

Trabajo de fin de Carrera titulado:

# "ANÁLISIS DEL POTENCIAL PREBIÓTICO DE LA INULINA DE ACHICORIA EN JUGOS NATURALES COMERCIALIZADOS EN EL DMQ, MEDIANTE LA SIMULACIÓN DE UN SISTEMA GASTROINTESTINAL *IN-VITRO*"

Realizado por:

# LUIS FERNANDO ZALDUMBIDE CISNEROS

Director del proyecto:

ING. ANDRÉS HERRERA, MsC.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

QUITO, 2 de Abril del 2024

# DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, LUIS FERNANDO ZALDUMBIDE CISNEROS, con cédula de identidad # 1723206387, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado de calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo.

**FIRMA** 

172320638-7

## **DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

# ANÁLISIS DEL POTENCIAL PREBIÓTICO DE LA INULINA DE ACHICORIA EN JUGOS NATURALES COMERCIALIZADOS EN EL DMQ, MEDIANTE LA SIMULACIÓN DE UN SISTEMA GASTROINTESTINAL *IN-VITRO*

# Realizado por:

## LUIS FERNANDO ZALDUMBIDE CISNEROS

como Requisito para la Obtención del Título de:

# INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Ha sido dirigido por el profesor:

## MANUEL ANDRES HERRERA YELA

quien considera que constituye un trabajo original de su autor.

**FIRMA** 

# LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

# PhD. JESUS LOPEZ VILLLADA

# Ing. JOHANNA MEDRANO BARBOZA

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral

ante el tribunal examinador

FIRMA FIRMA

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

# Energías, Ambiente y Biotecnología

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

# DEDICATORIA,

A todos los que buscan siempre ser mejores.

# AGRADECIMIENTOS,

A mis padres por su amor y apoyo incondicional.

A mi familia por siempre estar ahí para mí.

A todos mis profesores por su esfuerzo incalculable.

A mi tutor Andrés Herrera por guiarme de la mejor manera.

#### Resumen

En diversas localidades del Ecuador, como el Distrito Metropolitano de Quito, se comercializan bebidas en las cuales se incorporan alimentos funcionales con el propósito de conferirles un valor biológico adicional, como es el caso de la inulina de achicoria, utilizada para potenciar su carácter prebiótico. Estos prebióticos, presentes en dichas bebidas, poseen la capacidad de estimular una proliferación más amplia de bacterias beneficiosas presentes en la microbiota humana, entre las que se incluyen los Lactobacillus. Dado que las empresas emplean estos aditivos con el fin de generar una inclinación favorable hacia sus productos por parte del público, el objetivo de este estudio radica en evaluar y determinar el auténtico potencial prebiótico que ostentan estas bebidas, las cuales se etiquetan con un supuesto valor biológico añadido. Este análisis se llevó a cabo mediante la evaluación de dichos productos en sistemas gastrointestinales in vitro, con el propósito de corroborar su capacidad para fomentar la proliferación de Lactobacillus. En consecuencia, se implementaron sistemas gastrointestinales in vitro y se adaptaron para comparar, a través de conteos celulares, la proliferación de Lactobacillus en muestras de control (sin bebidas con inulina de achicoria) y muestras experimentales (con bebidas que contienen inulina de achicoria). Asimismo, se determinó estadísticamente si existía una diferencia significativa entre ambos grupos. Se concluyó que estas bebidas efectivamente generaron un aumento en la población de Lactobacillus en las muestras experimentales en comparación con los controles; no obstante, el incremento derivado de la inulina de achicoria incluida en las bebidas demostró no ser estadísticamente significativo para inducir mejoras sustanciales en la microbiota humana.

Palabras clave: Prebióticos, Inulina, Microbiota, Microbiología, Simulación in vitro.

#### Abstract:

In diverse regions of Ecuador, including the Metropolitan District of Quito, beverages are commercially available wherein functional foods are incorporated to bestow upon them an additional biological value. An example of such incorporation is chicory inulin, employed to enhance their prebiotic characteristics. These prebiotics, present in these beverages, harbor the capability to stimulate a broader proliferation of beneficial bacteria within the human microbiota, notably including Lactobacillus. Given that companies utilize these additives to engender a favorable inclination towards their products among the public, the essence of this study lies in the evaluation and determination of the genuine prebiotic potential inherent in these beverages, labeled with an assumed biological value. This analysis was executed through the assessment of said products in in vitro gastrointestinal systems, aimed at substantiating their capacity to foster the proliferation of *Lactobacillus*. Consequently, in vitro gastrointestinal systems were implemented and adapted to compare, through cellular counts, the proliferation of Lactobacillus in control samples (lacking beverages containing chicory inulin) and experimental samples (with beverages containing chicory inulin). Moreover, a statistical determination was conducted to ascertain if a significant difference existed between the two groups. It was concluded that these beverages did, indeed, induce an augmentation in the *Lactobacillus* population within the experimental samples compared to the controls. Nevertheless, the increase resulting from chicory inulin included in the beverages proved not to be statistically significant enough to show substantial improvements in the human microbiota.

Key words: Prebiotics, Inulin, Microbiota, Microbiology, In vitro simulation

# Índice de contenidos

1.	Introducción
	1.1. Planteamiento del problema
	1.2. Justificación
	1.3. Marco teórico
	1.3.1. Probióticos
	1.3.2. Prebióticos
	1.3.3. Inulina como prebiótico
	1.3.4. Sistemas gastrointestinales in vitro
	1.4. Objetivos
	1.5. Hipótesis
<b>2.</b> N	Metodología22
2	2.1. Etapa 1: Adaptación del sistema gastrointestinal in vitro22
	2.1.1. Fase 1 (Estómago)
	2.1.2. Fase 2 (Intestino delgado)
	2.1.3. Fase 3 (Intestino grueso)
2	2.2. Etapa 2: Evaluación del potencial prebiótico27
	2.2.1. Medio de cultivo
	2.2.2. Conteo celular
	2.2.3. Análisis estadístico
3. I	Resultados28
	3.1. Etapa 1: Adaptación del SGI in vitro28
	3.1.1. Fase 1: Estomago
	3.1.2. Fase 2: Intestino delgado
	3.1.3. Fase 3: Intestino grueso
	3.2. Etapa 2: Determinación del potencial prebiótico31

	3.2.1. Conteo celular	31
	3.2.2. Análisis estadístico:	34
4. Discus	sión de resultados	38
	4.1. Adaptación del SGI	38
	4.2. Presencia de prebióticos	41
	4.3. Potencial prebiótico	43
5. Conclu	lusiones	47
6. Recom	nendaciones	48
7. Bibliog	ografía	49
8 Anevo	ns.	53

# Índice de ilustraciones

Ilustración 1. Esquema completo del SGI in vitro	22
Ilustración 2. Esquema de la fase estomacal con sus componentes	24
Ilustración 3. Esquema de la fase del intestino delgado con sus componentes	25
Ilustración 4. Dispositivos de intercambio de gases incorporados en la boquilla de las n	muestras.
	26
Ilustración 5. Análisis ANOVA de las muestras de la dilución 10 <sup>-4</sup>	34
Ilustración 6. Test de Tukey de las muestras de la dilución 10 <sup>-4</sup>	35
Ilustración 7. Análisis ANOVA de las muestras de la dilución 10 <sup>-5</sup>	35
Ilustración 8. Test de Tukey de las muestras de la dilución 10 <sup>-5</sup>	36
Ilustración 9. Análisis ANOVA de las muestras de la dilución 10 <sup>-6</sup>	36
Ilustración 10. Test de Tukey de las muestras de la dilución 10 <sup>-6</sup>	37
Ilustración 11. Análisis ANOVA de las muestras de la dilución 10 <sup>-7</sup>	37
Ilustración 12. Test de Tukey de las muestras de la dilución 10 <sup>-7</sup>	38

### 1. Introducción

## 1.1. Planteamiento del problema

En la industria alimenticia ecuatoriana, la producción de jugos y bebidas con adición de ingredientes que contienen un alto potencial prebiótico se promociona mediante métodos publicitarios en su empaque, para inducir al público en general a preferir estos jugos con un supuesto valor biológico añadido. Esto conlleva a sus consumidores a comprar estos productos con la intención de mejorar su calidad de vida basándose en los beneficios que ofertan los prebióticos (Ferreira et al., 2023). Además, la confianza de los consumidores se basa únicamente en los mensajes encontrados en los empaques de los jugos, sin tener ninguna forma científica de comprobar por qué deberían preferir ese producto si su intención es obtener beneficios prebióticos. Por lo tanto, es necesario desarrollar un estudio del potencial prebiótico de los jugos comercializados en el Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) que afirman tener ingredientes como la inulina de achicoria en su composición, para proporcionar información segura y comprobable a sus consumidores sobre los verdaderos beneficios que estos les aportan.

