Press. New York. Vol II. pp. 593.
- Smith, R. J. y Caruso, J. L. 1964. Determination of phosphorus. Methods in carbohydrate. chemistry. R.L. Whistle. Ed. Academic Press. New York. pp. 42.
- Šunderić, M.; Đukanović, B.; Malenković, V. y Nedić, O. 2014. Molecular forms of the insulin-like growth factor-binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Experimental and Molecular Pathology*. 96: 48-53.
- Takasuka, N.; Naito, A.; Fukamachi, K.; Murakoshi, M.; Nishino, H. y Tsuda, H. 2002. Modifying effects of carotenoids in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*. 78: 33-37.

- Tanaka, T. 2009. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*. 8: 5.
- Tanaka, T. 2012. Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. *International Journal of Inflammation*. 2012: 658786.
- Tanaka, T.; Kohno, H.; Suzuki, R.; Yamada, Y.; Sugie, S. y Mori, H. 2003. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*. 94: 965-973.
- Thirabunyanon, M. y Hongwittayakorn, P. 2013. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology*. 168: 511-525.
- Tonon, R.; Grosso, C. y Hubinger, M. 2011. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*. 44(1): 282-289.
- Torroella, M. y Villa, S. 1998. Bases genéticas del cáncer. Fondo de cultura económica. 1a Edición. Ed. Fondo de Cultura Económica. D.F., México. pp. 11-30.
- Toshimasa, Y.; Kodama, T. y Yamada, M. 1961. Fundamental studies on the aerobic fermentation part VIII oxygen transfer within a mold pellet. *Agricultural and Biological Chemistry*. 25 (7): 580-584.
- Trejo-Solís, C.; Pedraza-Chaverrí, J.; Torres-Ramos, M.; Jiménez-Farfán, D.; Cruz Salgado, A.; Serrano-García, N. y Sotelo, J. 2013. Multiple molecular and cellular mechanisms of action of lycopene in cancer inhibition. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 1-17.
- Veiga, P.; Gallini, C.A.; Beal, C.; Michaud, M. y Delaney, M.L. 2010. *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *National Academy of Sciences. USA*. 107: 18132-18137.
- Vigneri, P.G.; Tirrò, E.; Pennisi, M.S.; Massimino, M.; Stella, S.; Romano, C. y Manzella, L. 2015. The insulin/IGF system in colorectal cancer development and resistance to therapy. *Frontiers in Oncology*. 5: 230.
- Villacrez, J. 2013. Desarrollo de microencapsulados por spray drying a partir de frutos demora de castilla (*Rubusglaucus Benth*). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia. TESIS. pp. 30-70.
- Wal'sch, S.; Wal'sch, Y.; Kirilov, E.; Linde, N.; Mnitentag, H. y Agbaria, R. 2007. Tomato lycopene extract supplementation decreases insulin-like growth factor-I levels in colon cancer patients. *European Journal of Cancer Prevention*. 16 (4): 298-303.
- Walfisch, S.; Walfisch, Y.; Kirilov, E.; Linde, N.; Mnitentag, H.; Agbaria, R. y Levy, J. 2007. Tomato lycopene extract supplementation decreases insulin-like growth factor-I levels in colon cancer patients. *European Journal of Cancer Prevention*. 16: 298-303.
- Waliszewski, K. y Blasco, G. 2010. Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Pública*. 52: 254-265.

- Wang, S.Q.; Cui, S.X.; Qu, X.J. 2019. Metformin inhibited colitis and colitis-associated cancer (CAC) through protecting mitochondrial structures of colorectal epithelial cells in mice. *Cancer Biology & Therapy*. 20: 338-348.
- Wang, X. D. 2004. Carotenoid oxidative/degradative products and their biological activities. In: Carotenoids in Health and Disease. Krinsky, N. I., Mayne, S. T. y Sies, H. Dekker, New York, NY. pp. 313-335.
- Weinbreck, F. y Bodnar, I. 2010. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*. 136 (3): 364-367.
- Wertz, K.; Siler, U. y Goralczyk, R. 2004. Lycopene: Modes of action to promote prostate health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 430: 127-134.
- Whitaker, S. 1986. Flow in porous media II: The governing equations for immiscible, two-phase flow. *Transport in Porous Media*. 1(2): 105-125.
- Whitaker, S. 1991. Role of the species momentum equation in the analysis of the Stefan diffusion tube. *Industrial y Engineering Chemistry Research*. 30(5): 978-983.
- Wirtz, S.; Neufert, C.; Weigmann, B. y Neurath, MF. 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*. 2: 541-546.
- Wong, C.B.; Odamaki, T.; Xiao y J.Z. 2019. Beneficial effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 on human health: Modulation of gut microbiome as the principal action. *Journal of Functional Foods*. 54: 506-519.
- Wrolstad, R. 2010. Food Carbohydrate Chemistry. Ed. John Wiley y Sons. New Jersey. United State. pp 23-28.
- Wu, B. B.; Yang, Y.; Xu, X. y Wang, W. P. 2016. Effects of Bifidobacterium supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World Journal of Pediatrics*. 12(2): 177-182.
- Wu, Y.; Yakar, S.; Zhao, L.; Hennighausen, L. y LeRoith, D. 2002. Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Research*. 62: 1030-1035.
- Yancu, D.; Blouin, M.J.; Birman, E.; Florianova, L.; Aleynikova, O.; Zakikhani, M. y Pollak, M. 2017. A phenotype of IGFBP-3 knockout mice revealed by dextran sulfate-induced colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 32: 146-153.
- Yang, D.; Chi, M.; Sanguansri, L. y Weerakkody, R. 2010. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Food science*. 75(9): 588-595.
- Yin, Y.; Zheng, Z. y Jiang, Z. 2019. Effects of lycopene on metabolism of glycolipid in type 2 diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 109: 2070-2077.
- Yücel, Ç.Y.; Erden, G.; Yılmaz, F.M.; Sezer, S.; Çalıcı, E. 2018. IGF-1 and IGFBP-3 levels and their correlations with carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients. *Alexandria Journal of Medicine*. 54(1): 11-15.
- Zhang, C.; Yu, Z.; Zhao, J.; Zhang, H.; Zhai, Q. y Chen, W. 2019. Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum*. *Journal of Functional Foods*. 53: 157-165.

