



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas libres y encapsuladas contra *Helicobacter pylori in vitro*

Presenta:

Johana Rangel Martínez

Para obtener el título de

Licenciada en Química de Alimentos

Directora de tesis

Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés

Codirector de Tesis

Dr. Javier Castro Rosas

Mineral de la Reforma Hidalgo, fecha 24 de agosto del 2023



Mineral de la Reforma, Hgo., a 8 de septiembre de 2023

Número de control: ICBI-D/1445/2023
Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de la Licenciatura en Química de Alimentos **Johana Rangel Martínez**, quien presenta el trabajo de titulación "**Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas libres y encapsuladas contra *Helicobacter pylori in vitro***", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente Dra. Irais Sánchez Ortega

Secretario: Dra. Esmeralda Rangel Vargas

Vocal: Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés

Suplente: Dr. Javier Castro Rosas

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI



OAAS/YCC

Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México, C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx



DEDICATORIA.

Dedico esta tesis a mis amigos quienes fueron un gran apoyo emocional, agradezco por su amistad y ayuda durante el tiempo en que realice esta tesis, ellos hicieron posible que este trabajo se convirtiera en una realidad.

A mis padres quienes me apoyaron todo el tiempo, por su amor incondicional y por creer en mí desde el primer día, por sus sacrificios y su apoyo constante que ha sido la clave de mi éxito, este logro es también suyo.

Para mi abuelita, por su ejemplo, su sabiduría, por estar siempre conmigo durante este proceso tan largo, nunca podré pagarle todo su sacrificio.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

A mi querida Alma Mater, La Doctora Nallely y a todas las personas que la conforman les agradezco de todo corazón. No podría haber llegado hasta aquí sin su apoyo.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

Mi agradecimiento especial a la Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo, la cual me abrió sus puertas para formarme profesionalmente

¡GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	10
2.1. <i>Helicobacter pylori</i>	10
2.1.7 Utilización de probióticos en combinación con antibióticos en el tratamiento de <i>H. pylori</i>	16
2.1.7.1 Utilización de probióticos solos en el tratamiento de <i>H. pylori</i>	17
2.1.7.2 Mecanismos de acción de probiótico contra <i>H. pylori</i>	17
2.2. Probióticos	18
2.2. Prebióticos	22
2.3. Simbióticos	23
2.4. Microencapsulación	24
2.4.2. Estructuras de las microcápsulas	24
2.4.3. Secado por aspersion	25
2.4.4. Microencapsulación de simbióticos	26
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	29
5.1. Objetivo general	29
5.2. Objetivos específicos	29
VI. METODOLOGÍA	30
6.1 Material biológico	31
6.2 Activación de las BAL y <i>Helicobacter pylori</i>	31
6.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de BAL sin prebióticos contra <i>Helicobacter pylori in vitro</i>	32
6.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de BAL adicionadas con prebióticos contra <i>Helicobacter pylori in vitro</i>	33
6.4 Microencapsulación de BAL	33
6.4.1 Proceso de secado por aspersion	33
6.5 Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersion	35
6.5.1. Eficiencia de encapsulación (%)	35
6.5.4 Caracterización morfológica de las microcápsulas por MEB	37
6.5.6 Resistencia a sales biliares de BAL libres y encapsuladas	38

6.5.7 Actividad antimicrobiana de BAL contra <i>Helicobacter pylori</i> después del proceso de encapsulación	38
6.6. Análisis estadístico	39
VII. RESULTADOS	40
7.1 Actividad antimicrobiana de las BAL con y sin prebióticos contra <i>Helicobacter pylori</i>	40
7.2 Caracterización de los microencapsulados obtenidos mediante secado por aspersión	42
7.2.1 Eficiencia de encapsulación (%)	42
7.2.2. Actividad de agua (a_w) y contenido de humedad (%) de los encapsulados	43
7.2.3. Morfología de microcápsulas	44
7.2.4. Resistencia a pH 2	47
7.2.5. Resistencia a sales biliares	50
7.2.6. Actividad antimicrobiana de las BAL encapsulada con y sin prebióticos contra <i>Helicobacter pylori</i>	52
7.2.7 Viabilidad de las bacterias de las microcápsulas durante el almacenamiento	53
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. PERSPECTIVAS	58
X. REFERENCIAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen tridimensional de <i>Helicobacter pylori</i>	10
Figura 2. Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	12
Figura 3. Colonización de <i>Helicobacter pylori</i>	14
Figura 4. Directrices para evaluación de probióticos para su uso en alimentos...	21
Figura 5. Esquema del equipo de secado por aspersion	26
Figura 6. Diagrama general de la metodología experimental.....	30
Figura 7. Sistema de cajas Gaspack	32
Figura 8. Equipo de secado por aspersion BUCHI Mini Spray Dryer B –191.....	35
Figura 9. Microscopio electrónico de barrido (MEB).....	37
Figura 10. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de bacterias ácido lácticas contra <i>H. pylori</i> con y sin prebiótico.	40
Figura 11. Microfotografías de microencapsulados con BAL a) sin prebióticos y b) con prebióticos (1000x).....	46
Figura 12. Viabilidad BAL libre, encapsulada con y sin prebiótico después de someterse a pH 2 durante 3 h de exposición; a) L17, b) L19, c) L25.....	49
Figura 13. Viabilidad BAL libre, encapsulada con y sin prebiótico después de someterse a concentración del 0.3% de sales biliares durante 3 h de exposición; a) L17, b) L19, c) L25.....	51
Figura 14. Actividad antimicrobiana de las bacterias BAL <i>Enterococcus lactis</i> (L17, L19 y L25) después del proceso de encapsulación	52
Figura 15. Viabilidad BAL encapsulada con y sin prebiótico después de nueve semanas de almacenamiento a) L17, b) L19, c) L20 y d) L25.....	54
Figura 16. Microfotografías de BAL encapsuladas después de 9 semanas de almacenamiento	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Polímeros utilizados para la encapsulación de probióticos	25
Tabla 2. Bacterias ácido lácticas (BAL) con potencial probiótico, utilizadas en la investigación.....	31
Tabla 3. Porcentajes de adición de prebiótico para el crecimiento de BAL en medio de cultivo MRS.....	33
Tabla 4. Mezclas de bacterias ácido lácticas con y sin prebióticos para su encapsulación mediante secado por aspersión.....	34
Tabla 5. Eficiencia de encapsulación (%EE), conteo de humedad (%), actividad de agua, para ensayos de BAL con y sin prebióticos	43

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue microencapsular simbióticos mediante la técnica de secado por aspersión y evaluar la actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori in vitro*. Como primera etapa se evaluó la actividad antimicrobiana de cuatro cepas de bacterias ácido lácticas (*Lactocaseibacillus paracasei* UAEH20 (L20), *Enterococcus lactis* UAEH 17 (L17), *Enterococcus lactis* UAEH 19 (L19), *Enterococcus lactis* UAEH 25 (L25)) con y sin prebióticos (inulina (INU) y fructooligosacáridos (FOS)) contra *H. pylori in vitro*. Posteriormente los mejores tratamientos de actividad antimicrobiana fueron encapsulados usando el secado por aspersión, se utilizó en el equipo una temperatura de entrada de 100 °C y como material de pared almidón N-lok. Después del proceso de encapsulación se determinó la eficiencia de encapsulación (%EE), la viabilidad de las bacterias encapsuladas (UFC/g) en condiciones similares de pH y sales biliares, la morfología, actividad de agua y humedad (%) y finalmente la actividad antimicrobiana *in vitro* contra *H. pylori* de las microcápsulas. Las mejores mezclas con actividad antimicrobiana contra *H. pylori* fueron L17 más INU; L19 más FOS más INU; L25 más INU. L20 no presentó actividad antimicrobiana. Las microcápsulas se caracterizaron, presentaron morfología irregular con cavidades resultado del secado por aspersión, con tamaños entre los ≈ 10 a 20 μm , se obtuvieron eficiencias de encapsulación de 90.8 a 98.4 %EE, y se evaluó la viabilidad a pH similar al estómago (> 6 Log UFC/g) y concentración alta de sales biliares (> 7 Log UFC/g), la humedad de los polvos se presentó en un rango de 5.1 a 5.8 % y la actividad de agua entre 0.2 a 0.3, para la actividad antimicrobiana después del secado por aspersión se obtuvieron halos de inhibición de (12 mm), se obtuvo que el uso de prebiótico favoreció la actividad antimicrobiana contra *H. pylori*, además se evaluó la viabilidad de las bacterias después de nueve semanas a 25 ± 3 °C, y se obtuvo que la mezcla de probióticos y prebióticos (simbióticos) presentaron una supervivencia mayor durante el almacenamiento en comparación a los microencapsulados sin el prebiótico, con valores superiores a 8 Log UFC/g, concentración requerida por la OMS para que estos microorganismos puedan tener un efecto benéfico en el consumidor.

I. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un patógeno que afecta principalmente al sistema gastrointestinal, causando enfermedades como úlceras gastroduodenales, gastritis y adenocarcinoma gástrico, la infección por *H. pylori* afecta alrededor del 50% de la población mundial de los cuales los países subdesarrollados son los que poseen un mayor impacto al desarrollar una prevalencia de hasta el 90%. *H. pylori* es un patógeno de gran importancia en la salud, su constante resistencia a los antimicrobianos hace que su erradicación no se logre, teniendo como consecuencia que la infección sea más grave (Cammarota *et al.*, 2012). De acuerdo con lo complejo de la situación, al tratar con un patógeno como *H. pylori* se han implementado estudios para encontrar un tratamiento que resulte efectivo para la erradicación del patógeno, a partir del año 2001 se han realizado experimentos con el uso de probióticos en terapias como coadyuvante en pacientes infectados por *H. pylori*, géneros como *Lactobacillus*, *Saccharomyces boulardii* and *Bifidobacterium*, han demostrado tener actividad anti - *H. pylori in vitro* y en modelos animales (Lv *et al.*, 2015). Los efectos de los probióticos sobre *H. pylori* pueden deberse a mecanismos inmunológicos y no inmunológicos: i) competencia en el sitio del epitelio de la mucosa del estómago; ii) producción de sustancias contra *H. pylori*, como ácidos orgánicos; iii) regulación de la función inmunológica y secreción de inmunoglobulina A para mejorar la capacidad defensiva de la mucosa; sin embargo no se ha reportado un mecanismo definido. No obstante resulta atractivo el investigar el efecto de la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en mezcla con prebiótico. Para incrementar la sobrevivencia de las bacterias ácido lácticas, se ha recurrido a la microencapsulación, la cual es una técnica que ayuda a proteger los microorganismos de condiciones adversas, destacando por su versatilidad, fácil manejo y económico el proceso de secado por aspersión. Por todo lo anterior el objetivo de este trabajo fue microencapsular simbióticos mediante la técnica de secado por aspersión y evaluar la actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Helicobacter pylori*

2.1.1. Generalidades

Helicobacter pylori es una bacteria descubierta en 1982 por los científicos Robin Warren y Barry Marshall y como resultado el premio nobel, *H. pylori* es una bacteria microaerófilo, Gramnegativa, de crecimiento lento y forma helicoidal (**Figura 1**) con abundantes flagelos (2 a 6), es considerada una bacteria exigente, ya que requiere de medios suplementados para su crecimiento (Posse *et al.*, 2006).

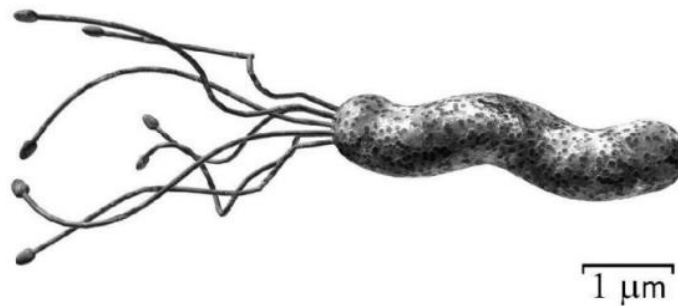


Figura 1. Imagen tridimensional de *Helicobacter pylori*. Fuente: Barry Marshall (2002)

2.1.2. Incidencia a nivel mundial y nacional

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2021) anualmente, el cáncer gástrico produce más de un millón de muertes en el mundo y el 90% de esos tumores son secundarios a la infección por *H. pylori*, bacteria que en 1994 fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como cancerígeno tipo I y que fue ratificada en 2010. Incluso, adicionalmente a la patología gástrica, es responsable de casos de anemia por deficiencia de hierro y vitamina B12, y trombocitopenia inmune.

Más de 30 años después de su descubrimiento, la infección por *H. pylori* sigue siendo la causa más frecuente de enfermedades gástricas y duodenales (Delgado *et al.*, 2018). En México la medida de seroprevalencia de *H. pylori* reportada por parte de la población general es de un 66%, mientras que a nivel mundial afecta a un 50% de la población (Ladrón *et al.*, 2019). Aunque se tiene registro de tantas personas infectadas el modo exacto de su transmisión aún sigue causando controversia, se tiene que en los países en desarrollo la población infectada presenta de entre 50 y 90% (Webb *et al.*, 1994), esto explica la prevalencia de esta infección al estar estrechamente relacionada con las condiciones socioeconómicas de las personas, reflejando las escasas condiciones de higiene, la transmisión de este patógeno es probablemente vía fecal-oral ya que se ha detectado en agua contaminada, principalmente se adquiere por la ingestión oral de la bacteria y puede ser transmitida de persona en persona (Hulten *et al.*, 1996).

2.1.3. Infección por *Helicobacter pylori*

Antes de 1982, se pensaba que la mayor causa de la úlcera péptica era el estrés y el estilo de vida; ahora se sabe que *H. pylori* está implicado en más del 90% de las úlceras duodenales y hasta el 80% de las úlceras gástricas (Posse *et al.*, 2006). *H. pylori* es la causa principal de la gastritis crónica, la úlcera péptica, el linfoma MALT gástrico y el adenocarcinoma gástrico (Eidt *et al.*, 1994; Uemura *et al.*, 2001; Correa, 2003). Un cuadro clínico de infección de *H. pylori* puede llegar a ser muy variable y está influido por factores tanto microbianos como del huésped (**Figura 2**), el patrón y la distribución de la gastritis se correlaciona con el riesgo de secuelas clínicas, como lo son, úlceras duodenales o gástricas, atrofia de la mucosa, carcinoma o linfoma gástricos (Dixon, 2001).

Los pacientes con gastritis más predominio antral, son las más comunes y están más predispuestos a ser úlceras duodenales, mientras que los pacientes donde existe un predominio de cuerpo y atrofia multifocal tienen más probabilidad de contraer úlceras gástricas, atrofia gástrica, metaplasia intestinal y en último caso carcinoma gástrico (Marshall *et al.*, 1988). El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte más frecuente relacionada con cáncer. Existen diferentes pruebas de que

H. pylori es un causante del aumento del riesgo para contraer cáncer gástrico (Parsonnet *et al.*, 1994; Wotherspoon, 1998). La resistencia del linfoma al tratamiento de erradicación está ligada con ciertas anomalías genéticas del huésped y a menudo es asociado con la progresión de tumores de alto grado (Blum *et al.*, 1998).