## 1.2. Justificación

La industria de comercialización de alimentos y bebidas es uno de los pilares sobre los cuales se sustenta el desarrollo social y económico del Ecuador. Según cifras del Banco Central del Ecuador, este sector representa un 6.6% en la generación del producto interno bruto del país, además de una presencia del 45% en la actividad manufacturera (Banco Central del Ecuador, 2022). La importancia de este sector financiero invita a los alimentos y bebidas ecuatorianos a incluirse en la emergente corriente denominada alimentos funcionales. A estos alimentos se los conoce por,

además de brindar un aporte nutritivo, proporcionar componentes biológicamente activos que mejoren la salud del consumidor (Beltrán de Heredia, 2016).

En Ecuador se cultivan varios alimentos que pueden ser considerados como alimentos funcionales debido a sus características biológicas, así como lo mencionan Pacheco y colaboradores en su estudio del año 2020, donde se analiza la posibilidad de considerar como alimentos funcionales a cinco tubérculos cultivados en suelo ecuatoriano (Pacheco et al., 2020).

Por otro lado, el estudio realizado por García y colaboradores en el año 2021, plantea al tomate de árbol cultivado en Ecuador como un alimento con potencial prebiótico. Este último concepto corresponde a capacidad de un alimento de aportar nutrientes biológicos que pueden ser degradados por la microbiota intestinal para incrementar la población de bacterias beneficiosas, tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* (Gafar Babatunde Bamigbade et al., 2022) (Reyes-García et al., 2021).

La posibilidad de consumir alimentos funcionales con un alto potencial prebiótico es un aspecto que a la mayoría de las empresas alimenticias les interesa brindar a sus consumidores, puesto que es algo innovador y con varios beneficios a nivel de salud. Es por esto que actualmente a varios productos se les añade ingredientes que contengan estos nutrientes biológicos considerados prebióticos. Uno de los prebióticos más utilizados es la inulina obtenida de la planta de achicoria, esta se trata de una fibra fructosa polidispersa (Qin et al., 2023). Además de ser fácil de obtener, la inulina de achicoria puede ser usada sobre todo en bebidas, lo cual permite a las empresas añadirla de forma segura y sin mayores complicaciones para convertir su producto en un alimento con un valor biológico añadido.

A las bebidas que contienen ingredientes prebióticos se los etiqueta de tal forma que el publico en general pueda entender que si las consumen se beneficiarán de las ventajas biológicas del potencial prebiótico de esa bebida (Ferreira et al., 2023). Sin embargo, a nivel nacional, a día de la realización de este estudio, es poca, por no decir inexistente, la información acerca del potencial prebiótico de los jugos o bebidas manufacturados en Ecuador que afirman brindar mejoras en la salud de sus consumidores.

El problema de esta desinformación radica en que los estudios acerca del potencial prebiótico dichas bebidas son muy escasos, es decir, que no hay una forma confiable de ratificar que en los jugos cuya composición afirman tener prebióticos efectivamente los tengan y vayan a mejorar de algún modo la salud de aquellos que los consuman. De igual forma no se han encontrado estudios donde las empresas que comercializan este tipo de jugos verifiquen el potencial prebiótico de sus productos y detallen con exactitud cuál es la mejora que estos aportan.

Si bien es cierto que, existen estudios como el de Monar y colaboradores en el año 2014, donde se analizan bebidas con potencial prebiótico como el kéfir, o análisis como los mencionados anteriormente sobre los tubérculos o el tomate de árbol, la información acerca del potencial prebiótico de jugos procesados que se comercializan diariamente y forman parte de la dieta de la población del DMQ no se encuentra disponible (Monar et al., 2014). Es ahí donde este estudio toma gran importancia, pues brinda un enfoque informativo y comprobable a la comunidad sobre si realmente los jugos o bebidas que consumen poseen un potencial prebiótico que pueda llegar a mejorar su salud. De esta forma, se provee una visión que ratifica o no la información que es brindada por las empresas que fabrican este tipo de productos.

## 1.3. Marco teórico

## 1.3.1. Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que presentan un beneficio a la salud de su hospedador cuando son administrados en cantidades adecuadas (Sanders et al., 2018). Estos corresponden a la microbiota autóctona de nuestro sistema gastrointestinal, por lo que deben tener ciertas características como el ser capaces de; crecer anaeróbicamente, colonizar varias partes del sistema digestivo y mantener una población estable en adultos saludables (Gil et al., 2019).

Existen varias bacterias probióticas, sin embargo, para este estudio la bacteria de interés se trata de la *Lactobacillus*. Esta es una bacteria gram positiva que no forma esporas y que se encuentra presente en varias partes de nuestro SGI. Estas bacterias son estrictamente fermentadoras y poseen una temperatura de crecimiento de entre 2 y 53 °C y un pH óptimo de 5,5 a 6,2 (Zhang et al., 2018). El uso de estos probióticos como el *Lactobacillus* ha sido investigado con respecto a la seguridad

de su uso como foco de estudio de análisis *in vivo* e *in vitro*, a lo cual se puede concluir que su uso en cantidades adecuadas no produce bacteriemia (Kullar et al., 2023). A pesar de que hay índices muy raros de abscesos hepáticos en pacientes con ciertos síndromes, se considera a estas bacterias como un probiótico seguro de usar (Shira et al., 2015).

Algunos de sus beneficios por los que se deben cuidar estas bacterias en nuestro organismo incluyen la estimulación del metabolismo mediante la producción de vitaminas, también la regulación de la microbiota gastrointestinal donde eliminan microorganismos patogénicos como *Staphylococcus aureus, Salmonella spp., Shiguella spp* (Gil et al., 2019). También han demostrado ser capaces de generar sustancias como la acetilcolina, serotonina y dopamina, que son

considerados clave en procesos neuro inmunes y neuro activos, lo que indica que podrían poseer cierta importancia al momento de tratar y remediar trastornos psicológicos (Mindus et al., 2021).

## 1.3.2. Prebióticos

Los prebióticos consisten en un grupo de nutrientes de origen biológico que tienen la capacidad de ser fermentados o metabolizados por la microbiota que se encuentra en el SGI. El producto de su degradación es la liberación de ácidos grasos de cadena corta, mismos que luego son trasportados al colon y absorbidos por la sangre (Gafar Babatunde Bamigbade et al., 2022).

Estos compuestos son usados ampliamente en la producción bebidas, carnes, suplementos, etc. Se conoce que poseen gran sinergia con los probióticos por lo que muchas veces se adicionan ambos elementos para un mejor crecimiento de la microbiota gastrointestinal (Ferreira et al., 2023).

Los prebióticos se dividen principalmente en fructo-oligosacaridos y galacto-oligosacaridos. Las únicas variaciones en esta clasificación son debido a que ciertos prebióticos como la inulina, lactulosa y polidextosa se conocen como prebióticos estándar y otros como los xilo-oligosacaridos y los isomalto-oligosacaridos se conocen como prebióticos emergentes (Gafar Babatunde Bamigbade et al., 2022).

Un parámetro importante a tener en cuenta al hablar de prebióticos tiene que ver con el grado de polimerización, el cual se define como el número de unidades monoméricas que contiene una macromolécula ya sea un oligómero o polímero, los cuales son el conjunto de varias unidades monoméricas unidas. Esto es crucial al usar prebióticos como suplementos puesto que mientras una macromolécula tenga más grado de polimerización esto se traduce en una mayor temperatura de fusión y mayor fuerza mecánica entre sus enlaces (Baocheng et al., 2017).

Algunos beneficios demostrados del uso de prebióticos constituyen la prevención de la diabetes tipo 2, un nivel de glucosa más controlado, pérdida de peso y un metabolismo lipídico mejorado (Ferreira et al., 2023).

## 1.3.3. <u>Inulina como prebiótico</u>

El prebiótico de interés para este estudio es la inulina de achicoria, el termino inulina es una expresión genérica para los fructanos (un tipo de prebiótico) de cadena recta compuestos de fructosilos (Abed et al., 2016). La inulina es una mezcla entre oligómeros y polímeros de fructosa y una glucosa. Se encuentran de forma natural en muchas plantas y de igual forma en vegetales y frutas como las bananas, achicoria, espárragos y cebollas. Se ha demostrado en reiterados estudios de forma *in vivo* e *in vitro* su capacidad prebiótica (Terrera, 2021).

Hablando de la inulina de achicoria, esta es extraída normalmente de planta de achicoria, específicamente de una parte de su raíz, para luego ser hidrolizada por una endoinulasa y posteriormente ser refinada por otros procesos. La achicoria es el componente más explotado a nivel industrial para la extracción de inulina (Abed et al., 2016).