## ANEXO A

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### I. Solución amortiguadora de fosfatos

Compuesto químico	Cantidad (mL)
Fosfato monobásico	33 mL
Fosfato dibásico	67 mL

#### II. Composición por litro de saliva artificial

Compuesto	Cantidad
Cloruro de sodio	6.20 g
Cloruro de potasio	2.20 g
Cloruro de calcio	0.22 g
Bicarbonato de sodio	1.20 g

#### III. Composición por litro de jugo gástrico simulado

Compuesto	Cantidad
Cloruro de sodio	2 g
Pepsina	3.2 g
Agua destilada	c.s.p.1000 mL
pH final de 2*	

\*Ajustado con HCl 1N y NaOH 1M

#### IV. Composición por litro de fluido intestinal simulado

Compuesto	Cantidad
Fosfato de potasio monobásico	6.8 g
Pancreatina	10 g
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL
pH final de 7.5*	

\*Ajustado con HCl 1N y NaOH 1M

#### V. Composición por 100 mL de 1,2-dimetilhidrazina al 0.07 M

Compuesto	Cantidad
EDTA	37 mg
Solución fisiológica estéril	c.s.p. 100 mL
pH final de 6.5*	

\*Ajustado con HCl 1N y NaOH 1M  
\*Preparar 24 h antes de la inducción

**ANEXO B**  
**Diseño experimental**

**Tabla I.** Diseño experimental para la microencapsulación por las técnicas de goteo, secado por aspersión I, secado por aspersión II, utilizando como agentes encapsulantes goma arábica, alginato de sodio, caseína, almidón fosfatado y maltodextrina.

<b>Técnica de encapsulación</b>	<b>Goteo</b>			<b>Goteo</b>			<b>Goteo</b>								
<b>Relación en mezcla</b>	<b>40</b>	<b>:</b>	<b>40</b>	<b>:</b>	<b>20</b>	<b>60</b>	<b>:</b>	<b>30</b>	<b>:</b>	<b>10</b>	<b>40</b>	<b>:</b>	<b>20</b>	<b>:</b>	<b>40</b>
<b>Número de experimento/concentración del material encapsulante (w:v)</b>	<b>Goma arábica (%)</b>	<b>Alginato de sodio (%)</b>	<b>Caseína (%)</b>	<b>Goma arábica (%)</b>	<b>Alginato de sodio (%)</b>	<b>Caseína (%)</b>	<b>Goma arábica (%)</b>	<b>Alginato de sodio (%)</b>	<b>Caseína (%)</b>						
1	0.4	0.4	0.1	0.6	0.3	0.05	0.4	0.2	0.2						
2	0.4	1	0.2	0.6	0.75	0.1	0.4	0.5	0.4						
3	0.4	1.6	0.3	0.6	1.2	0.15	0.4	0.8	0.6						
4	0.8	0.4	0.2	1.2	0.3	0.1	0.8	0.2	0.4						
5	0.8	1	0.3	1.2	0.75	0.15	0.8	0.5	0.6						
6	0.8	1.6	0.1	1.2	1.2	0.05	0.8	0.8	0.2						
7	1.2	0.4	0.3	1.8	0.3	0.15	1.2	0.2	0.6						
8	1.2	1	0.1	1.8	0.75	0.05	1.2	0.5	0.2						
9	1.2	1.6	0.2	1.8	1.2	0.1	1.2	0.8	0.4						
<b>Técnica de encapsulación</b>	<b>Secado por aspersión I</b>			<b>Secado por aspersión I</b>			<b>Secado por aspersión I</b>								
<b>Relación en mezcla</b>	<b>10</b>	<b>:</b>	<b>10</b>	<b>:</b>	<b>80</b>	<b>40</b>	<b>:</b>	<b>40</b>	<b>:</b>	<b>20</b>	<b>60</b>	<b>:</b>	<b>20</b>	<b>:</b>	<b>20</b>
<b>Número de experimento/concentración del material encapsulante (w:v)</b>	<b>Alginato de sodio (%)</b>	<b>Goma arábica (%)</b>	<b>Almidón fosfatado (%)</b>	<b>Alginato de sodio (%)</b>	<b>Goma arábica (%)</b>	<b>Almidón fosfatado (%)</b>	<b>Alginato de sodio (%)</b>	<b>Goma arábica (%)</b>	<b>Almidón fosfatado (%)</b>						
1	0.1	0.1	2	0.4	0.4	0.5	0.6	0.2	0.5						
2	0.1	0.2	6	0.4	0.8	1.5	0.6	0.4	1.5						
3	0.1	0.3	10	0.4	1.2	2.5	0.6	0.6	2.5						
4	0.25	0.1	6	1	0.4	1.5	1.5	0.2	1.5						

5	0.25	0.2	10	1	0.8	2.5	1.5	0.4	2.5
6	0.25	0.3	2	1	1.2	0.5	1.5	0.6	0.5
7	0.4	0.1	10	1.6	0.4	2.5	2.4	0.2	2.5
8	0.4	0.2	2	1.6	0.8	0.5	2.4	0.4	0.5
9	0.4	0.3	6	1.6	1.2	1.5	2.4	0.6	1.5

Técnica de encapsulación	Secado por aspersión II		Secado por aspersión II	
Relación en mezcla	80	20	50	50
Número de experimento / concentración del material encapsulante (w:v)	Goma arábica (%)	Maltodextrina (%)	Goma arábica (%)	Maltodextrina (%)
1	0.8	1.2	0.5	3
2	0.8	1.6	0.5	4
3	0.8	2	0.5	5
4	1.6	1.2	1	3
5	1.6	1.6	1	4
6	1.6	2	1	5
7	2.4	1.2	1.5	3
8	2.4	1.6	1.5	4
9	2.4	2	1.5	5

Cada columna representa el porcentaje final en la mezcla encapsulante preparada de concentraciones iniciales de goma arábica (1 %, 2 % y 3 %), alginato de sodio (1 %, 2.5 % y 4 %), caseína (0.5 %, 1 % y 1.5 %), almidón fosfatado (2.5 %, 7.5 % y 12.5 %) y maltodextrina (6 %, 8 % y 10 %) para la proporción en mezcla indicada.

**II. Diseño experimental. Difusividad efectiva.**

<b>Sistema de microencapsulamiento</b>	<b>Mezcla encapsulante</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>
Goteo	1.2 % goma arábica/0.8 % alginato de sodio/ 0.2 % caseína	20	2
		20	5
		20	7
		30	2
		30	5
		30	7
		40	2
		40	5
		40	7
		Secado por aspersión I	1.6 % alginato de sodio/0.8 % goma arábica/2.5 % almidón fosfatado.
20	5		
20	7		
30	2		
30	5		
30	7		
40	2		
40	5		
40	7		

## ANEXO C

### I. Determinación del contenido de fosfatos solubles mediante espectrofotometría ultravioleta-visible. Método de adiciones estándar

#### Preparación de reactivos

1. Reactivo vanado-molibdico: En 400 mL de agua destilada, disolver 20g de heptamolibdato amónico,  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Preparar una segunda disolución de 0.5 g de metavanadato amónico,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , en 300 mL de agua y añadir 100 mL de ácido nítrico concentrado. Aforar a 1 L.
2. Disolución patrón de ortofosfato ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup> (1 g/L): Preparar 100 mL de disolución patrón en matraz aforado disolviendo la cantidad adecuada de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en agua destilada.
3. Disolución de trabajo de ortofosfato (0.1 g/L).

