



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* INMOVILIZADO, TRATADO BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES HUMANAS SIMULADAS *IN VITRO*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOPROCESOS

PRESENTA

Angélica Gabriela Mendoza Madrigal

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Enrique Durán Páramo

México, D. F. Julio de 2009.





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

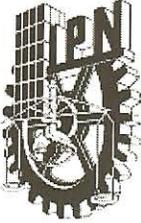
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 30 del mes de Junio del año 2009, la que suscribe Angélica Gabriela Mendoza Madrigal alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B071854, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Enrique Durán Páramo y cede los derechos del trabajo intitulado “Determinación de la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* inmovilizado, tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección gabrielamenmad@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Angélica Gabriela Mendoza Madrigal

Nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13 horas del día 22 del mes de junio del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis de grado titulada:

"Determinación de la viabilidad de Bifidobacterium bifidum inmovilizado, tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas in vitro"

presentada por la alumna:

MENDOZA

Apellido paterno

MADRIGAL

materno

ANGÉLICA GABRIELA

nombre

Con registro:

B	0	7	1	8	5	4
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de: Maestra en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

DR. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO


DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO


DRA. MARÍA DEL CARMEN OLIVER SALVADOR


DR. JORGE YÁÑEZ FERNÁNDEZ


DR. FABIÁN ROBLES MARTÍNEZ


EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

SOPORTE FINANCIERO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioconversiones del Departamento de Bioprocesos de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Enrique Durán Páramo.

El soporte financiero para realización del proyecto fue a través de los proyectos de investigación 20082706 y 20091568 de la Secretaria de Investigación y Posgrado del IPN dirigidos por el Dr. Enrique Durán Páramo. Asimismo, el alumno agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN por las becas otorgadas para la realización de sus estudios de posgrado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Durán Páramo por su ejemplar labor académica y administrativa que hacen de él un hombre institucional y comprometido con la educación en el IPN. Asimismo, agradezco su apoyo permanente y su profesionalismo a lo largo de mi formación como alumno de posgrado.

Al Dr. Gustavo Valencia del Toro por su enorme calidad humana y su auténtico compromiso con la labor docente y de investigación en la UPIBI. Agradezco profundamente sus valiosas aportaciones y contribuciones al presente trabajo.

A la M. en C. Karina Cruz Pacheco por guiarme en este proyecto y por haberme brindado su amistad.

A la Dra. Ma. del Carmen Oliver Salvador, al Dr. Fabián Robles Martínez y al Dr. Jorge Yañez Fernández por sus valiosas aportaciones y comentarios hacia esta investigación.

A la I. Bt. Aurea V. Alarcón Elías, a la I. A. Abril Ramírez Higuera y al I. Bt. César A. Jiménez Sierra, de quienes siempre he recibido apoyo, comprensión y amistad incondicional.

A la I. A. María de Jesús Perea Flores y al Dr. José Jorge Chanona Pérez, por enriquecer mi vida personal y profesional.

A Karla y Ángel, que son mi guía e inspiración.

CONTENIDO

RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Bacterias lácticas.....	2
2.1.1 Bifidobacterias.....	3
2.1.2 Probióticos.....	4
2.2 Tracto gastrointestinal del ser humano.....	7
2.2.1 Estómago del ser humano.....	7
2.2.1.1 Funciones del estómago humano.....	8
2.2.1.2 Jugos digestivos.....	8
2.2.1.3 Vaciado gástrico en el ser humano.....	9
2.2.2 Funciones y composición de la bilis hepática humana.....	9
2.2.3 Intestino delgado del ser humano.....	10
2.2.4 Microflora del tracto gastrointestinal humano.....	11
2.3 Inmovilización celular.....	13
2.3.1 Unión química.....	13
2.3.2 Retención física.....	13
2.3.2.1 Alginato de sodio.....	14
2.3.2.3 Inmovilización de bacterias lácticas.....	16
2.4 Simulación del tracto gastrointestinal humano <i>in vitro</i>	18
2.5 Análisis de la microestructura de microorganismos inmovilizados.....	22
2.5.1 Técnicas de microscopía.....	22
2.5.2 Análisis de imágenes.....	23
2.5.2.1 Parámetros morfológicos.....	25
2.5.2.2 Parámetros de textura.....	25
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos específicos.....	30
V. METODOLOGÍA	31
5.1 Estrategia de trabajo.....	31
5.2 Etapa 1. Selección del microorganismo.....	32

5.3 Etapa 2. Determinación de la viabilidad de <i>B. bifidum</i> bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	34
5.3.1 Técnica de inmovilización celular.....	36
5.3.2 Determinación de viabilidad por cuenta en placa de Petri.....	36
5.4 Etapa 3. Determinación de la viabilidad de <i>B. bifidum</i> en presencia de diferentes alimentos.	37
5.5 Etapa 4. Evaluación de la morfología y la microestructura de las esferas de <i>B. bifidum</i> inmovilizadas.....	40
5.6 Etapa 5. Análisis estadístico.....	44
5.7 Equipo utilizado.....	44
5.8 Soluciones utilizadas.....	44
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
6.1 Tratamiento control. Resultados de la viabilidad de <i>B. bifidum</i> libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas <i>in vitro</i>	45
6.1.1 Efecto del soporte de inmovilización.....	48
6.1.2 Evaluación de la morfología y la microestructura de <i>B. bifidum</i> inmovilizado en alginato de sodio tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas <i>in vitro</i>	50
6.2 Efecto de la presencia de diferentes alimentos sobre la viabilidad <i>B. bifidum</i> libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas <i>in vitro</i>	54
6.2.1 Efecto de la presencia de alimento testigo sobre la viabilidad de <i>B. bifidum</i> libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas <i>in vitro</i>	54
6.2.2 Efecto de la presencia de desayuno sobre la viabilidad de <i>B. bifidum</i> libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas <i>in vitro</i>	56
6.2.3 Efecto de la presencia de café soluble sobre la viabilidad de <i>B. bifidum</i> libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas <i>in vitro</i>	59
6.2.4 Efecto de la presencia de chile serrano sobre la viabilidad de <i>B. bifidum</i> libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas <i>in vitro</i>	61
6.2.5 Efecto de la presencia de cerveza sobre la viabilidad de <i>B. bifidum</i> libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas <i>in vitro</i>	64
VII. CONCLUSIONES.....	67
VIII. PERSPECTIVAS.....	68
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del aparato digestivo del ser humano.....	7
Figura 2. Esquema del estómago humano.....	8
Figura 3. Esquema del intestino delgado humano.	10
Figura 4. Esquema del tracto gastrointestinal humano mostrando funciones y la distribución microorganismos no patógenos.....	12
Figura 5. Estructura del alginato, (a) y (b) monosacáridos, ácido- β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, respectivamente, y (c) y (d) unidades que se repiten en cadena.	15
Figura 6. Mecanismo de gelificación del alginato en presencia de cationes de calcio.....	15
Figura 7. Etapas del análisis de imágenes.....	24
Figura 8. Ángulos posibles de medición de la entropía desde la matriz de Co-ocurrencia en escala de grises (GLCM) y diferencias entre los valores de entropía medidas a diferentes ángulos y en diferentes tipos de imágenes.	26
Figura 9. Estrategia de trabajo.....	31
Figura 10. Diagrama de cinética de crecimiento microbiano.....	33
Figura 11. Esquema de la simulación del tracto gastrointestinal humano <i>in vitro</i>	34
Figura 12. Diagrama de la simulación del tracto gastrointestinal humano <i>in vitro</i>	35
Figura 13. Esquema de la técnica de inmovilización por atrapamiento con soporte de alginato de sodio.	36
Figura 14. Descripción de la metodología realizada para la evaluación de la microestructura y morfología de las partículas conteniendo de <i>B. bifidum</i> inmovilizado.....	40
Figura 15. Menú de comandos para la extracción de parámetros morfológicos de las esferas en el software ImageJ.	42
Figura 16. Menú de comandos para la extracción de la entropía de las esferas en el software ImageJ.	42
Figura 17. Menú de comandos para la extracción de textura fractal de las esferas en el software ImageJ.....	43
Figura 18. Cinética de pérdida de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	46
Figura 19. Cambios morfológicos de <i>Bifidobacterium bifidum</i> inmovilizado en alginato de sodio durante su tratamiento bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas <i>in vitro</i> : (a) Área, (b) Perímetro, (c) Diámetro de Feret, (d) Circularidad, e, f y g muestran imágenes binarias de las esferas (e) al inicio, (f) después del tratamiento gástrico y (g) intestinal.	52
Figura 20. Parámetros de la textura de <i>Bifidobacterium bifidum</i> inmovilizado. (a) Dimensión Fractal y (b) Entropía. Imágenes Microscopía electrónica de barrido ambiental y su correspondiente gráfico 3-D en escala de grises de la superficie de las esferas al inicio del tratamiento (c.1), después del tratamiento gástrico (c.2) e intestinal (c.3) y del interior de las esferas al inicio (d.1), después del tratamiento gástrico (d.2) e intestinal (d.3).	53

Figura 21. Cinética de pérdida de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de alimento testigo bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	55
Figura 22. Cinética de pérdida de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de desayuno bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i> .	58
Figura 23. Cinética de pérdida de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de café bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	61
Figura 24. Cinética de pérdida de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de chile bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	62
Figura 25. Cinética de pérdida de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de cerveza bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i> ..	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto clínico en humanos de microorganismos probióticos.....	6
Cuadro 2. Composición de la bilis humana.	10
Cuadro 3. Microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal del ser humano.	11
Cuadro 4. Efectos benéficos en productos con probióticos encapsulados.....	16
Cuadro 5. Resumen de sistemas en donde se ha evaluado el comportamiento de probióticos en condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	19
Cuadro 6. Resumen de aplicaciones del análisis de imágenes en la evaluación de alimentos.....	24
Cuadro 7. Medio específico para <i>Bifidobacterium</i>	32
Cuadro 8. Formulación del medio MRS adicionado con cisteína.	33
Cuadro 9. Diseño de la encuesta realizada para determinar los alimentos introducidos a la simulación del tracto gastrointestinal humano <i>in vitro</i>	37
Cuadro 10. Resultados de la encuesta realizada.	38
Cuadro 11. Alimentos utilizados en la Etapa 3 del proyecto.	38
Cuadro 12. Porcentaje de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	46
Cuadro 13. Porcentaje de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de alimento testigo bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	55
Cuadro 14. Porcentaje de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de desayuno bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	58
Cuadro 15. Porcentaje de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de café bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	60
Cuadro 16. Porcentaje de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de chile bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	62
Cuadro 17. Concentración de compuestos de fenilpropanoides en <i>Capsicum annum</i>	64
Cuadro 18. Porcentaje de viabilidad de células de <i>Bifidobacterium bifidum</i> libres e inmovilizadas en presencia de cerveza desayuno bajo condiciones gastrointestinales humanas <i>in vitro</i>	65

RESUMEN

En la presente investigación se comparó la viabilidad de las células libres e inmovilizadas de *Bifidobacterium bifidum* NRRL-41410 tratadas bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. Para inmovilizar las células se empleó la técnica de atrapamiento físico utilizando un soporte de alginato de sodio al 2% (p/v), las células libres e inmovilizadas se sometieron a una simulación de las condiciones del estómago para las cuales se empleó pepsina, mucina y ácido clorhídrico para ajustar el pH a 2.0; por otro lado, para simular las condiciones intestinales se empleó bilis hepática, pancreatina, mucina, hidróxido de sodio para ajustar el pH a 6.8, asimismo durante toda la simulación se controló la temperatura, la agitación y la peristalsis. La viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* evaluada bajo estas condiciones resultó ser mayor cuando se inmovilizaron las células con respecto a las células que no fueron inmovilizadas, lo cual indica que el soporte proporcionó protección a las bacterias lácticas probióticas.

Mediante técnicas de microscopía electrónica y análisis de imágenes se evaluaron los cambios morfológicos y microestructurales que ocurrieron durante el tratamiento de *B. bifidum* inmovilizado en condiciones gastrointestinales humanas *in vitro* (tratamiento control) y los resultados sugieren que la pérdida de viabilidad de las bacterias lácticas puede estar controlada mayoritariamente por procesos difusivos y en menor medida al daño estructural del soporte de inmovilización.

Se utilizaron diferentes alimentos y bebidas con la finalidad de evaluar la viabilidad de *B. bifidum* y comparar el efecto de dichos alimentos, la mayor viabilidad se observó en el tratamiento con células inmovilizadas y en presencia de desayuno cuyos componentes contienen fructooligosacáridos que actúan como prebióticos, lo cual favoreció la viabilidad de *B. bifidum*. Además se observó mayor pérdida de viabilidad de *B. bifidum* provocada por la cerveza y el chile.

En el simulador diseñado fue posible evaluar la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* libre e inmovilizado, así como introducir diferentes muestras de alimentos al sistema, sin embargo se podrían evaluar otras bacterias lácticas con características probióticas para estudiar su comportamiento bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

ABSTRACT

In the present investigation the viability of free and immobilized *Bifidobacterium bifidum* NRRL-41410 under gastrointestinal human *in vitro* conditions was studied. The immobilization technique used was physical entrapment with sodium alginate (2% w/v), the free and immobilized cells were treated under gastric simulated conditions that include pepsin, mucin and HCl that was used for adjusting the pH to 2.0; on the other hand, to simulate the intestinal conditions bile salts, pancreatin, mucin and NaOH were used, during the simulation the temperature and peristalsis were controlled. Immobilization support provided protection for *B. bifidum* from the adverse gastric and intestinal conditions, as a result, higher numbers of immobilized bacteria survived compared with free cells.

Electronic microscopy and image analysis were used in order to evaluate the morphologic and microstructural changes on immobilization spheres support when treated under gastrointestinal conditions (control treatment) and the results suggest that the viability loss can be controlled by diffusive processes and by the structural support damage.

Different meals and beverages were used in order to evaluate the viability of *B. bifidum* and to compare the effect of such meals, the highest viability numbers were shown in the immobilized cells in presence of breakfast due to the fructo-oligosaccharides content in banana and fiber that may act as prebiotics, this behavior allowed the maintenance of the viability of *B. bifidum*. Moreover a higher viability loss of *B. bifidum* produced by beer and chili was shown.

It was possible to evaluate the viability of *B. bifidum* in the simulation system and to introduce different meals samples to the system; however other acid lactic bacteria with probiotic characteristics can be studied under gastrointestinal human simulated conditions.

I. INTRODUCCIÓN.

A principios del siglo XX surgió el interés por la relación entre alimentos fermentados y los beneficios a la salud, sentándose bases científicas más sólidas sobre lo que se conoce actualmente como probióticos.

Estudios más detallados en microbiología, bioquímica, biología molecular, y múltiples ramas de la medicina y fisiología, han permitido sustentar un entendimiento más claro sobre los beneficios de las bacterias lácticas capaces de colonizar la mucosa intestinal.

Es un hecho que las bacterias lácticas tienen beneficios al ser utilizados en la producción de alimentos fermentados, sin embargo, lo que no está claro aún es su capacidad de implantarse en la flora intestinal; estas bacterias, producen enzimas y sustancias antimicrobianas como el ácido láctico y las bacteriocinas, además de nutrimentos como algunas vitaminas, que muy probablemente puedan ejercer algunos efectos benéficos sobre los consumidores.

Para poder determinar la viabilidad de las bacterias probióticas en el intestino grueso, se han desarrollado modelos que simulan el tracto gastrointestinal humano; en los estudios realizados se utilizan sistemas que representan el estómago y el duodeno principalmente, que son órganos en donde las bacterias lácticas pierden su viabilidad debido al ambiente ácido en el estómago ocasionado por el ácido clorhídrico y la secreción de bilis por el duodeno.

Debido a la importancia del consumo de alimentos lácteos fermentados, específicamente probióticos, es de suma importancia que se realicen desarrollos tecnológicos que garanticen que la cantidad mínima recomendable de éstos vaya a ser adherida al tejido epitelial del colon una vez que han atravesado en tracto gastrointestinal humano para ejercer los beneficios adjudicados a su consumo.

II. ANTECEDENTES.

Las leches fermentadas han sido consideradas desde hace muchos años como alimentos benéficos para la salud. A finales del siglo XIX, Ellie I. Metchnikoff observó en Bulgaria que un gran número de personas vivían más de 100 años, este hecho lo relacionó con el gran consumo de bacterias en las leches fermentadas como forma de modular la flora intestinal y así evitar enfermedades y alargar la vida de la gente, su contribución ayudó a construir una imagen del yogurt y otras leches fermentadas como alimentos saludables (Duggan *et al.*, 2002).

La aplicación terapéutica de los probióticos fuera del ámbito de las leches fermentadas fue instituida en 1906 por Tissier, quien utilizó cepas de *Bifidobacterium bifidum* aisladas tiempo atrás por él mismo (1899-1900) para aliviar a infantes de diarrea (García-Garibay, 1996).

En 1930, Minoru Shirota, aisló de heces humanas una cepa de *Lactobacillus casei*, que posteriormente cultivó en leche originando una bebida con características probióticas. Shirota atribuyó a este lactobacilo la capacidad de promover la salud intestinal y prevenir enfermedades mediante su consumo oral y en 1935 desarrolló el Yakult, siendo este producto la primera leche fermentada diseñada específicamente como probiótico. Junto con Metchnikoff, Shirota fue uno de los pioneros en el estudio de probióticos, aunque las bases científicas más sólidas de los verdaderos beneficios de estas bacterias lácticas en la salud se han empezado a estudiar con mayor rigor científico desde mediados de la década de los 80s (Figuroa *et al.*, 2006).

En los últimos años se ha desarrollado un creciente interés por conocer cómo actúan las bacterias con características probióticas en los humanos, tanto en el sector científico como en el industrial, particularmente en los países europeos y en Japón, un poco menos en EUA y Canadá. En México está iniciándose un importante auge en el consumo de leches fermentadas con probióticos.

2.1 Bacterias lácticas.

Las bacterias lácticas son bacterias Gram positivas no esporuladas que tienen en común la capacidad de producir ácido láctico por fermentación utilizando azúcares como sustrato. Son microorganismos que requieren factores de crecimiento complejos como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos (García-Garibay, 1996). Dado que carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones, reciben energía por fosforilación a nivel sustrato.

Producen energía únicamente por fermentación. Carecen de la capacidad de biosíntesis del grupo hemo, razón por la cual son catalasa negativa. Crecen en presencia o ausencia de O₂, por lo que algunas bacterias son anaerobias facultativas y otras obligadas. Forman colonias pequeñas nunca pigmentadas, asociadas a la ausencia de citocromos.

Dentro de las características fisiológicas de las bacterias lácticas se distingue su tolerancia a la acidez, pueden seguir creciendo aún a valores de pH menores a 5.0. La actividad de las bacterias lácticas limita el crecimiento de otras bacterias, tanto por el efecto del bajo pH como por ciertas sustancias inhibidoras producidas por algunas especies (ácidos orgánicos y bacteriocinas).

Las bacterias lácticas agrupan a las especies de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus*. A continuación se describen las características del género *Bifidobacterium*.

2.1.1 Bifidobacterias.

Las especies del género *Bifidobacterium* son bacterias anaerobias facultativas, Gram positivas, catalasa negativa, no móviles y no producen gas; las bifidobacterias fueron descubiertas por Tissier en 1899 en el Instituto Pasteur, Paris, Francia (Chung *et al.*, 1999). Estas bacterias habitan en el tracto intestinal (principalmente en el intestino delgado) de animales y humanos, generalmente se encuentran en cantidades superiores a 10¹⁰ por cada gramo de contenido intestinal, comprenden cerca del 25% de la microflora, sin embargo, la cantidad de bacterias va disminuyendo con la edad, estado de salud y dieta (Linder *et al.*, 2007). Estas bacterias son componentes predominantes en la flora intestinal, colonizan el tracto gastrointestinal humano entre 2 y 5 días después del nacimiento, además se modifica e incrementa la diversidad microbiana en la etapa de lactancia al introducir alimentos en la dieta (Rozada-Sánchez *et al.*, 2007).

Se ha reportado que las bifidobacterias mejoran la flora intestinal al formar barreras, previniendo la colonización de patógenos (Chung *et al.*, 1999), esto puede ocurrir como consecuencia del pH intestinal por la secreción de ácido acético y láctico (Araya-Kojima *et al.*, 1996; Homma, 1998). También se ha encontrado que *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium infantis* inhiben la colonización de microorganismos patógenos como *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, ejerciendo un efecto antimicrobiano (Figuroa *et al.*, 2006; Cheikhoussef *et al.*, 2008).

Las personas intolerantes a la lactosa, pueden mejorar su absorción por la β -galactosidasa producida por células de *Bifidobacterium*, así como el bajo contenido de lactosa en bebidas que fueron fermentadas con este microorganismo; otro beneficio del consumo de bifidobacterias consiste en la estimulación del sistema inmune (Leahy *et al.*, 2005).

Las bebidas lácteas fermentadas como el yogurt se usan comúnmente como vehículos de bifidobacterias; sin embargo para mantener un alto número de bacterias viables es importante seleccionar cepas tolerantes a valores de pH bajos (presentes en el estómago humano) y a efectos por la secreción de bilis (Clark *et al.*, 1993). La liberación de las bifidobacterias viables en el intestino grueso, en donde son capaces de trabajar, se limita por las condiciones ácidas del estómago y la presencia de bilis hepática (Sun & Griffiths, 2000).

2.1.2 Probióticos.

Los probióticos son microorganismos vivos que mejoran el balance de la flora intestinal del huésped (Marco *et al.*, 2006). Son cultivos que al ser consumidos por humanos en las cantidades adecuadas, si sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal y se implantan en el colon o intestino delgado, benefician al huésped en términos de salud (García-Garibay, 1996; Champagne & Fustier, 2007).

A su vez, los probióticos son bacterias lácticas productoras de ácido láctico como metabolito principal de su fermentación. *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son especies que constituyen una parte importante de este grupo (Fuller, 1992 en Charteris *et al.*, 1998; Marco *et al.*, 2006), además que tienen la capacidad de implantarse en la flora intestinal y existen en grandes cantidades en el intestino, no sólo de infantes, sino también de adultos humanos sanos, contribuyendo al bienestar fisiológico del individuo (Salminen *et al.*, 1998).

Los probióticos tienen una aplicación tanto a nivel industrial en la elaboración de leches fermentadas, como desde el punto de vista nutricional en el ser humano. Al modificar la microflora intestinal, los probióticos influyen de manera directa e indirecta en el estado de salud de producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulación de la respuesta inmune y protección frente a microorganismos enteropatógenos (Salminen *et al.*, 1998).

Para que un microorganismo pueda ser considerado como probiótico tiene que poseer las siguientes características:

-
- Ser habitante normal del tracto gastrointestinal humano.
 - No ser patógeno, ni tóxico.
 - Ser estable al contacto con bilis, ácido y enzimas.
 - Tener la habilidad para adherirse a la mucosa intestinal.
 - Mostrar potencial de colonización en el tracto gastrointestinal humano.
 - Producir sustancias antimicrobianas.

Entre los beneficios de los microorganismos probióticos sobre los cuales existen evidencias científicas se encuentran: disminución de síntomas de intolerancia a la lactosa, reduciendo la concentración de la misma en la leche fermentada por actividad de la lactasa durante la fermentación; disminución de la duración de la diarrea en niños y adultos, así como infecciones gastrointestinales, además de la producción de compuestos antimicrobianos; efecto inmunoprotector y propiedades antitumorales (Escalante, 2001).