Además de los beneficios descritos de los prebióticos en general, la inulina de achicoria juega un rol importante en la inhibición de la expresión de factores inflamatorios, mejorando la absorción de minerales y bajando considerablemente el riesgo de contraer cáncer de colon (Abed et al., 2016).

## 1.3.4. Sistemas gastrointestinales in vitro

Los estudios que se realizan a cerca de la microbiota humana intestinal tienden a tener mejores resultados cuando se los realiza de forma *in vivo*, sin embargo, este tipo de experimentos son bastante costosos en lo que refiere a tiempo y recursos, de igual forma no permiten un correcto

análisis de la microbiota en un estado que no sean las heces humanas. Por otro lado, los procesos *in vitro* permiten replicar de forma más exacta los procesos que ocurren dentro del sistema gastrointestinal (Peters et al., 2020).

La mayoría de los estudios antecedentes, se realizan con una mayor cantidad de recursos tales como el uso del reactor SHIME, que es la herramienta que simula de forma exacta el proceso que ocurre en el tracto intestinal, mediante el uso de válvulas y reguladores pH., etc. Sin embargo, para efectos de este estudio se recurrió a un estudio mucho más alcanzable, el cual se realizó en la Universidad Internacional SEK por Peñaherrera y colaboradores en 2022, donde se evaluaba la capacidad de un SGI *in vitro* para producir café de especialidad simulando la digestión del grano de café dentro del sistema digestivo de *Paradoxurus hermaphroditus* (Peñaherrera et al., 2022).

A este SGI mencionado anteriormente se le realizaron adaptaciones basándose en diferentes fuentes bibliográficas además de la propia experiencia del investigador para determinar un modelo que permita estudiar de forma más cercana el potencial prebiótico de los jugos con inulina de achicoria.

## 1.4. Objetivos

# Objetivo General

Evaluar la capacidad prebiótica de la inulina de achicoria en jugos distribuidos en el DMQ, mediante la simulación de un sistema gastrointestinal (SGI) *in vitro* para la determinación de su potencial proliferante de bacterias lácticas.

# Objetivos Específicos

 Adaptar un modelo de simulación gastrointestinal in vitro para la proliferación de bacterias lácticas.

- Obtener bacterias lácticas aisladas para su uso como inoculo en la fase intestinal del SGI
- Comparar la proliferación de bacterias lácticas en el SGI con y sin adición de jugos que contengan inulina de achicoria, en base a conteos celulares.

## 1.5. Hipótesis

- Hipótesis nula (H0): La inulina de achicoria no presenta una capacidad prebiótica significativa en jugos comercializados en el DMQ.
- Hipótesis alternativa (H1): La inulina de achicoria presenta una capacidad prebiótica significativa en jugos comercializados en el DMQ.

## 2. Metodología

En este estudio se dividió la metodología experimental en dos etapas: la primera etapa donde se adaptó la estructura de un SGI *in vitro* descrito por Peñaherrera en el 2022, para adecuarlo al estudio de bacterias lácticas (*Lactobacillus*) y la segunda etapa donde se determinó el potencial prebiótico de los jugos seleccionados, mediante conteos celulares (Peñaherrera et al. 2022).

## 2.1. Etapa 1: Adaptación del sistema gastrointestinal in vitro

Dentro de este SGI *in vitro* adaptado se describen tres fases principales para la simulación del proceso de digestión en organismos omnívoros como se muestra en la Ilustración 1:

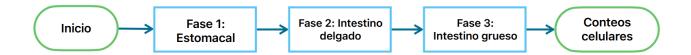


Ilustración 1. Esquema completo del SGI in vitro

Es importante mencionar que, para lograr una determinación del potencial prebiótico de los productos seleccionados para este estudio se realizaron tres muestras control sin la adición de jugos

prebióticos y 10 muestras experimentales que contaron con la adición de los jugos con prebióticos. La diferencia de cantidad entre las muestras control y las experimentales se debió únicamente a la limitación del tamaño de la incubadora de la que se disponía.

## 2.1.1. Fase 1 (Estómago)

Durante esta fase se elaboró una solución gástrica correspondiente a una parte de alimentos y un ácido gástrico simulado. Para llegar al rango de pH del estómago, que se encuentra entre 1.5 y 3.5, se hizo uso de ácido clorhídrico concentrado (Bell-Young, L., 2021).

Previamente a introducir el ácido clorhídrico a la solución, se añadieron sales de potasio (2.14 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1.09 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), con el objetivo de evitar cambios radicales en el pH (Peñaherrera et al., 2022).

## Muestras control:

Para el montaje de la solución gástrica de las muestras control se hizo uso de las sales de potasio descritas anteriormente, 15 g de frutas, 15 g de carne molida, 200 mL de agua y 1.5 mL de ácido clorhídrico concentrado (Peñaherrera et al., 2022).

## Muestras experimentales:

Por otro lado, para el montaje de las muestras experimentales se hizo uso de todos los ingredientes mencionados en el montaje de las muestras control y además se les añadió la cantidad correspondiente una porción (300 mL) del jugo con ingredientes prebióticos a analizar.

La solución gástrica tanto para las muestras control como para las experimentales se realizó en matraces de vidrio. En ambas muestras las frutas y la carne se trituraron en un procesador de

comida antes de ser introducidas en la solución ácida. Finalmente se dejó incubar a 37 °C durante 1 día a ambos tipos de muestras.

La forma de determinar el rendimiento del sistema en cuanto a la digestión fue mediante la medición de grados Brix antes y después del día de incubación, haciendo uso de un refractómetro digital (Peñaherrera et al., 2022). Una representación gráfica de esta fase se muestra en la Ilustración 2.

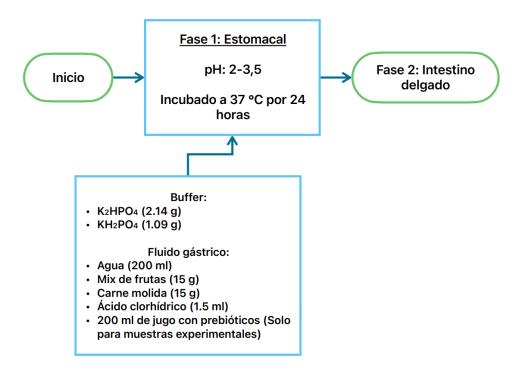


Ilustración 2. Esquema de la fase estomacal con sus componentes.

## 2.1.2. Fase 2 (Intestino delgado)

En este proceso se simuló el intestino delgado dentro del SGI. Posterior a la digestión realizada en la fase estomacal se hizo uso de los productos salientes de dicha fase para continuar con la simulación de este protocolo. Durante este procedimiento no se diferenció entre muestras control

o experimentales para su realización, es decir, todas las muestras recibieron los mismos tratamientos (Peñaherrera et al., 2022). Estos tratamientos son descritos en la Ilustración 3.

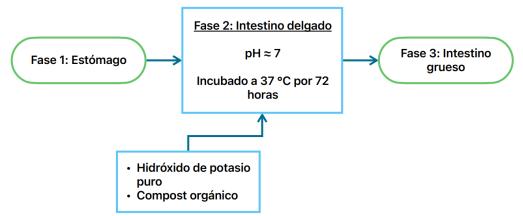


Ilustración 3. Esquema de la fase del intestino delgado con sus componentes.

Para alcanzar el rango de pH del intestino delgado (6-7.4), se les añadió hidróxido de potasio puro a los productos salientes de la fase estomacal (Barko et al., 2017). Finalmente se añadió 2 gramos de compost con un 60% de contenido orgánico y se dejó incubar las muestras durante 72 horas a 37 °C (Peñaherrera et al., 2022).

Se monitoreó el crecimiento de microorganismos mediante una medición de la densidad óptica de la solución gástrica a una longitud de onda de 600 nm una vez finalizadas las 72 horas de incubación con la ayuda de un espectrofotómetro.

## 2.1.3. Fase 3 (Intestino grueso)

Para esta fase se intentó simular los procesos llevados a cabo por el intestino grueso dentro del SGI con respecto únicamente al análisis de la proliferación de bacterias lácticas (*Lactobacillus*). Es por esto que, a los productos salientes de la fase del intestino delgado se les inoculó con una muestra de 1.36 mL bacterias lácticas aisladas.

Los *Lactobacillus* usados para esta fase del intestino grueso fueron proporcionados por la Universidad Internacional SEK provenientes de un subcultivo del cual se aislaron bacterias lácticas encontradas en agua de reservorio.

Finalmente, después de inoculadas, se dejó incubar tanto a las muestras control como a las experimentales durante 72 horas a 37 °C.

Para evidenciar el funcionamiento del SGI durante esta fase se usaron dispositivos de intercambio de gases acoplados a las boquillas de los matraces. Dichos dispositivos estaban conformados por un globo unido herméticamente a los matraces y con pequeños orificios en su superficie como se ve en la Ilustración 4. De esta forma el CO<sub>2</sub> generado por las *Lactobacillus* al proliferarse dentro de las muestras inflaría el globo y mediante los orificios se evitaría un aumento en la presión dentro de los matraces (National Research Council (US), 1992).