#### Calibrado externo

1. En matraces aforados de 25 mL, pipetear alícuotas de la disolución de trabajo de forma que la concentración final de fosfato sea de 3, 5, 10, 15 y 20 mg/L.
2. Agregar 10 mL de la disolución vanado-molibdato amónico a cada solución anterior.
3. Reposar por 10 minutos.
4. Preparar un *blanco* (disolución con 10 mL de vanado-molibdato, sin fosfato).

#### Preparación de las muestras problema

1. Pipetear 5 mL de la disolución problema y pasarlos a un matraz de 25 mL.
2. Añadir 10 mL de la disolución vanado-molibdato y aforar con agua destilada.
3. Dejar reposar 10 minutos

#### Medidas de absorbancia

1. Ajustar el espectrofotómetro para medidas de absorbancia a 420 nm
2. Introducir el blanco en el aparato.

3. Medir finalmente la absorbancia a 420 nm.
4. Construir la recta de calibrado y determinar la concentración de cada muestra problema.
5. La concentración de fosfatos en la muestra problema original será el resultado de promediar los resultados de las tres medidas y aplicar el factor de dilución.

## II. Tinción de Gram

### Extensión

1. En un portaobjetos limpio (con alcohol, papel de filtro y flameado) colocar una gota de agua destilada a la que, con el asa de siembra, previamente esterilizada a la llama, se lleva una pequeña cantidad de suspensión de bacterias o, en su caso, de una colonia.
2. Con el asa se extiende la gota y las bacterias sobre el portaobjetos y se fija la extensión por el calor, calentando suavemente a la llama del mechero hasta que se seque.

### Coloración

1. 3 min en cristal violeta de Hucker (colorante inicial).
2. Se lava con agua destilada.
3. 1 min en lugol (mordiente).
4. Se decolora con alcohol de 95° (decolorante).
5. Se lava con agua destilada.
6. 1 min en safranina (colorante de contraste).
7. Se lava con agua corriente.
8. Se seca suavemente y sin frotar con papel. Una vez que la preparación está totalmente seca, poner una gota muy pequeña de aceite de cedro y observar al microscopio con el objetivo de inmersión. En esta tinción diferencial las bacterias Gram (-) aparecen rojas y las Gram (+) violeta. Observar (100×).

### III. Determinación del número de células y su viabilidad con un hemocitómetro y azul de tripano

1. Determinar el número de células viables añadiendo 0.5 mL de azul de tripano al 0.4 %, 0.3 mL de solución salina al 0.8 % y 0.1 mL de suspensión celular en un tubo para centrifuga.
2. Mezclar y centrifugar a 4,000 rpm por 5 min, antes de proceder con la lectura.
3. Colocar el objetivo 100x en el trayecto óptico del microscopio en campo iluminado.
4. Limpiar la superficie del hemacitómetro con una solución de alcohol al 70 %.
5. Colocar 10  $\mu$ L de la mezcla en cada cámara del hemocitómetro.
6. Colocar el hemocitómetro en el microscopio y localizar la retícula grabada.
7. Dejar que las células se asienten durante 1-2 minutos y proceda al conteo.
8. Contar por separado a las CMN azules (muertas) y a las CMN birrefringentes o blancas (vivas) que sean observadas en cada uno de los cuadros por considerar.
9. La cuenta celular para cada cuadrante externo deberá oscilar entre 20-50 células, teniendo un total de células para los cuatro cuadrantes 4x4 de 80:200 células. Las células localizadas en los márgenes externos de cada esquina (marcados en rojo) No deberán incluirse en las cuentas.
10. Cuando existe una densidad celular mayor a 50 células por cuadrante 4x4, se procederá al conteo del cuadrante central.
11. Pueden contarse las células de todos los cuadros secundarios, o si se prefiere, los 4 cuadros secundarios de las esquinas y el central. Determinar las células por mL mediante los siguientes cálculos:

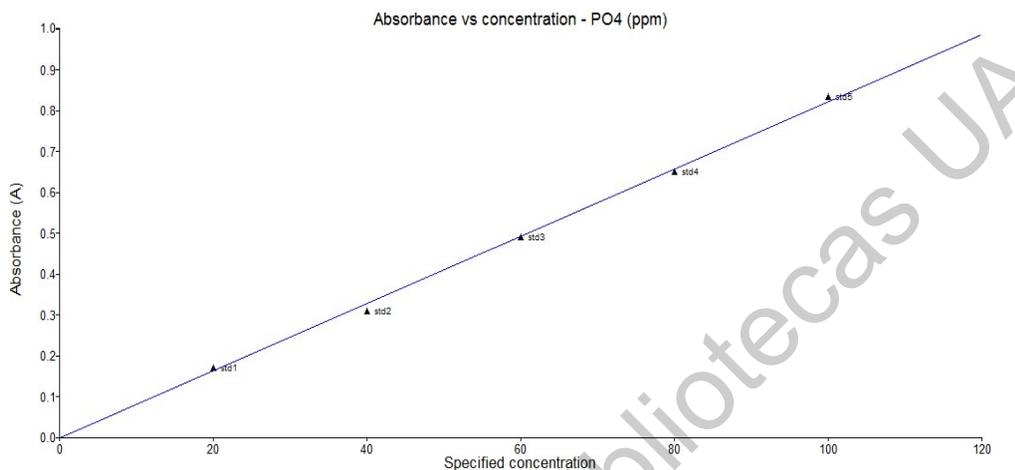
$$\text{Células} \cdot \text{mL}^{-1} = \text{promedio por cuadrante} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

$$\text{Células totales} = \text{Células} \cdot \text{mL}^{-1} \times \text{volumen total de la suspensión celular tomada}$$

$$\text{Porcentaje de células viables} = \frac{\text{número de células blancas}}{\text{número de células totales}} \times 100$$