Los probióticos pueden incrementar la resistencia contra los patógenos mediante la colonización competitiva y la producción de ácidos orgánicos (láctico y acético), bacteriocinas y otros metabolitos primarios como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de carbono. La producción de ácidos orgánicos disminuye el pH intestinal e inhibe el crecimiento de patógenos, también incrementan los movimientos peristálticos, lo que de manera indirecta remueve los patógenos acelerando la velocidad con la que atraviesan el intestino. El peróxido de hidrógeno producido puede funcionar a través del sistema lactoperoxidasa-tiocianato, en el cual el peróxido de hidrógeno oxida el tiocianato para convertirlo a ácido hidrocianico que es perjudicial para los patógenos. Bacteriocinas como acidofilina, lactobacilina, acidolina, lactocidina y lactolina muestran un efecto antimicrobiano contra los patógenos (Kailasapathy *et al.*, 2000).

En el Cuadro 1 se presentan algunos microorganismos probióticos y su efecto clínico en humanos.

Cuadro 1. Efecto clínico en humanos de microorganismos probióticos.

Cepa	Efecto clínico en humanos
<i>Lactobacillus johnsonni</i>	Prevención de diarrea, modulación de la flora intestinal, alivio de la intolerancia a la lactosa.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Inhibición de bacterias patógenas, adhesión a las células intestinales humanas.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Colonización del tracto intestinal.
<i>L. plantarum</i> y <i>Sacch. boulardii</i>	Disminución de la intolerancia a la lactosa, mejoramiento en la adherencia de células en la mucosa intestinal.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Reducción o eliminación de los síntomas de intolerancia a la lactosa.
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Prevención de diarrea, modulación de la respuesta inmune.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Reducción de la duración de la diarrea y aumento de la respuesta inmunológica.
<i>Bifidobacterium longum</i>	Inhibición de <i>E. coli</i> de la superficie de la mucosa intestinal humana.
<i>B. brevis</i> y <i>B. infantis</i>	Inhibición de <i>E. coli</i> y <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , ejerciendo actividad antimicrobiana.

El intestino grueso es el sitio de acción de la mayoría de las bacterias probióticas, para que su funcionamiento sea efectivo, las bacterias deben llegar viables en un número suficiente. La pérdida de viabilidad de las bacterias ocurre a lo largo del tracto gastrointestinal de los humanos y posiblemente es por la presencia de un ambiente ácido en el estómago y la secreción de bilis en el duodeno (Mainville *et al.*, 2005).

Actualmente se conocen los beneficios de los probióticos en humanos y es importante desarrollar sistemas o modelos que permitan conocer si las bacterias probióticas llegan viables en concentraciones de entre 10^7 y 10^8 UFC/mL al intestino grueso para que ejerzan un efecto benéfico al huésped (Charteris, *et al.*, 1998; Klingberg & Budde, 2006).

2.2 Tracto gastrointestinal del ser humano.

La digestión es un proceso por el cual las moléculas ingeridas son fraccionadas en otras más pequeñas mediante reacciones catalizadas por enzimas. Como resultado de la digestión, las moléculas ingeridas se transforman en otras que pueden ser digeridas (Berne & Levy, 1999).

El aparato digestivo del ser humano (Figura 1) dota al cuerpo de una provisión continua de agua, electrolitos y nutrientes. Para cumplir este propósito necesita: 1) progresión del alimento a través del tubo digestivo; 2) secreción de jugos digestivos y digestión del alimento; 3) absorción de los productos digestivos, agua y los diferentes electrolitos; 4) circulación de la sangre por los órganos digestivos para acarrear las sustancias absorbidas, y 5) control de todas estas funciones por parte de los sistemas nervioso y hormonal.

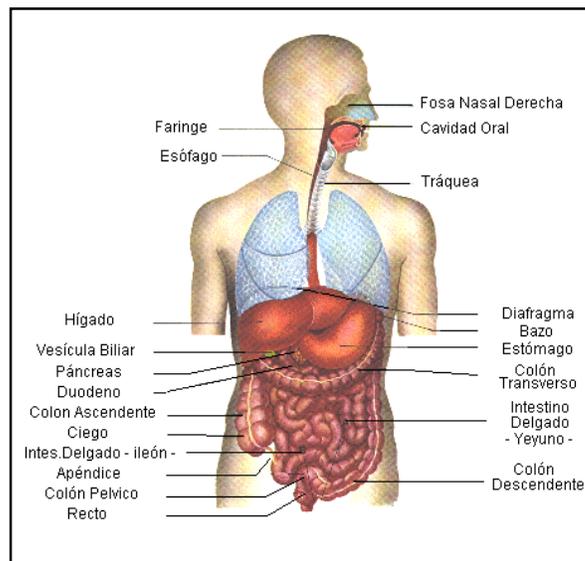


Figura 1. Esquema del aparato digestivo del ser humano.

Tomado de: www.lexuspe.com

2.2.1 Estómago del ser humano.

El estómago es una dilatación del tubo digestivo, se ubica entre el esófago y el duodeno; sirve como sitio de mezclado y sitio de retención (Figura 2). A intervalos apropiados después de ingeridos los alimentos, el estómago transfiere una pequeña parte de su contenido a la porción inicial del intestino delgado. En el estómago, continúa la digestión de los almidones, se inicia la de las proteínas y triglicéridos. Varios minutos después de que los alimentos entran al estómago, se producen movimientos peristálticos a intervalos de 15 a 25

segundos, los cuales maceran los alimentos, los mezclan con las secreciones de las glándulas gástricas y los reducen a quimo.

2.2.1.1 Funciones del estómago humano.

Las funciones motoras del estómago son (Ganong, 2002):

1. Almacenamiento de grandes cantidades de alimento hasta que puedan vaciarse en el duodeno.
2. Mezclar este alimento con secreciones gástricas hasta que se forme una mezcla semifluida que se llama *quimo*.
3. Vaciamiento lento del *quimo* hacia el intestino delgado a una velocidad adecuada para la digestión y absorción correctas por parte del intestino delgado.

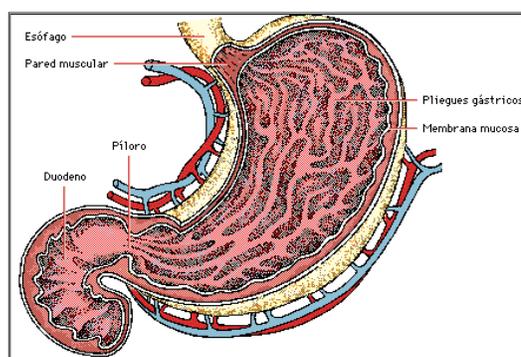


Figura 2. Esquema del estómago humano.

Tomado de: www.isftic.mepsyd.es

2.2.1.2 Jugos digestivos

Los jugos digestivos del estómago son secretados por las *glándulas gástricas*; estas secreciones entran en contacto directo con la porción del alimento almacenado que está en contacto con la superficie mucosa.

Los jugos digestivos contienen agua, ácido clorhídrico y enzimas: pepsina (puede proteger a las células del género *Bifidobacterium* cuando se encuentran en pH ácidos), renina y lipasa gástrica, entre otras. Por la presencia del ácido clorhídrico se facilita la degradación de las proteínas para convertirlas en unidades más pequeñas.

2.2.1.3 Vaciado gástrico en el ser humano.

El vaciado gástrico, o paso periódico del quimo del estómago al duodeno, está regulado por reflejos neuronales y hormonales.

- Estímulos como la distensión del estómago y la presencia de proteínas digeridas parcialmente, etanol y cafeína pueden iniciar el vaciado gástrico.
- Estos estímulos hacen que aumente la secreción de gastrina y que se generen impulsos parasimpáticos que juntos estimulan la contracción del cardias, aumentan la motilidad gástrica y relajan el esfínter pilórico.

El vaciado gástrico se controla en grado moderado por factores gástricos, sin embargo en este control es más importante la presencia de señales de retroalimentación que provienen del duodeno y que incluyan tanto la retroalimentación enterogástrica y hormonal. Los dos mecanismos de retroalimentación funcionan para disminuir la tasa de vaciamiento cuando ya hay demasiado quimo en el intestino delgado o cuando el quimo es muy ácido, contiene demasiada proteína o grasa no procesada. De este modo la velocidad de vaciamiento del estómago se limita a la cantidad de quimo que puede procesar el intestino delgado.

2.2.2 Funciones y composición de la bilis hepática humana.

Para que los microorganismos logren sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal humano deben resistir ambientes extremos, por ejemplo variaciones en el pH, bajos niveles de oxígeno, limitación de nutrientes y elevada osmolaridad. El hígado secreta bilis al tracto intestinal lo que implica otro factor crítico en la supervivencia de los microorganismos, específicamente las bacterias lácticas (Begley *et al.*, 2005). Una característica deseable en los microorganismos no patógenos, es tolerar la bilis para sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal humano.

La bilis tiene un papel importante en la emulsificación y solubilización de lípidos. Cada día, los hepatocitos secretan 800 a 1000 mL de bilis (Guyton, 1994) que está compuesta principalmente de agua, ácidos, pigmentos y sales biliares, colesterol y diversos iones (Cuadro 2). Las sales biliares participan en el desdoblamiento de glóbulos y absorción de lípidos después de su digestión, se reabsorben por transporte activo en la porción final del intestino delgado (íleon) y pasan a la sangre que fluye hacia el hígado. El colesterol se vuelve soluble en la bilis gracias a las sales biliares y a la lecitina.

Cuadro 2. Composición de la bilis humana.

Fuente: Begley et al., 2005.

Composición de la bilis humana	
Sodio (mmol/L)	145
Ácido clorhídrico (mmol/L)	90
Sales biliares (mmol/L)	40
Fosfolípidos (mmol/L)	7
Potasio (mmol/L)	4
Colesterol (mmol/L)	3
Peso seco (mg/mL)	20
pH	7.5-8.0

2.2.3 Intestino delgado del ser humano.

El intestino delgado (Figura 3) se divide en tres partes, el duodeno tiene 25 cm de longitud, el yeyuno 1 m y continúa con el íleon; ésta es la parte más larga del intestino delgado, casi de 2 m de longitud.

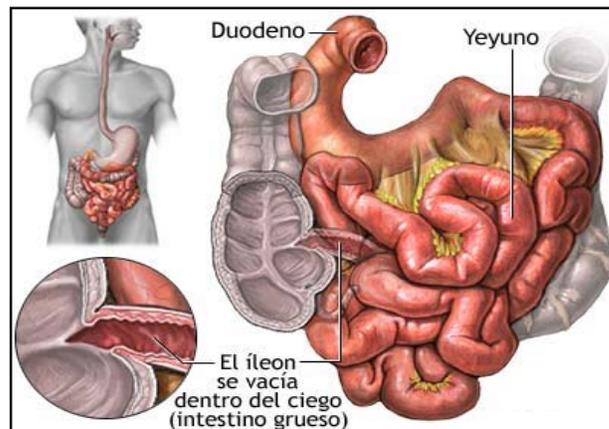


Figura 3. Esquema del intestino delgado humano.

Tomado de: www.nlm.nih.gov

Después de que los alimentos se combinan con el ácido estomacal, descienden al duodeno, donde se mezclan con la bilis proveniente de la vesícula biliar y los jugos digestivos del páncreas, la absorción de vitaminas, minerales y otros nutrientes comienza en el intestino delgado.

En la boca, la amilasa salival convierte el almidón en maltosa, maltotriosa y α -dextrinas. En el estómago, la pepsina convierte las proteínas en péptidos, y las lipasas transforman algunos triglicéridos en ácidos grasos, diglicéridos y monoglicéridos. De esta manera, el quimo que llega al intestino delgado contiene carbohidratos, proteínas y lípidos digeridos parcialmente. La digestión de estas sustancias se completa gracias a la acción conjunta del jugo pancreático, bilis y jugo intestinal en el intestino delgado.

2.2.4 Microflora del tracto gastrointestinal humano.

El tracto gastrointestinal humano es el lugar de digestión de los alimentos, se compone de estómago, intestino delgado y grueso (Figura 4). El estómago puede considerarse una barrera microbiológica contra la entrada de bacterias extrañas en el tracto gastrointestinal, dado que el pH de los fluidos del estómago es de 2.0.

El intestino delgado está dividido en dos partes: el duodeno y el íleon. El yeyuno conecta las dos partes. El primero adyacente al estómago, es ligeramente ácido. Desde el duodeno al íleon, el pH se hace progresivamente menos ácido y aumenta el número de bacterias. En el íleon, las bacterias se encuentran en la cavidad intestinal mezcladas con el material digestivo. Son habituales los recuentos celulares de 10^5 - 10^7 por gramo.

En el colon las bacterias están presentes en grandes cantidades y utilizan como nutrientes algunos productos de la digestión de los alimentos. El recuento total de aerobios facultativos (*Escherichia coli*) son por lo general inferiores a 10^7 células por gramo del contenido intestinal. La actividad de los aerobios facultativos consume todo el oxígeno presente, convirtiendo el ambiente del intestino grueso a estrictamente aerobio y favorable para el crecimiento de anaerobios obligados como especies de *Clostridium* y *Bacteroides*, los recuentos van de 10^{10} - 10^{11} células/g del contenido intestinal (Cuadro 3). La microbiota intestinal en el hombre también puede variar dependiendo de la dieta (Madigan *et al.*, 2004).

Cuadro 3. Microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal del ser humano.

Fuente: Madigan *et al.*, 2004.

Lugar anatómico	Microorganismos
Boca	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Actinomyces</i> .
Tracto gastrointestinal	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> .

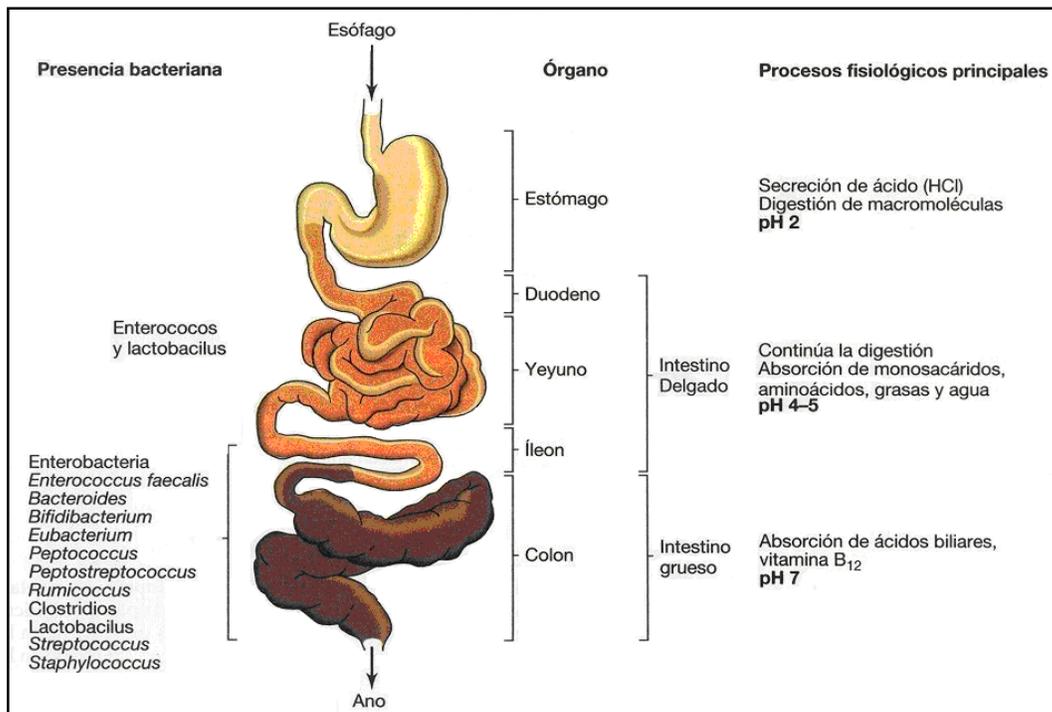


Figura 4. Esquema del tracto gastrointestinal humano mostrando funciones y la distribución microorganismos no patógenos

Fuente: Madigan et al., 2004.

Como se ha mencionado previamente, la acidez y bilis hepática son los principales responsables de la disminución de la viabilidad de las bacterias lácticas durante su trayecto en el tracto gastrointestinal humano, es por ello que se han diseñado sistemas que simulen dichas condiciones, además algunos incluyen técnicas de inmovilización celular para brindar mayor protección a las bacterias probióticas y lograr que lleguen viables a su sitio de acción en las cantidades adecuadas para ejercer su efecto benéfico en el organismo humano.

2.3 Inmovilización celular.

La inmovilización celular es un proceso en el que se localiza a las células en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que protegen a las células y retienen su actividad, en algunos casos, pueden ser reutilizadas.

Como ventajas del empleo de células inmovilizadas destacan:

- El aumento de la estabilidad de las células.
- Protección frente a las condiciones a las que son sometidas.
- Uso de diferentes soportes de inmovilización, dependiendo el proceso.

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos categorías: *Retención física* y *Unión química* (Arroyo, 1998).

2.3.1 Unión química.

Unión a soportes. Se debe procurar que la inmovilización disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Dentro de esta categoría se encuentra:

- Adsorción: los factores que influyen en la adsorción son el pH del medio, la fuerza iónica, el diámetro del poro y la presencia de iones.
- Unión covalente: se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas.

2.3.2 Retención física.

La retención física incluye técnicas como atrapamiento y microencapsulación celular.

Atrapamiento celular. Consiste en la retención física de las células en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la célula en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico.

Microencapsulación celular. En esta técnica, las células están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto.

En la industria de los alimentos, se emplean soportes orgánicos no tóxicos. La familia de polisacáridos más conocida por sus aplicaciones como gelificante químico es la de los alginatos.

2.3.2.1 Alginato de sodio.

Alrededor de las algas surgió una gran industria para la extracción de polisacáridos solubles en agua, siendo las algas “Feofíceas” (algas marrones) y “Rodofíceas” (algas rojas) las principales plantas de agua salina utilizadas. Los alginatos son extraídos mayormente de tres especies de algas marrones: *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*, otras incluyen *Laminaria japónica*, *Eclonia maxima* y *Lesonia negrescens*. La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos (Pavez *et al.*, 2005).

El algín (la sal sódica de ácido algínico), o la algina (que engloba al ácido algínico, sus sales y derivados) proceden de las algas marrones. El alginato es uno de los hidrocoloides más utilizados en la industria alimentaria, fue descubierto por el químico galés Stanford en 1881 (Santacruz *et al.*, 2005) y es muy abundante en la naturaleza.

El ácido algínico se forma a partir del ácido β -D-manurónico (M) o de su epímero C-5, el ácido α -L-gulurónico (G), monómeros que se unen para formar largas moléculas lineales con enlaces glicosídicos (1 \rightarrow 4), dando lugar a la estructura secundaria (Figura 5).

Las propiedades del alginato vienen dadas por las proporciones relativas de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico y de su secuencia en la cadena. Los residuos monoméricos M y G se unen en secciones homopoliméricas de bloques M y bloques G, o bloques heteropoliméricos con cadenas alternantes (MGMGMG). Los monómeros tienden a encontrar la estructura energética más favorable dentro de la cadena del polímero. De esta forma, en el bloque G-G, es la silla 1C_4 , la que forma un enlace glicosídico α -(1,4). Para M-M, es la silla 4C_1 la que se une con un enlace glicosídico β -(1,4). En los bloques M-M se produce un enlace ecuatorial/ecuatorial, y en grupos M-G el enlace que se da es ecuatorial/axial, debido a la posición del grupo carboxílico.

La consecuencia de esto es un polímero con estructura en zig-zag en las regiones de bloque G, y un polímero de cadena más lineal en las regiones de bloque M, lo que significa que los ángulos de enlace formados en los grupos G son más favorables para la unión electrostática con cationes polivalentes, y éstos tienen mayor tendencia que los bloques M a formar geles, mientras que las regiones de bloque MG presentan una linealidad intermedia.

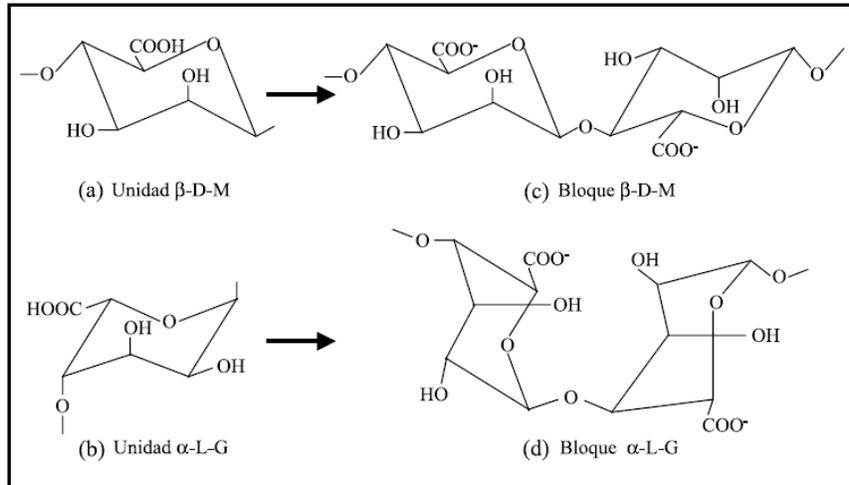


Figura 5. Estructura del alginato, (a) y (b) monosacáridos, ácido- β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, respectivamente, y (c) y (d) unidades que se repiten en cadena.

Fuente: Santacruz et al., 2005.

Cuando se añade una sal de catión polivalente a la disolución del alginato, aparece instantáneamente un gel como consecuencia de la interacción electrostática entre el catión y los grupos iónicos y polares del alginato, la cual se ve favorecida por la conformación en zigzag de sus cadenas. En la Figura 6 se ilustra esquemáticamente la formación del gel debido a la unión electrostática producida en presencia de iones calcio.

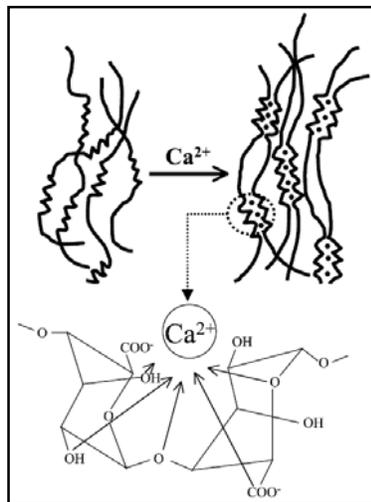


Figura 6. Mecanismo de gelificación del alginato en presencia de cationes de calcio.

Fuente: Santacruz et al., 2005.

2.3.3 Inmovilización de bacterias lácticas.

Las técnicas de inmovilización de microorganismos probióticos en geles se han utilizado efectivamente con el objetivo de proteger a las bacterias. Como se ha mencionado con anterioridad, la inmovilización es un proceso mediante el cual se forman partículas que contienen un ingrediente activo y se cubren con otro material que le provee protección. La composición del soporte usualmente determina las propiedades funcionales de las microcápsulas (Sultana *et al.*, 2000).

Los métodos de encapsulación se han utilizado para incrementar la supervivencia y liberación de bacterias. Se han desarrollado métodos de encapsulación para su uso en fermentaciones y la adición en alimentos.

La inmovilización de bacterias lácticas se ha empleado para proteger a las células de las condiciones adversas cuando atraviesan el tracto gastrointestinal humano, se han utilizado soportes de gelatina, κ -carragenina, alginato de sodio entre otros. En el Cuadro 4 se enlistan algunos efectos benéficos derivados de la microencapsulación de cultivos lácticos en matrices de alginato. Los beneficios se deben a la producción de probióticos y a su uso como nutracéuticos en la industria de los alimentos.

Cuadro 4. Efectos benéficos en productos con probióticos encapsulados.

Modificado de: Champagne & Fustier, 2007.