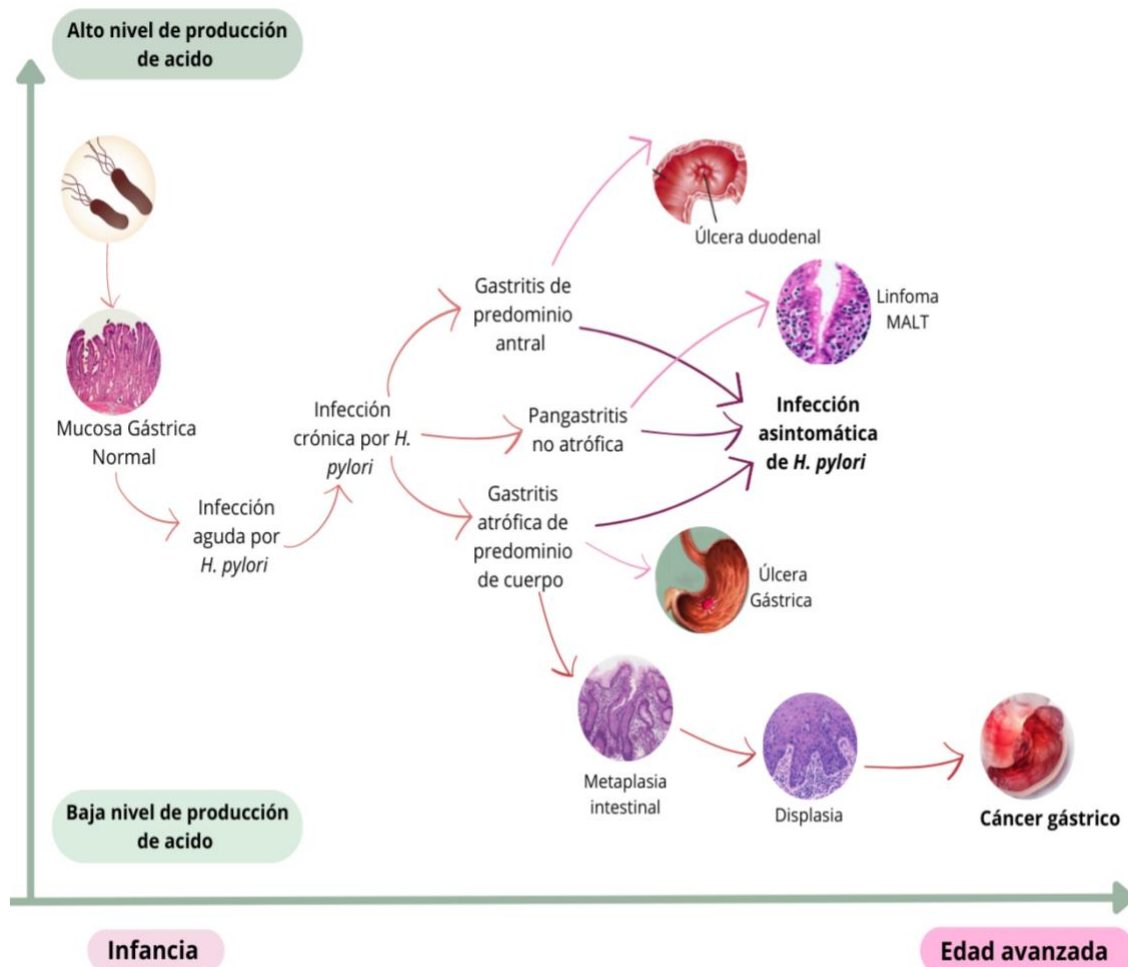


Figura 2. Infección por *Helicobacter pylori*. Fuente: Suerbaum *et al.* (2002).

2.1.4. Patogenicidad

Aunque la infección con *H. pylori* promueve la aparición de diferentes enfermedades gastroduodenales, la mayoría de las personas infectadas no presentan síntomas ni desarrollan esas afecciones y la incidencia de dichas

enfermedades varía considerablemente entre las diferentes regiones geográficas. Hoy se sabe que este fenómeno se debe a que la patogénesis promovida por este microorganismo está determinada por la compleja interacción de factores del hospedero, ambientales y bacterianos. Entre los factores del hospedero se encuentran la inducción de una respuesta inflamatoria mucosal persistente, dada por la activación e infiltración de células mononucleares y neutrófilos, así como sus productos, en la mucosa gástrica infectada. Además, la estimulación de la transcripción y la síntesis de varias citosinas proinflamatorias (Ej: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y antiinflamatorias (Ej: IL-4 e IL-10) es también un hecho relevante en la patogénesis de la enfermedad. Factores ambientales incluye la dieta y la coinfección parasitaria han sido asociados con un incremento en el riesgo de desarrollar afecciones severas en los pacientes infectados. Los principales estudios de los factores de patogenia de *H. pylori* han centrado su atención fundamentalmente en aquellos que aparecen y se expresan diferencialmente en las cepas más patogénicas. Entre estos, los más estudiados han sido: las proteínas CagA y VacA; las diferentes OMPs que contribuyen a la virulencia; así como recientemente los genes de las zonas de plasticidad (González & Rodríguez, 2011).

H. pylori está adaptado al nicho ecológico de la mucosa gástrica, teniendo una gama única que le permite entrar en el moco estomacal, desplazarse, orientarse en la mucosa, unirse a células epiteliales, evadir repuestas inmunes y teniendo como resultado la colonización y transmisión persistente. En la secuencia del genoma de *H. pylori* se ha descubierto alrededor de 32 proteínas de la misma familia de membrana externa (proteínas de HOP) en donde se incluyen adhesinas propias de *H. pylori*, además del descubrimiento de diferentes genes que se activan y desactivan por medio de la mutagénesis. El genoma de *H. pylori* codifica 1500 proteínas, entre algunas proteínas codificadas por los genes del patógeno se hayan enzimas que pueden modificar la estructura antigénica de algunas moléculas superficiales, regula la entrada de ADN extraño en las bacterias e influyen en la motilidad. Cuando entra al sistema la bacteria evade las sustancias bactericidas del contenido liminal gástrico y entra a la mucosa gástrica. Para el primer paso para la

infección de *H. pylori* la producción de ureasa es esencial, cuando se produce, está comienza a hidrolizar urea lo cual genera CO_2 y amoníaco, permitiendo por medio de la hidrólisis de urea que *H. pylori* sobreviva a entornos ácidos.

En la Figura 3 se indica de forma general los pasos para el desarrollo de la infección provocada por *H. pylori*: 1. *H. pylori* penetra la capa mucosa del estómago y se adhiere a la superficie de la capa mucosa epitelial gástrica. 2. Produce amoníaco a partir de la urea, para neutralizar el ácido gástrico. 3. Migración y proliferación de *H. pylori* al foco de infección. 4. Se desarrolla la ulceración gástrica con destrucción de la mucosa, inflamación y muerte de las células mucosas. El amoníaco es el responsable de la destrucción de la mucosa, permitiendo que el ácido penetre a la pared muscular gastrointestinal (Suerbaum *et al.*, 2002).

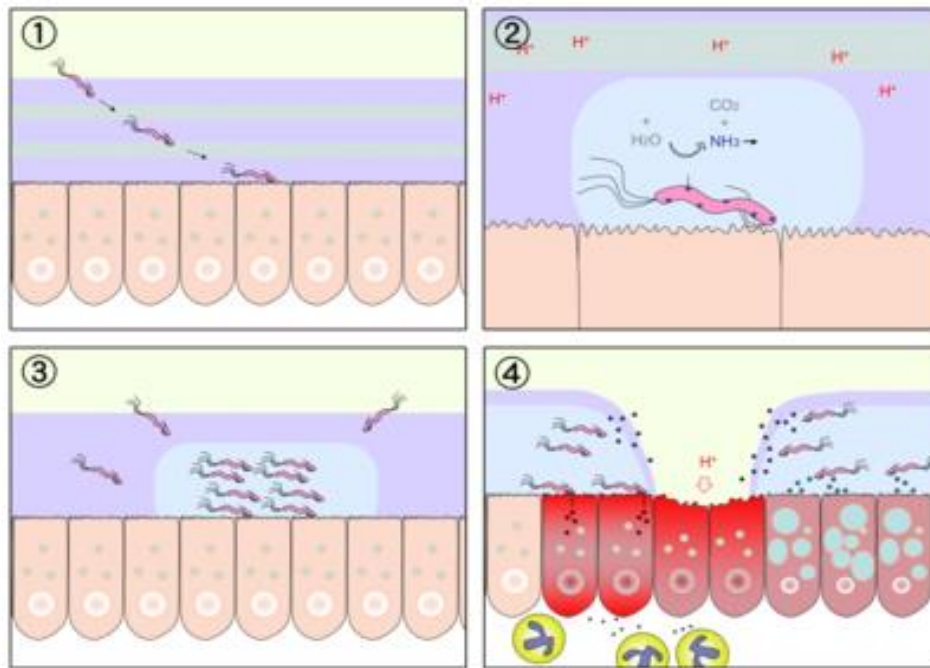


Figura 3. Patogenicidad de *Helicobacter pylori*. Fuente: Suerbaum *et al.* (2002).

2.1.5. Tratamientos farmacológicos

Entre los diferentes tratamientos para *H. pylori* existe la terapia triple estándar, la cual está constituida por un inhibidor de bomba de protones (IBP) y de 2 de 3 antibióticos con amoxicilina o claritromicina o metronidazol/tinidazol, la terapia cuádruple con bismuto (IBP, bismuto, tetraciclina y metronidazol), terapia secuencial (IBP más amoxicilina) y la terapia cuádruple sin bismuto constituida por IBP, claritromicina, amoxicilina y metronidazol. En la actualidad un tratamiento como el triple estándar no es muy efectivo al momento de erradicar a *H. pylori* y es debido principalmente a la resistencia a medicamentos con claritromicina y metronidazol (Graham, 2010; Trespalacios *et al.*, 2010; Cammarota *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta la gravedad de la enfermedad y las posibles consecuencias a una infección crónica, es muy importante identificar un esquema óptimo para lograr una efectiva erradicación (Graham & Shatoni, 2008). Si las tasas de resistencia superan en un 15% como una primera y segunda línea en el tratamiento se recomienda la combinación cuádruples de fármacos con o sin bismuto de 10-14 días, es evidente la dificultad de un cumplimiento de 14 días de tratamiento seguidos, por lo tanto, se requiere un compromiso completo de paciente para una correcta erradicación (Chey *et al.*, 2017; Randel *et al.*, 2018). Sin embargo, una tasa de éxito puede llegar a variar a nivel mundial y no existe un consenso sobre su eficacia.

2.1.6. Resistencia a antimicrobianos

La erradicación de *H. pylori* con antibióticos puede curar la gastritis y disminuir el riesgo de cáncer, no obstante, la bacteria se ha vuelto muy resistente y difícil de erradicar. La OMS en 2017, que clasificó a *H. pylori* como un microorganismo de prioridad alta que amenaza la salud humana, debido al incremento de la resistencia a la claritromicina; se continúa la vigilancia de la resistencia de este microorganismo y se está realizando investigación para que sea considerada su inclusión dentro del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (OPS, 2021). En México se ha estudiado la resistencia que presenta *H. pylori* a los antimicrobianos desde hace aproximadamente 20 años. *H. pylori* presentaba anteriormente una resistencia específica del 12% a la

claritromicina, mientras que medicamentos como metronidazol presentaba alrededor del 40% y con estudios posteriores se encontró también una resistencia del 7% contra amoxicilina. En 2017 en la última evaluación de cepas se registra una resistencia por arriba del 60% a metronidazol y la resistencia a claritromicina fue relevante (Bosques-Padilla *et al.*, 2018).

2.1.7 Utilización de probióticos en combinación con antibióticos en el tratamiento de *H. pylori*

Ensayos clínicos en adultos y niños colonizados por *H. pylori* sugieren que los probióticos no erradican *H. pylori* pero mantienen niveles más bajos de este patógeno en el estómago; en combinación con antibióticos, los probióticos pueden aumentar la tasa de erradicación y/o disminuir los efectos adversos (Gotteland *et al.*, 2006; Lv *et al.*, 2015). La mayoría de los estudios son clínicos y han sido evaluados en pacientes infectados por la bacteria niños y adultos. Se han realizado experimentos con el uso de probióticos en terapias como adyuvante en pacientes infectados por *H. pylori*, géneros como *Lactobacillus*, *Saccharomyces boulardii* and *Bifidobacterium*, los cuales han demostrado tener actividad anti *H. pylori* (Yoon *et al.*, 2011; Scaccianoce *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2013). Gong *et al.* (2015), mencionaron las probabilidades de erradicación de *H. pylori* con la terapia triple sola, en comparación con la terapia triple con suplementos de probióticos; observaron reducciones significativas de los efectos secundarios, como náuseas, vómitos, distensión abdominal, dolor epigástrico, diarrea, estreñimiento, distorsión del gusto y erupción cutánea con el uso de probióticos. Las bacterias probióticas ayudan a la erradicación de *H. pylori*, los resultados de estos ensayos difieren dependiendo de la cepa probiótica, la cepa *H. pylori* y la susceptibilidad del huésped que se estudie. De manera general el uso de los probióticos como agente adyuvante en las terapias actuales parece ser efectivo (Ruggiero, 2014).

2.1.7.1 Utilización de probióticos solos en el tratamiento de *H. pylori*

En estudios anteriores sobre los efectos de las bacterias con potencial probiótico se ha implicado dos tipos de sustancias que ayudan con la inhibición de *H. pylori* las cuales son, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y bacteriocinas. Algunos AGCC tales como ácido fórmico, acético, propiónico, butírico y láctico son producidos por los probióticos en el metabolismo de los carbohidratos y tiene un papel importante en la disminución del pH y dieron como resultados que con ácido acético y láctico tuvieron un efecto inhibitorio en diferentes dosis contra *H. pylori* siendo el ácido láctico el que mostro más efecto inhibitorio. Algunas cepas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se correlacionan con la intensidad de inhibición de *H. pylori*, tal actividad no solo se debe a su producción de ácido láctico, sino que también a la capacidad de inhibición de la actividad ureasa. (Gotteland *et al.*, 2006)

Michetti *et al.* (1999), mencionan una serie de experimentos clínicos que se realizaron en pacientes adultos infectados por *H. pylori*, a los cuales se les administraron cepas como *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1, sin embargo la bacteria patógena no fue erradicada, el estudio demostró también que solo ciertas cepas *L. acidophilus* muestran una actividad inhibitoria efectiva con *H. pylori in vivo* e *in vitro*. En otro estudio realizado por Cruchet *et al.* (2003), evaluaron las cepas *Lactobacillus johnsonii* y *L. paracasei* en concentraciones de $>10^7$ CFU/mL cada día, durante 4 semanas contra *H. pylori*, y encontraron que *L. johnsonii* puede reducir el riesgo de trastornos asociados con *H. pylori* y el alto riesgo de inflamación gástrica, sin embargo se requiere más evaluaciones respecto al comportamiento entre cepas específicas de *L. johnsonii* como entre más bacterias con potencial probiótico.

2.1.7.2 Mecanismos de acción de probiótico contra *H. pylori*

Los efectos de los probióticos sobre *H. pylori* pueden deberse a mecanismos inmunológicos y no inmunológicos: i) competencia en el sitio del epitelio de la

mucosa del estómago; ii) producción de sustancias contra *H. pylori*, como ácidos orgánicos; iii) regulación de la función inmunológica y secreción de inmunoglobulina A para mejorar la capacidad defensiva de la mucosa (Lv *et al.*, 2015); sin embargo no se ha reportado el mecanismo exacto contra la bacteria. Algunos estudios *in vitro* demostraron que los probióticos son capaces de inhibir *H. pylori* al producir diferentes compuestos, como los ácidos grasos de cadena corta (fórmico, acético, propiónico, butírico, láctico) y bacteriocinas, incluyendo nisina A, pediocina PO₂, leucocina K y reuterina (3-hidroxi propionaldehído) (Gotteland *et al.*, 2006; Hamilton-miller, 2002).

2.2. Probióticos

2.2.1. Definición

El término "probióticos" proviene de la palabra griega "*para la vida*" y se usa para referirse a los organismos vivos que no causan enfermedades y sus efectos beneficiosos en el huésped. Señala que los "probióticos" tienen un efecto beneficioso sobre la microflora intestinal (Pandey *et al.*, 2015). Un término adoptado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define a los probióticos como "microorganismos vivos los cuales administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico y saludable en el huésped" (FAO, 2002). Existen diferentes tipos de microorganismos probióticos, los géneros más usados son: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *bifidobacterias* y *ciertas cepas de Lactobacillus casei*, *grupos Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli* cepa Nissle 1917, ciertos enterococos, *especialmente Enterococcus faecium* SF68 y *Saccharomyces boulardii* que pertenece a las levaduras (Pandey *et al.*, 2015).

2.2.2. Criterios para actividad probiótica

Los criterios de selección y controles para los probióticos se considera una gran prioridad en 2002 la FAO hizo pública una guía para la evaluación sistemática de probióticos (**Figura 4**) la cual contiene los siguientes aspectos (Sanz *et al.*, 2003):

- *Identificación del género, especie y cepa probiótica.* Es esencial que se tenga una correcta identificación a nivel de género y especie, esto con el fin de

garantizar que se trata de microorganismos presumiblemente inocuos y de grado alimentario (GRAS) (Sanz *et al.*, 2003). Una correcta identificación de la cepa conlleva a vincularla con un efecto específico sobre la salud, así como también permitir estudios epidemiológicos y de vigilancia precisos (FAO, 2002).