## ANEXO D

### I. Curva de calibración para la cuantificación de fosfatos en almidón fosfatado.

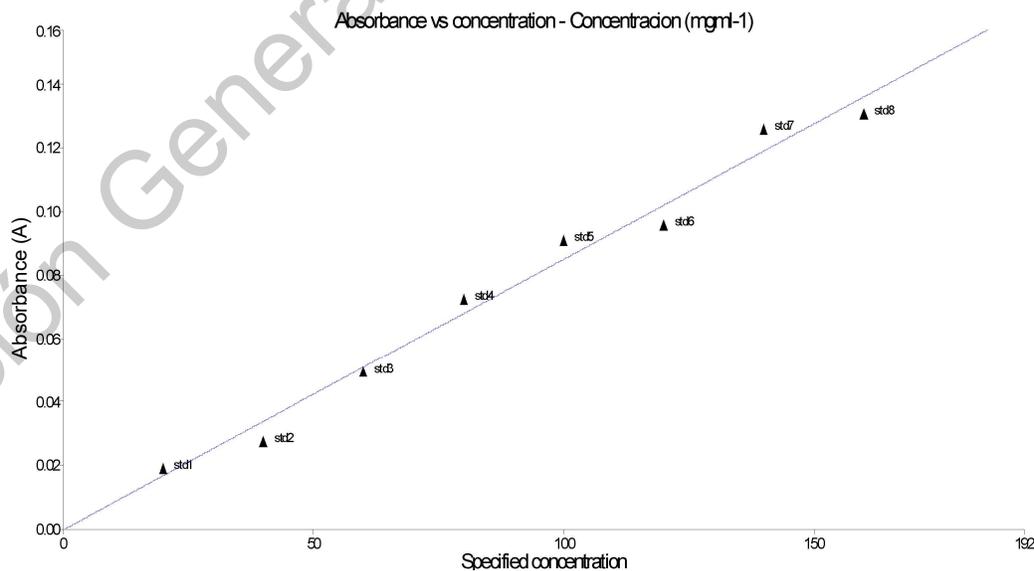


Longitud de onda: 420nm

Coefficiente de correlación específica: 0.980000

Coefficiente de correlación calculado: 0.998886

### II. Curva de calibración para la determinación de la velocidad de difusividad.

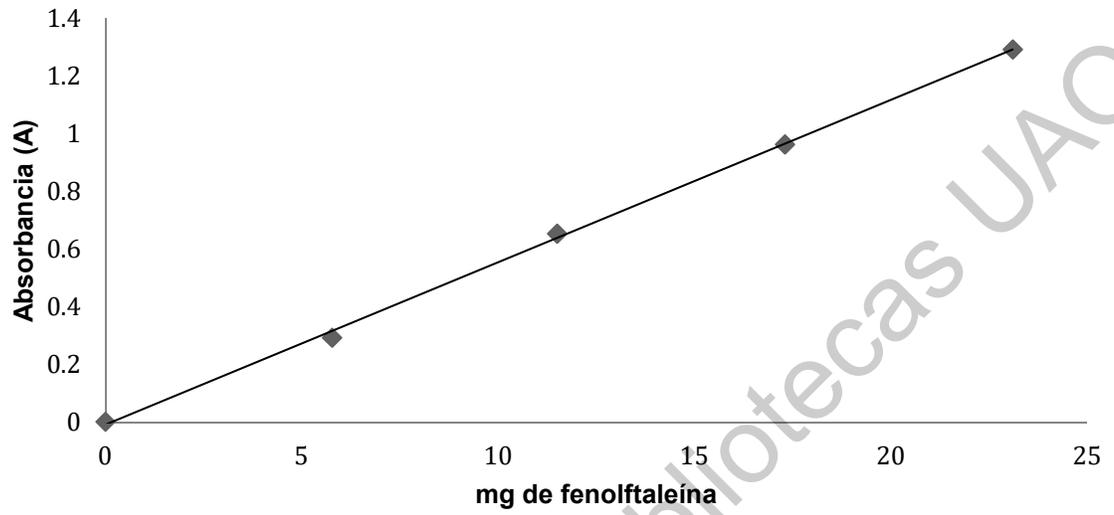


Longitud de onda: 617 nm

Coefficiente de correlación específica: 0.980000

Coefficiente de correlación calculado: 0.991088

### III. Curva de calibración para la determinación de la actividad $\beta$ -GA



Longitud de onda: 540 nm

Coefficiente de correlación específica: 0.990000

Coefficiente de correlación calculado: 0.991088

ANEXO E

I. Peso corporal, ganancia de peso corporal, pH, actividad  $\beta$ -GA y población de *Bifidobacterium longum* durante 16 semanas.

Grupos	Semana	Peso corporal (g)		Ganancia de peso corporal (g)		pH		$\beta$ -GA <sup>1</sup>		Viabilidad de BF <sup>2</sup>											
Sano	1	31.15	± 0.92	e	A	0.00	± 0.00	7.29	± 0.30	a	A	5.67	± 0.07	a	A	5.87	± 0.02	a	A		
	2	32.76	± 0.72	de	A	1.50	± 0.17	e	C	7.40	± 0.08	a	A	5.09	± 0.18	a	A	5.87	± 0.02	a	A
	3	32.91	± 0.84	cde	A	1.70	± 0.45	e	B	7.23	± 0.07	a	A	5.26	± 0.44	a	A	5.85	± 0.05	a	A
	4	33.60	± 0.63	bcde	A	2.30	± 0.30	de	B	7.13	± 0.03	a	A	5.33	± 0.30	a	AB	5.91	± 0.02	a	AB
	5	35.72	± 1.04	abcd	A	4.60	± 0.56	cde	B	7.33	± 0.21	a	A	5.56	± 0.01	a	CD	5.94	± 0.03	a	A
	6	36.54	± 0.82	abcd	A	5.30	± 0.58	bcd	B	7.23	± 0.07	a	C	5.12	± 0.27	a	CD	4.65	± 0.04	a	A
	7	37.25	± 0.79	abc	A	6.00	± 0.73	abc	A	7.28	± 0.04	a	B	5.55	± 0.01	a	D	4.42	± 0.02	a	AB
	9	37.89	± 0.68	ab	A	6.60	± 0.86	abc	B	7.24	± 0.03	a	A	5.33	± 0.15	a	B	4.29	± 0.08	ab	A
	10	38.48	± 0.72	a	AB	7.20	± 0.76	abc	B	7.21	± 0.03	a	B	4.87	± 0.16	a	BC	4.38	± 0.10	a	BC
	11	39.04	± 0.81	a	A	7.80	± 0.77	abc	A	7.34	± 0.08	a	A	5.02	± 0.14	a	CD	4.35	± 0.08	ab	A
	12	37.51	± 1.07	ab	A	6.40	± 0.60	abc	B	7.20	± 0.04	a	A	4.90	± 0.12	a	CD	4.49	± 0.10	a	A
	13	39.10	± 0.92	a	A	7.90	± 0.71	ab	B	7.10	± 0.03	a	A	5.71	± 0.06	a	C	4.19	± 0.09	b	A
	14	39.72	± 1.09	a	A	8.60	± 0.81	a	B	7.32	± 0.09	a	A	5.70	± 0.05	a	DE	4.22	± 0.01	b	A
	15	38.65	± 1.03	a	A	7.50	± 0.81	abc	B	7.35	± 0.13	a	A	5.65	± 0.04	a	D	4.53	± 0.12	a	AB
	16	39.56	± 1.01	a	A	8.40	± 0.79	ab	B	6.99	± 0.10	a	DE	5.72	± 0.03	a	DE	4.41	± 0.10	a	AB
	Control AOM + DSS	1	30.62	± 0.54	e	A	0.00	± 0.00	7.24	± 0.25	b	A	5.40	± 0.26	ef	A	5.72	± 0.11	a	A	
2		33.55	± 0.43	de	A	2.90	± 0.28	e	A	7.20	± 0.08	b	A	5.09	± 0.08	f	A	5.72	± 0.11	a	A
3		34.63	± 0.52	cd	A	4.00	± 0.49	de	A	7.20	± 0.06	b	A	5.92	± 0.25	def	A	5.86	± 0.01	a	A
4		35.28	± 0.69	cd	A	4.70	± 0.47	de	A	7.20	± 0.10	b	A	5.39	± 0.02	ef	AB	5.90	± 0.04	a	AB
5		36.53	± 1.00	bcd	A	6.10	± 0.66	cd	AB	7.74	± 0.04	ab	A	6.63	± 0.17	cd	A	5.88	± 0.00	a	A