Ilustración 4. Dispositivos de intercambio de gases incorporados en la boquilla de las muestras.

## 2.2. Etapa 2: Evaluación del potencial prebiótico

Para cumplir con el objetivo de evaluar el potencial prebiótico de los jugos seleccionados se hizo uso del método de conteo celular con la base de un medio de cultivo selectivo para bacterias lácticas. De esta forma se diluyeron los productos salientes del SGI *in vitro* y se cultivaron en placas Petri para posteriormente contar las UFC generadas y comparar estos conteos celulares entre las muestras control y las muestras experimentales.

## 2.2.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo usado para este estudio fue el MRS, debido a su capacidad selectiva y proliferantes de bacterias lácticas (Choi et al., 2021). El medio de cultivo fue autoclavado a 121 °C y 15 psi y se distribuyeron 25 mL de este en cada caja Petri.

# 2.2.2. Conteo celular

Una vez terminada la última fase de incubación del SGI *in vitro*, se procedió a tomar 1 mL del caldo de cada una de las muestras realizadas y a realizar diluciones seriadas en tubos de ensayo. Se realizaron diluciones hasta llegar al factor 1·10<sup>-7</sup>. Una vez realizadas las diluciones se procedió a tomar 25 μL del contenido de los tubos de ensayo con una micropipeta y a cultivarlos en las placas Petri con medio MRS, haciendo uso del asa de cultivo de Digalsky para obtener un cultivo por extensión. Se tomaron 25 μL de los tubos de ensayo debido a que, en ensayos previos, los cultivos realizados con una cantidad mayor a la mencionada mostraron resultados catalogados como "incontables".

Finalmente se dejó en incubación a las placas Petri por dos días a 37 °C y una vez finalizado el periodo de incubación se contaron las UFC presentes en las placas para posteriormente obtener la concentración celular en UFC/ml de las muestras salidas del SGI *in vitro*.

## 2.2.3. Análisis estadístico

Para analizar los datos de forma estadística y determinar de forma confiable si se debe refutar o aceptar la hipótesis, se realizaron dos análisis estadísticos en base a los datos obtenidos del conteo celular.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias de los conjuntos de datos obtenidos (Judd et al., 2017). Posteriormente se realizó un test de Tukey para determinar si la diferencia entre las medias de los conjuntos es significativamente diferente (Lee et al., 2018). Todos estos análisis se realizaron en el programa InfoStat versión 2020.

## 3. Resultados

## 3.1. Etapa 1: Adaptación del SGI in vitro

# 3.1.1. Fase 1: Estómago

Con respecto a la fase estomacal los resultados obtenidos se muestran tanto en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. como en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. Mediante la medición del contenido de azucares en grados Brix antes y después del periodo de digestión se puede observar que al haber una digestión efectiva hay una mayor liberación de azucares dentro del fluido gástrico, lo que se traduce a un número más elevado de grados Brix como se muestra en las tablas mencionadas previamente.

### Tabla 1.

Evaluación De Liberación De Azucares En La Fase Estomacal De Las Muestras Control Valores de medición de azúcares en grados Brix

Matraces control	<u>Inicial</u>	<u>Final</u>
1	1.4	10.9
2	1.6	11
3	1.1	10.7

Tabla 2.

Evaluación De Liberación De Azucares En La Fase Estomacal De Las Muestras Experimentales

Valores de medición de azúcares en grados Brix

Matraces experimentales	<u>Inicial</u>	<u>Final</u>
1	2.8	14.1
2	2.5	11.9
3	2.3	11.4
4	2.6	12.3
5	2.1	13.7
6	2.8	13.2
7	2.3	11.7
8	1.9	10.3
9	2.8	12
10	2.2	12.8

# 3.1.2. Fase 2: Intestino delgado

Durante esta fase el parámetro a evaluarse fue la proliferación y crecimiento de microorganismos dentro del SGI. Mediante la medición de la densidad óptica antes y después del periodo de incubación de esta fase como se ve en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. y Tabla 3, se comprobó un incremento de esta, lo cual corrobora un aumento poblacional de los

microorganismos en las muestras control y experimentales. De igual forma, ratifica la actividad efectiva de las enzimas microbianas para la digestión en esta fase (Peñaherrera et al., 2022).

Tabla 3.

Medición De Densidad Óptica Inicial Y Final

Valores de densidad óptica a 600 nm de las muestras control en la fase del intestino delgado.

Matraces control	<u>Inicial</u>	<u>Final</u>
1	1.16	1.69
2	0.83	1.22
3	1.02	1.53

Tabla 4.

Medición De Densidad Óptica Inicial Y Final

Valores de densidad óptica a 600 nm de las muestras experimentales en la fase del intestino delgado.

Matraces experimentales	<u>Inicial</u>	<u>Final</u>
1	0.97	1.71
2	0.89	1.68
3	1.02	1.74
4	1	1.77
5	0.95	1.69
6	1.02	1.75
7	0.97	1.79
8	1.03	1.64
9	1.01	1.67
10	1.05	1.72

## 3.1.3. Fase 3: Intestino grueso

Durante esta fase del SGI se buscó corroborar una digestión anaerobia dentro de los matraces, lo cual se realizó con la ayuda del dispositivo de intercambio de gases indicado en la Ilustración 4, mediante el cual se pudo comprobar la inflación de los globos a través del periodo de incubación. De esta forma se puede confirmar la digestión de los azúcares disueltos en la solución gástrica simulada por parte de los *Lactobacillus* al momento de su proliferación. Debido a que los *Lactobacillus* son catalogados como anaerobios tolerantes al oxígeno, el mínimo oxigeno que pudiera entrar por los orificios de los globos no afectaría la proliferación de estos (Zotta et al., 2017).

# 3.2. Etapa 2: Determinación del potencial prebiótico

### 3.2.1. Conteo celular

En la Tabla 5 y Tabla 6 se observan los resultados del conteo celular realizado una vez terminada la simulación del SGI *in vitro* en las muestras control y experimentales. De igual forma, se muestra el promedio de las UFC contadas en las cajas y su respectiva concentración celular, la cual fue calculada con la fórmula que se muestra en la Ecuación 1. Estos datos pertenecen a cada una de las placas Petri inoculadas con los contenidos de las diluciones seriadas correspondientes a cada uno de los matraces.

Únicamente se cultivaron los contenidos de los tubos de ensayo pertenecientes al factor de dilución  $1 \cdot 10^{-4}$  hasta el  $1 \cdot 10^{-7}$ , puesto que, en ensayos previos, todos los factores de dilución mayores a  $1 \cdot 10^{-4}$  no aportaron resultados concluyentes.

$$C.C. = \frac{Promedio \# UFC}{Cantidad \ de \ fluido \ gastrico \ cultivada} \times F.D. \times F.C.$$

Ecuación 1. Cálculo de la concentración celular en UFC/mL. C.C: Concentración celular. F.D: Factor de dilución. F.C: Factor de conversión de μL a mL.

Es importante mencionar que, de acuerdo con los protocolos realizados para obtener estos datos, se toma como referencia y valor más exacto al conteo realizado en la dilución con el factor  $1 \cdot 10^{-7}$ , puesto que estos datos son los menos susceptibles a errores de conteo, contaminación, etc. Adicionalmente, como se muestra en la Ecuación 2, se calculó la relación entre los valores referencia (dilución con factor  $1 \cdot 10^{-7}$ ) de los conteos de UFC de ambos tipos de muestras (control y experimentales) para mostrar la diferencia que existe con respecto a la proliferación de *Lactobacillus* dentro de los productos salientes del SGI.

Relación entre V.R.: 
$$\frac{V.R.}{V.R.} \frac{de\ muestras\ experimentales}{V.R.} = \frac{1.9 \times 10^{10}\ UFC/_{mL}}{9.6 \times 10^9\ UFC/_{mL}} = 2.01$$

Ecuación 2. Relación entre valores de referencia de muestras experimentales sobre muestras control. V.R: Valores de referencia.

De esta forma al calcular la relación entre los valores de referencia de ambos tipos de muestra se evidencia el incremento en la población de *Lactobacillus* dentro de los matraces que contenían los jugos con ingredientes prebióticos por un factor de dos con respecto a los matraces control que no contenían ningún tipo de ingrediente prebiótico.

Tabla 5.

Conteo celular de las UFC de Lactobacillus cultivadas en medio MRS provenientes de las muestras experimentales.