Beneficio	Producto
Mayor estabilidad cuando son sometidas a condiciones gástricas y soluciones de bilis hepática.	Nutracéutico
Protección contra bacteriófagos	Leches fermentadas
Protección contra levaduras contaminantes	Yogurt, mayonesa y leche
Mayor estabilidad durante almacenamiento.	Helado y jugo de arándano
Mayor viabilidad en condiciones de congelación	

Existen evidencias científicas del uso de esta tecnología para proteger a las células de las condiciones presentes en el tracto gastrointestinal humano (Cuadro 5), tal es el caso de las investigaciones realizadas por Sultana *et al.* (2000), Sun & Griffiths (2000), Favaro-Trindade & Grosso (2002), Lian *et al.* (2003) y Ainsley *et al.*, (2005).

En estudios recientes se evaluó con mayor grado de complejidad la inmovilización de bacterias probióticas, Cruz (2007) evaluó la viabilidad de *Lactobacillus delbluecki* subsp.

bulgaricus bajo condiciones gástricas y duodenales humanas *in vitro*. Dentro de las variables que introdujo al sistema se encuentran la técnica de inmovilización celular por atrapamiento empleando como soporte alginato de sodio y en algunos tratamientos inulina asociada al soporte de inmovilización. Observó que la viabilidad de las bacterias probióticas después del tratamiento gástrico y duodenal humano *in vitro* fue mayor cuando se utilizó alginato de sodio e inulina adicionada al soporte de inmovilización comparado con las células libres.

Annan *et al.* (2008) emplearon una técnica novedosa de doble encapsulamiento utilizando alginato de sodio y gelatina para inmovilizar una cepa de *Bifidobacterium adolescentis*, las microesferas fueron expuestas a condiciones gastrointestinales simuladas, se comparó la viabilidad de las células que fueron inmovilizadas contra las células libres, encontrando un mayor número de supervivencia en aquellas que fueron tratadas con el método de encapsulación.

2.4 Simulación del tracto gastrointestinal humano *in vitro*.

Se ha demostrado científicamente que los alimentos que contienen microorganismos probióticos al ser consumidos por el ser humano, deben tener una concentración de bacterias viables mayor a 10^7 UFC/mL, sin embargo debido a la sensibilidad que estas bacterias presentan a las condiciones cuando recorren el tracto gastrointestinal humano, específicamente a los ácidos estomacales y a la bilis hepática, es difícil que lleguen viables a su sitio de acción en un número suficiente para ejercer su efecto probiótico. Es por ello que se han desarrollado sistemas que evalúan el comportamiento de los microorganismos con características probióticas, además estos sistemas permiten seleccionar a los microorganismos que son más resistentes a las condiciones simuladas como la acidez estomacal o la bilis secretada en el hígado, una vez seleccionados los microorganismos más resistentes, son introducidos a productos comerciales garantizando que pueden mantener su viabilidad en mayor cantidad.

Con la finalidad de proteger a las bacterias lácticas probióticas se han empleado técnicas de inmovilización celular para evitar que la viabilidad celular disminuya drásticamente a causa de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal humano, cuando estos microorganismos son ingeridos mediante bebidas lácteas fermentadas; para realizar una evaluación de las esferas de inmovilización conteniendo microorganismos probióticos, se someten a condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. Es importante mencionar que la inmovilización celular se realiza en soportes orgánicos, los cuales, deben presentar estabilidad ante las condiciones ácidas del estómago, enzimas digestivas y sales biliares, por mencionar algunas; sin embargo, el soporte debe tener la capacidad de degradarse a lo largo del recorrido por el tracto gastrointestinal o bien, presentar características difusivas para que las células contenidas en el soporte puedan ser liberadas y actúen en el tejido epitelial del colon humano y de esta manera el huésped obtenga los beneficios del consumo de un alimento con características probióticas.

Recientemente se han desarrollado sistemas complejos para el estudio de los parámetros que afectan la viabilidad de las bacterias probióticas, dichos sistemas se realizan *in vitro* evaluando diferentes cepas con características probióticas y modificando algunas condiciones que se presentan en el tracto gastrointestinal humano, algunos de ellos se describen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Resumen de sistemas en donde se ha evaluado el comportamiento de probióticos en condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

Microorganismos	Condiciones gástricas	Condiciones intestinales	Información adicional	Referencias
<i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> .	pH 2.0, 0.3% (p/v) de pepsina, 1 g/L de mucina.	pH 8.0, 0.1% de pancreatina, 1 g/L de mucina y sales biliares.	Temperatura controlada (37°C), se adicionaron proteínas de leche al sistema.	Charteris <i>et al.</i> (1998)
<i>Bifidobacterium</i> .	Únicamente se evaluó el efecto de sales biliares.	0.06 a 0.15% (p/v) de sales biliares, pH 7.0.	Se utilizaron heces humanas para aislar especies de <i>Bifidobacterium</i> .	Chung <i>et al.</i> (1999)
<i>L. acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i> spp. encapsulado en matriz de alginato.	pH: 2.0, 3.0 y 4.0. Tiempo de incubación: 3 horas.	pH: 4.5. Bilis porcina: 1 a 2 %. Tiempo de incubación: 3 horas.	Experimentos realizados a 37°C.	Sultana <i>et al.</i> (2000)
<i>B. infantis</i> libre e inmovilizadas en una mezcla de gomas gelana y xantana.	pH: 1.5, 2.0 y 2.5. Toma de muestra al tiempo 0, 15, 30, 60 y 120 minutos.	Únicamente se estudió el efecto de las condiciones gástricas.	Experimentos realizados a 37°C.	Sun & Griffiths (2000)
<i>L. acidophilus</i> y <i>B. lactis</i> encapsulados en celulosa.	pH 2.0	0.5 y 2% de bilis hepática.	Experimentos realizados a 37°C. Se realizó análisis microestructural mediante microscopía electrónica de barrido ambiental.	Favaro-Trindade & Grosso (2002)
<i>B. infantis</i> y <i>B. longum</i> libres e inmovilizadas en gelatina, goma arábica y almidón.	pH: 2.0 y 3.0 y 3 g/L de pepsina	Solución de bilis hepática: 0.5 y 2 % (p/v).	Metodología basada en Charteris <i>et al.</i> (1999).	Lian <i>et al.</i> (2003)

Cuadro 5. Resumen de sistemas en donde se ha evaluado el comportamiento de probióticos en condiciones gastrointestinales humanas in vitro (continuación).

Microorganismos	Condiciones gástricas	Condiciones intestinales	Información adicional	Referencias
<i>Lactobacillus</i> y <i>bifidobacterium</i>	Se diseñó un simulador con dos biorreactores que representaron el estómago y duodeno humano, se incluyó un alimento como parte del diseño. El pH, la temperatura y la agitación se controlaron durante todo el proceso. Para las secreciones duodenales se utilizó una solución de bilis.		La temperatura fue controlada a 37°C con agua recirculada. El tiempo de tratamiento fue de 90 minutos.	Mainville <i>et al.</i> (2005)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> inmovilizado empleando proteína de suero y Ca ²⁺ como agente gelificante.	Basado en Mainville <i>et al.</i> (2005)		La estructura del gel y la distribución de las bacterias en la matriz fueron examinadas mediante microscopía electrónica de barrido ambiental.	Ainsley <i>et al.</i> (2005)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> libres e inmovilizadas en alginato de sodio.	Se evaluó la acidez estomacal a diferentes valores de pH: 2.4 y 4.2. Tiempo de tratamiento: 30 minutos.	Se empleó una solución de bilis hepática 0.3% (p/v), se simularon movimientos peristálticos. Tiempo de tratamiento: 60 minutos.	Se estudió el efecto de la adición de inulina en el soporte de inmovilización. Se incluyó un alimento tipo en la simulación.	Cruz (2007)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> libres e inmovilizadas en doble soporte de alginato y gelatina.	0.3 g/L de pepsina, pH 2.0. T	Secreciones intestinales con pH de 7.4.	El tiempo de tratamiento fue de 120 minutos. La temperatura se mantuvo constante en 37°C.	Annan <i>et al.</i> (2008)

Se ha evidenciado científicamente que el soporte de inmovilización celular protege a las células cuando se someten a condiciones del tracto gastrointestinal humano simuladas *in vitro* (Sultana *et al.*, 2000; Sun & Griffiths, 2002; Favaro-Trindade & Grosso, 2002; Lian *et al.*, 2003; Cruz, 2007; Annan *et al.*, 2008), no obstante, en muy pocas investigaciones se han introducido al sistema alimentos con la finalidad de evaluar su efecto protector y su repercusión en la viabilidad de las bacterias estudiadas, más aún, los alimentos tratados son bebidas lácteas fermentadas y únicamente Cruz (2007) evaluó un alimento que incluye fruta y leche.

En los últimos años se han realizado investigaciones que dejan claro que las bacterias lácticas probióticas son sensibles a ácidos estomacales y a bilis hepática principalmente, también es claro que la inmovilización celular protege a las células de estas condiciones y además su viabilidad puede llegar al sitio de acción en las concentraciones necesarias, por eso es importante que se introduzcan más elementos al sistema para acercarnos más a lo que ocurre en el organismo humano. Si se evalúan diferentes alimentos, especialmente los consumidos regularmente por la población mexicana, se puede saber cuál es el efecto directo o indirecto sobre la viabilidad de los microorganismos probióticos, además los resultados de dicha investigación podrían ser útiles no solo para el desarrollo de nuevos productos con cepas resistentes a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal humano, sino también ayudarían a conocer con qué alimentos sería recomendable consumir una bebida láctea fermentada con características probióticas y con cuáles no sería tan deseable porque su viabilidad se vería afectada.

Finalmente, para evaluar la viabilidad de un microorganismo con características probióticas es importante determinar su resistencia a las condiciones gástricas e intestinales del cuerpo humano, así como emplear técnicas que permitan mantener su viabilidad cuando se someten a las condiciones antes mencionadas, es decir someter a las células a una inmovilización empleando un soporte orgánico o bien, emplear una mezcla de alimentos con la finalidad de proteger al microorganismo. Esto es importante porque actualmente existe una gran variedad de productos lácteos fermentados elaborados a partir de microorganismos probióticos como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, a pesar del beneficio reportado por el consumo de estos alimentos, se sabe que es difícil que logren mantener la concentración mínima necesaria para ejercer un efecto benéfico en los consumidores (Begley *et al.*, 2005; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2005), es por ello que este tipo de investigaciones presenta las evidencias necesarias para saber si es conveniente consumir estos productos y más aún saber combinarlos para obtener el mayor beneficio posible.

2.5 Análisis de la microestructura de microorganismos inmovilizados.

El estudio de la microestructura de las bacterias que han sido inmovilizadas y tratadas bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro* es importante para el entendimiento del desgaste del soporte y para relacionar la pérdida de viabilidad de las bacterias a lo largo del tratamiento al que han sido sometidas.

Entender la función de los soportes sobre las bacterias inmovilizadas en alginato o algún otro material utilizado es importante porque evidencia el rol protector del soporte sobre las bacterias bajo las condiciones a las que son tratadas. Es importante conocer las técnicas disponibles para la examinación y análisis de las bacterias inmovilizadas, dichas técnicas actualmente son utilizadas por investigadores del área de bioprocesos para caracterizar cualitativa y cuantitativamente la microestructura, proveyendo información valiosa.

2.5.1 Técnicas de microscopía.

Las técnicas de microscopía son utilizadas para el estudio de la microestructura de las bacterias lácticas, dentro de las más comunes para su estudio se encuentran la microscopía de luz y la microscopía electrónica.

La microscopía de luz tiene limitada la magnificación, pero debido a la larga distancia focal permite la observación de piezas de gran tamaño. Las técnicas preparativas son rápidas y no originan muchas alteraciones de la muestra. La información obtenida del microscopio es conveniente para la cuantificación usando el software para el análisis de imágenes.

Existen dos tipos de microscopía electrónica que brindan datos morfológicos y analíticos de sistemas biológicos. Dentro de los microscopios electrónicos de barrido (MEB) se encuentra el microscopio electrónico de barrido ambiental o de bajo vacío (MEBA) en donde la muestra no requiere estar completamente seca y conductiva; este microscopio permite variar el medio ambiente de la muestra a través de presión, temperatura y composición de gas; permite la examinación en su estado natural. Por otro lado, en el microscopio electrónico de transmisión (MET) las muestras requieren alto vacío, deben estar secas y por lo general que éstas sean conductivas, es por ello que el uso de este microscopio en el estudio de los cambios estructurales de un estado hidratado se ve limitado (Aguilera, 2003).

Favaro-Trindade & Grosso (2002), inmovilizaron células de *L. acidophilus* y *B. lactis* en celulosa, posteriormente las células fueron tratadas en condiciones gástricas e intestinales *in vitro*, las microcápsulas fueron evaluadas utilizando MEB. Ainsley *et al.* (2005) evaluaron

las microcápsulas de *Lactobacillus rhamnosus* inmovilizado empleando proteínas de suero y Ca^{2+} como agente gelificante, la estructura del gel y la distribución de las bacterias en la matriz fue examinado mediante microscopía electrónica de barrido ambiental. En 2008 Allan-Wojtas *et al.*, evaluaron la microestructura de microcápsulas, las partículas que contenían bacterias probióticas inmovilizadas en soporte de alginato fueron comparadas con aquellas que no contenían microorganismos, esto se realizó utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido ambiental (MEB).

Las técnicas empleadas fueron útiles para evaluar cualitativamente el soporte en presencia o ausencia de bacterias probióticas, sin embargo para un estudio más profundo es importante hacer un análisis cuantitativo, lo cual se logra mediante el análisis de imágenes.

2.5.2 Análisis de imágenes.

En los años recientes, los métodos de análisis de imágenes han sido aplicados para la evaluación cuantitativa de la morfología, estructura y microestructura de diferentes tipos de alimentos y materiales biológicos. Es una técnica no destructiva, permite realizar mediciones *in situ*; además de que puede automatizarse, se obtiene información diversa a partir de la toma de una sola medida y puede arrojar información sobre la textura y morfología de las superficies. De acuerdo a Du & Sun (2002) el análisis digital de imágenes involucra 5 etapas (Figura 7):

- *Captura de la imagen.* Se produce la imagen digital que puede ser capturada usando una cámara digital o un escáner.
- *Pre-procesamiento.* Se realizan modificaciones a la imagen para resaltar los objetos de interés para el análisis. Las estrategias consisten en realizar variaciones del contraste, brillo e intensidad, además de la eliminación de ruido o la identificación de regiones específicas.
- *Segmentación de la imagen.* Se extrae la parte de la imagen donde se encuentra la información de interés para el estudio.
- *Extracción de parámetros.* Hace referencia a la extracción de las características particulares que permiten analizar los objetos de estudio, por ejemplo área, circularidad, factor de forma, textura, color, entre otros.
- *Clasificación.* Se utiliza para identificar objetos en clases o categorías, lo que implica la comparación de los parámetros previamente obtenidos con los que han sido estudiados por otros autores o bien, mediante otro criterio. Los tres métodos más utilizados en la literatura son la clasificación estadística, las redes neuronales y la lógica difusa.



Figura 7. Etapas del análisis de imágenes.

La información extraída es útil para trasladar la complejidad del sistema biológico a datos numéricos para después ser analizado y para mejorar el entendimiento de la relación estructura-función de sistemas complejos, tales como materiales biológicos y alimentos. La clave para la cuantificación de la irregularidad de superficie y contorno en alimentos está relacionado con la evaluación de la dimensión fractal extraída a partir de las características estructurales y microestructurales medidas (Santacruz-Vázquez *et al*, 2007). Por lo tanto el análisis fractal es importante en la examinación de la arquitectura y propiedades estructura-funcionalidad de alimentos.

Esta herramienta se ha empleado en el estudio de diversos alimentos (Cuadro 6), sin embargo a pesar que existen evidencias científicas del uso de técnicas de microscopía electrónica para evaluar probióticos encapsulados tratados en diferentes condiciones, existen pocas evidencias científicas en las cuales se haya recurrido al análisis de imágenes.

Cuadro 6. Resumen de aplicaciones del análisis de imágenes en la evaluación de alimentos.

Productos	Aplicaciones	Referencias
Manzana	Defectos en la segmentación	Leemans <i>et al.</i> (1999)
Cereza	Analizar la forma de la fruta	Beyer <i>et al.</i> (2002)
Plátano	Determinación de la senescencia	Quevedo <i>et al.</i> (2008)
Manzana	Evaluación del encogimiento y color de cortes circulares de manzana durante la deshidratación	Fernández <i>et al.</i> (2005)
Chocolate	Cambios en el color de la superficie durante su almacenamiento	Briones & Aguilera (2005)
Arroz	Clasificación por calidad	Wan <i>et al.</i> (2002)
Carne	Utilizando parámetros de textura como indicadores de calidad	Li <i>et al.</i> (1999)
Puerco	Evaluación de color	Lu <i>et al.</i> , (2002)
Queso	Evaluación de las propiedades funcionales	Wang & Sun (2001)
Embutidos	Estimación de características sensoriales	Ioannou <i>et al.</i> (2002)

2.5.2.1 Parámetros morfológicos.

Existen diferentes parámetros para evaluar la morfología y el tamaño de los objetos. A partir de estos parámetros se puede medir desde una imagen digital el perímetro, el área, la circularidad, el factor de forma, el diámetro, tortuosidad, entre otros. Algunos de los más utilizados en las técnicas de análisis de imágenes para describir la forma y tamaño de los objetos son las siguientes (Aguilera, 2001):

Perímetro.

El perímetro de una imagen digital es la medida del número de píxeles del contorno de una imagen binaria. Este parámetro puede utilizarse para describir la sinuosidad de un objeto.

Área.

El área es definida como el plano bidimensional con contornos definidos. Es la suma de los píxeles de una región definida. Este parámetro puede utilizarse para describir el tamaño global de un objeto.

Diámetro Feret (Feret D).

Este parámetro describe la forma de un objeto. Es el diámetro de un objeto circular ficticio que tiene la misma área que el objeto de medición. Este parámetro puede utilizarse para describir el encogimiento global de un objeto.

Circularidad.

Es definido como 4π multiplicado por el área y dividido entre el perímetro al cuadrado. Un círculo perfecto tiene un valor de factor de forma de 1.0 y una línea tiene un valor de 0.

$$\text{Circularidad} = \frac{4\pi \cdot \text{Área}}{\text{Perímetro}^2}$$

2.5.2.2 Parámetros de textura.

Existen diferentes parámetros para evaluar la textura de una imagen, por ejemplo Haralick, *et al.* (1973) proponen determinar 14 diferentes parámetros desde una imagen en escala de grises; basta solo unos cuantos para dar un valor numérico a la complejidad de la imagen, entre estos parámetros se encuentran la entropía, el contraste, el segundo momento angular, entre otros. De estos parámetros la entropía provee una adecuada descripción de

la complejidad de una imagen. Por otro lado, la dimensión fractal también es útil para describir la tortuosidad de contornos de objetos o la rugosidad de superficies.

Entropía digital.

La entropía de una imagen es una medida del desorden o aleatoriedad de la distribución de píxeles de una imagen, es un indicador de la complejidad de la misma (Fernández *et al*, 2005). Una imagen compleja presenta mayores valores de entropía mientras que una imagen con una distribución de píxeles ordenada o de menor complejidad proporciona valores de entropía menores (Figura 8). La entropía de una imagen puede estimarse desde una matriz de Co-ocurrencia en escala de grises (GLCM) por sus siglas en inglés (Grey Level Matrix Co-occurrence). La medición de la entropía puede llevarse a cabo en referencia a un píxel central y haciendo el barrido a diferentes ángulos (0° , 90° , 180° y 270°) y generalmente en las dos direcciones (vertical y horizontal) como se muestra en la Figura 8, obteniéndose cuatro valores de entropía, una para cada ángulo.

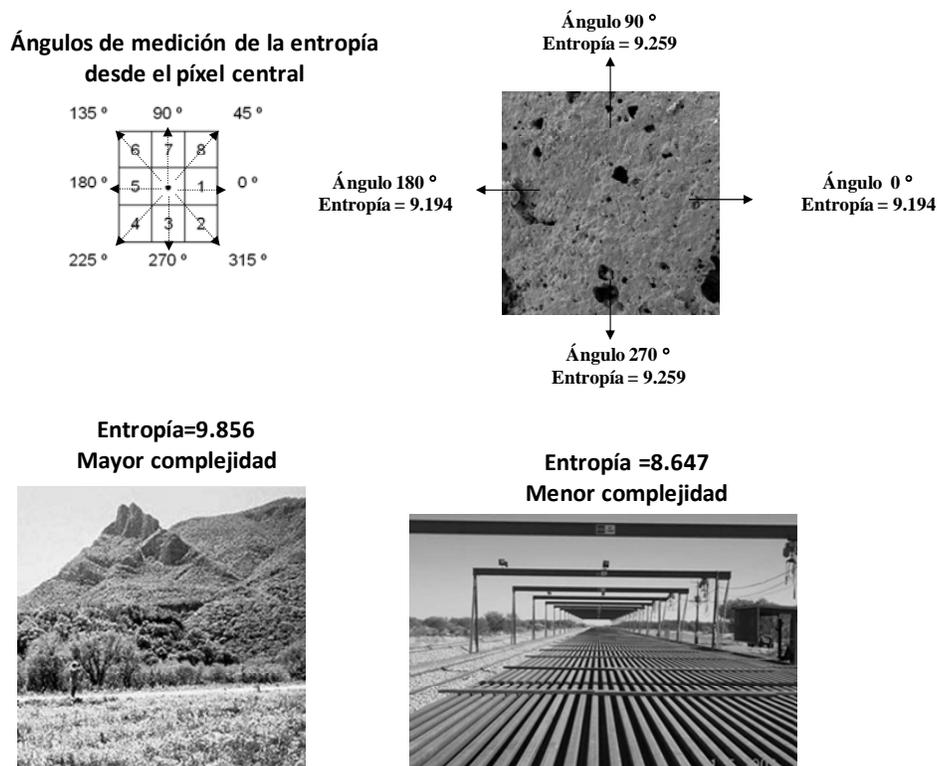


Figura 8. Ángulos posibles de medición de la entropía desde la matriz de Co-ocurrencia en escala de grises (GLCM) y diferencias entre los valores de entropía medidas a diferentes ángulos y en diferentes tipos de imágenes.

Dimensión fractal de textura.

La dependencia espacial de los elementos de una imagen (por ejemplo, píxeles en “x” y “y” de la imagen) en función de los valores de los píxeles en escala de grises provee una matriz tridimensional que está relacionada con la textura de la imagen. El método de conteo de cajas o “box-counting” para la determinación de la dimensión fractal de una imagen fue propuesto por Sarkar & Chaudhuri (1994), donde cada conjunto de coordenadas x, y tiene una tercera dimensión asociada (coordenada z) representando la intensidad del píxel (escala de grises).

Algunos patrones tales como contornos de células, estructuras y texturas biológicas con propiedades fractales son difíciles de describir al usar medidas euclidianas como diámetro o longitud, pero se pueden cuantificar usando medidas de rugosidad o tortuosidad de los objetos. Por lo que el concepto de dimensión fractal resulta apropiado para su mejor descripción (Mandelbrot, 1977). Para superficies, la textura fractal o dimensión fractal de textura resulta útil para medir la rugosidad de las imágenes. De acuerdo con Quevedo *et al.* (2002) un método para determinar la Textura Fractal (TF) de una imagen puede ser efectuado a través del análisis de la Intensidad de la Superficie (IS) de la imagen, que puede ser obtenida al graficar en tres dimensiones las coordenadas cartesianas de los píxeles (x, y) con respecto al nivel de grises de cada píxel (z). Cuando la IS es caracterizada usando el concepto de dimensión fractal (DF), la TF es llamada textura fractal de la imagen y si la DF es evaluada usando el algoritmo Shifting Differential Box-Counting (SDBC), la DF es denotada como DF_{SDBC} (Wen-Shiung *et al.*, 2003). La textura fractal de una imagen puede ser evaluada usando la ley de potencia y el algoritmo antes mencionado para estimar la TF o la DF_{SDBC} . Altos valores de DF_{SDBC} indican que las imágenes son más rugosas, mientras que bajos valores están asociados a imágenes más lisas.