	6	37.47 ± 0.70	abc	A	6.90 ± 0.55	bcd	AB	7.85 ± 0.13	a	AB	6.44 ± 0.20	de	A	4.58 ± 0.18	b	A
	7	39.36 ± 0.43	ab	A	8.70 ± 0.62	abc	A	7.98 ± 0.06	a	A	8.27 ± 0.12	b	A	3.70 ± 0.14	c	CD
	9	40.66 ± 0.45	a	A	10.00 ± 0.49	a	A	7.78 ± 0.02	ab	A	8.21 ± 0.25	b	A	4.11 ± 0.12	bc	A
	10	40.83 ± 0.55	a	A	10.20 ± 0.76	a	A	7.88 ± 0.22	a	A	8.24 ± 0.32	b	A	4.08 ± 0.04	bc	C
	11	40.83 ± 0.55	a	A	10.20 ± 0.51	a	A	7.62 ± 0.21	ab	A	7.90 ± 0.21	bc	A	4.13 ± 0.08	bc	A
	12	39.97 ± 0.77	ab	A	9.40 ± 0.75	ab	A	7.54 ± 0.20	ab	A	8.09 ± 0.24	b	A	4.00 ± 0.02	bc	B
	13	40.32 ± 0.60	a	A	9.70 ± 0.50	ab	AB	7.56 ± 0.09	ab	A	8.40 ± 0.24	ab	A	4.18 ± 0.06	bc	A
	14	40.51 ± 0.64	a	A	9.90 ± 0.43	a	AB	7.73 ± 0.06	ab	A	8.33 ± 0.44	ab	A	3.85 ± 0.22	bc	A
	15	40.24 ± 1.41	a	A	10.00 ± 1.07	a	AB	7.55 ± 0.04	ab	A	8.45 ± 0.21	ab	A	4.02 ± 0.02	bc	B
	16	40.46 ± 1.01	a	A	10.00 ± 0.68	a	AB	8.08 ± 0.13	a	A	9.52 ± 0.08	a	A	3.96 ± 0.02	bc	C
<b>BF + AOM + DSS</b>	1	29.71 ± 0.88	e	A	0.00 ± 0.00			7.18 ± 0.30	a	A	5.62 ± 0.04	cd	A	6.18 ± 0.09	ab	A
	2	31.11 ± 0.97	e	A	1.43 ± 0.20	f	C	7.28 ± 0.02	a	A	4.60 ± 0.05	efg	A	6.27 ± 0.08	a	A
	3	32.84 ± 0.95	de	A	3.14 ± 0.40	ef	AB	7.05 ± 0.05	a	A	4.66 ± 0.05	efg	A	6.39 ± 0.10	a	A
	4	33.40 ± 0.97	cde	A	3.71 ± 0.61	def	AB	7.07 ± 0.07	a	A	4.68 ± 0.28	efg	BC	6.21 ± 0.20	a	A
	5	36.39 ± 1.04	bcd	A	6.71 ± 0.81	cde	AB	7.13 ± 0.36	a	A	6.11 ± 0.11	bc	B	5.16 ± 0.07	a	A
	6	37.33 ± 0.78	abcd	A	7.57 ± 0.75	bcd	AB	7.42 ± 0.16	a	ABC	6.65 ± 0.16	ab	A	4.72 ± 0.08	cd	A
	7	37.99 ± 0.96	abc	A	8.29 ± 0.68	abc	A	7.45 ± 0.12	a	AB	6.91 ± 0.05	a	BC	4.57 ± 0.06	cd	AB
	9	38.18 ± 0.81	abc	A	8.43 ± 0.75	abc	AB	7.56 ± 0.19	a	A	4.11 ± 0.22	g	BC	4.42 ± 0.05	cd	A
	10	39.04 ± 0.83	ab	AB	9.29 ± 0.78	abc	AB	7.37 ± 0.07	a	AB	4.62 ± 0.19	efg	BC	4.92 ± 0.14	a	A
	11	39.32 ± 0.84	ab	A	9.57 ± 0.84	abc	A	7.62 ± 0.21	a	A	4.23 ± 0.25	fg	D	4.46 ± 0.05	cd	A
	12	39.91 ± 0.79	ab	A	10.14 ± 0.86	abc	A	7.51 ± 0.22	a	A	4.92 ± 0.24	def	CD	4.58 ± 0.03	cd	A
	13	40.42 ± 1.00	ab	A	10.71 ± 0.99	ab	AB	7.14 ± 0.08	a	A	5.53 ± 0.01	cd	C	4.50 ± 0.09	cd	A
	14	40.52 ± 1.17	ab	A	10.86 ± 0.88	ab	AB	7.51 ± 0.46	a	A	5.36 ± 0.02	cde	EF	3.37 ± 0.18	d	A
	15	41.47 ± 1.29	a	A	11.86 ± 1.14	a	A	7.04 ± 0.24	a	A	4.87 ± 0.05	defg	E	4.72 ± 0.05	bcd	A
	16	41.76 ± 1.29	a	A	12.14 ± 1.03	a	A	6.96 ± 0.10	a	E	4.88 ± 0.14	defg	EF	4.61 ± 0.00	cd	A
	<b>BF + LYC</b>	1	30.00 ± 0.78	e	A	0.00 ± 0.00			7.31 ± 0.36	abc	A	5.67 ± 0.40	abcd	A	6.02 ± 0.10	a