<u>Dilución</u> <u>Número de UFC</u>							2				Promedio de UFC	Concentración celular (UFC/mL)
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10		
1.10-4	276	300*	300*	207	300*	232	215	198	253	242	252.3	$1 \cdot 10^{8}$
1.10-5	164	179	183	138	300*	125	143	162	175	164	173.3	$6.9 \cdot 10^8$
1.10-6	152	137	93	95	102	83	72	96	115	91	103.6	$4.1 \cdot 10^9$
1.10-7	63	55	46	46	42	35	48	32	49	67	48.3	$1.9 \cdot 10^{10}$

Nota: Se muestra resaltado en verde el valor de referencia. Los valores con \* corresponden a placas Petri donde hubo demasiadas UFC para ser contadas y por ende se les asignó el máximo valor aceptable para el conteo de una caja Petri (300).

Tabla 6.

Conteo celular de las UFC de Lactobacillus cultivadas en medio MRS provenientes de las muestras control.

<u>Dilución</u>	<u>Nún</u>	nero de U	<u>JFC</u>	Promedio de UFC	Concentración celular (UFC/mL)
	C1	C2	С3		
$1 \cdot 10^{-4}$	206	300*	197	234.3	$9.4 \cdot 10^7$
1.10-5	117	125	105	116	$4.6 \cdot 10^8$
1.10-6	47	49	43	46	$1.9 \cdot 10^9$
1.10-7	26	15	31	24	9.6·10 <sup>9</sup>

Nota: Se muestra resaltado en verde el valor de referencia. Los valores con \* corresponden a placas Petri donde hubo demasiadas UFC para ser contadas y por ende se les asignó el máximo valor aceptable para el conteo de una caja Petri (300).

### 3.2.2. Análisis estadístico:

Desde la Ilustración 5 hasta la Ilustración 12 se pueden observar tanto el análisis ANOVA como el test de Tukey para la determinación de diferencias significativas que pudiesen existir entre las medias de cada uno de los grupos.

Para estos análisis estadísticos se utilizó un parámetro de confianza estándar del 95%, es decir, que para determinar que alguna diferencia sea significativa *p* debe ser menor a 0.05.

El ANOVA y test de Tukey se realizaron entre grupos determinados por el factor de dilución, es decir, se compararon las muestras control con las experimentales correspondientes a cada uno de los factores de dilución (del  $1 \cdot 10^{-4}$  al  $1 \cdot 10^{-7}$ ), lo que nos da un total de cuatro ANOVAs y cuatro test de Tukey.

El programa usado para estos análisis fue InfoStat, cuyo test de Tukey etiqueta con una letra distinta a los valores de las medias de los grupos que sean significativamente diferentes (Di Rienzo et al., 2020). Como se puede observar en las figuras mencionadas previamente, de acuerdo con el test de Tukey realizado en InfoStat, ninguna media de ningún grupo comparado entre sí fue etiquetada con una letra distinta, lo que nos indica que no existen medias significativamente diferentes.

Dilución 1·10<sup>-4</sup>: Análisis de la varianza

Varia	able	N	Rª	Rª	Aj	CV	7
NUM.	UFC	13	0.34	0	.12	16.	06

Cuadro de	e Análisi	s de	la Var	ianza	(SC tipo	III)
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	7253.59	3	2417.86	1.52	0.2745	
DILUCION	7253.59	3	2417.86	1.52	0.2745	
Error	14298.10	9	1588.68			
Total	21551.69	12				

Ilustración 5. Análisis ANOVA de las muestras de la dilución 1·10<sup>-4</sup>.

En la Ilustración 5 se puede ver el análisis de varianza correspondiente a la comparación entre muestras control y experimentales con un factor de dilución de  $1 \cdot 10^{-4}$ . Se puede observar que el valor de p es claramente superior a 0.05, por lo que no hay diferencias significativas entre los grupos de datos analizados.

```
Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=154.91328

Error: 1588.6778 gl: 9

DILUCION Medias n E.E.

C2_1:10000 300.00 1 39.86 A

M_1:10000 252.30 10 12.60 A

C1_1:10000 206.00 1 39.86 A

C3_1:10000 197.00 1 39.86 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)
```

Ilustración 6. Test de Tukey de las muestras de la dilución 10<sup>-4</sup>.

De igual forma en la Ilustración 6 se puede observar el test de Tukey con su respectivo parámetro de confianza y Diferencia Mínima Significativa (DMS) en la parte superior. Como se logra ver claramente, el programa nos indica que las medias de los grupos analizados en este test nos son significativamente diferentes (p>0.05).

## Dilución 1·10<sup>-5</sup>:

Análisis	de la va	rian	za			
Variable	N Rª	Rª A	j CV			
NUM. UFC	13 0.27	0.0	3 30.18			
					(SC tipo	III)
F.V.	SC		CM		•	
Modelo	7867.90	3	2622.63	1.13	0.3894	
DILUCION	7867.90	3	2622.63	1.13	0.3894	
Error	20980.10	9	2331.12			
Total	28848.00	12				

Ilustración 7. Análisis ANOVA de las muestras de la dilución 1·10-5

Se puede ver en la Ilustración 7 el respectivo analisis de varianza para las muestras experimentales y control con un factor de dilución de  $1 \cdot 10^{-5}$ . En este caso se aprecia que el valor de p sigue siendo mayor a 0.05, por lo tanto no hay diferencias significativas.

```
Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=187.65203

Error: 2331.1222 gl: 9

DILUCION Medias n E.E.

M_1:100000 173.30 10 15.27 A

C2_1:100000 125.00 1 48.28 A

C1_1:100000 117.00 1 48.28 A

C3_1:100000 105.00 1 48.28 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)
```

Ilustración 8. Test de Tukey de las muestras de la dilución 1·10<sup>-5</sup>.

Asimismo, en la Ilustración 8 se muestra el respectivo test de Tukey para las muestras con el factor de dilcuion  $1 \cdot 10^{-5}$ . Se muestran en una columna las medias de los grupos comparados, mismas que al no estar etiquetadas con una letra distinta proceden a no considerarse significativamente diferentes.

# Dilución 1·10<sup>-6</sup>:

# Análisis de la varianza Variable N R R Aj CV NUM. UFC 13 0.58 0.44 27.14 Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) F.V. SC gl CM F p-valor Modelo 7586.68 3 2528.89 4.20 0.0408 DILUCION 7586.68 3 2528.89 4.20 0.0408 Error 5416.40 9 601.82 Total 13003.08 12

Ilustración 9. Análisis ANOVA de las muestras de la dilución 1·10<sup>-6</sup>.

Como se ve en la Ilustración 9, el análisis de varianza para las muestras control y experimentales con un factor de dilución de  $1\cdot10^{-6}$  arroja un valor de p ligeramente menor a 0.05. Tomando

únicamente el análisis de este parámetro podemos decir que existen diferencias significativas entre los grupos analizados.

Ilustración 10. Test de Tukey de las muestras de la dilución 1·10<sup>-6</sup>.

De igual forma en la Ilustración 10 se aprecia el test de Tukey para todas las muestras con un factor de dilución de  $1 \cdot 10^{-6}$ , con su DMS y parámetro de confianza en el encabezado del mismo. Se puede observar que, mediante las comparaciones entre los grupos de muestras experimentales y control, el programa las etiqueta con una misma letra, dándonos a entender que las medias de los grupos analizados no poseen diferencias estadísticas significativas.

# Dilución 10<sup>-7</sup>:

de la va	ari	anza			
N Rª	Re	Aj CV			
13 0.58	0	.43 25.9	94		
a Anális	is (	de la Va	arian	za (SC tipo	III)
SC	gl	CM	F	p-valor	
1496.67	3	498.89	4.07	0.0442	
1496.67	3	498.89	4.07	0.0442	
1104.10	9	122.68			
2600.77	12				
	N R <sup>c</sup> 13 0.58  B Anális SC 1496.67 1496.67 1104.10	N R <sup>c</sup> R <sup>c</sup> 13 0.58 0 B Análisis SC gl 1496.67 3 1496.67 3	13 0.58 0.43 25.9  E Análisis de la V  SC gl CM  1496.67 3 498.89  1496.67 3 498.89  1104.10 9 122.68	N R <sup>c</sup> R <sup>c</sup> Aj CV 13 0.58 0.43 25.94 B Análisis de la Variana SC gl CM F 1496.67 3 498.89 4.07 1496.67 3 498.89 4.07 1104.10 9 122.68	N R <sup>c</sup> R <sup>c</sup> Aj CV 13 0.58 0.43 25.94 B Análisis de la Varianza (SC tipo SC gl CM F p-valor 1496.67 3 498.89 4.07 0.0442 1496.67 3 498.89 4.07 0.0442 1104.10 9 122.68

Ilustración 11. Análisis ANOVA de las muestras de la dilución 1·10<sup>-7</sup>.