III. JUSTIFICACIÓN.

En los últimos años se ha desarrollado un creciente interés por el consumo y producción de alimentos probióticos; México está inmerso en ese proceso dinámico científico y tecnológico, específicamente en el consumo de alimentos lácteos fermentados a partir de microorganismos considerados probióticos como bifidobacterias y lactobacilos. De acuerdo con “El sector alimentario en México” publicado por el INEGI en el año 2007, el volumen de producción de las bebidas lácteas fermentadas ha incrementado en un 60% a lo largo de 6 años debido a que el consumo de alimentos probióticos tiene efectos benéficos a la salud como la reducción de intolerancia a la lactosa, disminución de infecciones gastrointestinales, producción de compuestos antimicrobianos, entre otros. Sin embargo, existen evidencias científicas que demuestran la sensibilidad de los microorganismos probióticos a las condiciones del tracto gastrointestinal humano, específicamente a los ácidos estomacales y a la bilis hepática.

Las empresas productoras de alimentos lácteos han aprovechado la divulgación que se ha hecho sobre el consumo de los alimentos probióticos y sus beneficios a la salud, es por eso que han desarrollado alimentos funcionales como yogurt o bebidas lácteas fermentadas adicionadas con fibra, frutas, vitaminas, e incluso con cápsulas con bacterias probióticas contenidas en ellas con la finalidad de obtener el mayor beneficio posible del alimento. El gran problema es que las empresas productoras de este tipo de alimentos hacen más énfasis en todos los beneficios que se pueden obtener al consumir sus productos pero no dejan claro que para que las bacterias ejerzan su efecto benéfico en el colon humano deben atravesar una serie de condiciones limitantes que disminuyen su viabilidad y además llegar en las concentraciones adecuadas.

Una bebida con características probióticas (por ejemplo el yogurt) contiene las bacterias en forma libre y es más probable que pierdan su viabilidad a causa de las condiciones del tracto gastrointestinal humano o no lleguen en las cantidades necesarias para ejercer su efecto benéfico en el organismo humano, es por eso que para determinar la viabilidad en estas condiciones, en el presente trabajo se hace una propuesta de una simulación del tracto gastrointestinal humano *in vitro*, además se propone la técnica de inmovilización celular por atrapamiento ya que se ha evidenciado científicamente que protege a las células ante las condiciones a las que son sometidas. Normalmente se consume una bebida con características probióticas acompañada de otro alimento, no en todas las ocasiones la mezcla favorece a las bacterias probióticas ya que en algunos casos se consume con alimentos que pueden perjudicar a estos microorganismos benéficos, por tal motivo en la

presente investigación se pretende adicionar a la simulación del tracto gastrointestinal humano *in vitro* diferentes alimentos con la finalidad de evaluar su efecto sobre la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum*. Este tratamiento nos puede dar una idea de lo que ocurre cuando se ingiere un desayuno, un alimento con picante, bebidas alcohólicas o café, ya que son los alimentos que generalmente se consumen en México y además este tratamiento nos da la posibilidad de realizar recomendaciones a la sociedad mexicana sobre cuál es la mejor combinación de alimentos para obtener todos los beneficios de un alimento con características probióticas.

IV. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Determinar la viabilidad de las células libres e inmovilizadas de *Bifidobacterium bifidum* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos.

- Determinar la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* bajo condiciones enzimáticas y fisicoquímicas *in vitro* similares a las del sistema digestivo humano.
- Determinar el efecto de diferentes alimentos y bebidas sobre la viabilidad de *B. bifidum*.
- Mediante técnicas de microscopía electrónica y análisis de imágenes, evaluar la morfología y la microestructura de la superficie y el interior del soporte de las partículas inmovilizadas utilizadas en la simulación del tracto gastrointestinal humano *in vitro*.

V. METODOLOGÍA.

5.1 Estrategia de trabajo.

Las etapas del proyecto se describen a continuación (Figura 9):

- Etapa 1. Selección del microorganismo.
- Etapa 2. Determinación de la viabilidad de *B. bifidum* bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.
- Etapa 3. Determinación de la viabilidad de *B. bifidum* en presencia de diferentes alimentos.
- Etapa 4. Análisis del soporte de inmovilización por microscopía electrónica y análisis de imágenes.
- Etapa 5. Análisis estadístico.

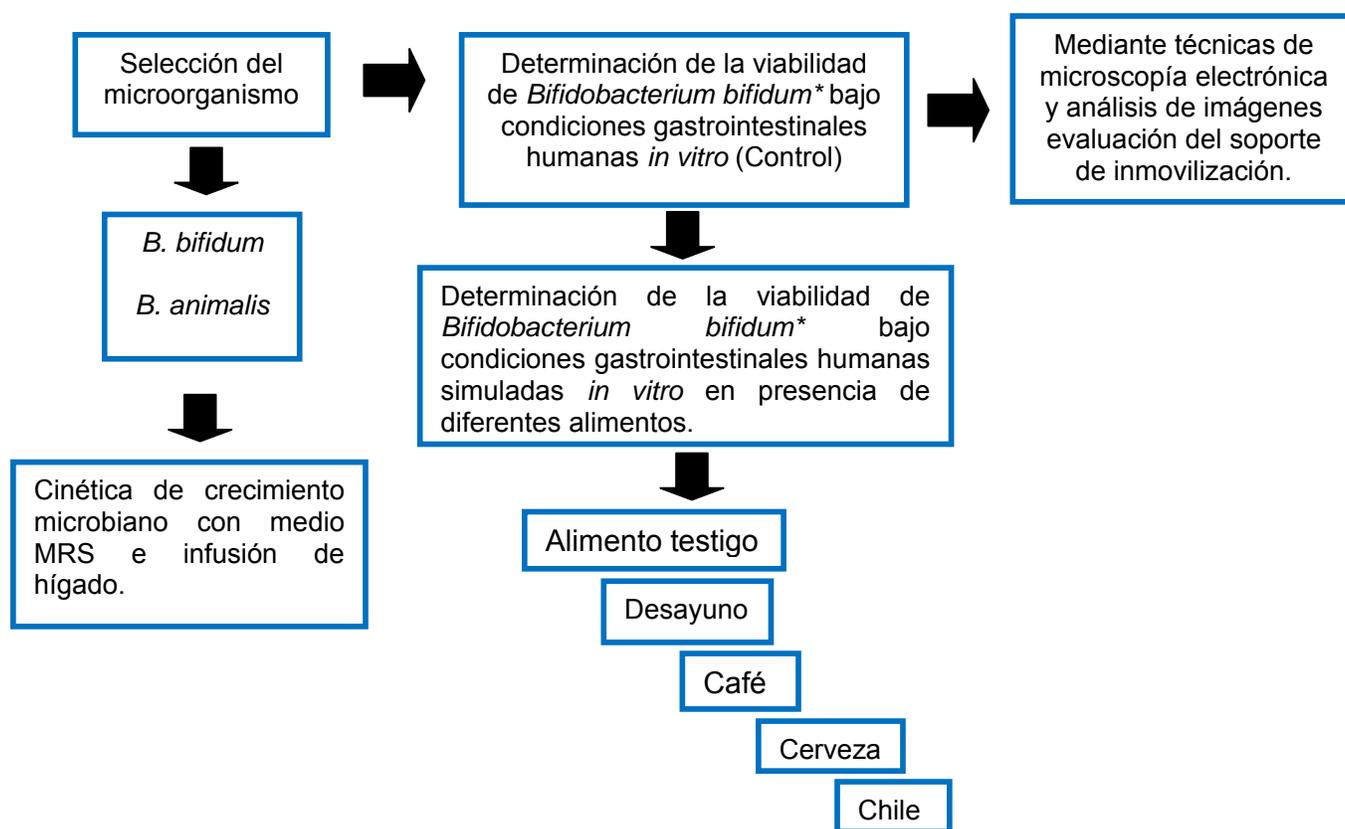


Figura 9. Estrategia de trabajo.

*La biomasa de *B. bifidum* se utilizó libre e inmovilizada en soporte de alginato de sodio.

5.2 Etapa 1. Selección del microorganismo.

Los criterios de la selección del microorganismo se basaron en las características del microorganismo, medio de cultivo, tiempo y temperatura de crecimiento. Se trabajó en la selección de la cepa considerando la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo como factor principal de elección (la temperatura de crecimiento debería ser muy cercana a la temperatura corporal humana dado que las células se sometieron a un tratamiento *in vitro* similar al del cuerpo humano) considerando los siguientes microorganismos:

- *Bifidobacterium bifidum* NRRL B-41410
- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* NRRL-B-41405.

Ambas cepas provenían del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. El proceso se inició por medio de la inoculación de liofilizados de *Bifidobacterium bifidum* NRRL B-41410 y *Blifidobacterium animalis* subsp. *lactis* NRRL-B-41405 en dos matraces con 100 mL de medio infusión de hígado, respectivamente. Los matraces semilla se incubaron a 37°C y 180 rpm, se realizaron pruebas para monitorear el crecimiento de cada cepa. Al cabo de una semana se observó crecimiento de *Bifidobacterium bifidum*, se realizó una tinción de Gram para verificar la pureza del cultivo y una cinética de crecimiento microbiano con el medio de cultivo recomendado por proveedores (infusión de hígado) y con un medio de cultivo alternativo que consistió en medio base MRS (Man Rogosa Sharpe) enriquecido con 0.05% de cisteína. Por otro lado, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* no mostró el mismo crecimiento que la otra cepa y se descartó su uso debido a que su temperatura óptima de crecimiento fue de 30°C.

Las cinéticas de crecimiento microbiano se realizaron con los medios de cultivo mostrados en el Cuadro 7 y 8.

Cuadro 7. Medio específico para *Bifidobacterium*.

Medio infusión de hígado	
Infusión de hígado (Difco)	35 g
Agua	1 L

Cuadro 8. Formulación del medio MRS adicionado con cisteína.

Reactivos	Cantidad
Peptona de caseína	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	10 g
Glucosa	20 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Fosfato ácido de potasio	2 g
Cisteína	500 mg
Sulfato de magnesio	200 mg
Sulfato de manganeso	50 mg
Tween 80	1 mL
Agua destilada	1 L

Las cinéticas de crecimiento microbiano se realizaron como se muestra en la Figura 10.

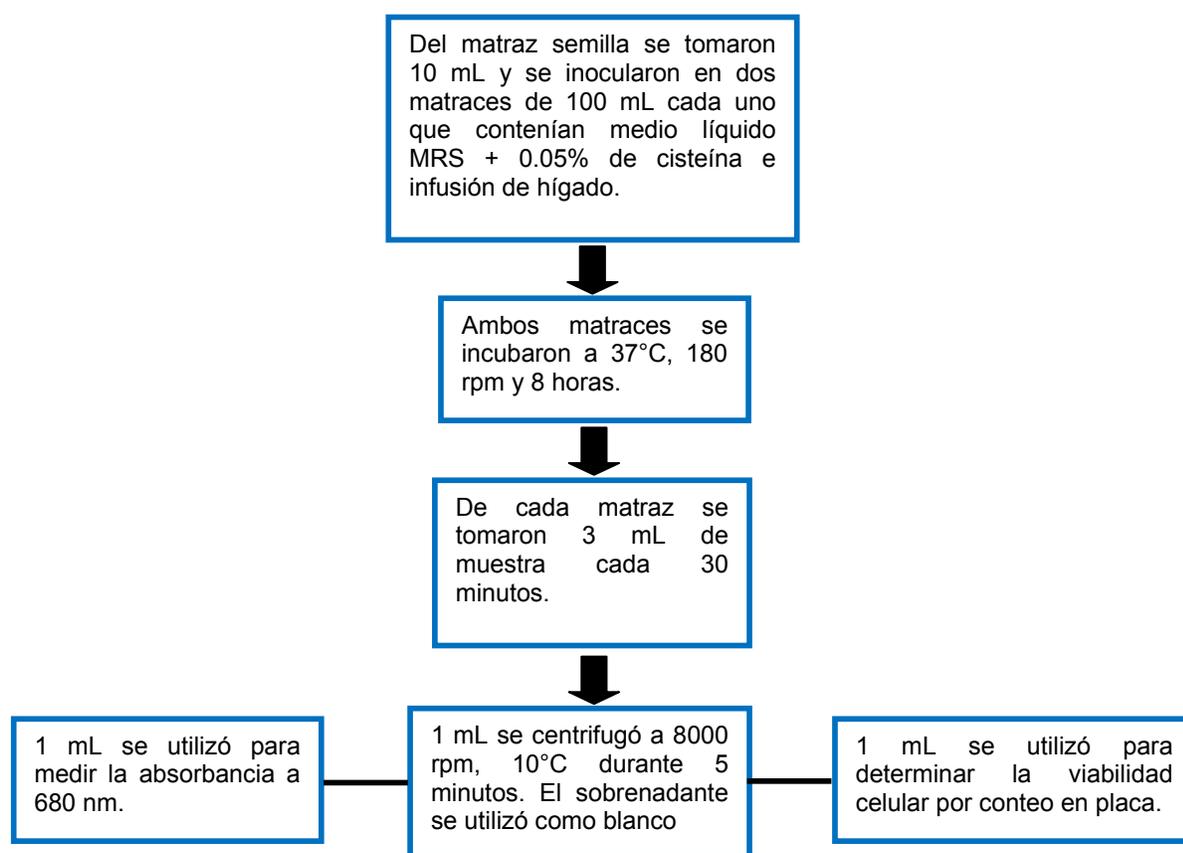


Figura 10. Diagrama de cinética de crecimiento microbiano.

Los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano permitieron decidir qué medio de cultivo era el ideal para los siguientes experimentos. Con medio líquido y sólido MRS adicionado con cisteína se obtuvo el mayor crecimiento microbiano en el menor tiempo, es por ello que se optó por utilizarlo en todas las cinéticas posteriores.

5.3 Etapa 2. Determinación de la viabilidad de *B. bifidum* bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

La simulación *in vitro* del tracto gastrointestinal humano se llevó a cabo en dos biorreactores enchaquetados de vidrio cuya capacidad fue de 500 mL, la tapa contaba con entradas para suministrar las soluciones que se utilizaron a lo largo del proceso. Las condiciones de esterilidad se lograron realizando las cinéticas de pérdida de viabilidad en una campana de flujo laminar.

Las condiciones de la simulación fueron las siguientes: para las secreciones gástricas se utilizó solución salina al 0.5% (p/v), 4 g/L de mucina, 3 g/L de pepsina y el pH se ajustó a 2.0 con HCl 5 M; las secreciones pancreáticas estaban compuestas por solución salina al 0.5% (p/v), 4 g/L de mucina, 1 g/L de pancreatina, bilis al 0.3% (p/v) y el pH se ajustó a 6.8 con NaOH 1.5 M; se simularon movimientos peristálticos intestinales con una bomba peristáltica a 50 rpm. La temperatura se controló durante todo el proceso a 37°C mediante un baño de temperatura controlada que conectaba ambos biorreactores (Figura 11 y 12).

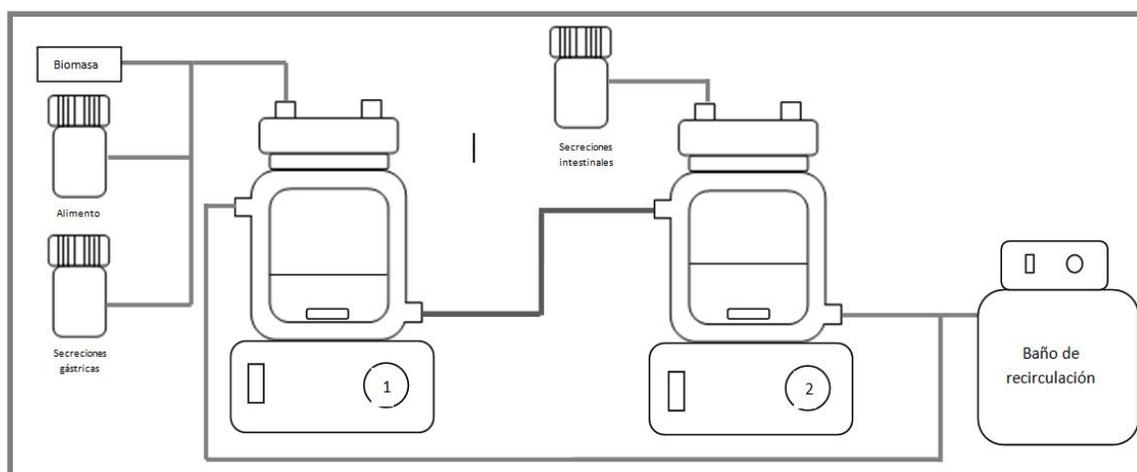


Figura 11. Esquema de la simulación del tracto gastrointestinal humano *in vitro*.

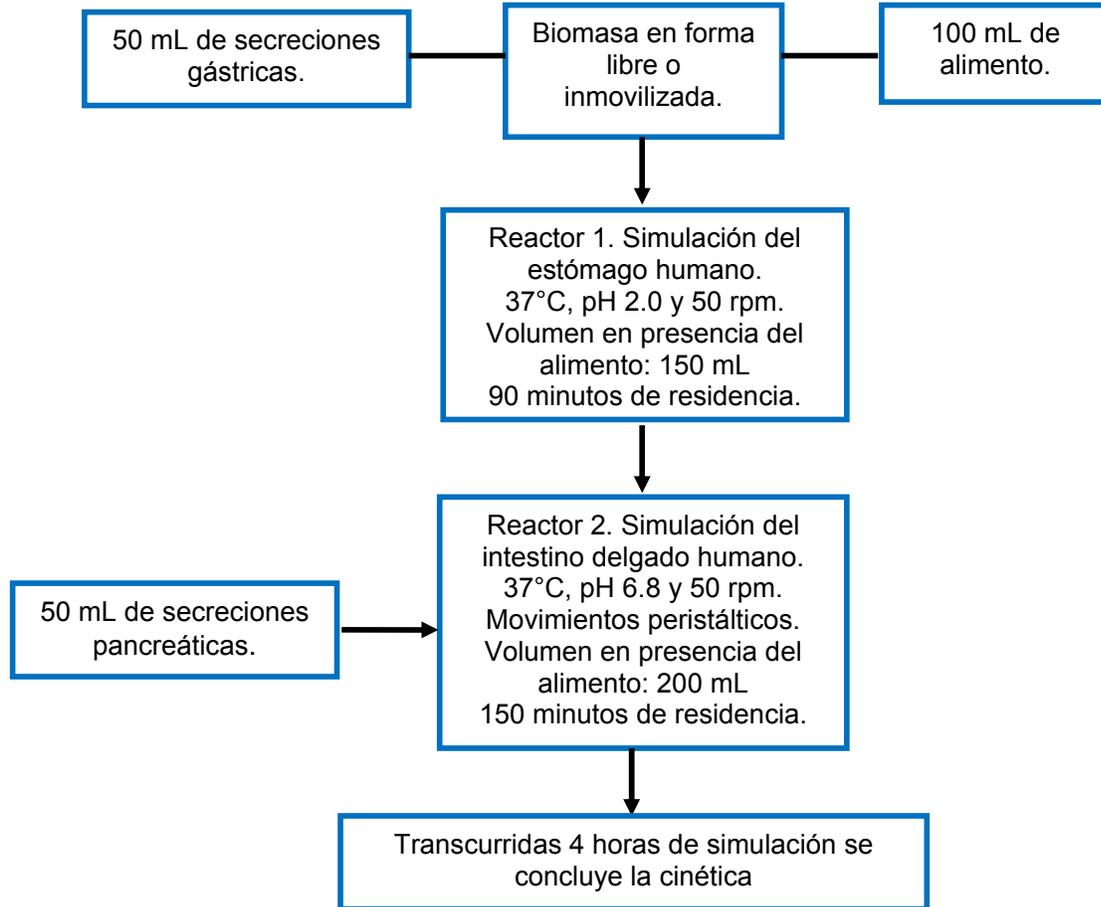


Figura 12. Diagrama de la simulación del tracto gastrointestinal humano in vitro.

Se inició sembrando 5 colonias de *B. bifidum* en un matraz con 100 mL de medio líquido MRS adicionado con cisteína, las condiciones de incubación fueron 37°C, 24 horas y 180 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se recuperó la biomasa formada mediante centrifugación, 5000 rpm, 5 minutos y 4°C.

Para las cinéticas de pérdida de viabilidad se utilizó la biomasa recuperada de forma libre e inmovilizada (la técnica de inmovilización se describe posteriormente); al primer reactor (estómago) se le adicionaron las secreciones gástricas y el pH se ajustó a 2.0 con HCl 5M. El tiempo de residencia de la mezcla en el primer reactor fue de 90 minutos.

Posteriormente la mezcla pasó a través de una bomba peristáltica al segundo reactor (que simuló al intestino delgado), se adicionaron las secreciones pancreáticas y el pH se ajustó a 6.8 con NaOH 1.5M, los movimientos peristálticos se llevaron a cabo durante la estancia de

la mezcla en este reactor; el tiempo de residencia de la mezcla fue de 150 minutos. La cinética de pérdida de viabilidad celular o simulación de las condiciones gastrointestinales finalizó transcurridas 4 horas.

5.3.1 Técnica de inmovilización celular.

La técnica empleada fue atrapamiento celular utilizando alginato de sodio al 2% como soporte de inmovilización (Durán, 1997; Cruz, 2007).

Mediante centrifugación se recuperó la biomasa producida después de 24 horas de incubación, posteriormente la solución de alginato de sodio se mezcló con la biomasa contenida en un recipiente en el cual se controló la agitación y temperatura (23°C), la mezcla pasó a través de una bomba peristáltica y por goteo a través de una aguja cae a la solución endurecedora (CaCl₂) que permanece en agitación (Figura 13). Las partículas formadas tuvieron un diámetro aproximado de 2 mm.



Figura 13. Esquema de la técnica de inmovilización por atrapamiento con soporte de alginato de sodio.

5.3.2 Determinación de viabilidad por cuenta en placa de Petri.

La técnica de cuenta en palca se realizó de la siguiente manera: se tomó una alícuota de suspensión celular de 1 mL, la cual se adicionó a un tubo de ensayo que contenía 9 mL solución salina al 0.9%; de este tubo se tomó un mililitro para hacer la dilución 10^{-2} y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-7} . Se tomó 0.1 mL de las diluciones 10^{-4} hasta 10^{-7} para sembrar por extensión en placa en medio sólido MRS-cisteína. Las placas de Petri se incubaron durante 48 horas y 37°C, transcurrido este periodo se contaron las colonias, los resultados se reportaron en UFC/mL y en porcentaje de viabilidad.

Para determinar la viabilidad de las células inmovilizadas, se tomaron 92 partículas esféricas que corresponden a 1 mL de alginato de sodio mezclado con biomasa, se adicionó a un tubo con 9 mL de citrato de sodio 0.1 M, el soporte se disolvió mediante agitación y manteniendo el tubo a una temperatura de 37 a 40°C. Una vez disuelto el soporte habiendo sido liberadas las bacterias inmovilizadas se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-7} en tubos con solución salina y se procedió como anteriormente se describió.

5.4 Etapa 3. Determinación de la viabilidad de *B. bifidum* en presencia de diferentes alimentos.

Con la finalidad de simular los hábitos alimenticios de la población mexicana se seleccionaron y se diseñaron 5 alimentos para ser evaluados en conjunto con *B. bifidum* durante la simulación del tracto gastrointestinal humano. La selección de los alimentos se basó en una encuesta aplicada a 100 personas de entre 18 y 65 años de edad, dicha encuesta contenía información acerca del consumo de productos lácteos fermentados (Cuadro 9).

