



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de fin de Carrera titulado:

“Análisis del potencial prebiótico de la inulina de achicoria en suplementos alimenticios para niños, comercializados en el DMQ, mediante la simulación de un sistema gastrointestinal in-vitro”

Realizado por:

Vanessa Alejandra Luján Andrade

Director del proyecto:

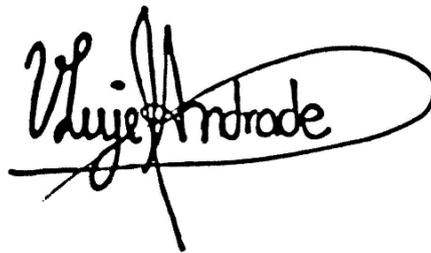
Ing. Andrés Herrera Yela, MSc.

QUITO, 02 de abril del 2024

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, VANESSA ALEJANDRA LUJE ANDRADE, con cédula de identidad # 1752960672, 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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'V. Lujé Andrade', with a large, sweeping flourish underneath.

FIRMA

175296067-2

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**ANÁLISIS DEL POTENCIAL PREBIÓTICO DE LA INULINA DE ACHICORIA EN
SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS PARA NIÑOS COMERCIALIZADOS EN EL
(DMQ) MEDIANTE LA SIMULACIÓN DE UN SISTEMA GASTROINTESTINAL *IN
VITRO***

Realizado por:

VANESSA ALEJANDRA LUJE ANDRADE

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Ha sido dirigido por el profesor:

MANUEL ANDRÉS HERRERA YELA

quien considera que constituye un trabajo original de su autor.



FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

Ph D. JOHANNA LUCÍA MEDRANO BARBOZA

Ph D. JESÚS LÓPEZ VILLADA

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral

ante el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 02 de abril del 2024

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 mi amada madre, quién siempre ha caminado a mi lado, brindándome su apoyo haciendo lo imposible posible para verme triunfar.

A mi querido padre, cuyo aliento me infunde fuerza para no desmayar.

Y a mi mascota Pelusa, su leal compañía iluminó siempre mi camino.

Agradecimiento

A Dios, por darme la oportunidad de cumplir mis metas haciendo perfecto mi camino.

A mis padres, quienes nunca me dejan sola.

A mis amigas que alegran mi vida.

A mi tutor Ing. Andrés Herrera Yela.

Resumen

En la actualidad se habla de los prebióticos como sustancias utilizadas para favorecer el crecimiento y actividad de microorganismos beneficiosos en el tracto gastrointestinal, principalmente en las bacterias probióticas. Se investigó el uso de la inulina de achicoria como prebiótico en un suplemento para niños distribuido en el Distrito Metropolitano de Quito (DMQ), evaluando su auténtico potencial prebiótico. Se llevaron a cabo estudios mediante simulaciones gastrointestinales *in-vitro* (SGI), comparando matraces con adición del suplemento para niños que contenía inulina frente a matraces sin prebióticos. Al concluir el SGI, se cultivaron muestras en un medio de cultivo (MRS) para bacterias lácticas. El análisis de datos se realizó utilizando Infostat, aplicando pruebas de ANOVA y un test de Tukey, revelando resultados con un valor de $p > 0,05$. Estos hallazgos indican que la inulina de achicoria en el suplemento para niños en presentación liofilizada no tuvo un impacto significativo en el crecimiento de bacterias lácticas en condiciones simuladas del SGI, mostrando una necesidad para la verificación de la concentración y presentación de inulina de achicoria en suplementos para niños.