En la Ilustración 11 se puede observar que, con respecto al ANOVA de las muestras con un factor de dilución de  $1 \cdot 10^{-7}$  el valor de p resultante es menor a 0.05, por lo que en este analisis encontramos diferencias significativas entre los grupos de muestras experimentales y control.

```
Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=43.04807

Error: 122.6778 gl: 9

DILUCION Medias n E.E.

M_1:10000000 48.30 10 3.50 A

C3_1:10000000 31.00 1 11.08 A

C1_1:10000000 26.00 1 11.08 A

C2_1:10000000 15.00 1 11.08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)
```

*Ilustración 12. Test de Tukey de las muestras de la dilución 1·10<sup>-7</sup>.* 

Por último, en la Ilustración 12 se observa el test de Tukey realizado para comparar las medias de los grupos de muestras tanto experimentales como control. Debido a que al costado de las medias estas no se encuentran etiquetadas con una letra distinta, esto indicaría que entre las medias comparadas no existe diferencia significativa.

#### 4. Discusión de resultados

### 4.1. Adaptación del SGI

Se determinaron varias adaptaciones a realizar en el SGI *in vitro* original para poder hacer uso de este en el análisis del potencial prebiótico de los jugos utilizados en este estudio (Peñaherrera et al., 2022).

Por un lado, en la fase estomacal del SGI de referencia, el autor hace uso de ácido sulfúrico como el agente acidificante del fluido gástrico, además de introducir las porciones de frutas cortadas en pequeños pedazos enteros. A diferencia del SGI de referencia, en este estudio se hizo uso de ácido clorhídrico concentrado como agente acidificante, el cual se procuró que se encuentre en una

cantidad similar a la del estómago (5.5 mg/L) (Smith, 2003). Otra adaptación corresponde a la presentación de las frutas y la carne, las cuales fueron trituradas en un procesador de alimentos para simular mejor la consistencia de un fluido gástrico.

Si bien es cierto que estos cambios pudieron haber ocasionado una diferencia significativa de resultados, se puede apreciar que, a pesar de las adaptaciones realizadas, el nivel de digestión efectiva alcanzada durante la fase estomacal en este estudio no difiere de forma radical con los resultados del SGI de referencia, puesto que se observa una digestión de compuestos orgánicos en ambos tipos de muestras mediante el incremento de azucares reflejado en el aumento de grados Brix medidos después del periodo de digestión (Peñaherrera et al., 2022).

Los resultados pudieron haber diferido debido a la naturaleza agresiva e hidrolítica del ácido sulfúrico, el cual puede incluso hidrolizar compuestos de celulosa (Swiatek et al., 2020). Sin embargo, es posible que el hecho de triturar la comida antes de su introducción en el SGI pudiera brindarle una ventaja al ácido clorhídrico usado y por ende obtener resultados muy similares a los del modelo de referencia en esta fase, confirmando así una digestión efectiva (Peñaherrera et al., 2022).

Por otro lado, también se realizaron adaptaciones en fase de simulación del intestino grueso dentro de este estudio. Peñaherrera en el año 2022 en esta fase describe que, para simular la microbiota intestinal se hizo uso de un inoculo compuesto por aproximadamente 3 g de heces y para medir su rendimiento se hace uso de dispositivos de arrastre de agua para determinar la generación de biogás (Peñaherrera et al., 2022).

Sin embargo, debido a que el enfoque de este estudio era el análisis del potencial prebiótico de los jugos seleccionados, se resolvió no usar el inoculo antes descrito. En su lugar se usó un inoculo

proporcional a la aportación de *Lactobacillus* en 3 g de heces humanas, haciendo uso de las bacterias lácticas obtenidas de un subcultivo de *Lactobacillus* aislados de agua de reservorio, dicha aportación se determinó mediante diferentes datos.

Se calculó la densidad de la muestra que se usó en el estudio (1.37 g/ml). Considerando que se deberían inocular  $3 \cdot 10^9$  *Lactobacillus*, debido a que una cantidad aproximada a la cantidad de *Lactobacillus* que estarían presentes en los 3 g de heces se estima alrededor de  $10^9$ /g y que el peso aproximado de una bacteria es de  $6.25 \cdot 10^{-10}$ , se debería inocular 1.875 g de muestra. Sin embargo, al relacionar este dato con la densidad obtenida previamente, encontramos que la cantidad a inocular será de 1.36 mL de *Lactobacillus* aislados (McCartney et al., 1996) (Tanner, 1948).

Es importante mencionar que los *Lactobacillus* fueron inoculados en la fase del intestino grueso de la simulación del SGI y no al principio de la misma debido a que se considera que la microbiota tanto del intestino delgado como del estómago es más susceptible a ser influenciada por los microorganismos de la cavidad oral y de la comida ingerida, cosa que no ocurre en el intestino grueso y por ende una población de bacterias lácticas estable es un hecho mucho más apegado a la realidad (Mosele et al., 2015).

De igual forma, debido a que los *Lactobacillus* no producen CO<sub>2</sub> con la misma intensidad que las bacterias metanogénicas el biogás, se resolvió utilizar dispositivos de intercambio de gases formados por globos, sustituyendo los dispositivos de arrastre de agua, para evitar comprometer la presión dentro de las muestras y aun así confirmar la generación de CO<sub>2</sub>.

Debido a que el enfoque durante la fase del intestino grueso era completamente diferente con respecto al estudio para el que se usó el SGI *in vitro* de referencia, los resultados no son comparables de forma específica. Sin embargo, podemos discutir resultados en cuanto a la

digestión efectiva llevada a cabo en esta fase. Podemos observar que, mediante un inoculo proporcional al del SGI original en cuanto a bacterias lácticas y el uso de dispositivos de intercambio de gases en las muestras, los resultados no difieren relevantemente en cuanto al SGI de referencia.

Esto lo podríamos corroborar debido a que, mediante los globos en cada una de las muestras determinamos una generación positiva de CO<sub>2</sub>, el cual es el gas que liberan los *Lactobacillus* al momento de llevar a cabo el proceso de fermentación láctica, donde transforman azucares en ácido láctico (Garcia & Remize, 2022). Lo que evidencia una digestión positiva de los azucares contenidos por parte del fluido gastrointestinal simulado en los matraces. De igual forma, se evidencia un uso correcto del inoculo de bacterias lácticas utilizado debido a que los conteos celulares evidencian una proliferación efectiva de *Lactobacillus* tanto en las muestras control como en las muestras experimentales.

A pesar de que estas adaptaciones realizadas podrían ocasionar resultados radicalmente diferentes a los del SGI original en cuanto a inoculación y digestión de compuestos, podemos afirmar que, gracias a las precauciones y consideraciones tomadas durante esta fase para mantenerse fiel al modelo original y por ende manifestar resultados concluyentes, en este estudio se evidencia una digestión efectiva y una microbiota de interés muy similares a los del SGI diseñado por Peñaherrera y colaboradores en el año 2022 (Peñaherrera et al., 2022).

# 4.2. Presencia de prebióticos

Para cumplir con el objetivo principal de este estudio era crucial verificar en un primer lugar que los jugos seleccionados para su análisis contuvieran prebióticos en su composición, a pesar de que tanto el empaque de los mismos como las empresas que los fabrican afirmen que así es. De esta

forma nos aseguramos que los cálculos y análisis realizados se basen en el efecto prebiótico de los ingredientes dentro los jugos y no en algún otro factor externo.

De acuerdo con la definición de un compuesto prebiótico, este es aquel que es capaz de atravesar todo el tracto gastrointestinal sin ser digerido hasta que llega al intestino grueso o el colon donde finalmente ahí es aprovechado por bacterias como Lactobacillus o Bifidobacterium para estimular el crecimiento de estas (Gafar Babatunde Bamigbade et al., 2022). Basándonos en este concepto acerca de los prebióticos, podemos analizar si efectivamente los jugos seleccionados para este estudio contenían ingredientes prebióticos como la inulina de achicoria enunciada en su empaque. Con base en los resultados obtenidos, podemos observar que a lo largo tanto de la fase estomacal como de la fase del intestino delgado hubo una digestión efectiva, lo cual se sustenta primero con el incremento de grados Brix en la fase estomacal y posteriormente con el incremento de densidad óptica en la fase del intestino delgado (Peñaherrera et al., 2022). Esto nos indica que la mayoría de los compuestos dentro del fluido gástrico simulado se han ido digiriendo a lo largo del SGI, proporcionando un ambiente correcto para determinar la supervivencia de compuestos prebióticos. Sin embargo, la verdadera fase donde podemos determinar la presencia o no de prebióticos es en la fase del intestino grueso, donde se encontrarían las bacterias (Lactobacillus) que deberían aprovechar estos compuestos, si los hubiera, para crecer y proliferarse, produciendo así una diferencia al momento de comparar los conteos celulares de las muestras control con las muestras experimentales (Gafar Babatunde Bamigbade et al., 2022).