- *Pruebas in vitro para seleccionar probióticos de uso en humanos.* Las pruebas *in vitro* son útiles para conocer a las diferentes cepas y mecanismos de efecto probiótico, actualmente las pruebas disponibles para evaluar su funcionalidad en el cuerpo humano no son totalmente adecuadas. Por ello se recomienda pruebas *in vitro* para que puedan correlacionarse con pruebas *in vivo* (FAO, 2002). Estas pruebas incluyen lo siguiente, 1) resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, 2) adherencia a la mucosa estomacal, así como también a las células epiteliales, esta es una prueba importante, ya que con ella se consideran algunas propiedades relevantes que debe cumplir el probiótico para poder ejercer inmunomoduladores y excluir la adhesión de patógenos, 3) habilidad para la reducción de adhesión de los patógenos y actividad antimicrobiana, 4) capacidad de hidrolizar sales biliares (Sanz *et al.*, 2003).
- *Seguridad de los probióticos.* Las cepas de probióticos más utilizadas pertenecen mayormente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* su implementación segura en diversos alimentos y en suplementos respaldan su uso constante, sin embargo, los probióticos también pueden ser responsables de efectos secundarios.
- *Estudios in vitro utilizando animales y humanos.* Estos estudios están principalmente destinados a demostrar las propiedades de los probióticos en relación con la mejora clínica, síntoma, bienestar y calidad de vida, así como también a la reducción de riesgo de enfermedades y a la recuperación de alguna enfermedad (Sanz *et al.*, 2003)
- *Etiquetado.* Se ha recomendado la incorporación de un sistema de etiquetado para los siguientes aspectos; 1) género, especie, y nombre de la cepa esto con el fin de evitar confusiones sobre su utilidad, 2) mínimo número de

vialidad de la cepa probiótica al final de la vida útil, 3) ingestión recomendable para la dosis, 4) efectos beneficiosos que aportan a la salud, 5) condiciones de almacenamiento, 6) contacto con centros de información al consumidor (Sanz *et al.*, 2003).

2.1.1. Desventajas de las bacterias probióticas

A pesar de ser beneficiosos para la salud los probióticos también tienen ciertas desventajas que pueden afectar a su viabilidad, tales como la presencia de oxígeno, altas temperaturas, antimicrobianos y la microbiota presente entre otras, dentro del huésped, el ambiente del tracto gastrointestinal se muestra agresivo debido a la presencia de pH bajos, sales biliares y algunas enzimas. Para que los probióticos tengan un efecto beneficioso, la concentración recomendada de células viables es generalmente $>10^6$ - 10^8 UFC/g o 10^8 - 10^{10} UFC/día en el producto en el tiempo de consumo (Champagne *et al.*, 2011). Sin embargo, la supervivencia de estas bacterias durante el procesamiento, almacenamiento y al paso por el tracto gastrointestinal es aún cuestionable, debido a que son susceptibles a distintos factores adversos como la concentración de oxígeno, pH ácido, y alta concentración de sales biliares (Castro-Rosas *et al.*, 2021).

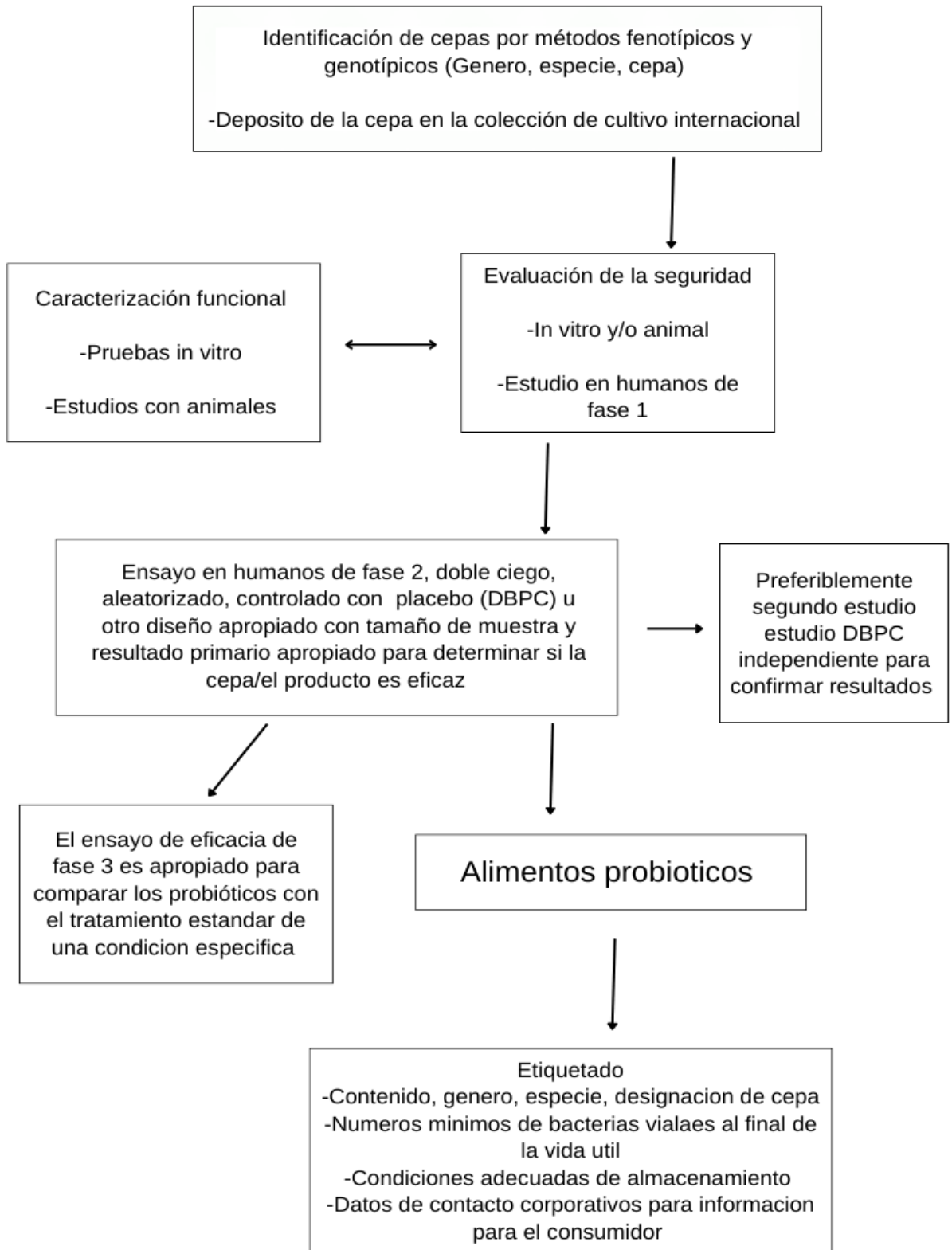


Figura 4. Directrices para evaluación de probióticos para su uso en alimentos. Fuente: FAO, (2002)

2.2. Prebióticos

2.2.1. Definición y fuentes de extracción

Los prebióticos son definidos como ingredientes alimentarios no digeribles (oligosacáridos) que ingresan al colon y sirven como sustrato para los microorganismos, produciendo energía, metabolitos y micronutrientes utilizados por el huésped, y estimulando el crecimiento y la selectividad de varias especies beneficiosas (principalmente *Bifidobacterias* y *Lactobacilos*) para la microbiota intestinal. Los primeros estudios sobre los prebióticos remonta al año de 1980, donde científicos japoneses utilizando técnicas *in vitro* y muestra de heces humanas, mostraron que algunos oligosacáridos, principalmente fructooligosacáridos (FOS), eran fermentados por bifidobacterias y que además de ser fermentativas ayudaban al crecimiento de la bacteria (Gibson *et al.*, 1995). Científicos como Gibson y Roberfroid. (1995), propusieron una primera definición para prebióticos la cual define que “es un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de especies bacterianas en el colon, y que por lo tanto mejora la salud”. Organizaciones como Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) también definieron su concepto la cual indica que los prebióticos son “ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo” (Corzo *et al.*, 2015).

2.2.2. Características generales

Para poder considerarse prebiótico a un ingrediente o alimento se debe considerar lo siguiente: no ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal y por lo tanto ser resistente a la acidez gástrica, a hidrólisis por enzimas digestivas y no ser absorbido por el intestino delgado, poder ser fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas pertenecientes a la microbiota intestinal y ser capaz de inducir efectos beneficiosos a la salud del huésped (Gibson & Roberfroid, 1995).

Los carbohidratos no digeribles pueden clasificarse en dos tipos, colónicos (fibra alimentaria) y prebióticos. Los colónicos son carbohidratos que llegan al colon, sirve de energía para microorganismos que viven ahí y les otorga energía, sustratos metabólicos, y macronutrientes, mientras que los prebióticos realizan las mismas funciones que los colónicos, pero además estimula el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas de la microbiota intestinal, aunque ya se estén comercializando carbohidratos como prebióticos, solamente algunos con evidencia científica de sus propiedades en humanos los cuales son inulina, Fructooligosacáridos (FOS), Galactooligosacáridos (GOS), lactulosa y los oligosacáridos de leche humana (Gibson *et al.*, 2010; Rastall, 2010; Lamsal, 2012). Entre los beneficios a la salud del consumo de prebióticos se encuentran los producidos en el colon como la estimulación del crecimiento de bacterias fermentativas con efectos positivos, generan ácidos grasos de cadena corta (que produce un descenso en el pH, controla el crecimiento de ciertas bacterias que pueden llegar a ser perjudiciales. Además, también actúan sobre determinadas funciones reduciendo el tiempo del tránsito intestinal, producir un aumento del bolo fecal y del número de deposiciones, esto es debido a la absorción eficaz de ácidos grasos de cadena corta que son utilizados posteriormente por las células epiteliales del colon estimulando mejor la secreción de agua y sales (Steed *et al.*, 2009).

2.3. Simbióticos

2.3.1. Definición

Los simbióticos se definen como "mezclas de probióticos y prebióticos diseñados para aumentar la supervivencia de bacterias beneficiosas con el fin de alterar la microbiota intestinal y su metabolismo" y el término debe reservarse exclusivamente para los productos que poseen verificación científica de la simbiosis, es decir en los cuales los prebióticos favorecen selectivamente a los probióticos adicionados en éste simbiótico en particular (Olagnero *et al.*, 2007). Las estrategias que pueden alentarse en el futuro incluyen la combinación de probióticos y prebióticos como simbióticos, que pueden ser definidos como: una mezcla de probióticos y prebióticos, benéficas para el huésped al aumentar la persistencia y el

anidamiento de suplementos microbianos activos en el tracto gastrointestinal y al estimular selectivamente el crecimiento de una o varias bacterias saludables. Entre los beneficios de los simbióticos se pueden encontrar, aumento de los niveles de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, equilibrio de la microbiota intestinal, mejora de las funciones hepáticas en pacientes con cirrosis, mejora de inmunomoduladores, prevención de translocación bacteriana, reducción de infecciones nosocomiales (Zhang *et al.*, 2010)

2.4. Microencapsulación

2.4.1. Definición

La microencapsulación es una técnica sumamente utilizada en varias ramas de la química, biología y microbiología. Este método fundamentalmente permite crear pequeñas partículas ya sean gotas de líquido o gases que se envuelven en un material de cobertura y esto a su vez nos da lugar a microcápsulas o a micropartículas, generalmente la microencapsulación es utilizada para poder incorporar ingredientes alimentarios, células, enzimas o probióticos. Los contenidos pueden ser liberados de manera controlada en distintas condiciones (Pérez *et al.*, 2013). Algunas de las principales razones por la cual se procede a microencapsular microorganismos probióticos son para facilitar y mejorar el transporte durante los procesos de producción de los alimentos fortificados, para poder garantizar y proteger su resistencia y viabilidad durante el almacenamiento de estos, también poder controlar su potencial en el momento y lugar adecuados después de ingerir el alimento (Arujo *et al.*, 2015).

2.4.2. Estructuras de las microcápsulas

Son pequeñas partículas con un agente activo rodeados por una cobertura, son constituidas por una pequeña membrana fuerte, delgada, esférica y semipermeable que lo envuelve desde unas pocas micras hasta varios milímetros. Para poder definir el tamaño y la forma se debe de llevar de manera específica de cada método o técnica a utilizar. Hay varios tipos de estructuras que pueden ser clasificadas como sistema capsular, y a su vez una gran cantidad de polisacáridos

(**Tabla 1**). En esta estructura el material activo está reservado, su naturaleza puede ser líquida o sólida y está cubierta por una fina capa y por último se tiene el sistema matricial, en este sistema el material activo está disperso en la matriz polimérica. Para la superficie, esta puede ser lisa o irregular, con o sin presencia de los poros que son capaces de hacer que la microcápsula se vea afectada (Perez *et al.*, 2013).

Tabla 1. Polímeros utilizados para la encapsulación de probióticos.

Origen	Polisacáridos
Algas Marinas	k-carragenina, alginato
Plantas	Goma arábiga, almidón y sus derivados
Bacterias	Xantana, gelano
Animales	Quitosano
Proteínas de origen animal	Gelatina, proteína se suero de leche.

Fuente: Pérez-Lenard *et al.* (2013).

2.4.3. Secado por aspersion

La técnica de secado por aspersion (**Figura 5**) consiste en atomizar una suspensión o emulsión que contenga los principios activos a encapsular es importante mencionar que el material que se vaya a ocupar debe ser polimérico (**Tabla 1**). Este debe estar dentro de la cámara y con una constante entrada de gas caliente (aire) ya que este promueve la evaporación del agua logrando que los principios activos queden adheridos al material encapsulante y esto a su vez dar origen a la formación de micropartículas. La velocidad de secado es relativamente rápida y a su vez el daño térmico de los principios activos es relativamente bajo, sin embargo, es importante tomar en cuenta las variables como el flujo de aire, el flujo de alimentación y la temperatura de entrada al secador (Arujo *et al.*, 2015).

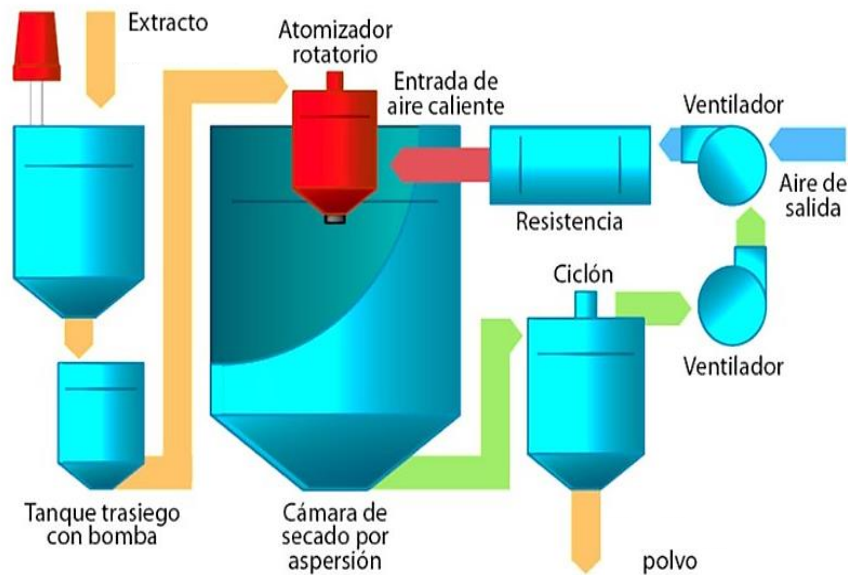


Figura 5. Esquema del equipo de secado por aspersión. Fuente: Palomares *et al.* (2016)

2.4.4. Microencapsulación de simbióticos

Al ser agregados prebióticos a microcápsulas con probióticos da un resultado beneficioso, ya que da una capsula funcional, además de contribuir a la protección de los probióticos frente al estrés inducido por la técnica de secado por aspersión (Raddatz *et al.*, 2020). Además de los factores que se debe tomar en cuenta de la técnica es importante apreciar la importancia de la estabilidad en condiciones gástricas (Wunwisa-Krasaekoopt *et al.*, 2003). Gutiérrez-Zamorano *et al.*, (2019) evaluaron el efecto de *Lactobacillus fermentum* encapsulado con el prebiótico carragenina contra *H. pylori* simulando condiciones gástricas, ellos encontraron que cuando el probiótico era encapsulado con la carragenina mostraba un incremento entre probiótico y prebiótico teniendo mejor efecto contra *H. pylori* y mostrando una mejor supervivencia en las condiciones gástricas de la bacteria ácido láctica (Gutiérrez-Zamorano *et al.*, 2019). Existen pocas investigaciones sobre la encapsulación de simbióticos y el efecto sobre microorganismos patógenos

III. JUSTIFICACIÓN

La infección dada por *Helicobacter pylori* es una infección sobresaliente en gran parte del mundo, siendo el causante principal de gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico. En México la medida de seroprevalencia de *H. pylori* reportada por parte de la población general es de un 66%, mientras que a nivel mundial afecta a un 50% de la población. A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes tratamientos para erradicar *H. pylori*, usando tratamientos de primera línea con antibióticos. Sin embargo aún con un tratamiento de este tipo, la supervivencia de *H. pylori* es un problema grave, además de seguir usando de manera excesiva los antibióticos en la población humana ha llevado a un aumento en la resistencia contra algunos antibióticos. Por lo que en la investigación científica, se proponen alternativas para coadyuvar en el tratamiento contra esta bacteria, entre ellas el uso de probióticos, los cuales son definidos por la OMS/FAO. (2002), como microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso en la salud de huésped.