Palabras clave: Prebiótico, inulina de achicoria, suplemento para niños, Sistema Gastrointestinal *in-vitro*

Abstract

Currently, prebiotics are acknowledged as substances employed to facilitate the growth and activity of beneficial microorganisms within the gastrointestinal tract, primarily targeting probiotic bacteria. The utilization of chicory inulin as a prebiotic in a children's supplement distributed in the Metropolitan District of Quito (DMQ) was investigated, aiming to evaluate its genuine prebiotic potential. Studies were conducted through in-vitro gastrointestinal simulations (SGI), contrasting flasks supplemented with the children's supplement containing inulin against flasks devoid of prebiotics. Upon the conclusion of SGI, samples were cultured in a medium (MRS) suitable for lactic acid bacteria. Data analysis was performed employing Infostat, incorporating ANOVA tests and a Tukey test, revealing outcomes with a significance level of $p>0.05$. These findings suggest that chicory inulin in the lyophilized children's supplement did not yield a significant impact on the growth of lactic acid bacteria under simulated SGI conditions, thus indicating a necessity to validate the concentration and presentation of chicory inulin in children's supplements.

Keywords: Prebiotic, chicory inulin, pediatric supplement, *In-vitro* Gastrointestinal System.

Tabla de contenido

1. Introducción	14
1.1. Planteamiento del problema	14
1.2. Justificación.....	14
1.3. Marco teórico	16
1.4. Objetivos	20
1.5. Hipótesis.....	20
2. Metodología	20
2.1. Fase ácida (estómago)	22
2.2. Fase aerobia (intestino delgado).....	23
2.3. Fase anaerobia (intestino grueso).....	23
2.4. Cultivo.....	24
3. Resultados	25
3.1. Funcionamiento del sgi	25
3.2. Densidad óptica	26
3.3. Conteos celulares.....	27
3.4. Análisis inferencial.....	28

4. Discusión.....	33
4.1. Acondicionamiento del sgi.....	33
4.2. Efecto prebiótico	34
5. Conclusiones	38
6. Recomendaciones	39
7. Referencias bibliográficas.....	40
8. Anexos	44

Tabla de Ilustraciones

Ilustración 1: Diagrama de flujo Sistema Gastrointestinal In vitro (SGI).....	21
Ilustración 2. Esquema gráfico de la fase ácida	22
Ilustración 3: Fase anaerobia, generación de CO ₂ , técnica de intercambio de gases	24
Ilustración 4: Cantidad obtenida de grados Brix en cada matraz con prebióticos durante la fase ácida	25
Ilustración 5. ANOVA para dilución 10 ⁻⁴	29
Ilustración 6. Test de Tukey para dilución 10 ⁻⁴	29
Ilustración 7. ANOVA para diluciones 10 ⁻⁵	30
Ilustración 8. Test de Tukey para diluciones 10 ⁻⁵	30
Ilustración 9. ANOVA para diluciones 10 ⁻⁶	31
Ilustración 10. Test de Tukey para diluciones 10 ⁻⁶	31
Ilustración 11. ANOVA para diluciones 10 ⁻⁷	32
Ilustración 12. Test de Tukey para diluciones 10 ⁻⁷	32

Índice de tablas

Tabla 1.....	26
--------------	----

Tabla 2.....	26
Tabla 3.....	27
Tabla 4.....	28

1. Introducción

1.1.Planteamiento del problema

Los derechos de los consumidores tienen limitada protección por parte de la legislación ecuatoriana, siendo necesaria la implementación de un control más riguroso de las autoridades sobre los suplementos para niños con prebióticos comercializados dentro del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ), para verificar la publicidad y constatar con la realidad, monitoreando si cumplen con la calidad y funcionalidad que mencionan en sus etiquetas (Tufiño, 2016).

La publicidad es una herramienta de suma importancia en la actualidad en el mundo entero, ya que, con ella podemos tener un dinamismo dentro del comercio aumentando el ingreso económico y la circulación de productos dentro del DMQ. Sin embargo, esta disonancia entre la promoción comercial y la realidad científica plantea interrogantes acerca de la autenticidad de los beneficios proclamados en los suplementos para niños con prebióticos en el desarrollo y bienestar de los niños (Tufiño, 2016).

La necesidad de abordar esta problemática radica en generar incertidumbre en el comprador para informarlo y disminuir la falsa publicidad en las etiquetas que aseguran tener potencial prebiótico en suplementos para niños con inulina de achicoria distribuidos en los supermercados situados en el DMQ.