Basándonos en los resultados obtenidos, podríamos determinar una presencia positiva de ingredientes prebióticos en los jugos seleccionados, puesto que a pesar de que el SGI *in vitro* propició una digestión efectiva a lo largo del mismo, aun así, se evidenció una diferencia

considerablemente mayor de UFC en los conteos celulares de las muestras experimentales al momento de compararlas con las muestras control. Esto nos indica que, efectivamente los compuestos dentro de los jugos sobrevivieron a la digestión gastrointestinal a lo largo del SGI, para finalmente llegar al intestino grueso, ser aprovechados por las *Lactobacillus* inoculadas y por ende estimular su proliferación y crecimiento (Peñaherrera et al., 2022). De esta forma se confirma la presencia de la inulina de achicoria dentro de los jugos.

# 4.3. Potencial prebiótico

Con respecto a los resultados obtenidos de los conteos celulares para la determinación del potencial prebiótico de los jugos, existen varios factores a tomar en cuenta acerca tanto a cerca del análisis estadístico realizado, como de los ingredientes prebióticos usados en estas bebidas.

Hablando del análisis estadístico realizado, como se puede observar claramente mediante los análisis ANOVA y Tukey realizados para comparar las muestras control con las experimentales, se aprecia que, a pesar de que en los análisis de las diluciones  $1 \cdot 10^{-6}$  y  $1 \cdot 10^{-7}$  el valor de p es menor a 0.05, las medias de los grupos comparados salen etiquetadas con una misma letra, significando que no existe una diferencia significativa.

Esto podría llevar a confusión si consideramos al valor de confianza (p) como el único parámetro mediante el cual podríamos detectar una diferencia significativa entre los datos. Sin embargo, el programa InfoStat nos permite esclarecer esta confusión mediante el uso de otro parámetro también muy usado en estadística inferencial como lo es la Diferencia Mínima Significativa (DMS). Este parámetro se muestra en el test de Tukey al lado del parámetro de confianza (0.05) y sirve para que, en ocasiones como la que acontece en este estudio, se puedan evitar errores de tipo

1, es decir, aceptar la hipótesis planteada cuando esta depende de un análisis de varianza erróneo (Lee et al., 2018).

La DMS corresponde al valor mínimo que debe haber entre las medias de los conjuntos evaluados para que estas puedan ser catalogadas como significativamente diferentes (Glen, 2013). Tomando en cuenta esta definición, podemos evaluar las medias de los grupos de datos analizados, no solo con el parámetro "p" sino también con la DMS y por ende tener una certeza aun mayor al momento de aceptar o rechazar la hipótesis.

Debido a que, en ninguno de los test de Tukey realizados se puede observar una diferencia entre las medias de los grupos que sea mayor a la DMS especificada para cada comparación, esto nos confirmaría que no existen diferencias significativas entre los grupos de datos analizados, aunque en algunos exista un valor de p<0.05 y a pesar de que en los conteos celulares se evidencie un incremento en la concentración poblacional de *Lactobacillus* debido al uso de la inulina de achicoria.

Por lo tanto, gracias al uso de dos parámetros dentro de los análisis estadísticos se puede rechazar la hipótesis alternativa (H1) y por consiguiente aceptar la hipótesis nula (H0) planteada al inicio de este estudio.

Respecto a la influencia de los ingredientes contenidos por los jugos, existen varios de estos que podrían relacionarse con los resultados obtenidos donde el potencial prebiótico de la inulina no evidencia beneficios prebióticos significativos.

Por un lado, tenemos a la inulina de achicoria, la cual después de comprobarse que se encuentra dentro de estas bebidas, es la principal responsable del potencial prebiótico que presentan estos productos. Sin embargo, como se mencionó previamente, el potencial prebiótico demostrado por

la inulina de achicoria implementada en estos jugos no fue suficiente para poder influir de tal forma en las bacterias lácticas como para manifestar diferencias significativas al momento de comparar las muestras experimentales con las muestras control (Peñaherrera et al., 2022).

Este hecho puede deberse a varios factores y uno de ellos podría ser la concentración de inulina de achicoria que se les fue suplementada a las bebidas al momento de su producción. A pesar de que este es un parámetro importante, la información acerca de la concentración de inulina de achicoria que contienen los jugos analizados en este estudio no se encuentra disponible y por ende no se puede saber a ciencia cierta si este podría ser un factor determinante en el desarrollo del potencial prebiótico de los mismos.

Sin embargo, existen varios estudios que estipulan que, para obtener beneficios prebióticos significativos, la concentración de inulina de achicoria pura que se debe consumir por día se encuentra en un rango de 5 a 7.5 g y que esta debe ser suplementada por al menos dos semanas para poder alcanzar resultados notables en la microbiota gastrointestinal (Peters et al., 2020) (Terrera, 2021). De acuerdo con estos estudios y los datos obtenidos de los conteos celulares realizados, podemos afirmar que, los jugos analizados podrían no poseer la suficiente cantidad de inulina de achicoria en su composición para relacionarse con la causalidad de un impacto prebiótico sostenible en la microbiota humana.

Por otro lado, uno de los ingredientes que también pueden tener gran influencia en la determinación del potencial prebiótico de los jugos analizados es el sorbato de potasio, el cual se encuentra enunciado dentro de sus ingredientes como conservante. El sorbato de potasio es un preservante alimenticio muy usado en general por las industrias alimenticias cuya concentración dentro de los productos no debe exceder las 1000 ppm (Yazdanfar et al., 2023) (Hecht, 2017).

A pesar de que esta regulación lo limita a una cantidad relativamente pequeña, se ha demostrado que aún en esas concentraciones, el sorbato de potasio es capaz de inhibir la proliferación de ciertas cepas de Lactobacillus e incluso de disminuir la concentración poblacional de estas bacterias (Edinger & Spllltstoesser, 1986). Debido a que este es el preservante usado en los jugos seleccionados para este estudio, pero que no se conoce la concentración en la que se usa dentro de las bebidas analizadas, se puede afirmar que, hasta cierto punto el sorbato de potasio podría estar relacionado con la manifestación de resultados contraproducentes en referencia a su influencia sobre el potencial prebiótico en las bebidas que lo incluyan. Para contrarrestar este efecto, se podrían usar preservantes no químicos como las sustancias cítricas, siempre en una cantidad recomendada (Lee, 2020).

Finalmente, un parámetro más que se debe tomar en cuenta al momento de analizar el potencial prebiótico de los productos que contengan inulina de achicoria es el grado de polimerización (Baocheng et al., 2017).

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, el grado de polimerización corresponde al número de unidades monoméricas que contiene una macromolécula ya sea un oligómero o polímero, mientras una macromolécula tenga más grado de polimerización esto se traduce en una mayor temperatura de fusión y mayor fuerza mecánica entre sus enlaces (Baocheng et al., 2017).

En cuestión de los prebióticos, los compuestos como la inulina poseen un grado de polimerización mucho más grande que otro tipo de oligómeros y polímeros dentro del grupo de los prebióticos, lo cual aumenta su tiempo de fermentación a por lo menos el doble que el que tienen otro tipo de ingredientes (Baocheng et al., 2017).

Este incremento en el tiempo de fermentación de la inulina de achicoria debido a su grado de polimerización, así como su concentración insuficiente en los jugos y el uso de sorbato de potasio como conservante, podrían verse relacionados con los resultados obtenidos en este estudio donde se refleja su incapacidad como agente prebiótico para manifestar beneficios significativos en la microbiota *in vitro*. Por lo tanto, se podría mejorar el potencial prebiótico de diferentes bebidas o productos mediante la experimentación con otro tipo de oligómeros o polímeros prebióticos con este mismo tipo de SGI (Peñaherrera et al., 2022).

#### 5. Conclusiones

- Se adaptó un modelo de simulación gastrointestinal in vitro mediante modificaciones a lo largo de un SGI de referencia, lo cual permitió que este fuera usado sin ninguna dificultad al momento de analizar la proliferación de bacterias lácticas.
- Se obtuvo bacterias lácticas correctamente aisladas pertenecientes a un subcultivo externo,
   estas fueron incorporadas como inoculo dentro de la fase intestinal de SGI in vitro sin
   presentar ninguna complicación.
- Se compararon los conteos celulares resultantes de la proliferación de bacterias lácticas dentro del SGI pertenecientes a muestras con y sin la adición de jugos que contengan inulina de achicoria, aunque los resultados mostraron una capacidad prebiótica existente, después de realizar análisis estadísticos esta demostró no ser significativa.
- Finalmente, se evaluó satisfactoriamente la capacidad prebiótica de la inulina de achicoria al ser usada en jugos distribuidos en el DMQ haciendo uso de un SGI *in vitro* adaptado y aunque se demostró la existencia de un potencial proliferante en bacterias lácticas mediante conteos celulares, este no es suficiente para aportar beneficios prebióticos significativos.