Cuadro 9. Diseño de la encuesta realizada para determinar los alimentos introducidos a la simulación del tracto gastrointestinal humano in vitro.

1. ¿Consume bebidas lácteas fermentadas?
2. ¿Con qué frecuencia lo consume?
3. ¿Qué cantidad de producto consume?
4. ¿Qué marca consume?
5. ¿Por qué razón consume el producto?
6. ¿En qué horario lo consume?
7. ¿Con que alimento acompaña su bebida láctea fermentada en el desayuno?
8. ¿Con que alimento acompaña su bebida láctea fermentada en la comida?
9. ¿Con que alimento acompaña su bebida láctea fermentada en la cena?
10. ¿Ha consumido bebidas alcohólicas junto con su bebida láctea

Los resultados de la encuesta que fueron útiles para la selección de los alimentos se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados de la encuesta realizada.

Pregunta.	Respuesta.
¿Consume alimentos lácteos fermentados?	Si: 95%; no: 5%.
¿En qué horario consume este tipo de alimentos?	Matutino: 54%; vespertino: 13; nocturno: 33%.
¿Con qué alimento acompaña su bebida láctea fermentada en el desayuno?	Fruta: 25%, barra de cereal: 23%; pan: 17%; café: 12%; otras respuestas: 23%.
¿Con qué alimento acompaña su bebida láctea fermentada en la comida?	Alimentos con picante: 19%; carne: 5%; otras respuestas: no lo consumen en la comida:
¿Con qué alimento acompaña su bebida láctea fermentada en la cena?	Pan: 22%; cereal: 20%; fruta: 13%; otras respuestas: 45%.
¿Ha consumido bebidas alcohólicas junto con la bebida láctea fermentada?	Si: 16%; no: 84%.

Las cinéticas de pérdida de viabilidad se realizaron de acuerdo a las condiciones descritas en el apartado 5.3. En esta etapa del proyecto se trabajó con diferentes alimentos que previamente fueron seleccionados con base a una encuesta realizada (Cuadro 11), dichos alimentos se emplearon con la finalidad de determinar su efecto sobre la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* cuando era sometido a condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

Cuadro 11. Alimentos utilizados en la Etapa 3 del proyecto.

Alimento	Composición (100 mL)
Desayuno	Leche, plátano y barra de cereal.
Alimento testigo	Leche y almidón.
Café	Café soluble al 1 %.
Chile	1.15 g. de chile serrano.
Cerveza	Cerveza indio; cervecería Cuauhtémoc.

Una vez seleccionados los alimentos a evaluar se prepararon de la siguiente manera:

- Alimento testigo: se esterilizaron 100 mL de leche y 8 gramos de almidón por separado, posteriormente, en condiciones asépticas se adicionó el almidón a la leche estéril, este alimento se evaluó para simular la consistencia de un yogurt comercial y así evitar que hubiera más microorganismos en la simulación o separación de fases si se hubiera esterilizado el producto.

-
- Cerveza: la botella de cerveza “Indio” de la cervecería Cuauhtémoc se desinfectó con alcohol al 100%, se vertieron 100 mL de cerveza en un frasco previamente esterilizado. La finalidad de introducir la cerveza en la simulación fue para evaluar de manera indirecta el efecto del etanol sobre la viabilidad de *B. bifidum* tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.
 - Desayuno: se utilizaron 100 mL de leche pasteurizada, medio plátano y una barra de cereal “Multigrano de nuez” de Bimbo. La mezcla se licuó durante 3 minutos utilizando una licuadora. Esta mezcla de alimento simuló un desayuno convencional y se introdujo al sistema para evaluar su efecto sobre la viabilidad de *B. bifidum* sometido a condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.
 - Café: en 100 mL de agua destilada se adicionó 1 gramo de café soluble “Nescafé” de Nestlé. El propósito de introducir el café soluble en el sistema fue para evaluar de manera indirecta el efecto de la cafeína sobre la viabilidad de *B. bifidum* tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.
 - Chile: en 100 mL de agua destilada se adicionaron 1.15 gramos de chile serrano previamente desinfectado. Se utilizó una solución de chile serrano con la finalidad de evaluar indirectamente el efecto de la capsaicina sobre la viabilidad de *B. bifidum* bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

Los alimentos que no habían recibido tratamiento térmico se sometieron a esterilización durante 15 minutos y 121 °C para posteriormente ser utilizados en las cinéticas correspondientes.

5.5 Etapa 4. Evaluación de morfología y microestructura de las esferas de *B. bifidum* inmovilizadas.

Con la finalidad de evaluar los cambios microestructurales y morfológicos de las partículas de inmovilización con las que se trabajó en la etapa 2 del proyecto (etapa control), se realizó un estudio empleando técnicas de microscopía (microscopio electrónico barrido ambiental y un estéreomicroscopio de luz) y análisis de imágenes. El procedimiento se muestra en la figura 14.

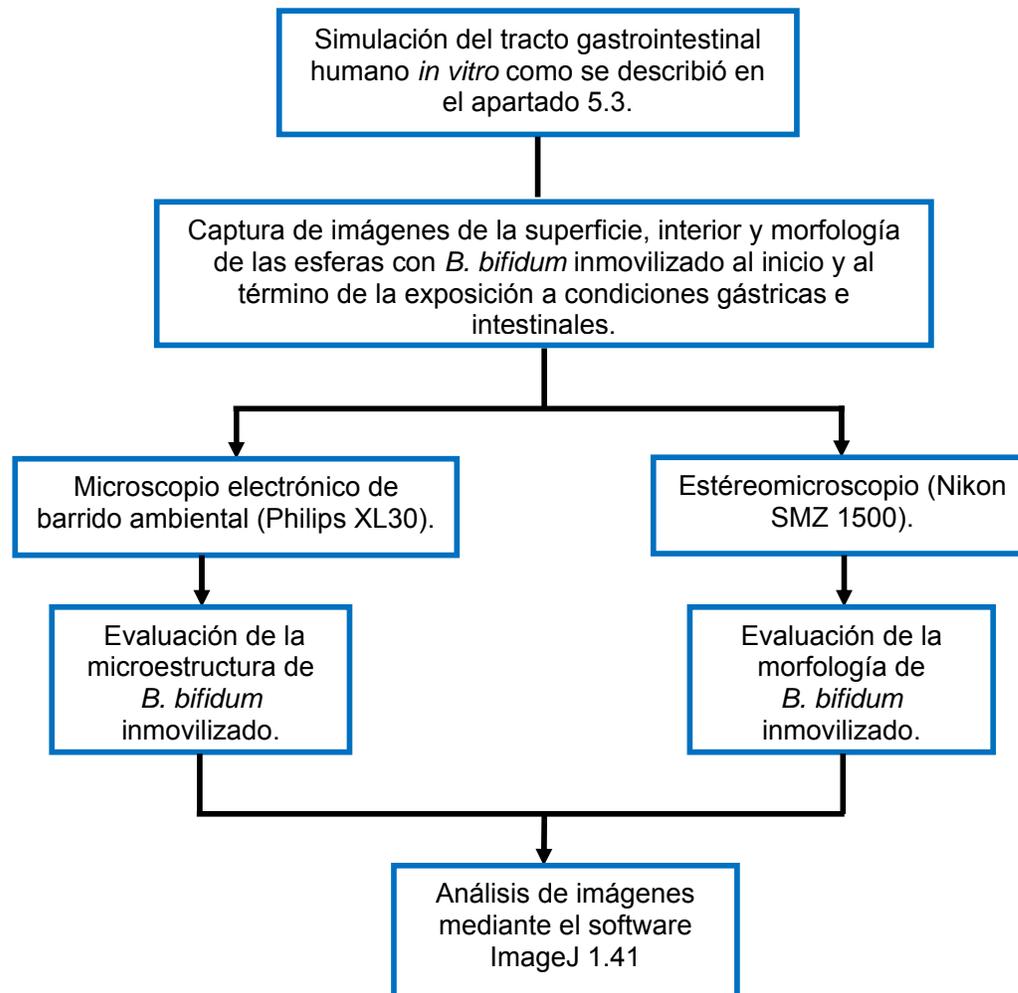


Figura 14. Descripción de la metodología realizada para la evaluación de la microestructura y morfología de las partículas conteniendo de *B. bifidum* inmovilizado.

Acondicionamiento de muestras y análisis de imágenes.

Se recolectaron las muestras a tres diferentes tiempos de tratamiento en soluciones salinas estériles al 0.9%. Posteriormente, de cada una de las muestras a los tres tiempos de tratamiento se tomaron esferas en condiciones asépticas y fueron colocadas y fijadas con

cinta adhesiva metálica de cobre de doble cara sobre un portamuestras para su observación en el microscopio electrónico de barrido ambiental (Philips XL30). Los portamuestras fueron sumergidos en un recipiente metálico que contenía nitrógeno líquido hasta el límite superior del portamuestra con la finalidad de realizar un enfriamiento indirecto sin contacto con la muestra, de tal manera que se congeló por conducción. Inmediatamente después, la muestra se introdujo al microscopio electrónico de barrido ambiental para capturar las imágenes de la microestructura externa e interna de las esferas de *B. bifidum* inmovilizadas a 300X, 25.0 kV y temperatura ambiente. Cabe señalar que para la captura de la cara interna de las partículas de inmovilización, las muestras fueron previamente cortadas cuidadosamente por la mitad con ayuda de un bisturí. Las imágenes fueron guardadas en formato TIFF (Tagged Image File Format) en el espacio de color RGB (24 bits). Un mínimo de tres imágenes de cada tratamiento y zona de observación (interna y externa) fueron capturadas para realizar el estudio.

Para el estudio de la morfología de las esferas, éstas fueron sumergidas en una solución salina en una caja Petri para evitar su deshidratación y fueron observadas directamente en un estéreomicroscopio de luz (Nikon SMZ 1500) que cuenta con un sistema captura de imágenes (Cámara digital Digital SIGHT DS/2Mv, Nikon) empleando luz transmitida y una magnificación de 2X. Bajo estas condiciones, imágenes de las siluetas de las esferas fueron capturadas y almacenadas en formato bmp (mapa de bits) en el espacio de color RGB (24 bits). Un mínimo de 10 imágenes para cada tratamiento fueron capturadas para realizar el estudio.

Las siguientes etapas del análisis de imágenes se realizaron en el software Image J 1.41. (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), siguiendo una metodología similar a la empleada en diferentes trabajos que aplican análisis de imágenes para el estudio de la estructura de biomateriales (Alamilla *et al.*, 2005; Sánchez-Pardo *et al.*, 2008; Quevedo *et al.*, 2008). El pre-procesamiento de las imágenes obtenidas en el estéreomicroscopio consistió en cambiar las imágenes de color (RGB 24 bits) a tonos de gris, para ello en el menú inicial se seleccionó la barra de "Image", posteriormente en "Type" se modificaron las imágenes a 8 bit. Para el procesamiento de la imagen se utilizó la opción de "Filters" en el menú de "Plugins" y se seleccionó la opción MultiThresholder para convertir la imagen de gris a binaria empleando el algoritmo Otsu, el cual ha sido empleado para la segmentación de poros en imágenes complejas (Sanchez-Pardo *et al.*, 2008) y se guardó con la extensión bmp. Posteriormente se seleccionaron los parámetros a calcular ("Set Measurements"): perímetro, área, circularidad y diámetro (Figura 15).

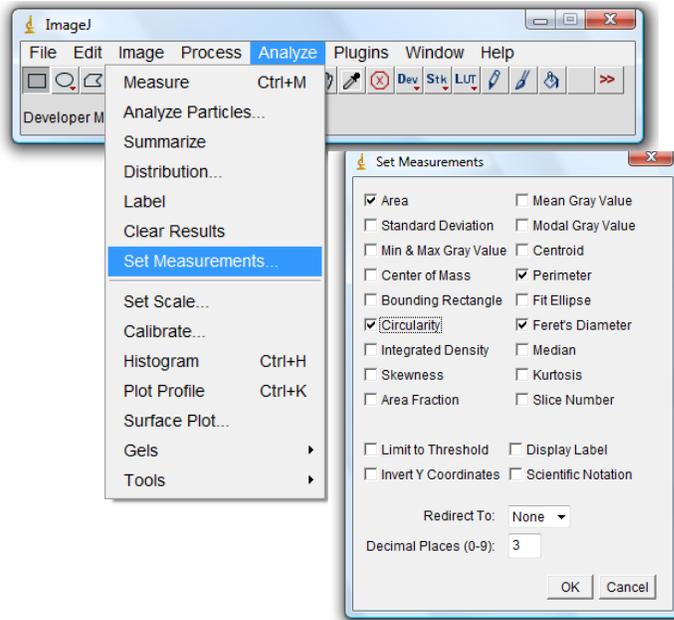


Figura 15. Menú de comandos para la extracción de parámetros morfológicos de las esferas en el software ImageJ.

Por otro lado, las imágenes capturadas en el microscopio electrónico de barrido ambiental fueron pre-procesadas haciendo un corte (opción “crop”) de la región de interés, además las imágenes fueron transformadas del formato TIFF en RGB (24 bits) a escala de grises en formato bmp (8 bits). Para estimar la entropía de las imágenes se seleccionando la opción “Analyze, GLCM Texture”, de la barra de “Plugins” (Figura 16). El algoritmo de cálculo está basado en el trabajo reportado por Haralick *et al.* (1973). La entropía es una medida del desorden o azar de las imágenes. Texturas complejas tienden a tener valores de entropía mayores (Fernandez *et al.*, 2005).

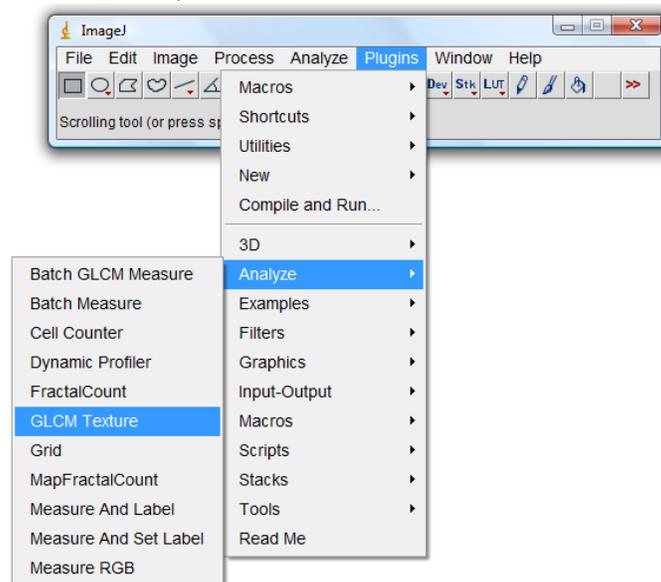


Figura 16. Menú de comandos para la extracción de la entropía de las esferas en el software ImageJ.

Adicionalmente, la textura fractal de las imágenes fue evaluada utilizando el algoritmo Shifting Differential Box Counting method (DF_{SDBC}), que corresponde a niveles de gris como el propuesto por Wen-Shiung *et.al.*, (2003).

La dimensión fractal de las imágenes se obtuvo seleccionando la opción “Analyze, MapFractalCount” de la barra de Pluggins. DF_{SDBC} (Figura 17), se calculó utilizando la ecuación (1), donde “N” es el número de cajas y “r” es el tamaño de las mismas.

$$FD_{SDBC} = \frac{\log(N)}{\log\left(\frac{1}{r}\right)} \quad (1)$$

Altos valores de DF_{SDBC} obtenidos por la Ecuación (1) indican mayor complejidad o azar en las imágenes, mientras que valores más bajos pueden estar asociados a imágenes más simples o más lisas.

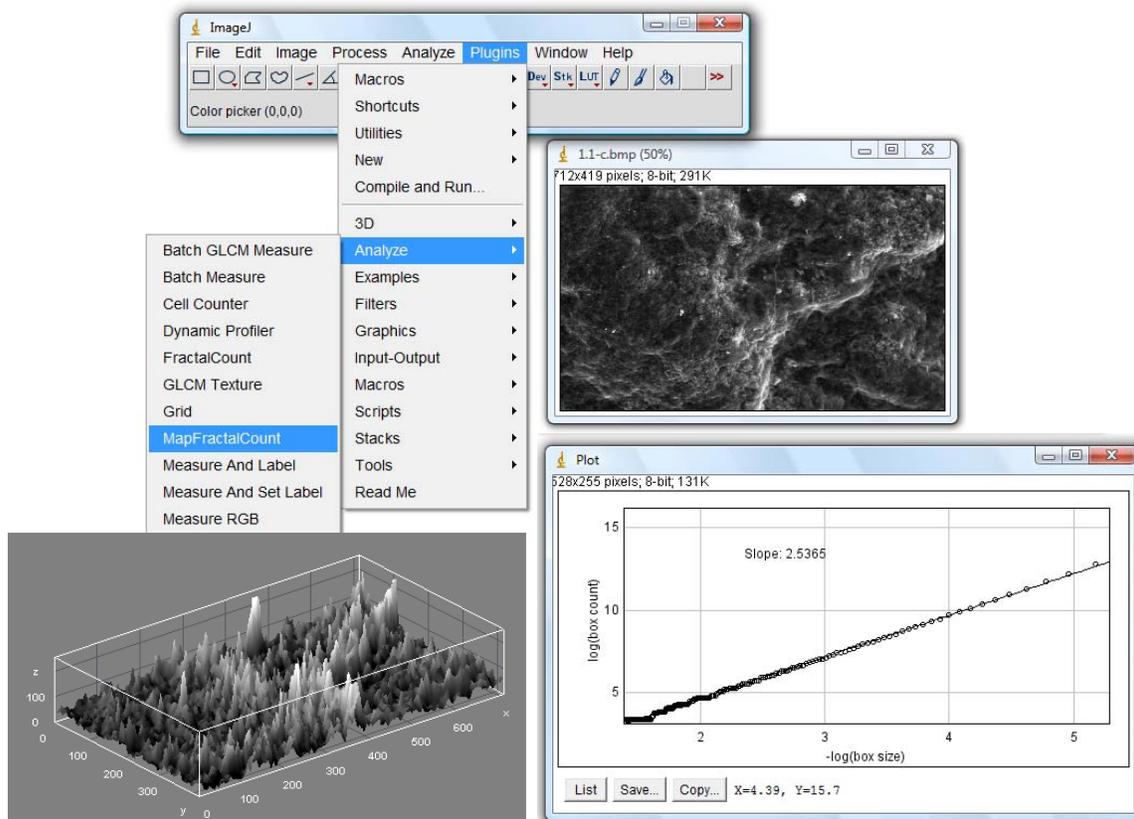


Figura 17. Menú de comandos para la extracción de textura fractal de las esferas en el software ImageJ.

5.6 Etapa 5. Análisis estadístico

Para las cinéticas de pérdida de viabilidad celular se realizó un análisis estadístico en el programa SPSS versión 14.0, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas entre los tratamientos para determinar la existencia de diferencias significativas. Los datos fueron analizados con un nivel de significancia de 5% y todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Para el procesamiento de imágenes se aplicó una prueba de rango múltiple de Duncan con la finalidad de determinar la existencia de diferencias significativas con un nivel de significancia del 5%.

5.7 Equipo utilizado.

El equipo utilizado durante el trabajo experimental se enlista a continuación:

- Campana de flujo laminar Telstar, BV-30/70, España.
- Incubadora orbital ESEVE, INO-65OV-7.
- Centrífuga Beckman J2-MC, Estados Unidos.
- Contador de colonias BZG 30, Estados Unidos.
- Potenciómetro Oakton, pH 2500 series.
- Vortex Thermolyne, Maxi Mix Plus, Estados Unidos.
- Autoclave Yamato, SM510.
- Bomba peristáltica Cole-Parmer, 7592-50.
- Microscopio electrónico ambiental Philips XL30.
- Estereomicroscopio Nikon SMZ 1500.
- Baño de temperatura controlada PolyScience.
- Parrillas de agitación IKA C-MAG MS7.
- Balanza Sartorius CP324S.

5.8 Soluciones utilizadas.

- Solución salina 0.9% (p/v).
- Solución salina 0.5% (p/v).
- Solución HCl 5 M.
- Solución NaOH 1.5 M.
- Solución de alginato de sodio 2%.
- Solución de etanol 70% (v/v).
- Solución de citrato de sodio 0.1 M.
- Solución de CaCl₂ 0.3 M.
- Medio líquido y sólido MRS adicionado con 0.05% de cisterna.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para determinar la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* NRRL-41410 tratada bajo condiciones gastrointestinales humanas, se diseñó un sistema *in vitro* en el cual se adaptaron algunas de las condiciones presentes en el estómago e intestino delgado humano como la pepsina y pancreatina, que son enzimas digestivas, la mucina, que recubre el tejido epitelial de los órganos del tracto gastrointestinal humano, la bilis presente en el duodeno (una de las tres partes del intestino delgado); la temperatura, tiempo de residencia del quimo y la peristalsis, fueron otros factores que se tomaron en cuenta para el sistema. Por otro lado se manejaron dos variables, la primera fue la manera en la cual se trataron las células: libres o inmovilizadas por atrapamiento en un soporte orgánico en una concentración de 2% (p/v); la segunda variable fue la introducción de un alimento al sistema, esto es, se realizaron 6 tratamientos (un control y 5 alimentos) y en cada uno se evaluaron las células libres o inmovilizadas, dando un total 12 cinéticas de pérdida de viabilidad. Los experimentos se realizaron por triplicado y la viabilidad se expresó en porcentaje.

Es importante mencionar que para todas las cinéticas, la concentración de células inicial se obtuvo después de incubar durante 24 horas el medio de cultivo previamente inoculado; además, la concentración de las células al inicio de todos los tratamientos fue mayor a 10^7 UFC/mL que es la cantidad mínima que debe tener un producto lácteo fermentado al ser ingerido por el ser humano para ser considerada un alimento probiótico (Charteris *et al.*, 1998; Klingberg & Budde 2006), los cambios en la concentración celular se observaron a lo largo del tratamiento.

6.1 Tratamiento control. Resultados de la viabilidad de *B. bifidum* libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

Los resultados de la viabilidad se presentan en el Cuadro 12 y en la Figura 18. El tratamiento consistió en simular las condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*; no se incluyó ningún alimento con la finalidad de comparar los demás tratamientos con un control.

En la Figura 18 se observa que las cinéticas iniciaron con un 100% de viabilidad para ambos casos: bacterias libres e inmovilizadas, este porcentaje corresponde al orden de 10^{10} UFC/mL. Los primeros 90 minutos corresponden a las condiciones estomacales y se observa que la viabilidad disminuyó 94.2 y 83.6% para las células libres e inmovilizadas, respectivamente. Después de que las células fueron sometidas a las condiciones intestinales, es decir, al término de la simulación, el porcentaje de viabilidad para células libres fue de 1.2 y de 2.5 para las células inmovilizadas. Las células inmovilizadas

mantuvieron el doble de la viabilidad observada en las células libres (ambos porcentajes fueron del orden de 10^9 UFC/mL).