**20 + AOM + DSS**

2	32.40 ± 0.89	de	A	2.25 ± 0.41	f	ABC	7.06 ± 0.11	bc	A	6.01 ± 0.35	abcd	A	6.29 ± 0.03	a	A
3	33.86 ± 0.82	cde	A	3.75 ± 0.31	ef	A	6.97 ± 0.07	c	A	6.13 ± 0.41	abcd	A	6.18 ± 0.01	a	A
4	35.05 ± 0.69	bcd	A	4.88 ± 0.48	de	A	7.07 ± 0.04	bc	A	6.06 ± 0.49	abcd	A	6.17 ± 0.04	a	A
5	37.39 ± 1.00	abc	A	7.38 ± 0.46	cd	A	7.01 ± 0.09	bc	A	5.70 ± 0.06	abcd	BC	5.10 ± 0.08	a	A
6	38.49 ± 0.67	ab	A	8.38 ± 0.42	bc	A	7.94 ± 0.13	ab	A	6.50 ± 0.11	abcd	A	4.59 ± 0.19	bc	A
7	38.83 ± 0.96	ab	A	8.88 ± 0.48	bc	A	7.69 ± 0.23	abc	AB	5.08 ± 0.45	cd	D	4.32 ± 0.15	bc	ABC
9	40.04 ± 0.80	a	A	10.00 ± 0.53	ab	A	7.73 ± 0.28	abc	A	4.80 ± 0.39	d	BC	4.46 ± 0.15	bc	A
10	40.07 ± 1.15	a	AB	10.13 ± 0.81	ab	AB	7.63 ± 0.22	abc	AB	5.31 ± 0.38	bcd	B	4.35 ± 0.00	bc	BC
11	40.73 ± 1.31	a	A	10.75 ± 0.84	ab	A	7.53 ± 0.13	abc	A	5.98 ± 0.23	abcd	BC	4.28 ± 0.07	c	A
12	40.77 ± 0.72	a	A	10.75 ± 0.31	ab	A	8.01 ± 0.10	a	A	6.24 ± 0.37	abcd	B	4.41 ± 0.06	bc	AB
13	41.60 ± 0.86	a	A	11.50 ± 0.57	a	A	7.44 ± 0.12	abc	A	6.42 ± 0.16	abcd	B	4.42 ± 0.06	bc	A
14	40.78 ± 0.69	a	A	10.75 ± 0.37	ab	AB	7.11 ± 0.29	abc	A	7.09 ± 0.05	a	BC	4.36 ± 0.04	bc	A
15	41.90 ± 0.79	a	A	11.88 ± 0.48	a	A	7.03 ± 0.28	bc	A	6.89 ± 0.25	ab	BC	4.39 ± 0.13	bc	AB
16	41.71 ± 0.97	a	A	11.63 ± 0.65	a	AB	7.07 ± 0.20	bc	C	6.71 ± 0.26	abc	C	4.51 ± 0.07	bc	A

**BF + LYC  
50 + AOM + DSS**

1	29.81 ± 0.48	g	A	0.00 ± 0.00			7.17 ± 0.31	ab	A	5.82 ± 0.30	a	A	6.00 ± 0.19	abc	A
2	31.50 ± 0.57	fg	A	1.63 ± 0.18	g	BC	7.22 ± 0.27	ab	A	5.67 ± 0.05	ab	A	6.42 ± 0.08	a	A
3	32.89 ± 0.74	efg	A	3.00 ± 0.33	fg	AB	7.06 ± 0.02	ab	A	5.40 ± 0.20	abc	A	6.12 ± 0.39	ab	A
4	33.29 ± 0.84	efg	A	3.50 ± 0.27	fg	AB	6.96 ± 0.11	b	A	5.03 ± 0.26	abcde	ABC	6.28 ± 0.17	ab	A
5	35.40 ± 0.95	def	A	5.75 ± 0.59	ef	AB	7.22 ± 0.45	ab	A	5.18 ± 0.05	abcd	D	4.98 ± 0.00	ab	A
6	36.21 ± 1.10	cde	A	6.88 ± 0.55	de	AB	7.48 ± 0.12	ab	ABC	5.97 ± 0.20	a	AB	4.70 ± 0.55	cd	A
7	36.67 ± 0.97	bcd	A	7.25 ± 0.73	cde	A	7.86 ± 0.14	a	AB	5.12 ± 0.18	abcd	D	4.62 ± 0.11	cd	A
9	38.29 ± 0.86	abcd	A	8.75 ± 0.53	bcd	AB	7.85 ± 0.20	a	A	4.04 ± 0.14	f	C	4.26 ± 0.05	d	A
10	38.59 ± 0.83	abcd	AB	9.13 ± 0.58	abcd	AB	7.26 ± 0.11	ab	AB	4.04 ± 0.16	f	C	4.44 ± 0.03	d	BC
11	39.45 ± 0.84	abcd	A	9.75 ± 0.49	abc	A	7.61 ± 0.21	ab	A	4.30 ± 0.31	def	D	4.44 ± 0.30	d	A
12	39.51 ± 1.09	abcd	A	9.88 ± 0.72	abc	A	7.82 ± 0.19	a	A	4.12 ± 0.33	ef	D	4.53 ± 0.16	d	A
13	41.54 ± 1.06	a	A	11.75 ± 0.75	a	A	7.45 ± 0.15	ab	A	4.01 ± 0.23	f	D	4.46 ± 0.04	d	A