#### 6. Recomendaciones

Para siguientes estudios con un enfoque similar al de este tipo de análisis, se deberían realizar más repeticiones tanto de muestras experimentales como de muestras control, puesto que de esta forma se obtendrían una mayor cantidad de datos lo que facilitaría la obtención de resultados más concluyentes al momento de realizar análisis estadísticos.

Es importante mencionar que el análisis de propiedades de los alimentos prebióticos de forma *in vitro* posee muchas variables que se pueden modificar y monitorear, por lo que se podrían usar algunas de estas como la simulación de movimientos gástricos para obtener resultados más reales. De igual forma, se debería tomar en cuenta la implementación de un monitoreo de las consecuencias que produce una exposición constante de ingredientes prebióticos sobre la microbiota *in vitro* durante periodos de tiempo más largos.

# 7. Bibliografía

- Abed, S. M., Ali, A. H., Noman, A., & Bakry, A. M. (2016). Inulin as Prebiotics and its Applications in Food Industry and Human Health; A Review. In *International Journal of Agriculture Innovations and Research* (Vol. 5, Issue 1).
- Alberto Alejandro Aguirre Bravo, & Francisco Xavier Peñaherrera Velasco. (2022). Diseño y evaluación de sistemas gastrointestinales in Vitro en base a microbiota de herbívoros y omnívoros para fermentación de café. UISEK.
- Banco Central del Ecuador. (2022, June 29). El sector de alimentos y bebidas, un mercado que sigue creciendo en el Ecuador. *Mucho Mejor Ecuador*.
- Baocheng X., Denglin L., Guangyue R., Jianxue L., Peiyan L., Sihai H., Xuan L., Yun L. (2019). Effects of inulin with different degree of polymerization on gelatinization and retrogradation of wheat starch, Food Chemistry, 35-43, ISSN 0308-8146, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.058.
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2017). *The Gastrointestinal Microbiome: A Review. Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 9–25. doi:10.1111/jvim.14875
- Beltrán de Heredia, M. R. (2016). Alimentos funcionales. *Farmacia Profesional*, *30*(3), 12–14. https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-alimentos-funcionales-X0213932416546681
- Choi, G. H., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2021). Optimization of Medium Composition for Biomass Production of *Lactobacillus plantarum* 200655 Using Response Surface Methodology. *Journal of microbiology and biotechnology*, 31(5), 717–725. https://doi.org/10.4014/jmb.2103.03018
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

- Edinger, W. D., & Spllltstoesser, D. F. (1986). Sorbate Tolerance by Lactic Acid Bacteria Associated with Grapes and Wine. *Journal of Food Science*.
- Ferreira, V. C., Barroso, T. L. C. T., Castro, L. E. N., da Rosa, R. G., & de Siqueira Oliveira, L. (2023). An overview of prebiotics and their applications in the food industry. *European Food Research and Technology*, 249(11), 2957 2976. https://doi.org/10.1007/s00217-023-04341-7
- Gafar Babatunde Bamigbade, Athira Jayasree Subhash, Afaf Kamal-Eldin, Laura Nyström, & Mutamed Ayyash. (2022). An Updated Review on Prebiotics: Insights on Potentials of Food Seeds Waste as Source of Potential Prebiotics. *Molecules*.
- Garcia, C., & Remize, F. (2022). Chapter 2 Lactic acid fermentation of fruit and vegetable juices and smoothies: Innovation and health aspects. In R. C. Ray, S. Paramithiotis, V. A. de Carvalho Azevedo, & D. Montet (Eds.), *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology* (pp. 27–46). Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89875-1.00008-0
- Gil A., Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda J., Gil-Campos M. (2019). *Mechanisms of Action of Probiotics*, Advances in Nutrition, Volume 10, Supplement 1, S49-S66, ISSN 2161-8313, https://doi.org/10.1093/advances/nmy063.
- Glen, S. (2013). How to Calculate the Least Significant Difference (LSD). Statistics How To.
- Judd, C.M., McClelland, G.H., & Ryan, C.S. (2017). Data Analysis: A Model Comparison Approach To Regression, ANOVA, and Beyond, Third Edition (3rd ed.). Routledge. https://doi.org/10.4324/9781315744131
- Kullar, R., Goldstein, E. J. C., Johnson, S., & McFarland, L. V. (2023). Lactobacillus Bacteremia and Probiotics: A Review. *Microorganisms*, 11(4). https://doi.org/10.3390/microorganisms11040896
- Lee, H. (2020, June 26). 10 NATURAL ALTERNATIVES TO CHEMICAL PRESERVATIVES. MOSAIC Foods.
- Lee, S., & Lee, D. K. (2018). What is the proper way to apply the multiple comparison test?. *Korean journal of anesthesiology*, 71(5), 353–360. https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242

- Lucy Bell-Young. (2021). The science behind hydrochloric acid. ReAgent.
- McCartney, A. L., Wenzhi, W., & Tannock, G. W. (1996). Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4608–4613. https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4608-4613.1996
- Mindus, C., Ellis, J., van Staaveren, N., & Harlander-Matauschek, A. (2021). Lactobacillus-Based Probiotics Reduce the Adverse Effects of Stress in Rodents: A Meta-analysis. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 15. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.642757
- Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramírez-Cárdenas, L. (2014). Chemical and microbiological characterization of Ecuadorian homemade water kefir Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. http://avances.usfq.edu.ec
- Mosele, J.I.; Macià, A.; Motilva, M.-J. (2015). Metabolic and Microbial Modulation of the Large Intestine Ecosystem by Non-Absorbed Diet Phenolic Compounds: A Review. *Molecules*, 20, 17429-17468. https://doi.org/10.3390/molecules200917429
- National Research Council (US). (1992). Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods. Applications of Biotechnology to Fermented Foods: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development. *NCBI*.
- Núñez-Colín, C. A. (2019). Análisis de varianza no paramétrica: un punto de vista a favor para utilizarla. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 4(3). https://doi.org/10.30973/aap/2018.4.3/1
- Pacheco, M. T., Hernández-Hernández, O., Moreno, F. J., & Villamiel, M. (2020). Andean tubers grown in Ecuador: New sources of functional ingredients. *Food Bioscience*, *35*, 100601. <a href="https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100601">https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100601</a>
- Peters, M. F., Choy, A. L., Pin, C., Leishman, D. J., Moisan, A., Ewart, L., ... Kolaja, K. L. (2020). Developing in vitro assays to transform gastrointestinal safety assessment: potential for microphysiological systems. Lab on a Chip. doi:10.1039/c9lc01107b
- Qin, Y.-Q., Wang, L.-Y., Yang, X.-Y., Xu, Y.-J., Fan, G., Fan, Y.-G., Ren, J.-N., An, Q., & Li, X. (2023). Inulin: properties and health benefits. *Food and Function*, *14*(7), 2948 2968. https://doi.org/10.1039/d2fo01096h

- Sanders, M. E., Merenstein, D., Merrifield, C. A., & Hutkins, R. (2018). *Probiotics for human use*. Nutrition Bulletin, 43(3), 212–225. doi:10.1111/nbu.12334
- Shira Doron, David R. (2015). Risk and Safety of Probiotics, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 60, S129–S134, <a href="https://doi.org/10.1093/cid/civ085">https://doi.org/10.1093/cid/civ085</a>
- Świątek, K.; Gaag, S.; Klier, A.; Kruse, A.; Sauer, J.; Steinbach, D. (2020). Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Sugars and Furfurals Formation. *Catalysts*, 10, 437. https://doi.org/10.3390/catal10040437
- Teferra, T. F. (2021). *Possible actions of inulin as prebiotic polysaccharide: A review*. Food Frontiers, 2, 407–416. https://doi.org/10.1002/fft2.92
- Yazdanfar, N., Manafi, L., Ebrahiminejad, B., Mazaheri, Y., Sadighara, P., Basaran, B., & Mohamadi, S. (2023). Evaluation of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate Preservative Concentrations in Different Sauce Samples in Urmia, Iran. *Journal of Food Protection*, 86(8), 100118. <a href="https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100118">https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100118</a>
- Zhang, Z., Lv, J., Pan, L. et al. (2018). Roles and applications of probiotic Lactobacillus strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 8135–8143. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9217-9
- Zotta, T., Parente, E., & Ricciardi, A. (2017). Aerobic metabolism in the genus Lactobacillus: impact on stress response and potential applications in the food industry. *Journal of Applied Microbiology*.

### 8. Anexos

Anexo A: Mediciones de densidad optica a 600 nm de algunas muestras del SGI in vitro después del periodo de incubación





Anexo B: Mediciones de grados Brix de algunas muestras experimentales del SGI in vitro después del periodo de digestión