1.2. Justificación

En los supermercados grandes situados en el Distrito metropolitano de Quito (DMQ), los productos que se exhiben son de diversas marcas con información detallada sobre el contenido nutricional en la parte posterior, sin embargo, en la parte delantera de los alimentos también son etiquetados para ser una herramienta potencial en ayudar a los consumidores a la hora de elegir opciones más saludables y funcionales (Mejean et al., 2013).

Pero ¿Qué pasa cuando el producto no cumple con lo establecido en su etiqueta?, hoy en día se habla mucho de los alimentos funcionales, principalmente por su característica al abarcar diversos componentes nutricionales, los cuales afectan varias funciones importantes en el cuerpo, produciendo bienestar y salud, disminuyendo el riesgo de algunas enfermedades, mejorando el nivel físico y mental, incluso en edades tempranas, por lo que existen suplementos dirigidos al consumo de los niños (Márquez Fernández & Márquez Fernández, 2019).

Los suplementos para niños que se usan desde temprana edad, en una etapa crucial de desarrollo físico y cognitivo, deben ser ricos en vitaminas, probióticos, prebióticos, minerales y otros compuestos, para que puedan contribuir en la prevención de enfermedades a largo plazo (Zamudio-Vázquez et al., 2017).

Incorporar hábitos alimenticios funcionales, como la inclusión de suplementos con prebióticos en la dieta de los niños, no solo les brinda una herramienta valiosa para optimizar su bienestar, sino que también promueve un crecimiento y desarrollo significativos. Es importante destacar que la microbiota se establece en gran medida alrededor de los 2 años de vida, siendo de gran relevancia en la prevención de numerosas enfermedades (Del Pilar & Pardo, 2020) (Zamudio-Vázquez et al., 2017).

Algunas de estas enfermedades aparecen con más frecuencia durante los primeros cinco años de vida, en dónde son comunes los episodios de diarrea provocada por rotavirus. Datos del hospital Baca Ortiz muestran que dentro del DMQ en el 2017, se reportó una tasa de mortalidad de 4,0 por cada mil niños, esto resalta la importancia de los alimentos funcionales con prebióticos o probióticos para fortalecer su microbiota intestinal (Játiva-Mariño et al., 2021)(Zamudio-Vázquez et al., 2017).

Los prebióticos se pueden definir como un “ingrediente” que estimula selectivamente el crecimiento de un limitado número de microorganismos dentro del microbiota intestinal generando beneficios en la salud del hospedador (Sánchez, 2017)(Gasaly et al., 2020). Por otra parte, los probióticos son microorganismos vivos que en cantidades adecuadas administradas atribuyen beneficios a la salud del hospedador (Sánchez, 2017).

Como se mencionó anteriormente los prebióticos y probióticos se relacionan de manera directa en ciertos suplementos para niños con el objetivo de proporcionar una microbiota fortalecida (Sánchez, 2017). Dentro de los prebióticos más usados de forma comercial se encuentra la inulina, la cual se define como un carbohidrato no soluble que se encuentran en diversas plantas, principalmente se extrae de la raíz de la achicoria, una planta herbácea perenne cultivada en Ecuador. Este prebiótico se encuentra de forma natural en fibras dietéticas con bajo valor calórico, mejorando la biodisponibilidad de calcio y magnesio, siendo así, la inulina objeto de estudio por su comportamiento como prebiótico y atribuida como alimento funcional (Dos Santos et al., 2021).

La demanda de los alimentos funcionales como los prebióticos es alta, por lo que, en el mercado existen diversas marcas que prometen un efecto prebiótico alto. Este efecto lo usan para llamar la atención del cliente mediante sus etiquetas, a pesar de ello, no existe evidencia científica de un efecto prebiótico significativo de la inulina de achicoria (Zamudio-Vázquez et al., 2017).

Esta investigación es de gran importancia, dado que, contribuirá a brindar una mayor instrucción a los consumidores acerca de los productos adquiridos con un supuesto potencial prebiótico dentro de los supermercados del DMQ, desmintiendo o no la información que se encuentra en las etiquetas de los suplementos para niños.