Recientemente la encapsulación de probióticos ha sido de interés para la protección e incremento de la viabilidad de estos microorganismos en la tecnología alimentaria, hoy en día el término simbiótico es utilizado para la mezcla de probióticos más prebióticos estos últimos componentes químicos que favorecen el desarrollo y metabolismo de los primeros. Existen pocos estudios donde se ha evaluado el efecto de los probióticos contra *Helicobacter pylori*, por lo anterior el objetivo de este trabajo es evaluar el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas encapsuladas contra *H. pylori in vitro*.

IV. HIPÓTESIS

Microencapsulados obtenidos mediante secado por aspersión con simbióticos, presentarán actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori in vitro*.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Microencapsular simbióticos mediante la técnica de secado por aspersión y evaluar la actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori in vitro*.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de simbióticos contra *Helicobacter pylori in vitro*.
2. Microencapsular simbióticos usando la técnica de secado por aspersión.
3. Determinar la eficiencia de encapsulación (EE%), morfología, tamaño, resistencia a pH similar al del estómago y a sales biliares, actividad de agua, humedad y actividad antimicrobiana en microencapsulados con simbióticos.
4. Evaluar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas encapsuladas después de nueve semanas en almacenamiento a 25 °C.

VI. METODOLOGÍA

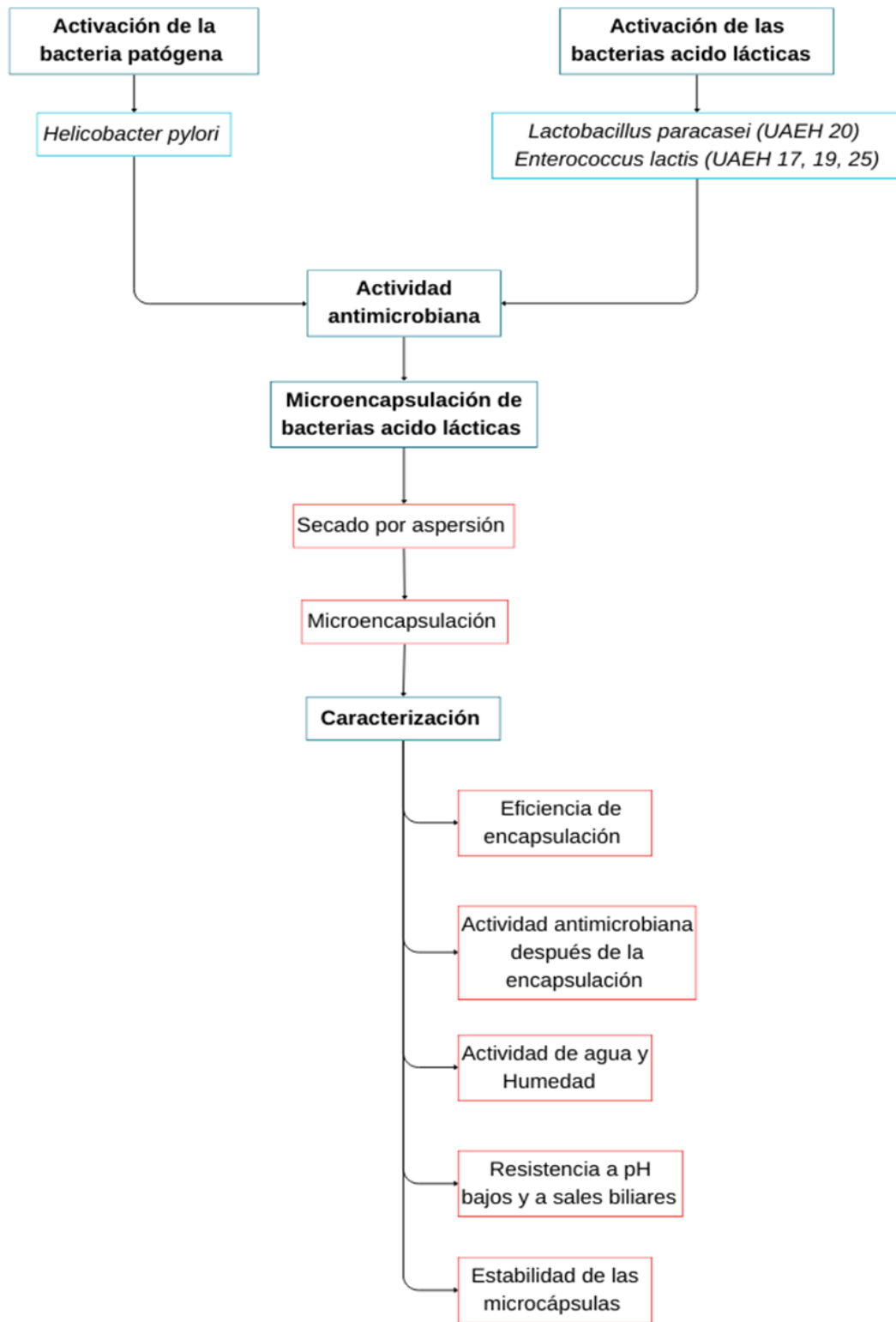


Figura 6. Diagrama general de la metodología experimental.

6.1 Material biológico

La cepa *Lacticaseibacillus paracasei* UAEH20 (L20) que se utilizó en este trabajo se aisló de queso tenate del estado de Hidalgo, México (Falfán-Cortés *et al.*, 2022) y tres cepas del género *Enterococcus lactis* UAEH 17, UAEH 19 y UAEH 25 aislados e identificados previamente de diversos quesos del mismo estado (**Tabla 2**). Como prebióticos se utilizaron inulina de *achicoria* (Sigma-Aldrich, Toluca, México) y Fructooligosacáridos de *achicoria* (FOS) (Sigma-Aldrich, Toluca, México).

Tabla 2. Bacterias ácido lácticas (BAL) con potencial probiótico, utilizadas en la investigación.

Microorganismo (BAL)	Abreviatura utilizada
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> UAEH20	L20
<i>Enterococcus lactis</i> UAEH 17	L17
<i>Enterococcus lactis</i> UAEH 19	L19
<i>Enterococcus lactis</i> UAEH 25	L25

6.2 Activación de las BAL y *Helicobacter pylori*

Se midieron con una micropipeta 200 μ L de las cepas de L17, L19, L20 y L25, (congeladas con glicerol) y se transfirieron a tubos de 3 mL con caldo MRS y se incubaron por 24 h a 37 °C. Se midieron 200 μ L la cepa de *H. pylori* (congeladas con glicerol) y se transfirieron a tubos de 3 mL de caldo BHI con 5% de suero fetal bovino (SFB) y se incubaron en condiciones anaerobias utilizando paquetes de gas Container Systems (BD GasPak® EZ), en un sistema de GasPak® System durante 24 h a 37 °C.

6.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de BAL sin prebióticos contra *Helicobacter pylori* in vitro

La actividad antimicrobiana de las diferentes cepas L17, L19, L20 y L25 contra *H. pylori* se realizó usando la técnica de difusión en pozo, como lo describe Sgouras *et al.*, (2004), con modificaciones. Se utilizó un cultivo de 24 h de incubación de *H. pylori* (10^6 UFC/mL) se sembró por vertido en placa en agar BHI (BD Bioxon, México), sobre el agar se realizaron pozos de 6 mm de diámetro. En diferentes pozos se colocaron alícuotas de 50 μ L de cultivo de las cepas L17, L19, L20 y L25 sin prebiótico respectivamente, obtenidas tras 24 h de incubación en caldo MRS. Las placas se incubaron 24 h en condiciones anaerobias utilizando paquetes de gas Container Systems (BD GasPak® EZ), en un sistema de GasPak® System durante 24 h a 37 °C (**Figura 7**), posteriormente se midieron los diámetros de las zonas de inhibición (milímetros) alrededor de los pozos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



Figura 7. Sistema de cajas Gaspack

6.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de BAL adicionadas con prebióticos contra *Helicobacter pylori in vitro*

Se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 6.3, sin embargo, las cepas de las BAL L17, L19, y L25 fueron suplementadas durante su crecimiento/incubación en MRS con el prebiótico de acuerdo con la **Tabla 3**.

Tabla 3. Porcentajes de adición de prebiótico para el crecimiento de BAL en medio de cultivo MRS.

Mezclas	Porcentaje (%) de prebiótico
L17 + Inulina	0.6
L19 + FOS + Inulina	0.3 y 0.3
L25 + Inulina	0.6

6.4 Microencapsulación de BAL

6.4.1 Proceso de secado por aspersión

Los cultivos de *Enterococcus lactis* (L17, L19, y L25) se obtuvieron después de la activación mediante doble transferencia sucesiva en caldo MRS a 37°C durante 24 h. Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min, para eliminar los residuos y obtener el paquete celular. El paquete celular fue suspendido en 10 mL de agua estéril y se mezcló con una suspensión de almidón (30% p/v) modificado - N-lok (marca Ingredion, México). Para la suspensión del almidón se pesaron 30 g (base seca) de almidón y se colocaron en 90 mL de agua estéril, la mezcla se homogenizó a 6500 rpm durante 5 minutos en un homogenizador (Ultra Turrax T- Homogenizer 25-SI, IKA Works, Wilmington, NC, USA). Se adicionó el prebiótico en la concentración mencionada en la **Tabla 4**. Finalmente, una mezcla compuesta por: almidón (material pared) + paquete celular (BAL) + (prebiótico) se homogeneizó a 3500 rpm durante 5 s y se llevó al secador BUCHI Mini Spray Dryer B – 191.

Tabla 4. Mezclas de bacterias ácido lácticas con y sin prebióticos para su encapsulación mediante secado por aspersión.

Mezclas
L17 sin prebiótico
L17 + 0.6% inulina
L19 sin prebiótico
L19 + 0.6% inulina (0.3) + FOS (0.3)
L25 sin prebiótico
L25 + 0.6% inulina

El proceso de microencapsulación se realizó de acuerdo con lo descrito por Hernández *et al*, (2018). La microencapsulación de las BAL se realizó en un secador por aspersión BUCHI Mini Spray Dryer B – 191 a escala laboratorio, se utilizó una temperatura de entrada de 100°C en un equipo BUCHI Mini Spray Dryer B – 191 (**Figura 8**) equipado con una boquilla con un diámetro de 0.5 mm. La solución de alimentación se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente, y se introdujo en la cámara de aspersión a través de una bomba peristáltica, con una tasa de flujo de alimentación de 4 mL/min. El flujo de aire se mantuvo a 600 mL/h, después del secado por aspersión las microcápsulas secas se colectaron en frascos de vidrio y se almacenaron para los posteriores análisis.



Figura 8. Equipo de secado por aspersión BUCHI Mini Spray Dryer B – 191.

6.5 Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersión

6.5.1 Eficiencia de encapsulación (%)

Para la eficiencia de encapsulación se usó la metodología propuesta por Alfaro-Galarza *et al.*, (2020). El recuento bacteriano de las BAL después del secado por aspersión se realizó por triplicado por el método de vaciado en placa. Se pesó 1 g de microcápsulas y se colocaron en 9.0 mL de diluyente de citrato de sodio al 2% (dilución 1), con la ayuda de un vortex, estas se solubilizaron. Se realizaron diluciones seriadas (10^{-5} a 10^{-9}) y se colocaron en cajas Petri con agar MRS (método de vaciado en placa). Las cajas fueron incubadas en posición invertida a 37 °C durante 48 h y se realizó el recuento de colonias, este procedimiento se realizó el mismo día en que fueron obtenidas las microcápsulas (No). El porcentaje de viabilidad de las bacterias encapsuladas fue calculado empleando la siguiente ecuación (Alfaro-Galarza *et al.*, 2020):

$$\% \text{ de viabilidad} = N/\text{No} \times 100$$

Donde:

N= Número de bacterias viables en las cápsulas después del secado por aspersión. No= Número de bacterias viables antes del secado.

6.5.2 Determinación de humedad (%) y actividad de agua (a_w) de los encapsulados

Para la determinación de humedad de las microcápsulas se pesó 1 g de las capsulas obtenidas y se colocaron en una termobalanza (OHAUS, Switzerland). Para la actividad de agua (a_w) se utilizó el equipo Aqua LAB V. 2.2 (Mod. 3TE, Decagon Devices, Inc., EE. UU.), se pesaron 1 g de muestra, ambas pruebas se realizaron por triplicado (Hernández *et al.*, 2018).

6.5.3 Tinción de Gram de BAL después del proceso de encapsulación

Se realizó la tinción de Gram a bacterias (BAL) antes y después de encapsular de acuerdo con la metodología reportada por Falfán-Cortés *et al.*, (2022). Se tomó con un asa bacteriológica (previamente esterilizada con la flama de un mechero), una muestra de colonia de las bacterias L17, L19, L20 y L25, se colocó en un porta objetos, se fijó la muestra pasándolo levemente en la flama de un mechero y se colocaron 2 gotas del reactivo cristal violeta, se dejó actuar 1 min, pasado el tiempo se enjuagó con agua de chorro, posteriormente se adicionó 2 gotas del reactivo yodo-lugol por 30 s, se enjuago con agua, se agregaron 2 gotas del reactivo alcohol-cetona y se dejó 15 s, se lavó con agua pasado el tiempo y por último se colocaron 2 gotas del reactivo safranina, se dejó reposar por 2 min y se lavó con agua destilada una vez concluido el tiempo. Las tinciones se observaron al microscopio óptico a 100X.

6.5.4 Caracterización morfológica de las microcápsulas por MEB

Las microcápsulas obtenidas se observaron a través de un microscopio electrónico de barrido (modelo JEOL IT-300) (**Figura 9**). Las muestras secas se colocaron sobre un porta muestras, con cinta electro conductiva de carbón de doble cara, para posteriormente recubrirlas con oro. Las muestras se analizaron a 15 A y 15KV (Figura X) (Hernández *et al.*, 2018).



Figura 9. Microscopio electrónico de barrido (MEB)

6.5.5 Resistencia a pH de BAL libres y encapsuladas

Se midió la resistencia a pH similar al del estómago de acuerdo con la metodología propuesta por Dumitru *et al.* (2021), y Hernández *et al.* (2018). La cepas de las BAL libres, y encapsuladas con y sin prebiótico fueron evaluadas a condiciones de pH bajo similar al del estómago *in vitro*. Las BAL se cultivaron en

caldo MRS y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL, con una concentración aproximada de 10⁹ UFC/mL se inocularon en tubos con 9 mL de caldo MRS a pH ajustado a 2 (HCl 0.1 N). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 3 h (muestreos: 0, 1.5 y 3 h). Se efectuó el conteo de bacterias sobrevivientes en los diferentes tiempos, tras hacer diluciones (10⁻⁹) y sembrar por la técnica de vaciado en placa. Para las bacterias encapsuladas con y sin prebiótico, se pesó 1 g de microcápsulas y se inocularon en caldo MRS ajustado a pH 2 y se evaluó bajo el mismo procedimiento descrito para la bacteria sin encapsular.

6.5.6 Resistencia a sales biliares de BAL libres y encapsuladas

Se midió la resistencia a sales biliares de acuerdo con la metodología propuesta por Dumitru *et al.* (2021) y Hernández *et al.* (2018). La cepas de las BAL sin encapsular con y sin prebióticos fueron evaluadas a alta concentración de sales biliares *in vitro*. La cepas de BAL se cultivaron en caldo MRS y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL, con una concentración aproximada de 10⁹ UFC / mL y se inocularon en un tubo con caldo MRS con pH ajustado a 7 y adicionado con 0.3% de sales biliares. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 3 h (muestreos: 0, 1.5 y 3 h). Se efectuó el conteo de bacterias sobrevivientes por la técnica de vaciado en placa utilizando el medio de cultivo MRS. Para las bacterias encapsuladas con y sin prebiótico, se pesó 1 g de microcápsulas y se inocularon en caldo MRS ajustado a pH 7 y adicionado con 0.3% de sales biliares y se evaluó bajo el mismo procedimiento descrito para la bacteria sin encapsular.