Cuadro 12. Porcentaje de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

Tiempo (min)	Viabilidad de células libres (%)	Viabilidad de células inmovilizadas (%)
0	100.0 ± 0.00	100.0 ± 0.00
30	19.4 ± 5.62	38.1 ± 2.49
60	9.6 ± 1.56	26.0 ± 4.84
90	5.8 ± 0.44	16.4 ± 2.17
120	3.9 ± 1.66	13.9 ± 0.55
150	4.1 ± 1.79	9.0 ± 0.90
180	3.0 ± 2.62	4.3 ± 0.99
210	2.1 ± 1.86	3.2 ± 1.05
240	1.2 ± 1.11	2.5 ± 0.57

Nota: los resultados presentados en el Cuadro 12 son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

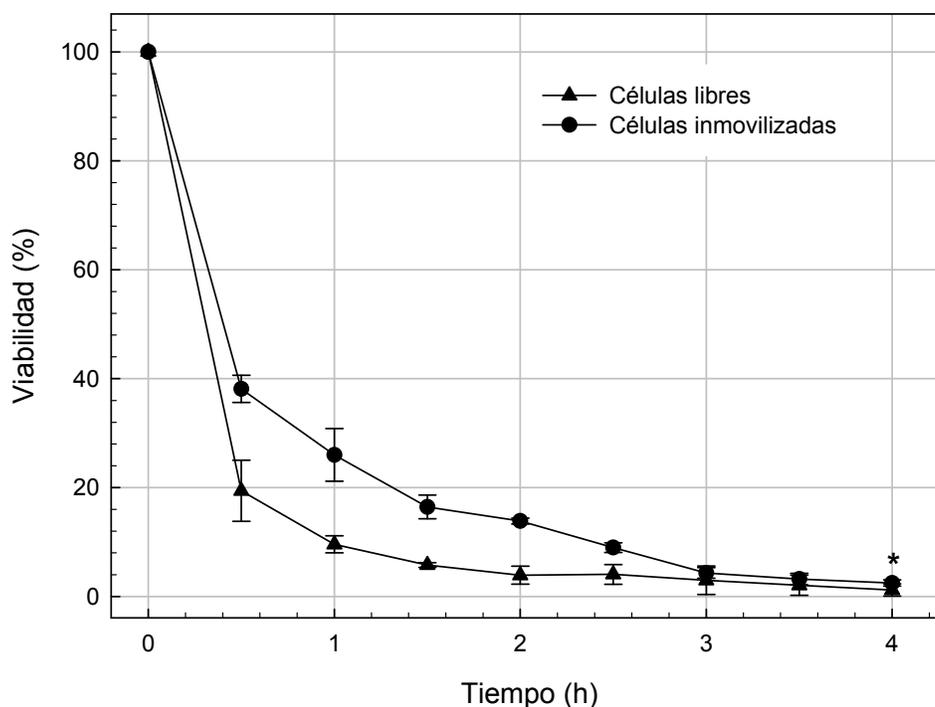


Figura 18. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*. (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

A continuación se analizan las condiciones independientes para explicar el efecto de cada una de ellas en la disminución de la viabilidad de *B. bifidum*. Charteris *et al.* (1998), evaluaron probióticos del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*, las secreciones gástricas empleadas fueron similares a las que se utilizaron en la presente investigación; después de la evaluación de los microorganismos se observó que la presencia de la mucina no afectaba la viabilidad de la mayoría de las cepas estudiadas (7 de 15), favorecía el crecimiento de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus salivarius*; sin embargo afectaba negativamente la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium animalis*.

No se ha estudiado de manera independiente el efecto de la pepsina, sin embargo Charteris *et al.* (1998); Lian *et al.* (2003) y Annan *et al.* (2008) han reportado concentraciones de pepsina similares a las que se emplearon en este proyecto y en todos los casos la viabilidad de las bacterias fue drásticamente afectada en las condiciones estomacales. Comparando nuestros resultados con las investigaciones realizadas, es evidente que el ambiente ácido del estómago, incluyendo la pepsina y el pH de 2.0, fue lo que más afectó la viabilidad de las células de *Bifidobacterium bifidum* cuando las células fueron sometidas a condiciones estomacales.

De acuerdo con Mainville *et al.* (2005), la pérdida de viabilidad de los probióticos ocurre a lo largo del tracto gastrointestinal, pero el ambiente ácido del estómago (como se ha evidenciado) y la presencia de bilis en el duodeno son los factores que afectan con gran magnitud su viabilidad, por lo que es importante evaluar y describir detalladamente el efecto de la bilis sobre las bacterias lácticas probióticas. En diversas investigaciones se ha evaluado el efecto de la bilis hepática sobre la viabilidad de bacterias lácticas, Ibrahim y Bezkorovainy (1993) examinaron la viabilidad de cepas de *bifidobacterium* en presencia de bilis y reportaron que *B. infantis* tuvo mayores tasas de supervivencia mientras que *B. longum* fue la que reportó menores. Chateau *et al.* (1994) estudiaron el efecto de sales biliares en 38 cepas de *Lactobacillus* (principalmente *L. rhamnosus*) aisladas de un consorcio de bacterias probióticas y se observó que de 22 cepas de *L. rhamnosus*, 3 fueron clasificadas como resistentes, 5 como tolerantes, 3 con tolerancia baja y 11 como sensibles. Un comportamiento similar fue observado por Jacobsen *et al.* (1999) quienes compararon la tolerancia a la bilis en 47 cepas de *Lactobacillus* spp. (incluyendo *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. paracasei*, *L. casei* and *L. johnsonni*). Cruz (2007) evaluó a *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* tratado con 0.3% (p/v) de bilis hepática, además estudió diferentes concentraciones de alginato para inmovilizar a la cepa estudiada con la técnica de atrapamiento, adicionalmente introdujo un

“alimento tipo” al sistema; observó que las células libres (sin inmovilizar) perdieron casi el 100% de su viabilidad bajo la influencia de sales biliares, no obstante las bacterias se mantuvieron viables en mayor cantidad cuando se inmovilizaron en un soporte de alginato al 2% y en presencia de un “alimento muestra”. Sin embargo en todos los estudios antes mencionados es indiscutible que la bilis afecta negativamente la viabilidad de las bacterias probióticas; lo mismo ocurre al evaluar *Bifidobacterium bifidum* NRRL-41410 con una concentración de 0.3% (p/v).

La peristalsis de manera indirecta remueve a los microorganismos acelerando la velocidad con la que atraviesan el intestino, si los microorganismos no fueron bien adheridos al tejido epitelial del colon, la peristalsis puede afectar porque los expulsa del organismo mediante las heces fecales, es por ello que para observar el impacto de los movimientos peristálticos sería conveniente hacer un estudio *in vivo* o estudiar la adhesión de las bacterias en el colon humano; la peristalsis no afectó directamente la viabilidad de *B. bifidum* NRRL-41410. La simulación se realizó a 37°C, es decir a la temperatura corporal, la cual favoreció el mantenimiento de las bacterias, además las cepas que se emplean para el desarrollo de alimentos funcionales como yogurts o bebidas lácteas fermentadas son seleccionadas con base a su temperatura óptima de crecimiento, además de la resistencia a bilis o ácidos estomacales. El efecto independiente de la pancreatina en la viabilidad de las bacterias lácticas probióticas no se ha estudiado, lo que se evalúa en trabajos como Annan *et al.* (2008) es el conjunto de las secreciones intestinales compuestas por bilis, pH neutros o alcalinos y la presencia de esta enzima.

6.1.1 Efecto del soporte de inmovilización.

El propósito de esta investigación fue determinar la viabilidad de *B. bifidum* libre e inmovilizado por atrapamiento considerando que Sultana *et al.* (2000); Sun & Griffiths (2000); Favaro-Trindade & Grosso (2002); Lian *et al.* (2003); Ainsley *et al.* (2005) y Cruz (2007) han demostrado que esta técnica provee protección a las células cuando son sometidas a condiciones similares a las presentes en el tracto gastrointestinal humano. Un factor clave en el desarrollo de la inmovilización de probióticos es la selección del soporte de inmovilización. Las partículas de inmovilización deben ser estables y mantener su integridad a lo largo del tracto digestivo hasta que llegue a su sitio de acción (colon), en donde las partículas de soporte que contienen las bacterias inmovilizadas deben liberar su contenido. El material del soporte de inmovilización debe retener a las bacterias y también es deseable que resista las condiciones que se presentan en el trayecto que recorre por el tracto digestivo. Polímeros como el alginato se han utilizado en diversas aplicaciones en alimentos (Prakash & Jones, 2005), en el caso de las cápsulas de alginato varios factores determinan

su estructura interna, incluyendo la distribución intramolecular, proporción de residuos de ácido gúlico y manurónico (Thu *et al.*, 1996). Dicha información estructural puede ser importante en el diseño de partículas de inmovilización para su uso en alimentos así como vehículos para liberar otro tipo de sustancias en el cuerpo (Allan-Wojtas *et al.*, 2008).

Por tal motivo, además de evaluar las condiciones fisicoquímicas y enzimáticas previamente mencionadas, se comparó la viabilidad de células de *B. bifidum* libres e inmovilizadas en un soporte adecuado, alginato de sodio a una concentración de 2% (p/v). Los resultados coinciden con lo reportado por Sun & Griffiths (2000), Lian *et al.* (2003) y Annan *et al.* (2008), ya que compararon diferentes soportes de inmovilización para encapsular especies de bifidobacterias y en todos los casos se observó una tendencia de disminución de la viabilidad durante el periodo de exposición a secreciones gástricas e intestinales, sin embargo fue notorio que las células inmovilizadas mostraron mayor supervivencia con respecto a las células libres, esto se atribuyó a que el soporte de inmovilización provee a la célula una cierta protección ante los efectos a los que fue sometida.

La prueba de ANOVA de medidas repetidas, indicó que existieron diferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos, es decir, entre células libres e inmovilizadas tratadas bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro* ($F_{1,4} = 63.72$, $p < 0.001$). Los resultados de este tratamiento indicaron que la mucina, la pepsina, el pH ácido y las sales biliares afectaron de manera importante la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* NRRL-41410, sin embargo la inmovilización celular permitió una menor daño a las células por su efecto protector (Figura 18).

6.1.2 Evaluación de la morfología y la microestructura de *B. bifidum* inmovilizado en alginato de sodio tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

Las técnicas de microscopía son herramientas útiles para evaluar los cambios que ocurren en la estructura de esferas de inmovilización empleadas como sistemas de protección de bacterias lácticas inmovilizadas durante los procesos de digestión *in vitro* a las que son sometidas (Annan *et al.*, 2008; Allan-Wojtas *et al.*, 2008). Asimismo, los métodos de análisis de imágenes han sido empleados para evaluar cuantitativamente la microestructura de un sin número de materiales de origen biológico (Li *et al.*, 1999; Aguilera, 2001; Du & Sun 2001; Alamilla *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2005; Sanchez-Pardo *et al.*, 2007; Quevedo *et al.*, 2008). La información que proveen los estudios de microscopía y el análisis de imágenes en los biomateriales es relevante pues permiten asignar valores numéricos a los objetos y superficies complejas, dicha información puede ser útil para realizar estudios comparativos y evaluar los cambios ocurridos durante su procesamiento. En el caso de las células inmovilizadas es posible que los cambios estructurales y morfológicos en la matriz del soporte de inmovilización puedan estar asociados a la pérdida de la viabilidad de las células inmovilizadas, por lo cual en esta parte del trabajo se presenta una propuesta de estudio de los cambios morfológicos y microestructurales que ocurren durante el tratamiento de *B. bifidum* inmovilizado en esferas de alginato de sodio bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

La Figura 19 muestra diferentes parámetros morfométricos obtenidos mediante análisis de imágenes para las esferas durante su tratamiento bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. En las Figuras 19 a-c se presentan los valores correspondientes al área, perímetro y diámetro de Feret respectivamente, dichos parámetros describen los cambios de tamaño que sufren las esferas a lo largo de la simulación; en todos los casos el tamaño de las esferas se incrementa durante los tratamientos (gástrico e intestinal) con respecto al inicial. Este efecto puede ser ocasionado por fenómenos de difusión del medio acuoso hacia el interior de las esferas que pueden promover el hinchamiento de las mismas, cambiando la estructura de la matriz de alginato de sodio y facilitando la difusión de las sales biliares, el HCl y las enzimas digestivas, sustancias que comúnmente están asociadas a la pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas (Charteris *et al.*, 1998; Lian *et al.*, 2003; Begley *et al.*, 2005; Mainville *et al.*, 2005). Por otro lado el incremento del perímetro y la pérdida de circularidad (Figura 19 b y d respectivamente) señalan que el borde de las esferas se hace más largo y la esfericidad se pierde conforme el material es sometido a la

simulación gastrointestinal (Figura 19 e-g), dicho comportamiento puede indicar que las esferas pierden rigidez estructural al deformarse debido a los fenómenos de difusión anteriormente mencionados.

La Figura 20 muestra los cambios microestructurales que sufre el soporte de inmovilización durante la simulación. Los valores de dimensión fractal y de entropía (Figura 20 a y b) indican que la superficie de las esferas se torna más rugosa y heterogénea debido a que el fenómeno de hinchamiento de la red estructural del soporte expone la estructura polimérica del alginato de sodio generando una microestructura más compleja y rugosa (Figura 20 c1-c3). Por otra parte, la microestructura interna tiende a tornarse más lisa y homogénea como lo muestran los valores de dimensión fractal y entropía (Figura 20 a y b), es posible que este fenómeno sea ocasionado por la difusión de la solución modelo hacia el interior de la matriz polimérica promoviendo el hinchamiento de las esferas, la pérdida de turgencia del material y el alisamiento de la microestructura (Figura 20 d1-d3).

Existen pocos estudios de la microestructura de biosoportos para inmovilización de células, por ejemplo Alla-Wojtas *et al.* (2008) realizaron estudios de crio-fractura en microcápsulas, ellos señalan que la información microestructural puede ser importante en el diseño de microcápsulas para su uso en alimentos y como vehículos de otras sustancias que requieran ser liberadas en el cuerpo. Sin embargo, son escasos los estudios que involucren análisis de imágenes para evaluar los cambios que sufren los biosoportos para inmovilización de células, de ahí la importancia de esta sección del trabajo; los resultados encontrados pueden indicar que la matriz polimérica del soporte puede no estar degradando a lo largo de la simulación y solo sufra deformaciones estructurales debido al hinchamiento de la matriz ocasionado por los fenómenos de difusión de los componentes de la solución modelo, responsables de la pérdida de viabilidad de las bacterias lácticas. Estos resultados sugieren que la pérdida de viabilidad de las bacterias lácticas puede estar controlada mayoritariamente por procesos difusivos y en menor medida al daño estructural del soporte de inmovilización y refuerza los resultados del efecto protector (Figura 18) de la técnica de inmovilización celular con alginato de sodio que fue utilizada en este trabajo.

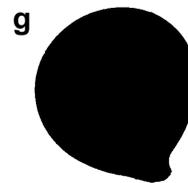
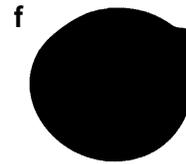
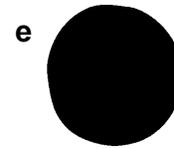
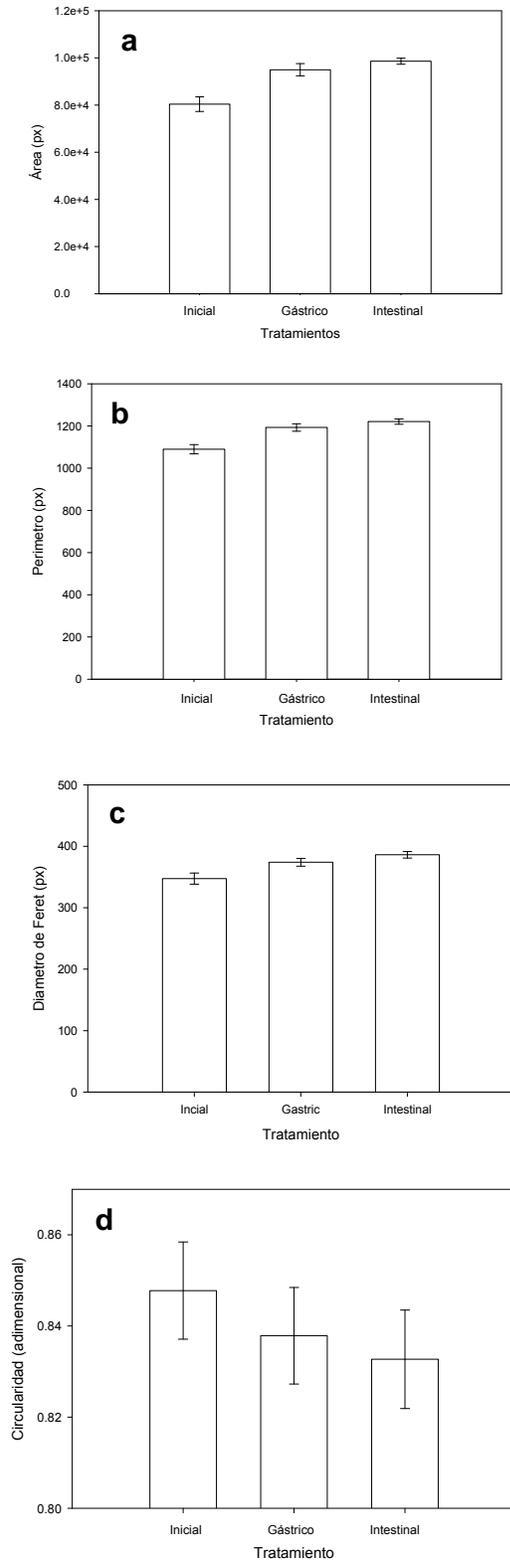


Figura 19. Cambios morfológicos de *Bifidobacterium bifidum* inmovilizado en alginato de sodio durante su tratamiento bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas in vitro: (a) Área, (b) Perímetro, (c) Diámetro de Feret, (d) Circularidad, e, f y g muestran imágenes binarias de las esferas (e) al inicio, (f) después del tratamiento gástrico y (g) intestinal.

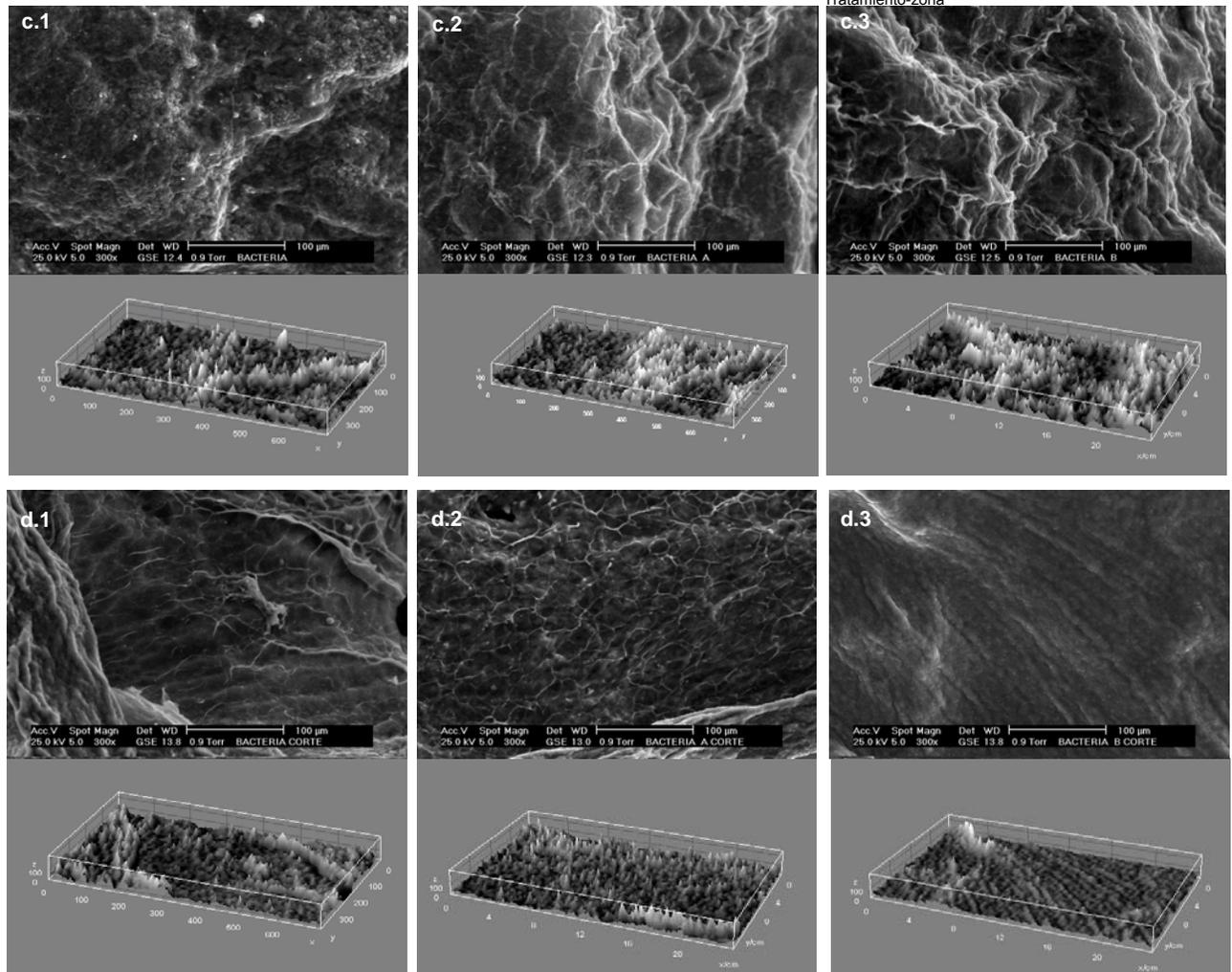
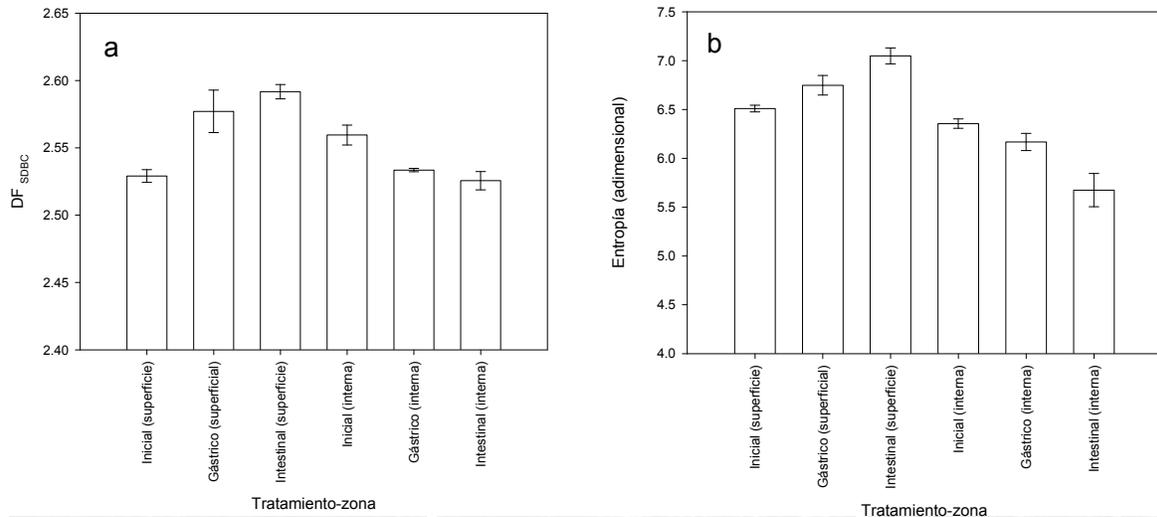


Figura 20. Parámetros de la textura de *Bifidobacterium bifidum* inmovilizado. (a) Dimensión Fractal y (b) Entropía. Imágenes Microscopía electrónica de barrido ambiental y su correspondiente gráfico 3-D en escala de grises de la superficie de las esferas al inicio del tratamiento (c.1), después del tratamiento gástrico (c.2) e intestinal (c.3) y del interior de las esferas al inicio (d.1), después del tratamiento gástrico (d.2) e intestinal (d.3).

6.2 Efecto de la presencia de diferentes alimentos sobre la viabilidad *B. bifidum* libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

En el apartado 6.1 se explicó cómo afecta cada una de las variables del sistema a *B. bifidum* libre e inmovilizado, razón por la cual, en este apartado nos centraremos en describir el efecto de los diferentes alimentos evaluados sobre la viabilidad de *B. bifidum*.