	14	40.92 ± 1.18	ab	A	11.25 ± 0.80	ab	AB	7.57 ± 0.22	ab	A	4.49 ± 0.09	cdef	F	4.29 ± 0.13	d	A
	15	40.87 ± 0.89	abc	A	11.13 ± 0.61	ab	A	7.23 ± 0.05	ab	A	4.52 ± 0.19	cdef	E	4.69 ± 0.11	abc	A
	16	41.42 ± 0.98	ab	A	11.50 ± 0.71	ab	AB	7.04 ± 0.11	ab	CD	4.71 ± 0.12	bcdef	F	4.42 ± 0.01	d	AB
<b>LYC 20 + AOM + DSS</b>	1	29.77 ± 0.67	e	A	0.00 ± 0.00			7.25 ± 0.24	ab	A	5.74 ± 0.09	bcde	A	6.12 ± 0.17	ab	A
	2	31.54 ± 0.43	de	A	1.71 ± 0.29	f	ABC	7.29 ± 0.00	ab	A	5.78 ± 0.12	bcde	A	6.25 ± 0.18	a	A
	3	33.25 ± 0.47	cd	A	3.43 ± 0.37	ef	AB	7.17 ± 0.07	b	A	5.15 ± 0.20	def	A	6.17 ± 0.14	ab	A
	4	33.40 ± 0.37	cd	A	3.57 ± 0.30	ef	AB	7.20 ± 0.06	ab	A	6.06 ± 0.11	bcd	A	5.49 ± 0.03	c	B
	5	35.64 ± 0.64	bc	A	5.86 ± 0.46	de	AB	7.27 ± 0.22	ab	A	6.00 ± 0.11	bcd	BC	5.04 ± 0.05	a	A
	6	37.08 ± 0.59	ab	A	7.29 ± 0.57	bcd	AB	7.51 ± 0.17	ab	ABC	5.35 ± 0.03	cdef	BC	4.58 ± 0.23	bc	A
	7	37.39 ± 0.48	ab	A	7.57 ± 0.75	abcd	A	7.42 ± 0.16	ab	AB	7.22 ± 0.51	a	AB	4.12 ± 0.18	c	ABCD
	9	37.77 ± 0.74	ab	A	8.00 ± 0.53	abcd	AB	7.57 ± 0.16	ab	A	4.60 ± 0.33	ef	BC	4.46 ± 0.05	bc	A
	10	36.92 ± 0.69	ab	B	7.14 ± 0.51	cd	AB	7.43 ± 0.09	ab	AB	4.20 ± 0.28	f	C	4.46 ± 0.09	bc	ABC
	11	38.10 ± 0.51	ab	A	8.29 ± 0.36	abcd	A	7.93 ± 0.09	ab	A	4.16 ± 0.25	f	D	4.40 ± 0.14	bc	A
	12	38.97 ± 0.44	a	A	9.14 ± 0.40	abc	AB	8.00 ± 0.01	a	A	6.17 ± 0.17	bcd	B	4.14 ± 0.13	c	AB
	13	39.32 ± 0.87	a	A	9.57 ± 0.75	abc	AB	7.40 ± 0.22	ab	A	6.41 ± 0.07	abc	B	4.16 ± 0.22	c	A
	14	39.10 ± 0.51	a	A	9.29 ± 0.42	abc	AB	7.27 ± 0.38	ab	A	6.48 ± 0.22	ab	CD	4.33 ± 0.11	bc	A
	15	39.50 ± 0.65	a	A	9.71 ± 0.61	ab	AB	7.10 ± 0.23	b	A	6.40 ± 0.15	abc	C	4.36 ± 0.13	bc	AB
	16	39.78 ± 0.70	a	A	10.00 ± 0.44	a	AB	7.19 ± 0.13	ab	B	6.26 ± 0.27	abcd	CD	4.06 ± 0.02	c	BC
	<b>LYC 50 +AOM + DSS</b>	1	29.09 ± 0.99	e	A	0.00 ± 0.00			7.18 ± 0.21	ab	A	5.94 ± 0.31	abc	A	5.93 ± 0.16	a
2		31.88 ± 1.18	de	A	2.86 ± 0.46	e	AB	7.40 ± 0.10	ab	A	4.35 ± 0.09	de	A	6.29 ± 0.10	a	A
3		33.35 ± 1.11	cde	A	4.29 ± 0.57	de	A	7.23 ± 0.09	ab	A	4.29 ± 0.09	e	A	6.30 ± 0.01	a	A
4		33.86 ± 0.90	bcde	A	4.71 ± 0.42	de	A	7.21 ± 0.09	ab	A	4.10 ± 0.12	e	C	5.83 ± 0.16	a	AB
5		36.80 ± 1.13	abcd	A	7.71 ± 0.57	cd	A	7.40 ± 0.29	ab	A	4.40 ± 0.14	de	E	4.79 ± 0.27	a	A
6		37.63 ± 1.22	abcd	A	8.57 ± 0.78	abcd	A	7.35 ± 0.09	ab	ABC	5.16 ± 0.17	cd	CD	4.62 ± 0.15	bc	A
7		37.40 ± 1.04	abcd	A	8.29 ± 0.68	abcd	A	7.72 ± 0.06	ab	AB	5.92 ± 0.06	abc	CD	3.93 ± 0.04	c	BCD
9		38.68 ± 1.10	abc	A	9.57 ± 0.65	abc	A	7.52 ± 0.15	ab	A	5.29 ± 0.13	c	B	4.30 ± 0.17	bc	A

	10	38.80 ± 1.18	abc	AB	9.71 ± 0.87	abc	AB	7.50 ± 0.12	ab	AB	5.39 ± 0.12	bc	B	4.54 ± 0.10	a	AB
	11	39.69 ± 1.48	a	A	10.71 ± 0.97	abc	A	7.45 ± 0.13	ab	A	6.41 ± 0.31	a	B	4.42 ± 0.03	bc	A
	12	39.62 ± 1.28	a	A	10.57 ± 1.00	abc	A	7.95 ± 0.30	a	A	6.54 ± 0.22	a	B	4.28 ± 0.12	bc	AB
	13	39.62 ± 0.78	ab	A	10.43 ± 1.60	abc	AB	7.63 ± 0.11	ab	A	6.62 ± 0.09	a	B	4.58 ± 0.02	a	A
	14	40.74 ± 1.36	a	A	11.71 ± 1.04	abc	A	7.36 ± 0.22	ab	A	6.58 ± 0.15	a	CD	4.37 ± 0.06	bc	A
	15	41.77 ± 1.27	a	A	12.71 ± 0.89	a	A	7.01 ± 0.26	b	A	6.45 ± 0.22	a	C	4.53 ± 0.10	a	AB
	16	41.19 ± 1.29	a	A	12.14 ± 1.08	ab	A	7.18 ± 0.16	ab	B	6.20 ± 0.10	ab	CD	3.99 ± 0.16	c	C
<b>Metformina + AOM + DSS</b>	1	29.29 ± 0.81	f	A	0.00 ± 0.00			7.12 ± 0.45	b	A	6.10 ± 0.23	b	A	6.07 ± 0.02	a	A
	2	31.05 ± 0.67	ef	A	1.71 ± 0.29	e	ABC	7.19 ± 0.29	ab	A	5.83 ± 0.12	bc	A	6.11 ± 0.33	a	A
	3	32.67 ± 0.99	def	A	3.43 ± 0.30	de	AB	7.08 ± 0.04	b	A	5.26 ± 0.09	bcde	A	5.95 ± 0.01	a	A
	4	33.15 ± 0.87	cdef	A	3.86 ± 0.34	de	AB	7.11 ± 0.04	b	A	5.69 ± 0.17	bcd	AB	5.84 ± 0.06	a	AB
	5	35.17 ± 0.81	bcde	A	5.86 ± 0.34	cd	AB	7.09 ± 0.20	b	A	5.22 ± 0.04	bcde	D	5.86 ± 0.23	a	A
	6	36.27 ± 0.97	abcde	A	7.00 ± 0.85	bc	AB	7.32 ± 0.02	ab	BC	4.48 ± 0.15	e	D	4.60 ± 0.29	a	A
	7	36.33 ± 1.23	abcd	A	7.14 ± 0.77	bc	A	7.60 ± 0.07	ab	AB	4.69 ± 0.25	de	D	3.65 ± 0.22	b	D
	9	37.78 ± 0.67	abc	A	8.43 ± 0.57	abc	AB	7.45 ± 0.06	ab	A	4.85 ± 0.40	cde	BC	4.07 ± 0.04	ab	A
	10	37.58 ± 0.92	abcd	AB	8.29 ± 0.78	abc	AB	7.79 ± 0.05	a	AB	4.78 ± 0.05	de	BC	4.28 ± 0.14	ab	BC
	11	37.55 ± 0.99	abc	A	8.29 ± 0.84	abc	A	7.42 ± 0.07	ab	A	5.25 ± 0.28	bcde	CD	4.19 ± 0.00	ab	A
	12	38.89 ± 0.89	ab	A	9.67 ± 0.99	ab	AB	7.79 ± 0.02	a	A	5.83 ± 0.17	bc	BC	4.16 ± 0.04	ab	AB
	13	39.03 ± 1.01	ab	A	9.83 ± 0.40	ab	AB	7.48 ± 0.09	ab	A	5.97 ± 0.12	bc	BC	4.34 ± 0.04	ab	A
	14	38.69 ± 1.05	ab	A	9.50 ± 0.67	ab	AB	7.11 ± 0.08	b	A	7.82 ± 0.22	a	AB	4.15 ± 0.03	ab	A
	15	39.65 ± 1.17	a	A	10.50 ± 0.62	a	AB	7.08 ± 0.25	b	A	7.64 ± 0.05	a	B	4.16 ± 0.30	a	AB
	16	39.03 ± 1.01	ab	A	9.83 ± 0.95	ab	AB	7.02 ± 0.25	b	CDE	7.62 ± 0.33	a	B	3.97 ± 0.09	b	C