6.5.7 Actividad antimicrobiana de BAL contra *Helicobacter pylori* después del proceso de encapsulación

La actividad inhibitoria de las diferentes cepas L17, L19, y L25 encapsuladas con y sin prebióticos se realizaron usando la técnica de difusión en pozo como lo describe Sgouras *et al.* (2004), con modificaciones. Un gramo de microcápsulas, fueron disueltas en solución de citrato al 2% para liberar las bacterias encapsuladas,

posterior se inocularon en 3 mL de caldo MRS durante 24 h. Posteriormente se siguió la metodología del apartado 5.2 método de difusión en placa. Se midieron los halos de inhibición (mm).

6.5.6. Sobrevivencia de las BAL encapsuladas a temperatura ambiente

Los polvos obtenidos después del secado por aspersion se colocaron en cajas Petry, y se dejaron a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$). Se realizó un conteo de la viabilidad de las BAL encapsuladas después de nueve semanas, utilizando la técnica de vaciado en placa con el medio de cultivo MRS.

6.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el Software STATISTICA versión 8.0 (StatSoft. 2007). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, las diferencias entre medidas se determinarán mediante ANOVA y prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%.

VII. RESULTADOS

7.1. Actividad antimicrobiana de las BAL con y sin prebióticos contra *Helicobacter pylori*

En la **Figura 10** se muestran los resultados de la inhibición en mm de las cuatro bacterias ácido lácticas (L17, L19 y L25) con y sin prebióticos contra *H. pylori* *in vitro*. Se obtuvo que el mayor halo de inhibición lo presentó la bacteria L25 adicionada con inulina seguida de L17 adicionada con inulina sin diferencia significativa ($p < 0.05$). Sin embargo, la bacteria L20 no presentó actividad antimicrobiana contra *H. pylori*.

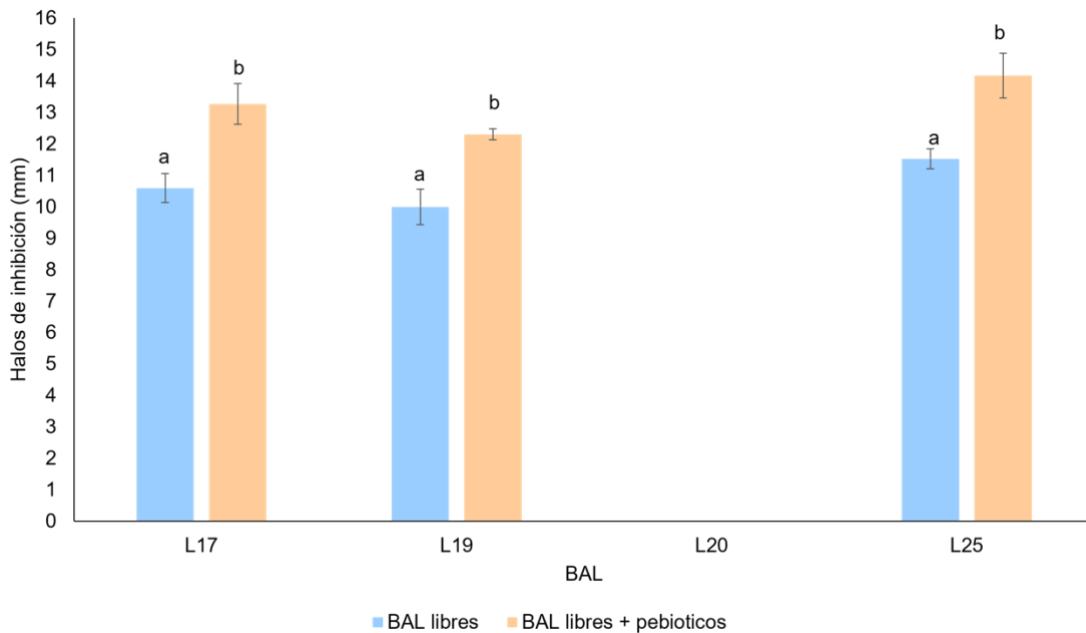


Figura 10. Efecto inhibitorio *in vitro* de bacterias ácido lácticas contra *H. pylori* con y sin prebiótico. Datos expresados como media \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Se observó que para las cepas L17, L19 y L25 adicionadas con prebiótico, tienen una mayor actividad antimicrobiana contra *H. pylori* ya que presentan halos por arriba de los 12 mm, en comparación con las cepas sin prebiótico ($p < 0.05$).

Autores como Ale *et al.* (2020), evaluaron la cepa de *Lactobacillus fermentum* y encontraron que tiene una alta capacidad para la actividad inhibitoria contra *H. pylori*, teniendo como respuesta que la cepa pudo modular las respuestas de infección de *H. pylori*, sin embargo en este trabajo la cepa *Lacticaseibacillus paracasei* UAEH20 (L20) no presentó efecto contra la bacteria patógena. Ale *et al.* (2020), explican que la cepa *L. fermentum* fue capaz de modular la respuesta de citocinas en las células epiteliales gástricas y de macrófagos después de una infección por *H. pylori*, reduciendo la producción de *citocinas* y *quimiocinas inflamatorias* y a su vez aumentando los niveles de *citocinas inmunorreguladoras*. Finalmente, con base a estos resultados la bacteria L20 fue descartada para el proceso de encapsulación. Es importante mencionar que la mayoría de los estudios donde evalúan la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas destacando el género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son clínicos en pacientes hospitalizados, niños y adultos principalmente (Gotteland *et al.*, 2006; Hamilton-miller, 2002).

Para el caso de las bacterias del género *Enterococcus* (L17, L19 y L25) presentaron actividad por lo que es importante destacar la importancia de los diferentes géneros utilizados como potencial para bacterias probióticas. Están reportados los mecanismos con el cual las bacterias probióticas inhiben a las bacterias patógenas a través de la adhesión, la inmunomodulación y la producción de sustancias antimicrobianas. La capacidad del probiótico para suprimir o desplazar un patógeno, interactuar con el sistema inmunitario y colonizar los intestinos es lo que más cuenta en la adhesión.

El sistema inmunitario es el objetivo principal de las interacciones del probiótico y modula la inmunidad induciendo respuestas tanto humorales como celulares. Finalmente, la producción de compuestos antimicrobianos se basa en dos grupos principalmente 1: compuestos de bajo peso molecular, que incluyen ácidos orgánicos, y 2: proteínas antimicrobianas (bacteriocina), con un espectro de

acción limitado para bacterias Gram (+) (Ouwehand *et al.*, 1999; Henriksson & Conway. 2001; Cross. 2002).

En este estudio, se encontró que el uso de probióticos y prebióticos juntos (simbióticos) inhibe mejor al patógeno. Se encontró que el efecto inhibitor de las tres cepas simbióticas (L17, L19 y L25) aumentó con la ayuda del prebiótico; esto podría deberse a que el prebiótico, al actuar como fuente de sustrato, energía, macronutrientes y estimular el crecimiento, y por ende es más efectivo contra *H. pylori*.

7.2 Caracterización de los microencapsulados obtenidos mediante secado por aspersión

7.2.1 Eficiencia de encapsulación (%)

La sobrevivencia a la microencapsulación de las BAL con y sin prebióticos (L17, L19, L25) después del secado por aspersión utilizando almidón modificado (N-lok) como material pared, se calculó como porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE). En la **Tabla 5**, se muestran los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos de encapsulados. Para las BAL (L17, L19 y L25) con prebiótico se puede observar que la eficiencia de encapsulación se incrementó en comparación con la bacteria sin adición del prebiótico. La bacteria L17 presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) con la adición del prebiótico (0.6% inulina).

Autores como Bustamante *et al.* (2020), explicaron que el daño celular y la pérdida de actividad de las BAL pueden ocurrir durante el procesamiento por lo tanto el proceso de encapsulación debe de garantizar que los microorganismos sobrevivan a este, así como también mantengan su vialidad durante el tiempo de almacenamiento. Ellos obtuvieron una eficiencia de encapsulación superior al 90% para los géneros *Lactobacillus rhamnosus* (91.23%), *Lactobacillus plantarum* (94.77%), *Bifidobacterium longum* (96.07%) y *Bifidobacterium infantis* (97.24%), en este trabajo se obtuvieron resultados similares para los géneros *Enterococcus lactis* siendo *UAEH L17 + inulina* el que obtuvo mayor porcentaje (98.4%) de supervivencia, mostrando que un género como *Enterococcus* tiene una gran

capacidad para sobrevivir a procesos como el secado por aspersión y por tanto alto potencial tecnológico.

Tabla 5. Eficiencia de encapsulación (%EE), contenido de humedad (%), actividad de agua, en microcápsulas de BAL con y sin prebióticos.

Tratamiento	Eficiencia de encapsulación (%)	Actividad de agua (a_w)	Contenido de humedad (%)
L17	93.9 ± 2.7 ^a	0.3 ± 0.0 ^a	5.7 ± 0.9 ^a
L17 + 0.6% inulina	98.4 ± 0.8 ^b	0.3 ± 0.0 ^a	5.1 ± 0.5 ^a
L19	90.8 ± 0.7 ^a	0.3 ± 0.0 ^a	5.8 ± 0.3 ^a
L19+0.6% inulina + FOS	91.8 ± 2.2 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	5.1 ± 0.2 ^a
L25	90.9 ± 2.9 ^a	0.3 ± 0.0 ^a	5.5 ± 0.1 ^a
L25+0.6% inulina	91.9 ± 0.4 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	5.3 ± 0.2 ^a

Promedio de tres repeticiones ± DS. Distintas letras minúsculas presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

7.2.2. Actividad de agua (a_w) y contenido de humedad (%) de los encapsulados

En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos para la actividad de agua de los encapsulados obtenidos por secado por aspersión. Los valores obtenidos fueron de 0.2 a 0.3. Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que una mayor temperatura (100°C) de secado conduce a una transferencia de calor a las partículas, esto aumenta la fuerza motriz de la evaporación, lo que conduce a una mayor eliminación de agua de la matriz alimentaria. Los valores por debajo de 0.3 de a_w promueven la estabilidad del polvo y prolongan la vida útil al reducir la presencia de agua libre disponible para las reacciones químicas (Atalar & Dervisoglu, 2015). Se muestran también los resultados obtenidos con respecto al contenido de humedad se obtuvieron valores entre 5.1 a 5.8 %, diferentes niveles

de humedad podrían interferir en las propiedades del polvo como, en la forma, la distribución del tamaño y en la fluidez (Jung *et al.*, 2018)

Se obtuvo que para las tres cepas los valores están entre los 0.2 y los 0.3 en a_w tanto para L19 y L25 con prebióticos se tiene una diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con la cepa sin el prebiótico, mientras que para la cepa de L17 no se aprecia una diferencia significativa entre la cepa con y sin prebióticos, al tener los tres BAL valores por debajo de 0.3 indica que la vida útil de los tres polvos obtenidos por secado por aspersión presentara más estabilidad en la vida útil. En cuanto a los resultados de humedad se observó que para las tres cepas no hay una diferencia significativa entre las BAL ($p < 0.05$) sin o con prebióticos.

Autores como Jurado *et al.* (2021), obtuvieron resultados similares a los de este trabajo, ellos trabajaron con el método de secado por aspersión utilizando una temperatura de entrada de 170°C y de salida 67°C tomando en cuenta que la BAL evaluada fue *Lactobacillus plantarum*, ellos obtuvieron una a_w no mayor a los 0.3 indicando también que la baja a_w es favorable para la vida útil de los polvos. Ellos también obtuvieron resultados similares con respecto a la humedad, obtuvieron una humedad de 5.26% explicando que la humedad se ve influida por el tamaño del microencapsulado, así como también evita la contaminación bacteriana y micótica.

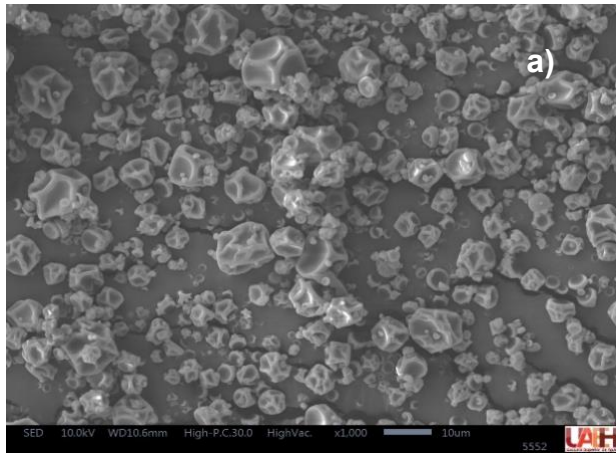
Hernández *et al.* (2018), ellos obtuvieron un contenido de humedad de 1.4% y a_w de 0.26 con una temperatura de secado de 140°C resaltando que a mayor temperatura el contenido de humedad y a_w bajan, estos resultados obtenidos son similares a los presentados en este trabajo, teniendo en cuenta que la humedad no es tan baja ya que la temperatura usada fue de 100°C, mientras que para la a_w el resultado es similar al que se obtuvo en este trabajo.

7.2.3. Morfología de microcápsulas

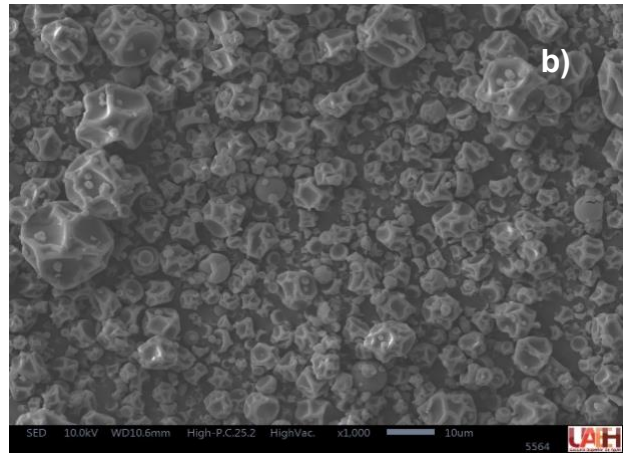
La forma de las microcápsulas en todas las mezclas presentó concavidades en la superficie, característica dada por el proceso de atomización la cámara de secado (**Figura 11**) y de la rápida evaporación del agua. Rodríguez-Barona *et al.*

(2012), reportaron resultados similares para encapsulados de *Lactobacillus casei* y *Lactobaccilllus rhamnosus*. Aunque no se determinó el promedio del tamaño de las micropartículas, las micrografías por MEB permitieron estimar el tamaño de las microcápsulas de ≈ 10 a $20 \mu\text{m}$.

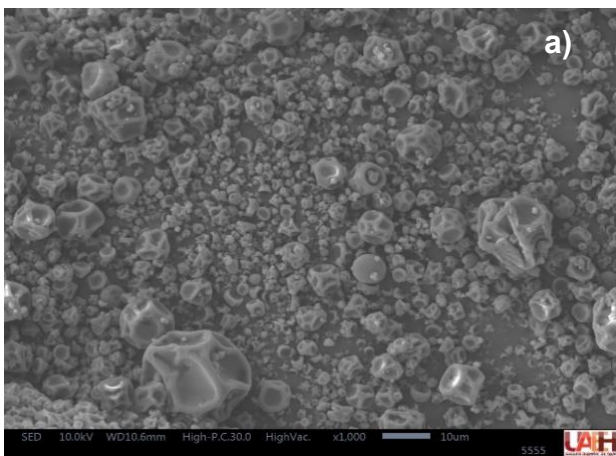
Se presentó que la morfología característica del secado por aspersión está presente en los tres tratamientos observados en MEB, se aprecia que en ningún tratamiento hay presencia de bacterias libres en el entorno, así como también presentaron estructuras cóncavas, rugosas y con poros en las partes superiores de la microcápsula. Rajam *et al.* (2014), describen morfologías similares a la de este trabajo, revelando que las microcápsulas están libres de fisuras, lo que nos indica la eficiencia del material pared al momento de soportar las condiciones del secado por aspersión. Jurado *et al.* (2021) reportaron tamaños de partícula de 15.18 a $35.6 \mu\text{m}$ en la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum*, en el presente trabajo las microcápsulas tuvieron tamaños más pequeños y por lo dicho por Pérez-Leonard *et al.* (2013) las características morfológicas de las microcápsulas como redondas u ovaladas tienen mayor facilidad de distribución al producto final, ellos también explican que un tamaño de partícula óptimo es de 15 a $100 \mu\text{m}$, cápsulas mayores a 100 son muy fáciles de detectar en la boca, y menores a 15 no dan una buena protección frente a agentes externos.