6.2.1 Efecto de la presencia de alimento testigo sobre la viabilidad de *B. bifidum* libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

El alimento testigo se empleó con la finalidad de elaborar un yogurt simulado, la preparación incluyó leche y almidón, el almidón se utilizó fue para obtener la consistencia de un yogurt comercial. No se empleó un yogurt comercial por dos razones importantes, si el yogurt se introducía al sistema sin esterilizarlo previamente, se corría el riesgo de no tener solamente una cepa, ya que se iban a identificar más de una; por el contrario si se hubiera trabajado con un yogurt esterilizado se iba a perder la consistencia original y se hubiera presentado una separación de fases por la precipitación de proteínas del producto.

Para las cinéticas con alimento testigo, la viabilidad inicial para ambos casos: bacterias libres e inmovilizadas, fue de 100% (Figura 21), este porcentaje corresponde al orden de 10^{10} UFC/mL. Cuando las bacterias fueron sometidas a condiciones estomacales simuladas *in vitro* se observó que únicamente el 4.8% de las células libres mantuvieron su viabilidad, mientras que las células inmovilizadas mantuvieron su viabilidad en un 14.4. % (Cuadro 13). Al término del tratamiento, una vez que las células fueron sometidas a las condiciones intestinales, el porcentaje de viabilidad para células libres fue de 1.6 y de 5.3 para las células inmovilizadas, ambos porcentajes fueron del orden de 10^8 UFC/mL. La prueba de ANOVA de medidas repetidas indicó que entre las células libres e inmovilizadas en presencia de alimento testigo hubo diferencias estadísticas significativas ($F_{1,7} = 139.279$, $p < 0.001$).

Comparando la viabilidad de las células libres control contra las libres en presencia de alimento no se observaron diferencias estadísticas significativas, lo mismo ocurrió al comparar las células inmovilizadas control contra el tratamiento con alimento testigo, lo que implica que únicamente la inmovilización celular contribuyó a que la viabilidad no disminuyera, el efecto del alimento testigo no ayudó adicionalmente a conservar la viabilidad de las bacterias. Esto quiere decir que al consumir un yogurt solo, las bacterias pueden

perder su viabilidad una vez que atraviesen el estómago, sería más conveniente consumir el alimento probiótico acompañado de otros alimentos más elaborados, es decir, que tengan más ingredientes que ayuden a mantener la viabilidad de las células, para que se pudiera observar un efecto protector.

Cuadro 13. Porcentaje de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas en presencia de alimento testigo bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

Tiempo (min)	Viabilidad de células libres (%)	Viabilidad de células inmovilizadas (%)
0	100.0 ± 0.00	100.0 ± 0.00
30	31.6 ± 4.12	43.3 ± 4.07
60	6.0 ± 2.05	27.0 ± 4.83
90	4.8 ± 1.28	14.4 ± 2.25
120	3.5 ± 0.40	10.4 ± 3.26
150	2.5 ± 0.91	9.3 ± 1.22
180	1.5 ± 0.59	9.9 ± 0.96
210	1.2 ± 0.16	7.0 ± 0.73
240	1.6 ± 0.52	5.3 ± 1.04

Nota: los resultados presentados en el Cuadro 13 son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

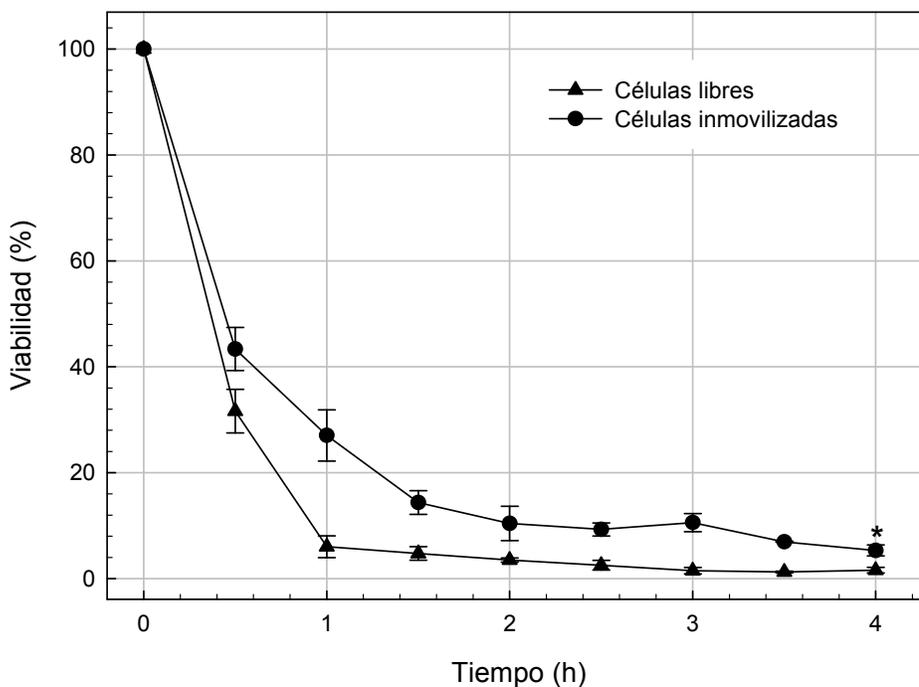


Figura 21. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas en presencia de alimento testigo bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*. (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

6.2.2 Efecto de la presencia de desayuno sobre la viabilidad de *B. bifidum* libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

Basándonos en los resultados de la encuesta, las personas usualmente desayunan un yogurt o una bebida láctea fermentada con una barra de cereal, fruta o pan, es por eso que para esta etapa se seleccionaron los alimentos que la población estudiada consumía frecuentemente y además que presentaban mayor disponibilidad en todas las épocas del año; por tal motivo el alimento diseñado y evaluado fue un desayuno compuesto por leche, plátano y una barra de cereal. En la Figura 22 se observa que las cinéticas iniciaron con un 100% de viabilidad para ambos casos: bacterias libres e inmovilizadas, este porcentaje corresponde al orden de 10^{11} UFC/mL. Después de los primeros 90 minutos de tratamiento que corresponden a las condiciones gástricas se observa que la viabilidad disminuyó 63.6 y 52.9% para las células libres e inmovilizadas, respectivamente (Cuadro 14). Después de que las células fueron sometidas a las condiciones intestinales, la viabilidad para células libres fue de 9.6 y de 14.7% para las células inmovilizadas, ambos porcentajes de viabilidad fueron del orden de 10^{10} UFC/mL. La prueba de ANOVA de medidas repetidas indicó que entre las células libres e inmovilizadas en presencia de desayuno hubo diferencias estadísticas significativas ($F_{1,7} = 139.279$, $p < 0.001$). Por otra parte, comparando la viabilidad de las células libres control y las células libres con desayuno se observaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, lo mismo ocurrió al comparar las células inmovilizadas control contra las células inmovilizadas en presencia de desayuno ($p < 0.001$).

Como se puede apreciar, el tratamiento en presencia de una muestra de desayuno, es el que contiene la muestra de alimento más compleja, además es el que presenta mayor viabilidad para ambos casos: células libres e inmovilizadas. Por tal motivo, es importante describir a detalle los componentes de la mezcla y los posibles efectos benéficos que tuvieron sobre las células para que éstas pudieran mantenerse viables en mayor cantidad.

Como se mencionó anteriormente, la adición de un alimento puede tener un impacto favorable en la viabilidad de los probióticos; por un lado la barra de cereal está formulada a base de cereales los cuales son fuente de proteína y carbohidratos, tienen alto contenido de vitaminas, minerales y fibra, la cual se asocia a efectos benéficos fisiológicos a la salud demostrados no sólo para el funcionamiento del tracto gastrointestinal, sino para la prevención y el tratamiento de numerosas enfermedades entre las que destacan el cáncer de colon y diabetes. La fibra, al igual que el plátano, actúa como prebiótico ya que puede ser utilizada como fuente de carbohidratos no digeribles por el organismo humano, pero si

por la microflora colónica estimulando el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2008).

El plátano contiene alto contenido de azúcares, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa, lo que sugiere que posiblemente las bacterias lácticas podrían emplearlos como sustrato, por otra parte, el plátano también contiene fructooligosacáridos (FOS) los cuales se ha demostrado que tienen efectos benéficos en la salud (Tsen *et al.*, 2004) ya que estimulan el crecimiento de las bacterias ácido lácticas en el colon humano (Ouwehand *et al.*, 2005) disminuyendo el crecimiento de microorganismos patógenos, por lo tanto si se combinan bacterias lácticas probióticas como *Bifidobacterium bifidum* con algunas frutas, como el plátano, que presenta características prebióticas se pueden tener los beneficios de un simbiótico (mezcla de probióticos y prebióticos), aunque no se asegura que bajo las condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro* haya un posible crecimiento de las bacterias probióticas.

Ingerir un desayuno como el que fue evaluado en esta etapa minimiza la pérdida de viabilidad bacteriana ya que la fibra contenida en la barra de cereal y los FOS del plátano pueden actuar como prebióticos, además el soporte de inmovilización provee protección extra a *B. bifidum*. Posiblemente el tamaño de partícula de la muestra que se empleó para simular el desayuno, pudo ayudar a recubrir las esferas de inmovilización ya que el desayuno tenía una consistencia semisólida y recubrió las esferas generando una barrera protectora adicional a la existente para el caso de las células inmovilizadas, que pudo haber retrasado la difusión de los ácidos estomacales o la bilis hepática, esto tiene efecto directo en la viabilidad de *B. bifidum* dado que se hace mas viscoso el sistema y puede recubrir la superficie de las esferas por la composición del alimento, esto sería posible corroborarlo mediante un análisis de imágenes en donde se podría observar que el tamaño de las esferas de inmovilización sería mayor con respecto a los demás tratamientos ya que el desayuno introducido al sistema sirvió como una segunda protección.

De acuerdo a los resultados obtenidos para los tratamientos previamente analizados, es decir tratamiento control y tratamiento en presencia de alimento testigo, cuando se utilizó el desayuno se obtuvo la mayor viabilidad celular, también se puede atribuir a que los alimentos empleados en los demás tratamientos eran fluidos, lo cuales no generaron el segundo recubrimiento del que se hace referencia en este apartado. Asimismo, el desayuno contribuyó a que la viabilidad no disminuyera tanto como se observó en el tratamiento control, dicho comportamiento puede atribuirse a lo reportado por Ruas-Mediedo *et al.* (2002), quienes plantearon que un alimento podría tener impacto favorable en la viabilidad

de las bacterias lácticas por un “efecto buffer” y posiblemente porque provee una barrera protectora en las bacterias ante las condiciones adversas a las que son sometidas. En el modelo propuesto por Mainville *et al.* (2005) se evaluaron diferentes bacterias probióticas bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*, además se adicionó un alimento a base de kefir. Los resultados presentados demuestran la importancia de incorporar un alimento al mismo tiempo que se consumen bacterias probióticas, de esta manera es más probable que las células puedan llegar a su sitio de acción en cantidades suficientes para producir su efecto fisiológico en el huésped.

Cuadro 14. Porcentaje de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas en presencia de desayuno bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

Tiempo (min)	Viabilidad de células libres (%)	Viabilidad de células inmovilizadas (%)
0	100.0 ± 0.00	100.0 ± 0.00
30	36.4 ± 3.43	47.1 ± 3.95
60	26.0 ± 2.58	37.1 ± 5.43
90	22.7 ± 1.15	27.8 ± 4.16
120	14.6 ± 2.04	19.4 ± 1.55
150	15.2 ± 2.87	17.4 ± 0.39
180	13.4 ± 1.64	16.0 ± 1.23
210	11.2 ± 1.13	15.7 ± 1.34
240	9.6 ± 1.68	14.7 ± 0.78

Nota: los resultados presentados en el Cuadro 14 son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

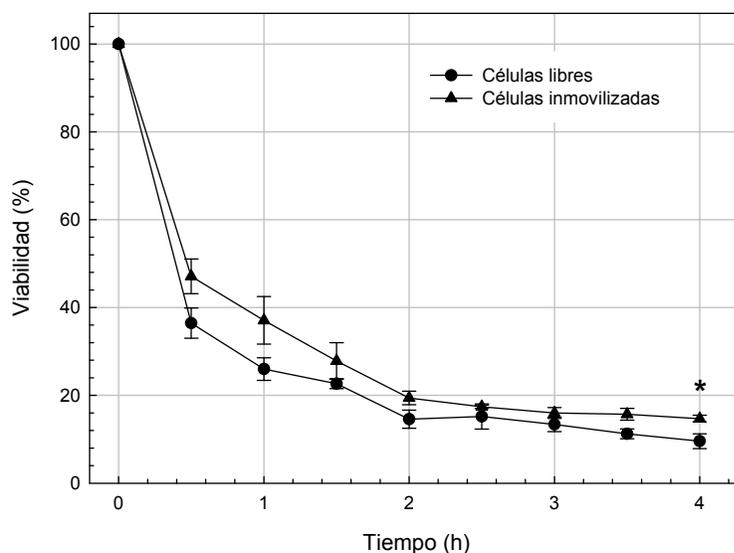


Figura 22. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas en presencia de desayuno bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*. (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

6.2.3 Efecto de la presencia de café soluble sobre la viabilidad de *B. bifidum* libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

De la encuesta realizada se obtuvieron datos que mostraban la preferencia de las personas encuestadas por el consumo de una bebida láctea fermentada acompañada de café negro, es por ello que se evaluó el efecto de una solución de café negro soluble al 1 % sobre la viabilidad de *B. bifidum* tratada en condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

El café es una bebida popular a nivel mundial que es preferida no solo por su sabor y aroma, sino por sus efectos fisiológicos ya que las bebidas de café contienen antioxidantes, fibra soluble y compuestos fenólicos, los cuales son utilizados por el organismo y por la microflora colónica humana (Cämmerer *et al.*, 2006; Brezová *et al.*, 2009). Se ha estudiado y evidenciado que el consumo de dicha bebida puede tener un impacto en la salud de los humanos, la mayoría de estas evidencias se obtuvieron mediante estudios *in vitro* y otros se realizaron en humanos; sin embargo hasta la fecha, no existen investigaciones médicas concretas a cerca de su absorción, distribución y metabolismo en el cuerpo humano.

En el Cuadro 15 se observa la pérdida de viabilidad de *B. bifidum* sometida a condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. La viabilidad inicial fue de 100% (Figura 23), el porcentaje corresponde al orden de 10^{11} y 10^{10} UFC/mL para las células libres e inmovilizadas, respectivamente. Después del tratamiento gástrico se observó que únicamente 10.6% de las células libres mantuvieron su viabilidad, mientras que las células inmovilizadas mantuvieron su viabilidad en un 11.5 % (Cuadro 15). Al término de la simulación, la viabilidad para células libres fue de 0.2 y de 3.6% para las células inmovilizadas, los porcentajes para las células libres fue del orden de 10^8 UFC/mL y 10^9 UFC/mL para las células inmovilizadas. La prueba de ANOVA de medidas repetidas indicó que entre las células libres e inmovilizadas en presencia de café hubo diferencias estadísticas significativas ($F_{1,4} = 261.917$, $p < 0.0001$). Por otra parte, comparando la viabilidad de las células libres control y las células libres con café no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($F_{1,4} = 1.046$, $p < 0.002$), al comparar la viabilidad de células inmovilizadas control y células inmovilizadas con café si se observaron diferencias estadísticas significativas ($F_{1,4} = 57.399$, $p < 0.002$). El efecto protector del soporte de inmovilización es evidente ya que se reportó una mayor viabilidad bajo estas condiciones.

Jaquet *et al.* (2009) evaluaron el efecto del consumo de café en 16 personas saludables que durante tres semanas consumieron 3 tazas de café soluble al día, además no consumieron yogurt ni bebidas con probióticos con la finalidad de no alterar la microflora colónica. El recuento se realizó mediante las heces fecales de cada individuo al inicio y al final del estudio, del cual demostró que el consumo moderado de café tuvo un efecto en la microflora colónica, principalmente en las bifidobacterias ya al final del tratamiento se manifestó que algunos (no todos) pacientes tuvieron mayor cantidad de este grupo de bacterias. Por otro lado se observó que la cantidad de microorganismos patógenos disminuyó y en general el recuento de microorganismos fue menor, sin embargo no se pudo demostrar cuál de los componentes del café era el responsable de dicho comportamiento, únicamente se explicó el efecto modulador de la microbiota. El café instantáneo es reconocido como una fuente importante de polisacáridos, estas características prebióticas fueron asociadas al incremento de bifidobacterias. Sin embargo, en la presente investigación los resultados obtenidos indican lo contrario, lo que se puede atribuir a que el café utilizado pudo tener diferente composición comparado con el que emplearon Jaquet *et al.*, además que las condiciones fisiológicas y metabólicas de cada persona son diferentes, ya que en el estudio mencionado no todos los pacientes presentaron incremento en la viabilidad de bifidobacterias, algunos individuos mostraron disminución. Bebidas como el café y té verde (Ishihara *et al.*, 2001) disminuyen la cuenta total de microorganismos patógenos y no patógenos, a pesar de que la viabilidad o cuenta de bifidobacterias aumenta en humanos, *Bifidobacterium bifidum* es una cepa muy sensible a cualquier ambiente en el que se encuentre; posiblemente el café, acompañado de todas las condiciones del tracto gastrointestinal humano, en lugar de contribuir al mantenimiento de la viabilidad celular, daña a las células impidiendo su reproducción.

Cuadro 15. Porcentaje de viabilidad de células de Bifidobacterium bifidum libres e inmovilizadas en presencia de café bajo condiciones gastrointestinales humanas in vitro.

Tiempo (min)	Viabilidad de células libres (%)	Viabilidad de células inmovilizadas (%)
0	100.0 ± 0.00	100.0 ± 0.00
30	15.1 ± 0.42	22.3 ± 2.92
60	12.4 ± 1.18	16.4 ± 1.28
90	10.6 ± 1.92	11.5 ± 2.48
120	1.7 ± 0.49	10.8 ± 1.60
150	0.9 ± 0.60	6.4 ± 1.67
180	0.6 ± 0.51	5.8 ± 2.03
210	0.1 ± 0.11	3.5 ± 0.80
240	0.2 ± 0.13	3.6 ± 0.42

Nota: los resultados presentados en el Cuadro 15 son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

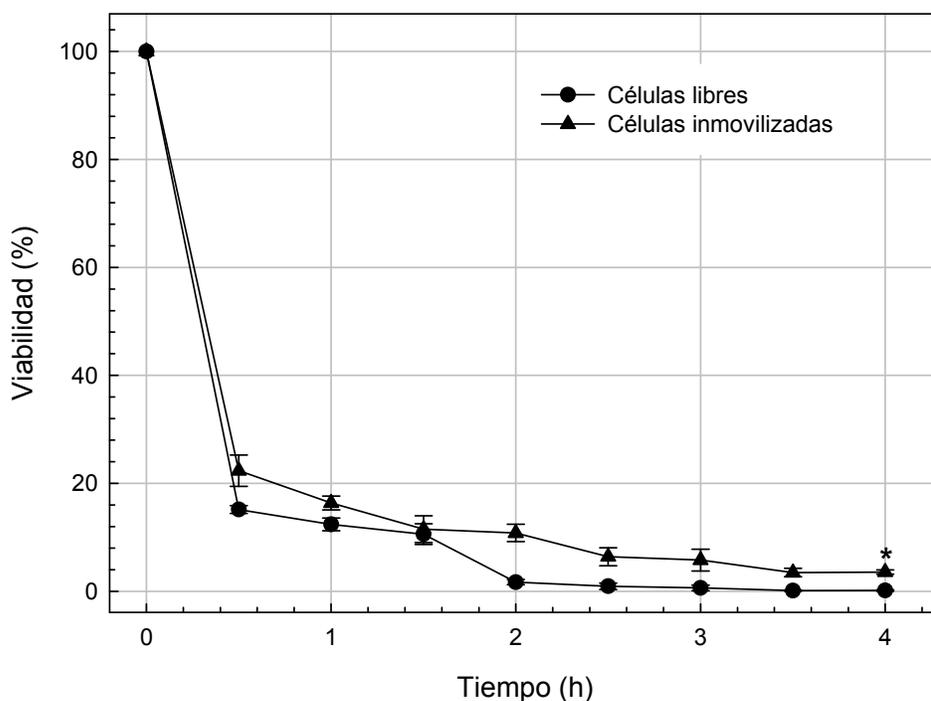


Figura 23. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas en presencia de café bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*. (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

6.2.4 Efecto de la presencia de chile serrano sobre la viabilidad de *B. bifidum* libre e inmovilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

La dieta de los mexicanos es muy variada, uno de los alimentos preferidos y más recurridos en las comidas es el chile, por tal razón para este tratamiento se evaluó el chile serrano con la finalidad de conocer el efecto en las bacterias lácticas probióticas.

En el Cuadro 16 se presenta la pérdida de la viabilidad de *B. bifidum* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. La viabilidad inicial fue de 100% (Figura 24), el porcentaje corresponde al orden de 10^{11} y 10^{10} UFC/mL para las células libres e inmovilizadas, respectivamente. En este tratamiento se logró monitorear la viabilidad de las células únicamente durante los primeros 30 minutos de cinética, la cual fue de 4.7% (el porcentaje corresponde al orden de 10^{10}) para las células libres y de 13.2% (porcentaje del orden de 10^9) para células inmovilizadas. Después de este tiempo no se obtuvo recuento microbiano.

Cuadro 16. Porcentaje de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas en presencia de chile bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

Tiempo (min)	Viabilidad de células libres (%)	Viabilidad de células inmovilizadas (%)
0	100.0 ± 0.00	100.0 ± 0.00
30	4.7 ± 1.30	13.2 ± 5.26
60	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
120	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
150	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
180	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
210	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
240	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Nota: los resultados presentados en el Cuadro 16 son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

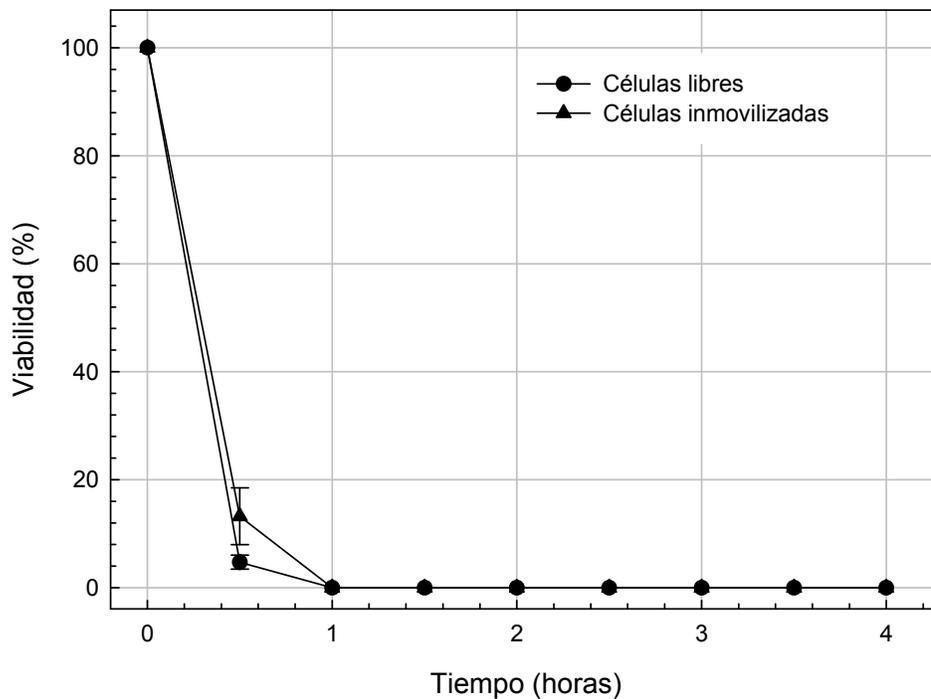


Figura 24. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas en presencia de chile bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

La prueba de ANOVA de una vía indicó que no hubo diferencias estadísticas significativas cuando se trataron las células libres e inmovilizadas en presencia de chile serrano, en este tratamiento fue el único en donde no se observó el efecto protector del soporte de inmovilización sobre la viabilidad de *B. bifidum*, esto se puede atribuir a que el efecto negativo del chile serrano sobre las células es mayor que el efecto benéfico que pueda tener

el soporte sobre la viabilidad celular. Por otra parte, comparando la viabilidad de las células libres control y las células libres en presencia de chile serrano se observó que si hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0.001$), al comparar la viabilidad de células inmobilizadas control y células inmobilizadas en presencia de chile serrano, también se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.001$).