El análisis se realiza en heces de ratones alimentados con microencapsulado de *Bifidobacterium longum*. Los valores son la media ± SEM (n = 6-10 animales por grupo). <sup>1</sup> µg de fenoltaleína por hora por g de heces. <sup>2</sup> Log UFC por g de heces. Las diferencias de medias que comparan las dieciséis semanas dentro de cada grupo experimental se expresan en letras minúsculas. Cada día comparado con el mismo día del grupo experimental respectivo y las diferencias de medida se expresan en letras mayúsculas. Los valores con letra(s) diferente(s) dentro de una columna son significativamente diferentes (Tukey α < 0.05).

II. Correlación entre las proteínas de expresión IGF-I, IGF-2, IGF-1R, IGFBPs y los parámetros intestinales en un modelo animal AOM-DSS.

Variable/Variable	Clasificación histopatológica	Incidencia tumoral	Incidencia de lesiones tempranas	IGF1	IGF2	IGF-1R	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	pH cecal	pH colónico	pH fecal
<b>Clasificación histopatológica</b>	1.00	0.41	0.18	0.48	0.15	0.35	0.08	0.19	-0.25	0.44	0.30	0.43
<b>Incidencia tumoral</b>		1.00	-0.13	0.35	0.27	0.31	0.32	0.27	-0.22	0.47	0.27	0.44
<b>Incidencia de lesiones tempranas</b>			1.00	-0.02	-0.14	-0.04	0.03	-0.22	-0.07	0.02	-0.01	-0.05
<b>IGF1</b>				1.00	0.44	0.63	0.42	0.38	-0.20	0.37	0.24	0.36
<b>IGF2</b>					1.00	0.30	0.43	0.33	0.09	0.15	0.15	0.18
<b>IGF-1R</b>						1.00	0.41	0.33	-0.22	0.41	0.19	0.42
<b>IGFBP1</b>							1.00	0.47	0.00	0.27	0.39	0.33
<b>IGFBP2</b>								1.00	-0.05	0.23	0.18	0.20
<b>IGFBP3</b>									1.00	-0.07	-0.01	-0.23
<b>pH cecal</b>										1.00	0.36	0.34
<b>pH colónico</b>											1.00	0.25
<b>pH fecal</b>												1.00

Correlación de Pearson. Correlaciones marcadas en rojo son significativas  $p < 0.0500$ . Variables=25.  $n=63$  (6-10 animales por grupo).

II. Correlación entre IGF-I, IGF-2, IGF-IR, IGFBPs y parámetros intestinales en un modelo animal (Continuación...)

Variable/Variable	$\beta$ -GA cecal	$\beta$ -GA colonico	$\beta$ -GA fecal	Log UFC estómago (Luminal)	Log UFC intestino delgado (Luminal)	Log UFC ciego (Luminal)	Log UFC colon (Luminal)	Log UFC intestino delgado (Adherente)	Log UFC ciego (Adherente)	Log UFC colon (Adherente)	Heces
Clasificación histopatológica	0.43	0.33	0.39	-0.04	-0.14	-0.11	-0.22	-0.13	-0.25	-0.13	-0.40
Incidencia tumoral	0.61	0.71	0.52	-0.19	-0.04	-0.25	-0.48	-0.13	-0.31	-0.20	-0.45
Incidencia de lesiones tempranas	-0.19	-0.21	-0.05	-0.06	-0.03	0.29	0.27	0.15	0.18	0.15	0.20
IGF1	0.40	0.38	0.34	0.11	-0.05	-0.30	-0.13	-0.04	-0.32	-0.25	-0.46
IGF2	0.12	0.13	0.08	0.14	-0.03	0.00	-0.05	0.09	-0.08	0.00	-0.22
IGF-1R	0.36	0.34	0.36	-0.11	-0.07	-0.23	-0.13	0.01	-0.24	-0.20	-0.25
IGFBP1	0.27	0.40	0.38	-0.10	0.10	-0.22	-0.07	-0.07	-0.23	-0.18	-0.29
IGFBP2	0.46	0.43	0.35	-0.10	-0.12	-0.20	-0.21	-0.22	-0.26	-0.23	-0.48
IGFBP3	-0.24	-0.16	-0.36	0.13	0.23	0.27	0.16	0.09	0.09	0.04	0.40
pH cecal	0.34	0.46	0.38	-0.29	-0.15	-0.09	-0.31	-0.19	-0.23	-0.14	-0.31
pH colónico	0.25	0.35	0.39	-0.22	0.04	-0.17	-0.17	-0.04	-0.26	-0.34	-0.27
pH fecal	0.60	0.55	0.64	-0.19	-0.03	-0.34	-0.24	-0.28	-0.37	-0.29	-0.43
$\beta$ -GA cecal	1.00	0.76	0.71	-0.16	-0.01	-0.44	-0.47	-0.45	-0.47	-0.39	-0.59
$\beta$ -GA colónico		1.00	0.68	-0.29	0.00	-0.46	-0.50	-0.33	-0.45	-0.31	-0.58
$\beta$ -GA fecal			1.00	-0.46	-0.34	-0.52	-0.43	-0.33	-0.54	-0.41	-0.66
Log UFC en estómago (Luminal)				1.00	0.32	0.10	0.27	-0.06	0.22	0.35	0.17
Log UFC intestino delgado (Luminal)					1.00	0.10	0.20	0.21	0.02	0.14	0.20
Log UFC ciego (Luminal)						1.00	0.37	0.27	0.40	0.19	0.54
Log UFC colon (Luminal)							1.00	0.13	0.32	0.14	0.51
Log UFC intestino delgado (Adherente)								1.00	0.30	0.05	0.31
Log UFC ciego (Adherente)									1.00	0.21	0.26
Log UFC colon (Adherente)										1.00	0.29