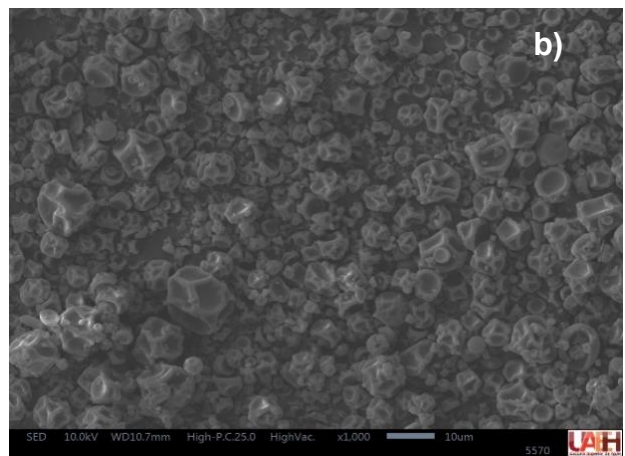
L17



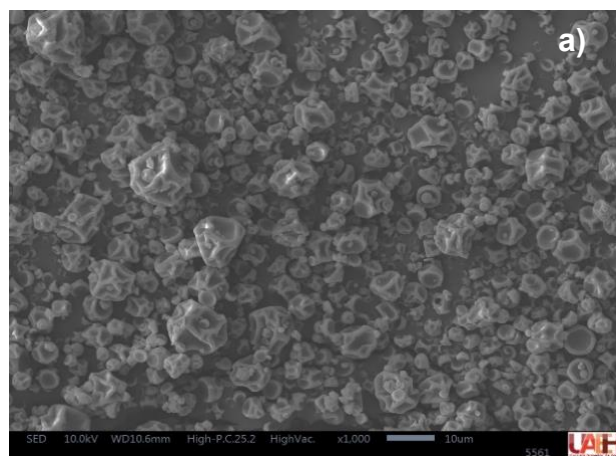
L17 + INU



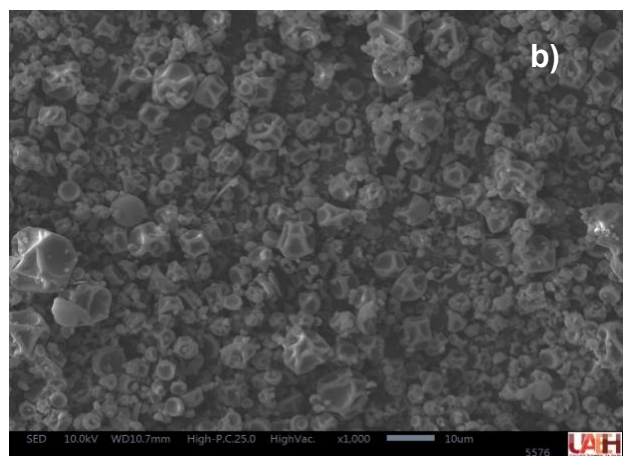
L19



L19 + INU + FOS



L25



L25 + INU

Figura 11. Microfotografías de microencapsulados con BAL a) sin prebióticos y b) con prebióticos (1000x) observadas bajo el microscopio electrónico de barrido.

7.2.4. Resistencia a pH 2

En la **Figura 12** se muestran los resultados obtenidos de la viabilidad para la célula libre (L17, L19 y L25), encapsulada con prebiótico y sin prebiótico adicionado. Se obtuvo que en las tres cepas encapsuladas con prebióticos a las 3 h tienen una viabilidad mayor ($p < 0.05$) en comparación con las cepas libres, en donde se muestra que la combinación de prebiótico con probiótico (simbiótico) tuvo un efecto favorable con respecto a la supervivencia a condiciones ácidas, dado que *Enterococcus lactis* es una cepa con alto potencial probiótica debido a su resistencia pH bajo (similar al estómago).

Se observó que para la cepa L19 con 0.6% de Inulina + FOS presenta mejor supervivencia a 3 h que las otras dos BAL (L17 y L25 ambas con 0.6% de inulina) esto puede deberse a la combinación de los dos prebióticos. En los tres tratamientos no se observan valores menores a los 6 Log UFC/g es decir las concentraciones establecidas para probióticos por la FAO/OMS, se mantienen en los microencapsulados. En el caso de las bacterias que se evaluaron sin encapsulación para las bacterias (L19 y L25 no se presentó viabilidad al final de la exposición del pH2), en este sentido se hace evidente el efecto de la encapsulación sobre la sobrevivencia de las BAL a condiciones de estrés.

Las especies de *Lactobacillus* son comensales en el tracto gastrointestinal humano y sus concentraciones en el estómago varían entre 0 y 10^3 /mL. Estas bacterias son ácido resistentes, persisten en el estómago más tiempo que otras como las del género *Bifidobacterias* y *Lactobacilos* que pueden sobrevivir en altas proporciones (>80%) en el ambiente gástrico por periodos de 2 h (Marteau *et al.*, 1997). Valeur *et al.* (2004), informaron que luego de la administración de 4×10^8 de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 a voluntarios sanos, fue posible detectar esta cepa adherida a células epiteliales a través de biopsias gástricas antrales, mediante hibridación fluorescente *in situ*. Por lo anterior, de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 12 la bacteria libre con mayor potencial para un efecto en condiciones de estrés de pH bajo (2) es L17, seguida de L25 y L19. Con

la microencapsulación se incrementa la resistencia a estas condiciones gástricas, sin embargo se necesitan estudios en modelos *in vivo*, que permitan identificar si la bacteria tiene la capacidad de adherirse a la mucosa gástrica.

Resultados similares fueron propuestos por Dumitru *et al.* (2021), quienes encontraron que la bacteria perteneciente al género *Lactobacillus* sobrevivía a pH 2 durante 3 h, ellos obtuvieron una supervivencia por arriba de los 6 Log UFC/g . Otros autores como Rosolen *et al.* (2019), evaluaron a *Lactococcus lactis* sin encapsular y encapsulada más prebiótico (inulina) a diferentes concentraciones de pH (2, 2.5 y 3), ellos obtuvieron que para la BAL libre sin encapsular tendía a no sobrevivir a condiciones acidas mientras que la BAL encapsulada con el prebiótico mantenía una supervivencia mayor.

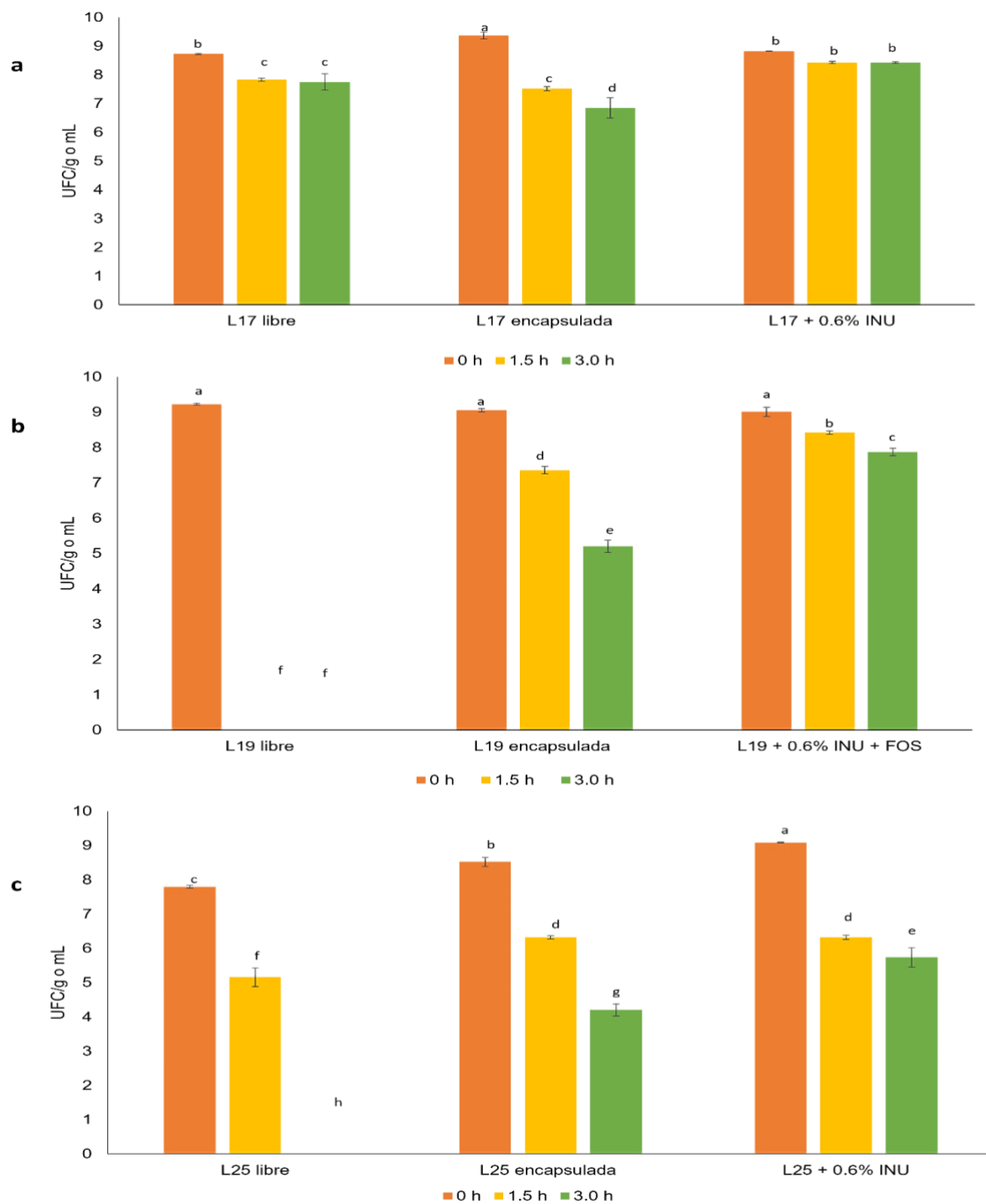


Figura 12. Viabilidad BAL libre, encapsulada con y sin prebiótico después de someterse a pH 2 durante 3 h de exposición; a) L17, b) L19, c) L25. Datos

expresados como media \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.2.5. Resistencia a sales biliares

En la **Figura 13** se muestran los resultados obtenidos de la viabilidad de célula libre (L17, L19 y L25), encapsulada con prebiótico y sin prebiótico, expuestas a sales biliares al 0.3% *in vitro*. Se obtuvo que para las BAL encapsuladas de L19 y L25 con prebióticos después de las 3 h de exposición, mostraron mejor supervivencia, teniendo resultados por arriba de 7 Log UFC/g esto puede ser a que los prebióticos adicionados ejerzan un efecto positivo en la resistencia a este factor de estrés. No obstante, la batería L17 microencapsulada con el prebiótico no presentó en mismo efecto, ya que después de las 3 h no se detectó viabilidad. Autores como Dumitru *et al.* (2021), ellos encapsularon a *Lactobacillus acidophilus* por la técnica de secado por aspersion, con una temperatura de 60°C utilizando como material pared maltodextrina, describen que la tolerancia a las sales biliares depende de las cepas, en algunas pueden presentar una mejor supervivencia mientras que en otras puede ser todo lo contrario, mencionan que para el género *Lactobacillus acidophilus* no presentó resistencia a sales biliares al 0.3% teniendo que después de 3 h su supervivencia es nula. Para las cepas utilizadas en este trabajo (*Enterococcus lactis*) presentaron un comportamiento similar, ya que a pesar de pertenecer a un mismo género las tres cepas presentaron una resistencia diferente entre sí, la cepa de L17 libre no presentó crecimiento a las 3 h. Los resultados obtenidos muestran que para la FAO/OMS la cepa de *Enterococcus lactis* es una BAL con potencial probiótico aprobado, ya que cumple con los criterios que establecieron la FAO/OMS en 2002 que muestra que la supervivencia a sales biliares es un factor clave para evaluar una cepa de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico.

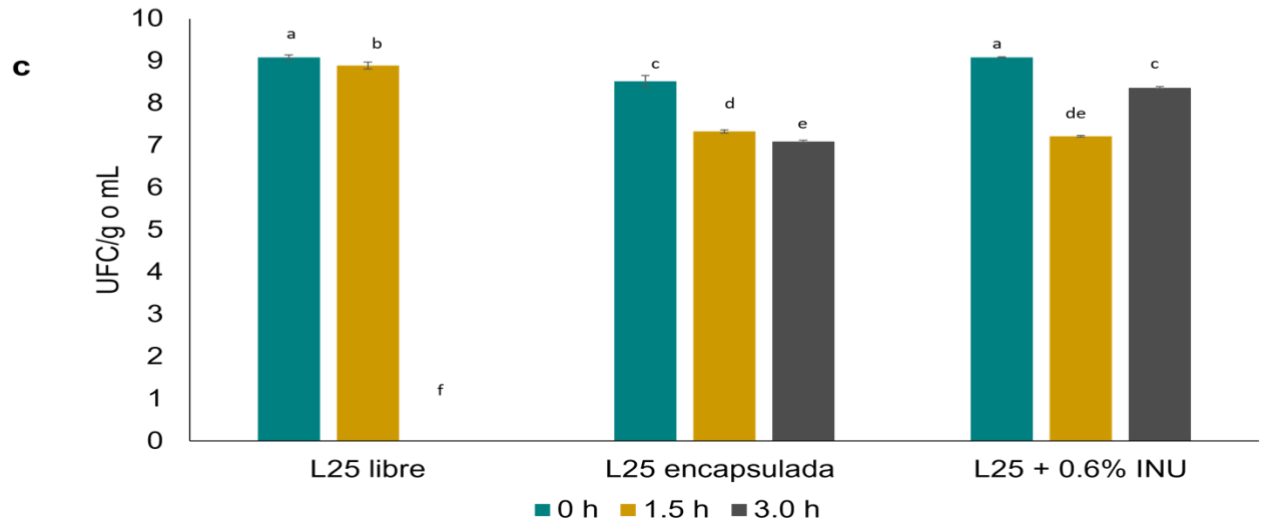
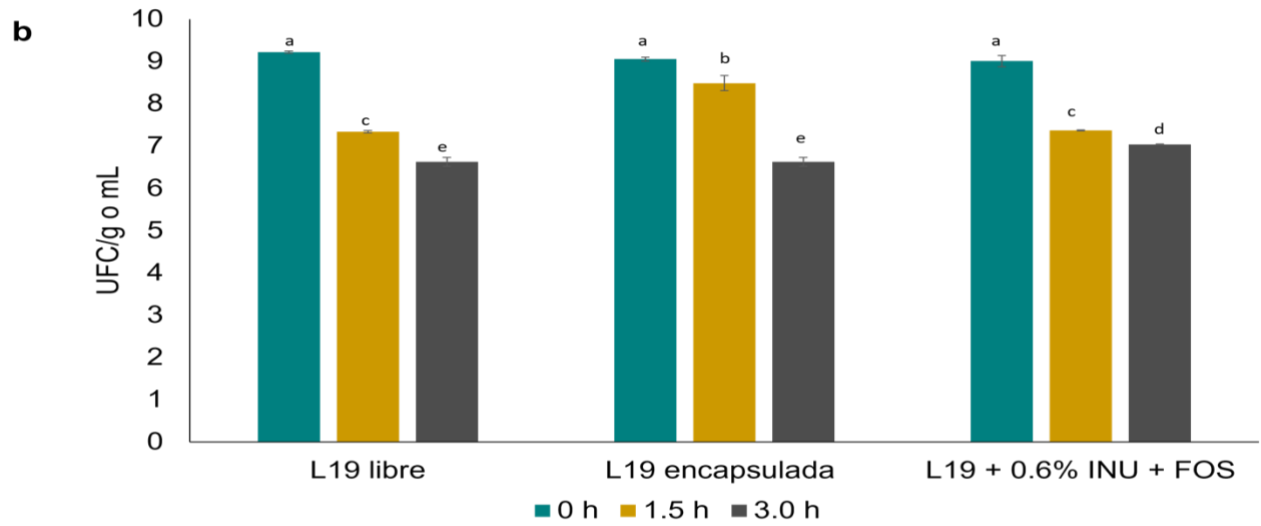
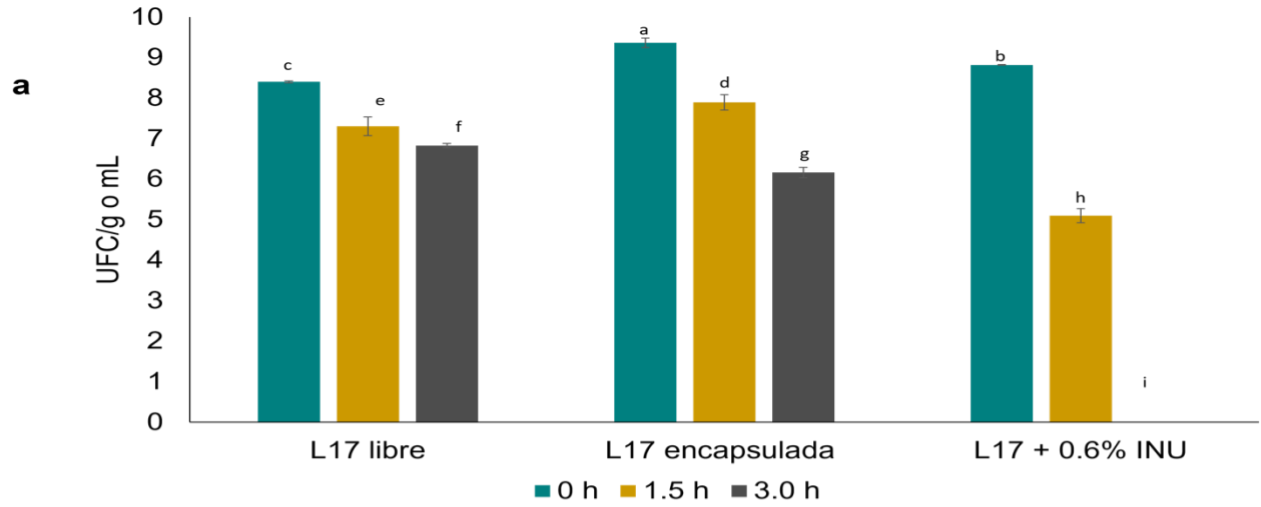