Dorantes *et al.* (2000) evaluaron el efecto del extracto de chile habanero, serrano y pimiento morrón contra 4 bacterias patógenas además identificaron compuestos fenilpropanoides y evidenciaron que el ácido cinámico y *m*-cumárico eran los responsables de la inhibición de las cuatro bacterias. Careaga *et al.* (2003) investigaron la actividad antibacteriana del extracto de *Capsicum annum* en carne inoculada con *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* y observaron que bajo algunas condiciones (diferentes microorganismos, concentraciones de extracto y de NaCl) se producía un efecto bacteriostático y en otras un efecto bactericida. Posteriormente Acero-Ortega *et al.* (2005) analizaron extractos de diez variedades de *Capsicum annum* mediante HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) e identificaron 7 compuestos, 3 de ellos mostraban un efecto inhibitor en *Listeria monocytogenes*. Por tal motivo es importante describir la composición del chile serrano y su efecto negativo sobre la viabilidad celular de *B. bifidum* (Figura 24). De acuerdo con Acero-Ortega *et al.* (2003), la capsaicina, el ácido caféico y cinámico son los compuestos que afectan la viabilidad de las bacterias.

En el Cuadro 17 se muestran los compuestos identificados en tres tipos de chiles consumidos comúnmente por los mexicanos; el chile serrano es el que presenta los valores más altos de los compuestos que como anteriormente se ha mencionado, repercuten en la viabilidad de las bacterias patógenas. En la literatura no se encuentran disponibles estudios que evidencien el efecto del chile en bacterias lácticas probióticas, sin embargo recopilando la información existente y extendiéndola al tratamiento que se realizó en esta investigación, es posible que el alto contenido de capsaicina y ácido caféico en el chile serrano, aunado a la alta sensibilidad que *B. bifidum* presenta a las condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*, hayan sido los principales factores que afectaron su viabilidad.

Cuadro 17. Concentración de compuestos de fenilpropanoides en *Capsicum annum*.

Modificado de Acero-Ortega et al. (2003).

Compuestos	Chile serrano	Guajillo	Jalapeño
Ácido <i>t</i> -cinámico	0.66 mg/mL	0.80 mg/mL	ND
Ácido <i>o</i> -cumárico	0.18 mg/mL	0.37 mg/mL	ND
Ácido <i>m</i> -cumárico	0.009 mg/mL	0.09 mg/mL	0.20 mg/mL
Ácido caféico	0.10 mg/mL	ND	ND
Capsaicina	6.5 mg/mL	4.65 mg/mL	7.63 mg/mL

ND: no detectado

6.2.5 Efecto de la presencia de cerveza sobre la viabilidad de *B. bifidum* libre e inmobilizado, bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

De acuerdo a la encuesta realizada, algunas personas acostumbran tomar un yogurt antes de consumir bebidas alcohólicas para evitar daño en la flora intestinal, de ahí surgió el interés por evaluar una marca comercial de cerveza, que es una de las bebidas tradicionales más consumidas por la población mexicana.

En el Cuadro 18 se observa la pérdida de viabilidad de *B. bifidum* tratada bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. La viabilidad inicial fue de 100% (Figura 25), el porcentaje corresponde al orden de 10^{11} UFC/mL para las células libres e inmobilizadas. La viabilidad únicamente se pudo monitorear los primeros 30 minutos de cinética, las células libres presentaron 19.4% de viabilidad, mientras que las células inmobilizadas mantuvieron su viabilidad en un 42.8 % (Cuadro 18), cabe señalar que para las células libres la viabilidad se mantuvo en el orden de 10^{10} UFC/mL y 10^{11} UFC/mL para las células inmobilizadas.

La prueba de ANOVA de una vía indicó que hubo diferencias estadísticas significativas cuando se trataron las células libres e inmobilizadas en presencia de cerveza ($p < 0.001$). Al comparar la viabilidad de las células control y las células en presencia de cerveza (tratamiento con células libres e inmobilizadas) se observó que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.

Las bacterias ácido lácticas se dividen en homofermentativas las cuales producen ácido láctico como principal metabolito, las heterofermentativas además producen etanol y dióxido de carbono. Dentro de las condiciones que limitan la viabilidad de las bacterias homofermentativas se encuentra la exposición a valores muy ácidos de pH, altas

temperaturas, aunado a esto, la presencia de etanol también afecta la viabilidad, tal es el caso de *Bifidobacterium bifidum*. Como se puede apreciar en la Figura 25, la viabilidad se pierde en su totalidad después de 30 minutos bajo condiciones gástricas simuladas *in vitro*, esto implica que al ingerir alguna bebida con microorganismos probióticos acompañada con cerveza o alguna bebida similar con 6° G. L., el efecto que proveen las bacterias es nulo ya que el etanol las afecta de tal manera que impide que lleguen viables a su sitio de acción. Este comportamiento no se observaría en el caso de una bacteria heterofermentativa ya que puede mantener su viabilidad en presencia de etanol y el daño sería causado por las condiciones antes mencionadas.

Cabe señalar que de acuerdo a los resultados obtenidos en este tratamiento, únicamente la inmovilización celular ayudó a mantener la viabilidad de *B. bifidum* durante los primeros minutos de la simulación del tracto gastrointestinal humano *in vitro*, la presencia del etanol y las condiciones ácidas simuladas en el estómago evitaron que *B. bifidum* permaneciera viable hasta el final de la cinética lo que sugiere que el consumo de bebida alcohólicas tiene efectos negativos sobre la viabilidad de los microorganismos con características probióticas.

Cuadro 18. Porcentaje de viabilidad de células de Bifidobacterium bifidum libres e inmovilizadas en presencia de cerveza bajo condiciones gastrointestinales humanas in vitro.

Tiempo (min)	Viabilidad de células libres (%)	Viabilidad de células inmovilizadas (%)
0	100.0 ± 0.00	100.0 ± 0.00
30	19.4 ± 4.13	42.8 ± 6.13
60	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
120	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
150	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
180	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
210	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
240	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Nota: los resultados presentados en el Cuadro 18 son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

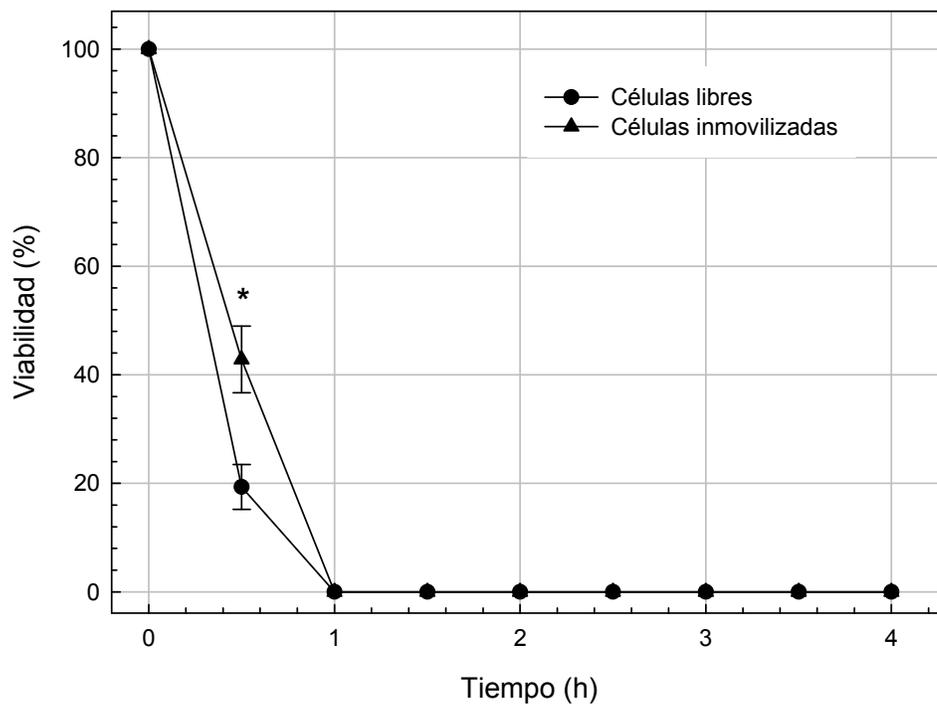


Figura 25. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* libres e inmovilizadas en presencia de cerveza bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*. (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas (Prueba de Duncan, $p < 0.05$).

VII. CONCLUSIONES.

- La viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* NRRL-41410 se evaluó en un simulador del tracto gastrointestinal humano *in vitro* y se demostró que en todos los tratamientos la viabilidad de las bacterias inmovilizadas en un soporte de alginato de sodio al 2% resultó ser mayor con respecto a las células que no fueron inmovilizadas. Esto indica que si existe una protección a las bacterias lácticas probióticas, específicamente a *B. bifidum* cuando fue sometida condiciones gástricas e intestinales similares a las del tracto gastrointestinal humano.
- De acuerdo a los resultados obtenidos de los tratamientos en presencia de alimentos podemos decir que es recomendable ingerir una bebida con características probióticas acompañada con alguna fruta o barra de cereal ya que maximiza su viabilidad, además algunas frutas y cereales contienen fructooligosacáridos que actúan como prebióticos, con un desayuno poco elaborado se pueden obtener los beneficios de un alimento simbiótico.
- Por otro lado, si se consumen probióticos con alimentos con alto contenido de capsaicina o bebidas alcohólicas, no se observará ningún beneficio a la salud, por el contrario, la microflora intestinal disminuirá y las bacterias probióticas ingeridas no llegarían viables a su sitio de acción.
- Se evidenció que *B. bifidum* es una bacteria muy sensible a condiciones gástricas, sin embargo, cuando las células se evaluaron inmovilizadas y en presencia de un desayuno, su viabilidad permaneció en las cantidades adecuadas, es decir en el orden de 10^8 UFC/mL, para ejercer su efecto benéfico en el colon humano.
- Por otro lado, la microscopía electrónica de barrido ambiental y el análisis de imágenes resultaron técnicas útiles para monitorear los cambios morfológicos y microestructurales del soporte de inmovilización causado durante la exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas *in vitro*.
- De acuerdo a los parámetros obtenidos mediante el análisis de imágenes se observó que el tamaño de las esferas de inmovilización a lo largo de la simulación (tratamiento control), incrementó en todos los casos con respecto al tamaño inicial de las esferas. Los valores de la dimensión fractal y de la entropía indicaron que la superficie de las esferas se volvió más rugosa y heterogénea; en el interior de las esferas se observó una estructura más lisa y homogénea.

VIII. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se evaluó la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum*, sin embargo, se podrían evaluar otras bacterias lácticas con características probióticas que se emplean comúnmente en la industria de los alimentos lácteos fermentados, también se podrían introducir alimentos adicionales a los ya evaluados para hacer más completa la simulación de las condiciones en el tracto gastrointestinal humano, incluso se podrían evaluar los productos comerciales más consumidos por la población con la finalidad de determinar la viabilidad de los microorganismos cuando son sometidos a las condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*.

Las características antes mencionadas, se relacionan con el impacto social que lograría al emitir recomendaciones sobre la forma en la cual se deben consumir dichos productos lácteos, en vista de mantener la viabilidad de los microorganismos involucrados.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Acero-Ortega, C., Dorantes-Alvarez, L., Hernández-Sánchez, H., Gutiérrez-López, G., Aparicio, G. & Jaramillo-Flores, M. E. (2005). Evaluation of Phenylpropanoids in Ten *Capsicum annum* L. Varieties and Their Inhibitory Effects on *Listeria monocytogenes* Murray, Webb and Swann Scott A. Food Science and Technology International. 11: 5-10.
2. Ainsley, R. A., Vuilleumard, J. C., Britten M., Arcand Y., Farnworth E. & Champagne C. P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺ induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. Journal of Microencapsulation. 22: 603-619.
3. Aguilera, J. M. (2001). Tamaño y forma de las partículas. En: Alvarado J. D. Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos. Editorial Acribia. España. pp 29-48.
4. Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J. J., Jiménez-Aparicio, A. R. & Gutiérrez-López, G. F. (2005). Description of morphological changes of particles along spray drying. Journal of Food Engineering. 67: 179-184.
5. Allan-Wojtas, P., Truelstrup, H. L. & Paulson, A. T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. LWT Food Science and Technology. 41: 101-108.
6. Annan, N.T., Borza, A. D. & Truelstrup, H. L. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro intestinal conditions. Food Research International. 41: 184–193.
7. Annan, N. T., Borza, A. D., Moreau, D. L., Allan-Wojtas, P. M., & Truelstrup, H. L. (2007). Effect of process variables on particle size and viability of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in genipin–gelatin microspheres. Journal of Microencapsulation. 24:152–162.
8. Araya-Kojima, T., Yaeshima, T., Ishibashi, N., Shimamura, S. & Hayasawa, H. (1996). Inhibitory effects of human-derived *Bifidobacterium* on pathogenic *Escherichia coli* serotype O-111. Biosci. Microfl. 15: 17–22.
9. Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars Pharmaceutica, 39:2; 23-39.

-
-
10. Begley, M., Gahan, C. G. M. & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 625-651.
 11. Berne, R. & Levy, M. (1999). *Fisiología*. Mosby/Doyma Libros. México, pp 398-399.
 12. Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 399S-405S.
 13. Beyer, M., Hahn, R., Peschel, S., Harz, M., & Knoche, M. (2002). Analyzing fruit shape in sweet cherry (*Prunus avium L.*). *Scientia Horticulturae*. 96: 139–150.
 14. Brezova, V., Šlebodova, A. & Staško, A. (2009). Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*. 114: 859–868.
 15. Briones, V. & Aguilera, J. M. (2005). Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Research International*. 38: 87–94.
 16. Cämmerer, B., & Kroh, L. W. (2006). Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*. 223: 469–474.
 17. Careaga, M., Fernández E., Dorantes, L., Mota, L., Jaramillo M. E. & Hernández, H. (2003). Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *International Journal of Food Microbiology*. 83: 331-335.
 18. Champagne, C. P. & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 18: 184-190.
 19. Charteris, W. P., Nelly, P.M., Morelli, L. & Collins, J.K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 759–768.
 20. Chateau, N., Deschamps, A. M. & Hadj, A. S. (1994). Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters of Applied Microbiology*. 18: 42–44.

-
-
21. Cheikhoussef, A., Pogori, N., Chen, W. & Zhang, H. (2008). Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology*. 125: 215–222
 22. Chung, H. S., Kim, Y. B., Chun, S. L. & Ji, G. E. (1999). Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 47: 25-32.
 23. Clark, P.A. & Martin, J.H. (1994). Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods. III. Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. *Cult. Dairy Prod. J.* 29: 18–21.
 24. Cruz, P. K. (2007). Inmovilización celular por atrapamiento, como vehículo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*. Tesis de Maestría. UPIBI-IPN, México.
 25. Dorantes, L., Colmenero, R., Hernández, H., Mota, L., Jaramillo, M. E., Fernández, E. & Solano, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*. 57: 125-128.
 26. Du, C. J. & Sun, D. W. (2004). Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*. 15: 230–249.
 27. Duggan, C., Gannon, J. & Walker, W. (2002). Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*. 75:789-808.
 28. Durán-Páramo, E. (1997). Etude du comportement physiologique de *Bacillus subtilis* ATCC-21556 confiné et en suspension: suivi des métabolites et d'activités enzymatiques endo et exocellulaires. Tesis de doctorado. Université de Technologie de Compiègne, Francia.
 29. El Sector Alimentario en México. (2007). Serie de Estadísticas Sectoriales. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.
 30. Escalante, L. A. (2001). El potencial de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Enfermedades infecciosas y microbiología*. 21:106-114.

-
-
31. Favaro-Trindade, C. S. & 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.
 32. Fernández, L., Castellero C. & Aguilera, J. M. (2005). An application of image analysis to dehydration of apple discs. *Journal of Food Engineering*. 67: 185–193.
 33. Figueroa, I, Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. & Cruz-Guerrero, A. (2006). El beneficio de los probióticos. *Industria Alimentaria*.
 34. Ganong, F. W. (2002). *Fisiología Médica*. Ed. El Manual Moderno. México. pp. 397-434.
 35. García-Garibay, M. (1996). Leches fermentadas como vehículos de probióticos. *Tecnología Alimentaria*.
 36. Guyton, A. C. (1994). *Fisiología y fisiopatología*. Mc Graw Hill. México. pp. 506-524.
 37. Guyton, A. C. & Hall, J. E. (1989). *Tratado de fisiología médica*. Editorial El Manual Moderno. México. pp. 750-791.
 38. Haralick, R. M., Shanmugam, K., & Dinstein, I. (1973). Texture parameters for image classification. *Institute of Electrical and Electronics (IEEE). Transactions on Systems, Man and Cybernetics*. 610-621pp.
 39. Homma, N., 1988. Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobact. Microfl.* 7: 35–43.
 40. Ibrahim, S.A. & Bezhorovainy, A. (1993). Survival of bifidobacterias in the presence of bile salt. *Journal of Science of Food Agriculture*. 62: 351–354.
 41. Ioannou, I., Perrot, N., Hossenlopp, J., Mauris, G., & Trystram, G. (2002). The fuzzy set theory: a helpful tool for the estimation of sensory properties of crusting sausage appearance by a single expert. *Food Quality and Preference*. 13: 589–595.
 42. Ishihara, N., Chu, D. C., Akachi S. & Juneja, L.R. (2001). Improvement of intestinal microflora balance and prevention of digestive and respiratory organ diseases in calves by green tea extracts. *Livestock Production Science*. 68: 217–229.

-
-
43. Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M. & Jakobsen, M. (1999) Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 4949– 4956.
 44. Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J., Cavin, C. & Bibiloni, R. (2009). Impact of coffee consumption on the gut microbiota: A human volunteer study. *International Journal of Food Microbiology*. 130: 117–121.
 45. Kailasapathy, K. & Chin, J. (2000) Survival and potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology Cell Biology*. 78:80-88.
 46. Klingberg, T. D. & Budde, B. B. (2006). The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic *lactobacilli* consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *International Journal of Food Microbiology*. 109: 157-159.
 47. Leahy, S. G., Higgings, D. G., Fitzgerald, G. F., Sinderen, D. (2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 98:1303–1315.
 48. Leemans, V., Magein, H., & Destain, M. F. (1999). Defect segmentation on 'Jonagold' apples using colour vision and a Bayesian classification method. *Computers and Electronics in Agriculture*. 23: 43–53.
 49. Li, J., Tan, J., Martz, F. A., & Heymann, H. (1999). Image texture features as indicators of beef tenderness. *Meat Science*. 53: 17–22.
 50. Lian, W. C., Hsiao, H. C., & Chou, C. C. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 293– 301.
 51. Lindner, J. D., Canchaya, C., Zhang, Z., Neviani, E., Fitzgerald, G. F., Sinderen, D. V. & Ventura, M. (2007). Exploring *Bifidobacterium* genomes: The molecular basis of stress response. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 13-24.
 52. Lu, J., Tan, J., Shatadal, P., & Gerrard, D. E. (2000). Evaluation of pork color by using computer vision. *Meat Science*. 56: 57–60.

-
-
53. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2004). Brock Biología de los Microorganismos. Editorial Pearson Educación, 10a Edición. México, pp. 137-166, 719-746.
54. Mainville, I., Arcand, Y. & Farnworth, E.R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 99: 287– 296.
55. Mandelbrot, B.B. (1977). *The Fractal Geometry of Nature*; Freeman: New York. pp. 30–41.
56. Marco, M. L., Pavan, S. & Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*. 17: 204-210.
57. Ouwehand, C. A., Derrien, M., Vos W., Tiihonen, K. & Rautonen, N. (2005). Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Current Opinion in Biotechnology*. 16:212–217.
58. Pavez, J., Silva, J. F., & Melo, F. (2005). Effects of alginic acid from marine algae on calcium carbonate electrodeposited coating. *Journal of Crystal Growth*. 282: 438–447.
59. Prakash, S. & Jones, M. L. (2005). Artificial cell therapy: New strategies for the therapeutic delivery of live bacteria. *Journal of Biomedical Biotechnology*. 1: 44–56.
60. Quevedo, R., López, G. R., Aguilera, J. M., & Cadoche, L. (2002). Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *Journal of Food Engineering*. 53: 361-371.
61. Quevedo, R., Mendoza, F., Aguilera, J. M., Chanona, J. & Gutiérrez-López G. (2008). Determination of senescent spotting in banana (*Musa cavendish*) using fractal texture Fourier image. *Journal of Food Engineering*. 84: 509-515.
62. Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y. (2008). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*. doi:10.1016/j.fm.2008.06.008.

-
-
63. Rozada-Sánchez, R., Sattur, A. P., Thomas, K. & Pandiella, S. S. (2008). Evaluation of *Bifidobacterium* spp. for the production of a potentially probiotic malt-based beverage. *Process Biochemistry*. 43: 848–854.
 64. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12: 163–171.
 65. Sánchez-Pardo, M. E., Ortiz-Moreno, A. Mora-Escobedo, R., Chanona-Pérez, J. J. & Necochea-Mondragón, H. (2007) Comparison of crumb microstructure from pound cakes baked in a microwave or conventional oven. *LWT Food Science and Technology*. 41: 620-627.
 66. Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. & Gorbach, S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. *Lactic Acid Bacteria 2nd Edition*. pp. 211-253.
 67. Santacruz, I., Nieto, M. I. & Moreno, R. (2005). Nuevas aplicaciones de los alginatos en el conformado cerámico. *Bol. Soc. Esp. Ceram*. 44:45-52.
 68. Santacruz-Vázquez, V., Santacruz-Vázquez, C., Chanona-Perez, J. J., Alamilla-Beltrán, L., Welti-Chanes, J. & Gutierrez-Lopez, G. F. (2007). Fractal Geometry and Natural Sciences Applications. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*. 1: 1-3.
 69. Sarkar, N. & Chaudhuri, B. (1994). An efficient differential box counting approach to compute fractal dimension of images. *IEEE. Trans. Syst. Man Cybernet*. 24: 115–120.
 70. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 47–55.
 71. Sun, W. & Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*. 61:17-25.

-
-
72. Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P., & Skjak-Bræk, G. (1996). Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials*. 17: 1031–1040.
73. Tsen, J. H., Lin, Y.P. & King, V. (2004). Fermentation of banana media by using κ -carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Microbiology*. 91: 215– 220.
74. Wan, Y. N., Lin, C. M., & Chiou, J. F. (2002). Rice quality classification using an automatic grain quality inspection system. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers (ASAE)*. 45: 379–387.
75. Wang, H. H., & Sun, D. W. (2001). Evaluation of the functional properties of cheddar cheese using a computer vision method. *Journal of Food Engineering*. 49: 47–51.
76. Wen-Shiung, C., Shang-Yuan, Y., & Chih-Ming, H. (2003). Two algorithms to estimate fractal dimension of gray-level images. *Optical Engineering*. 42: 2452–2464.