Figura 13. Viabilidad BAL libre, encapsulada con y sin prebiótico después de someterse a concentración del 0.3% de sales biliares durante 3 h de exposición; a) L17, b) L19, c) L25. Datos expresados como media \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.2.6. Actividad antimicrobiana de las BAL encapsulada con y sin prebióticos contra *Helicobacter pylori*

En la **Figura 14** se presenta la actividad antimicrobiana contra *H. pylori* de las bacterias BAL (L17, L19 y L25) después del proceso de encapsulación. Se observó que para las BAL como L17 + 0.6% de inulina y L19 + 0.6% de inulina + FOS se tuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación a la BAL libre y encapsulada sin prebiótico, los halos de inhibición fueron mayor a 12 mm; sin embargo, el encapsulado simbiótico de L25 no mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre si se encapsula sin o con prebiótico.

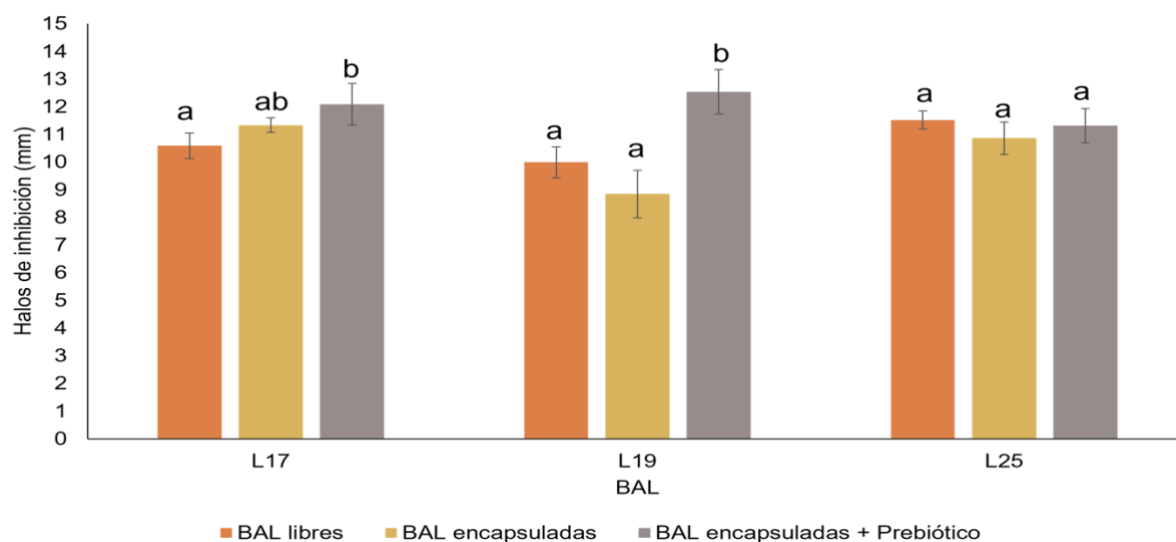


Figura 14. Actividad antimicrobiana de las bacterias BAL *Enterococcus lactis* (L17, L19 y L25) después del proceso de encapsulación. Datos expresados como media \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Chen *et al.* (2010), Obtuvieron resultados similares al evaluar cepas *Lactobacillus* contra *H. pylori*, presentaron halos de inhibición de 9 a 20 mm de diámetro de inhibición, ellos evaluaron alrededor de 15 cepas (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri* C234, *Lactobacillus casei ssp. Casei*, *L. casei* Zhang, *L. casei* BD-II, *L. casei* 2W, *Lactobacillus plantarum* S3 L, *plantarum* CZ211–2, *L. plantarum* DJ201 L, *plantarum* DJ102–1, *L. plantarum* ST-III L, *plantarum* ZS2058 L, *plantarum* 18 *Lactobacillus bulgaricus* L24 L, *bulgaricus* 2–3 *Lactobacillus gasseri* Chen) este trabajo evaluó a L20 es un género *Lactobacillus* el cual no presento un efecto contra *H. pylori*, esto puede deberse a que algunos géneros *Lactobacillus* no son eficaces contra un patógeno como *H. pylori* ellos exponen que la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus* contra el patógeno *H. pylori* se debe a productos metabólicos, incluidos ácidos orgánicos también redactan que los efectos contra *H. pylori* dependen de cada cepa. Ellos explican que 4 cepas de las 15 evaluadas tuvieron un efecto significativo en el efecto inhibitorio contra la actividad de ureasa de *H. pylori* mientras que las cepas restantes no mostraron un gran efecto contra el patógeno, especifican que la cepa de *L. plantarum* DJ201 no tuvo ningún efecto contra *H. pylori*.

7.2.7 Viabilidad de las bacterias de las microcápsulas durante el almacenamiento

Después de 9 semanas de almacenamiento a 25 °C, en la **Figura 15** se presenta la viabilidad de los probióticos encapsulados con y sin prebióticos. La estabilidad de las BAL no se vio afectada por el tiempo para los probióticos L17 y L19 adicionados con los prebióticos; mantuvieron una supervivencia por arriba de 8 Log UFC/g, manteniendo la bacteria estable durante ese tiempo.

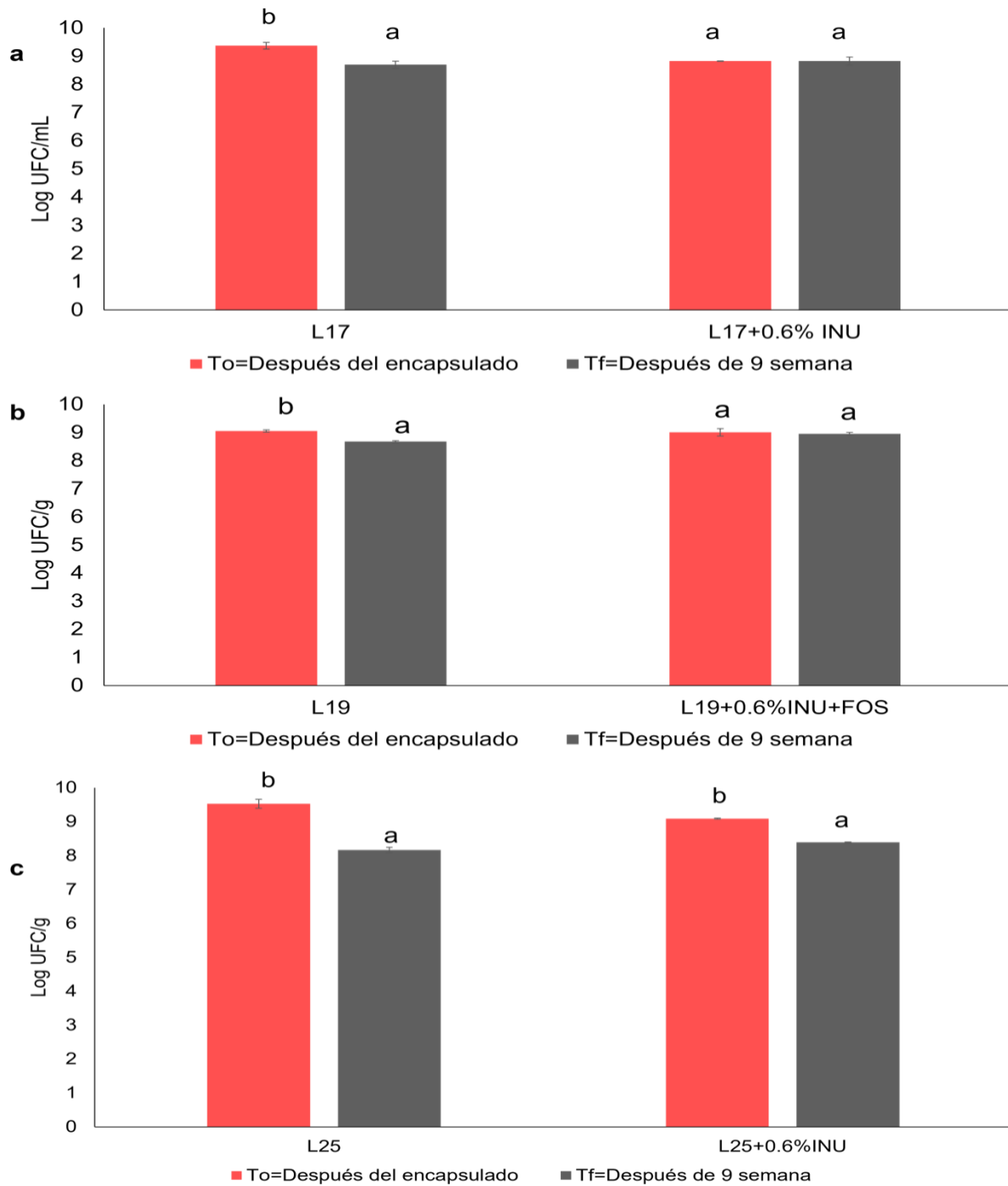
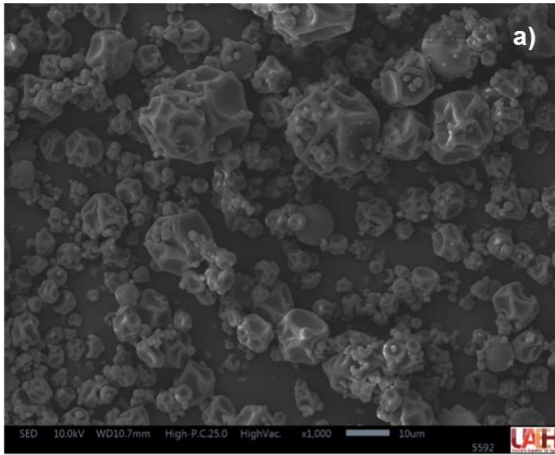


Figura 15. Viabilidad BAL encapsulada con y sin prebiótico después de nueve semanas de almacenamiento a) L17, b) L19, c) L20 y d) L25. Datos expresados como media \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

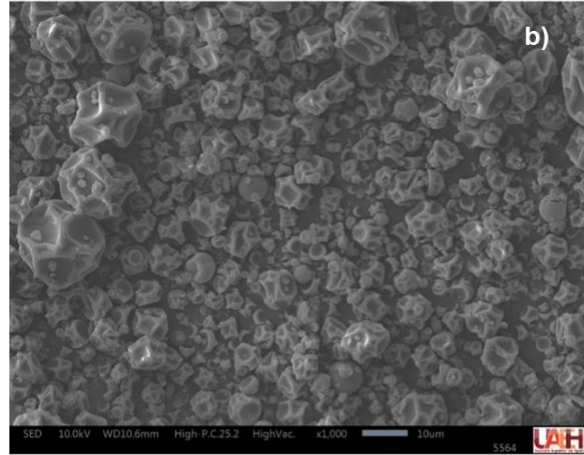
Dumitru *et al.* (2021) examinaron cepas de *Lactobacillus acidophilus* durante 64 días; encontraron que después de 30 días de almacenamiento, la supervivencia se mantuvo constante sin mostrar una disminución significativa, notando que hubo un recuento de 1 Log CFU/g menos que la concentración inicial al final del período de almacenamiento.

Resultados similares se encontraron en este trabajo, demostrando que no hubo diferencia significativa aún en presencia de un simbiótico microencapsulado. Rajam *et al.* (2014), obtuvieron resultados similares a los de este trabajo, ellos evaluaron a *L. plantarum* con y sin prebiótico FOS a una temperatura de 4°C, exponen que para la cepa sin prebiótico después de 60 días de almacenamiento tuvo una supervivencia baja en comparación a la cepa con prebiótico, explicando que la gran capacidad de retención de humedad del prebiótico fructooligosacáridos (FOS) evita el secado excesivo que puede afectar a la supervivencia del microencapsulado, mostrando también que el contenido de humedad y la movilidad molecular son un factor clave para la supervivencia de las cepas durante el almacenamiento.

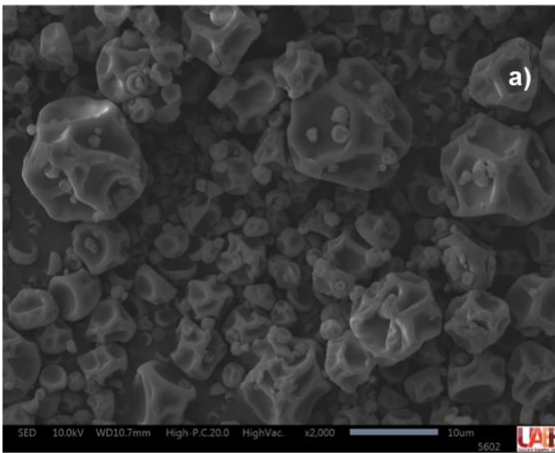
En la **Figura 16** se observan las micrografías de L17, L19 y L25 antes y después de 9 semanas de almacenamiento a una temperatura de 25°C, se muestra que los 6 tratamientos conservan la morfología característica del secado por aspersión. Después de las 9 semanas de almacenamiento las BAL (L17, L19 y L25) adicionadas con prebiótico muestran una morfología rugosa, con poros en la superficie y sin presencia de bacterias en el entorno, se aprecia que aun después de estar en un almacenamiento a temperatura ambiente su morfología no presentó cambios significativos.



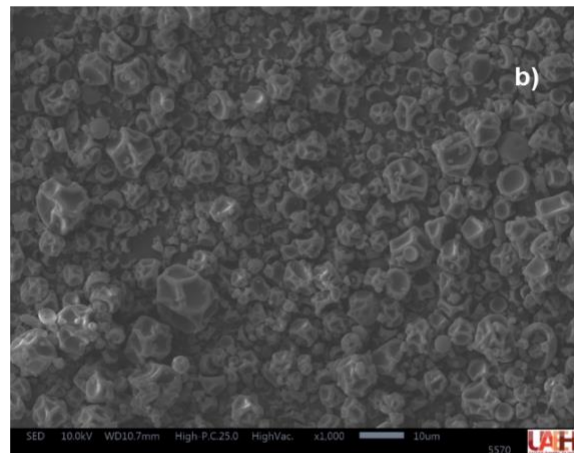
To= L17+0.6% Inulina



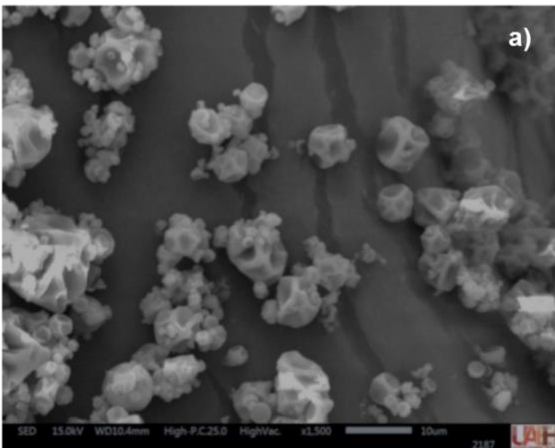
Tf= L17+0.6% Inulina



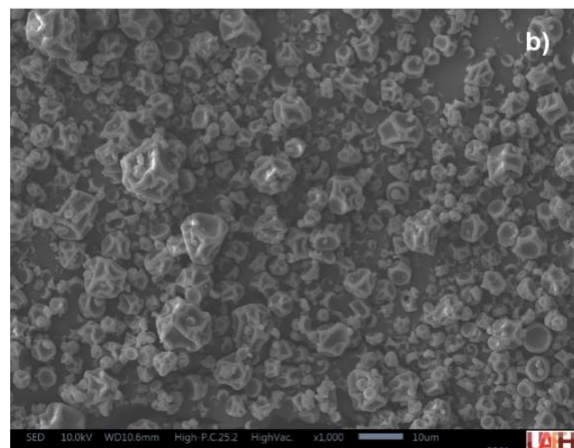
To= L19+0.6% INU+FOS



Tf= L19+0.6% INU+FOS



To= L25



Tf= L25

Figura 16. Microfotografías de BAL encapsuladas después de 9 semanas de almacenamiento

VIII. CONCLUSIONES

1. La microencapsulación de simbióticos usando el secado por aspersión favorece la viabilidad de las bacterias evaluadas a condiciones adversas de pH y sales biliares.
2. Las bacterias del género *Enterococcus lactis* presentaron en su forma libre, mayor resistencia a pH 2, por lo que la hace de gran interés por su potencial para adherirse a la mucosa gástrica.
3. La microencapsulación de simbióticos estabiliza la sobrevivencia de las bacterias encapsuladas en función del tiempo durante 9 semanas.

IX. PERSPECTIVAS

1. Hasta la fecha no existen muchos estudios acerca de *Enterococcus lactis* y su capacidad de fermentar tanto FOS como Inulina, además de su efecto inhibitorio contra *H. pylori* por lo que es necesario realizar estudios *in vivo*.
2. Realizar estudios que expliquen el posible mecanismo de acción de las bacterias en estudio en modelos *in vivo*.

X. REFERENCIAS

- Ahmad K, Fatemeh F, Mehri N and Maryam S: Probiotics for the treatment of pediatric *Helicobacter pylori* infection: a randomized double blind clinical trial. *Iran J Pediatr* 23: 79-84, 2013
- Ale, E. C., Rojas, M. F., Reinheimer, J. A., & Binetti, A. G. (2020). *Lactobacillus fermentum*: Could EPS production ability be responsible for functional properties. *Food microbiology*, 90, 103465.
- Alfaro Galarza, O. (2019). Microencapsulación de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* mediante secado por aspersión. Tesis de Maestría, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*. 39-41
- Atalar, I. & Dervisoglu, M. (2015). Optimización de los parámetros del proceso de secado por atomización para el polvo de kéfir utilizando la metodología de superficie de respuesta. *LWT-Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 60, 751-757.
- Atia, A., Gomaa, A., Fliss, I., Beyssac, E., Garrait, G., & Subirade, M. (2016). A prebiotic matrix for encapsulation of probiotics: physicochemical and microbiological study. *Journal of Microencapsulation*, 33, 89-101.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., GómezLlorente, C. and Gil, A., (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 61, 160-174.
- Blum, A. L., Talley, N. J., O'Moráin, C., van Zanten, S. V., Labenz, J., Stolte, M., ... & Junghard, O. (1998). Lack of effect of treating *Helicobacter pylori* infection in patients with nonulcer dyspepsia. *New England Journal of Medicine*. 339, 1875-1881.

- Bosques-Padilla, F. J., Remes-Troche, J. M., González-Huezo, M. S., Pérez-Pérez, G., Torres-López, J., Abdo-Francis, J. M., ... & Velasco, J. V. R. (2018). IV consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*. 83, 325-341.
- Cammarota, G., Sanguinetti, M., Gallo, A., & Posteraro, B. (2012). biofilm formation by *Helicobacter pylori* as a target for eradication of resistant infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 36, 222-230.
- Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Chávez-Urbiola, E. A., Hernández-Bautista, M., Rodríguez-Marín, M. L., Cabrera-Canales, Z. E., & Falfán-Cortés, R. N. (2021). Characterisation, storage viability, and application of microspheres with *Lactobacillus paracasei* obtained by the extrusion technique. *International Journal of Food Science & Technology*. 56, 1809-1817.
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F. & Charalampopoulos, D. (2011). Recomendaciones para la evaluación de la viabilidad de probióticos como cultivos concentrados y en matrices alimentarias. *Revista internacional de microbiología de alimentos*. 149, 185-193.
- Chen, X., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H. P., Zhang, H., & Chen, W. (2010). In vitro screening of lactobacilli with antagonistic activity against *Helicobacter pylori* from traditionally fermented foods. *Journal of dairy science*. 93, 5627-5634.
- Chey, W. D., Leontiadis, G. I., Howden, C. W., & Moss, S. F. (2017). ACG clinical guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection. Official journal of the *American College of Gastroenterology ACG*. 112, 212-239.

- Correa, P. (2003). Bacterial infections as a cause of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 95, E3-E3.
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., & Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*. 31, 99-118.
- Cross, M. L. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 34, 245-253.
- Cruchet S, Obregon MC, Salazar G, Diaz E, Gotteland M. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition* 2003; 19: 716–21.
- Delgado, J. S., García-Iglesias, P., Titó, L., Puig, I., Planella, M., Gené, E., ... & Calvet, X. (2018). Actualización en el manejo de la infección por *Helicobacter pylori*. Documento de posicionamiento de la Societat Catalana de Digestologia. *Gastroenterología y Hepatología*. 41, 272-280.
- Dixon MF (2001). Patología de gastritis y ulceración péptica. En: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, eds. *Helicobacter pylori: fisiología y genética*. Washington, DC: *ASM Press*, 459-69.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P. & Hill, C., (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait. *Applied and Environmental Microbiology*. 78, 1-6
- Dumitru, M., Vodnar, D. C., Elemer, S., Ciurescu, G., Habeanu, M., Sorescu, I., ... & Dudu, A. (2021). Evaluation of non-encapsulated and microencapsulated lactic acid bacteria. *Applied Sciences*. 11, 9867.

Eidt, S., Stolte, M., & Fischer, R. (1994). *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Clinical Pathology*. 47, 436-439.

Esteban C. Prevención de las infecciones urogenitales. Probióticos y Salud
Disponibile en: <http://www.probioticosysalud.com/probioticos-beneficios/probioticos-infeccion-urinaria-prevenir/>

Falfán-Cortés, R. N., Mora-Peñaflor, N., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Acevedo-Sandoval, O. A., Franco-Fernández, M. J., & Castro-Rosas, J. (2022). Characterization and evaluation of the probiotic potential in vitro and in situ of *Lactocaseibacillus paracasei* isolated from tenate cheese. *Journal of Food Protection*. 85, 112-121.

Food & Agriculture Organization (FAO). (2002). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*, 2002. Disponible en: <https://www.fao.org/3/y7352e/y7352e00.htm>

G. C. Raddatz, B. de Souza da Fonseca, G. Poletto et al., (2020). "Influence of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the viability of pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal gelation/emulsification". *Powder Technology*. 362 409–415.

Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., ... & Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*. 7, 1-19.

Gibson GR., Roberfroid MB. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics *The Journal of nutrition*, 125, 1401-1412.

- González López, L., & Rodríguez González, B. L. (2011). Patogénesis de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Medicina*, 50(4), 441-452.
- Gong, Y., Li, Y., & Sun, Q. (2015). Probiotics improve efficacy and tolerability of triple therapy to eradicate *helicobacter pylori*: A meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 8, 6530–6543.
- Gotteland m, brunser o, cruchet s. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1077-1086.
- Graham, D. Y., Abudayyeh, S., El-Zimaity, H. M. T., Hoffman, J., Reddy, R., & Opekun, A. R. (2006). Sequential therapy using high-dose esomeprazole-amoxicillin followed by gatifloxacin for *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 24, 845-850.
- Graham DY, & Shiotani A (2008). New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology* 5, 5321-31.
- Graham DY (2010). Therapy of *Helicobacter pylori*: Current status and issues. *Gastroenterology*. 118, S2-8.
- Gutiérrez-Zamorano, C., González-Ávila, M., Díaz-Blas, G., Smith, C. T., González-Correa, C., & García-Cancino, A. (2019). Increased anti-*Helicobacter pylori* effect of the probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain encapsulated in carrageenan evaluated in gastric simulations under fasting conditions. *Food Research International*. 121, 812–816.

- Hamilton-miller jm. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 22: 360-366.
- Henriksson A, Conway PL. (2001) Isolation of human faecal bifidobacteria which reduce the signs of Salmonella infection when orogastrically dose mice. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 223-228.
- Hernández-López, Z., Rangel-Vargas, E., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Cadena-Ramírez, A., Acevedo-Sandoval, O. A., ... & Falfán-Cortés, R. N. (2018). Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. *LWT-Food Science and Technology*. 95, 216-222.
- Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, et al. (1996). *Helicobacter pylori* en el agua potable en Perú. *Gastroenterología*. 110, 1031–5.
- Ji, J., & Yang, H. (2020). Using probiotics as supplementation for *helicobacter pylori* antibiotic therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21.
- Jung, H., Lee, Y. J., & Yoon, W. B. (2018). Effect of moisture content on the grinding process and powder properties in food: A review. *Processes*, 6, 69.
- Jurado-Gámez, H. A., Zambrano-Mora, E. J., & Pazos-Moncayo, A. (2021). Adición de un probiótico de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado en el alimento para pollos. *Universidad y Salud*. 23, 151-161.
- K. C. G. Silva, E. C. Cezarino, M. Michelon, & A. C. K. Sato (2018). “Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival,” *LWT-Food Science and Technology*. 89, 503–509.

Ladrón-de-Guevara, L., Bornstein-Quevedo, L., González-Huezo, S., Castañeda-Romero, B., Costa, F. G., & di Silvio-López, M. (2019). Erradicación de *Helicobacter pylori* en México con un esquema basado en levofloxacina versus la triple terapia estándar: resultados de un estudio clínico de fase iiiib, abierto, aleatorizado, de no inferioridad. *Revista de Gastroenterología de México*. 84, 274-283.

Lamsal BP. (2012) Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92, 2020-2028.

Lv, Z., Wang, B., Zhou, X., Wang, F., Xie, Y., Zheng, H. and Lv, N., (2015). Efficacy and safety of probiotics as adjuvant agents for *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 9, 707-716

Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JH. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1031–7.

Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, et al. (1988) Ensayo prospectivo doble ciego de recaída de úlcera duodenal después de la erradicación de *Campylobacter pylori*. *Lancet*. 2, 1437-42

Matsumoto M, Ishige A, Yazawa Y, Kondo M, Muramatsu K, Watanabe K. (2012) Promotion of intestinal peristalsis by *Bifido bacterium* spp. Capable of hydrolysis sennosides in mice. *PLoS One*; 7, e31700.

Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. (2013) Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell*. 152, 39-50.

- Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, et al. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 1999; 60: 203–9.
- Natalia De Araújo, U., Ramírez, L. A. G., Villadiego, O. S. R., & Campuzano, O. I. M. (2015). Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: Una revisión. *Alimentos Hoy*. 23, 112-126.
- Nilsson AC, Östman EM, Holst J, Björk IM. (2008) Including indigestible carbohydrates in the evening meal of healthy subjects improves glucose tolerance, lowers inflammatory marks, and increases satiety after subsequent standardized breakfast. *The Journal of nutrition*. 138, 732-9.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*. 25, 20-33.
- Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Tolkkio S, Salminen S. (1999). Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects of different age groups. *Fems Microbiology Letters*. 172, 61-64.
- Palomares, S. G., Estrada, A. H., & Sánchez, H. M. G. (2016). Guanábana (*Annona muricata* L.) en polvo secado por aspersión. *Revista de Divulgación Científica, Ciencia y Tecnología Universitarias*. 2-3
- Pandey, K., Naik, S., & Vakil, B. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology*. 52, 7577-7587.
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. (1991) Infección por *Helicobacter pylori* y el riesgo de carcinoma gástrico. *The New England Journal of Medicine*. 325, 1127-31.

- Parsonnet J, Hansen S, Rodríguez L, et al. (1994). Infección por *Helicobacter pylori* y linfoma gástrico. *The New England Journal of Medicine*. 330, 1267-71.
- Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., & Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47, 14-25.
- Posse, R. S. A., Toledo, R. A., & Cabral, M. L. V. (2006). *Helicobacter pylori*: Clínica, diagnóstico y tratamiento. *Revista de posgrado de la vía catedra de medicina*, 158, 9-12.
- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*. 60, 773-780.
- Randel A. (2018). *H. pylori Infection: ACG Updates Treatment Recommendations. American Family Physician*. 97, 135-7.
- Rastall RA. (2010) Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology*. 1, 305-339
- Rea, M.C., Alemayehu, D., Ross, R.P. and Hill, C. (2013). Gut solutions to a gut problem: bacteriocins, probiotics and bacteriophage for control of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Medical Microbiology*. 62, 1369-1378.
- Rodríguez-Barona, S., Montes, L. M., & Ramírez, D. D. J. (2012). Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersion en presencia de prebióticos. *Vitae*. 19, S186-S188.

- Rosolen, M. D., Bordini, F. W., de Oliveira, P. D., Conceição, F. R., Pohndorf, R. S., Fiorentini, Â. M., ... & Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. *LWT-Food Science and Technology* 115, 108411.
- Ruggiero, P. (2014). Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 5, 384-391.
- Sanz, Y., Collado, M. C., & Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española*. 61, 476-482.
- Scaccianoce G, Zullo A, Hassan C, et al: Triple therapies plus different probiotics for *Helicobacter pylori* eradication. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 12: 251-256, 2008.
- Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, Aşil Y, et al. (2007). Effects of probiotics and prebiotics and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *The Journal of Nutrition*. 137, 838S-846S.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., ... & Mentis, A. (2004). In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied and environmental microbiology*. 70, 518-526.
- Steed H, Macfarlane, S. (2009). Mechanisms of prebiotic impact on health. En: Charalampopoulos, D., Rastall, R. A., (Eds.), En: *Prebiotics and Probiotics: Science and Technology* (eds D. Charalampopoulos & R.A. Rastall), *Springer Science, New York*, pp. 135-161.

- Suerbaum, S., & Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine*. 347, 1175-1186.
- Szajewska H, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, Kolacek S, Shamir R, et al. (2014). Use of Probiotics for Management of Acute Gastroenteritis: A Position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 58, 531-9.
- Trespalacios A, Otero W, Mercado M. (2010). *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in Colombian patients. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 25, 31-8.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamagu-chi S, Yamakido M, et al. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer *New England Journal of Medicine*. 345, 784-9.2.
- Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly N, Ladefoged K. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1176–81
- Wang, L., Yu, X., Xu, H., Aguilar, Z. P., & Wei, H. (2016). Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying. *LWT-food Science and Technology*. 68, 8-13.
- Webb PM, Knight T, Greaves S, Wilson A, et al. (1994). Relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y las condiciones de vida en la infancia: evidencia de transmisión de persona a persona en los primeros años de vida. *British Medical Bulletin*. 308, 750–3.

- Wotherspoon AC. (1998). Infección por *Helicobacter pylori* y linfoma gástrico. *British Medical Bulletin*. 54, 79-85
- Yan, J., & Charles, J. F. (2017). Gut microbiome and bone: to build, destroy, or both?. *Current osteoporosis reports*, 15, 376-384.
- Yoon H, Kim N, Kim JY, et al: Effects of multistrain probiotic-containing yogurt on second-line triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 26: 44-48, 2011.
- Zhang, M. M., Cheng, J. Q., Lu, Y. R., Yi, Z. H., Yang, P., & Wu, X. T. (2010). Use of pre-, pro-and synbiotics in patients with acute pancreatitis: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16, 3970.
- Zhu, R., Chen, K., Zheng, Y. Y., Zhang, H. W., Wang, J. S., Xia, Y. J., ... & Guo, C. Y. (2014). Meta-analysis of the efficacy of probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *World journal of gastroenterology*. 20, 18013.