1.3.Marco Teórico

1.3.1. Probióticos

Los microorganismos vivos conocidos como probióticos son utilizados en su presentación más común, cepas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Estos microorganismos actúan mejorando la composición de la microbiota intestinal, compitiendo con patógenos por sitios de adhesión y produciendo metabolitos beneficiosos como ácidos grasos de cadena corta. Además, los probióticos junto a los prebióticos, han mostrado efectos positivos en la función inmunológica y la salud general del SG (Mugambi et al., 2012) (Souza et al., 2022). En estudios in vitro, se ha demostrado que los probióticos pueden colonizar el tracto gastrointestinal simulado, adherirse a las células epiteliales intestinales y producir metabolitos beneficiosos como ácidos grasos de cadena corta. Estos metabolitos pueden tener efectos antiinflamatorios y promover la integridad de la barrera intestinal. Sin embargo, es importante destacar que los resultados de los estudios in vitro deben interpretarse con precaución y complementarse con estudios in vivo para validar los efectos observados en entornos más complejos, como el sistema gastrointestinal humano en su totalidad. (Dyshlyuk et al., 2024)

1.3.2. Prebióticos

Los prebióticos son compuestos no digeribles que promueven el crecimiento y la actividad de microorganismos beneficiosos en el intestino. Estos compuestos, como la inulina y los fructooligosacáridos (FOS), actúan como sustratos selectivos para las bacterias beneficiosas, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Ayala Monter et al., 2018).

Estimulan el crecimiento de estas bacterias, mejorando la barrera mucosa intestinal y modulan la respuesta inmunológica, lo que contribuye a un ambiente intestinal saludable. La inulina es un tipo de fibra soluble que se encuentra en la raíz de la achicoria. Se clasifican como prebiótico debido a su capacidad para estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas en el colon. La inulina es fermentada por la microbiota intestinal, produciendo ácidos grasos de cadena corta que benefician la salud intestinal. Además, la inulina puede

mejorar la absorción de minerales y ayudar en la regulación del metabolismo de la glucosa (Bueno Vargas, 2016)(Ayala Monter et al., 2018).

1.3.3. Sistema Gastrointestinal *In vitro*

Los sistemas gastrointestinales se comenzaron a utilizar en la ciencia debido a su conexión intrínseca con la salud humana y el bienestar. Desde los primeros días de la investigación médica, los científicos han reconocido la importancia de comprender la digestión y la absorción de nutrientes. Estos sistemas son responsables de procesar los alimentos, absorber nutrientes esenciales y eliminar desechos del cuerpo. Su estudio es fundamental para comprender cómo el cuerpo humano funciona y cómo interactúa con su entorno (Gómez-Aldapa et al., 2023).

El sistema gastrointestinal (SG) desempeña un papel crucial en la salud humana, ya que no solo participa en la digestión y absorción de nutrientes, sino que también alberga una comunidad diversa de microorganismos conocida como microbiota intestinal. La interacción entre los componentes alimentarios y la microbiota intestinal influye en la salud y el bienestar de los niños. En este contexto, los probióticos y los prebióticos, así como la inulina de achicoria emergen como elementos clave que pueden modular positivamente la microbiota y, por ende, la salud gastrointestinal en los niños (Fuyuki et al., 2021).

Los modelos *in vitro* del sistema gastrointestinal son herramientas cruciales para estudiar la interacción entre los componentes alimentarios, los prebióticos, los probióticos y la microbiota intestinal. Estos sistemas reproducen de manera controlada las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal, permitiendo la evaluación de la digestión, la absorción y la fermentación de sustancias. Los estudios *in vitro* son fundamentales para comprender cómo los prebióticos y probióticos afectan la microbiota y la salud gastrointestinal en un entorno controlado y reproducible (Gómez-Aldapa et al., 2023).

1.3.4. Inulina como prebiótico

La inulina de achicoria es un prebiótico altamente beneficioso para la salud intestinal. Cuando se consume, la inulina llega al colon sin ser digerida por las enzimas del tracto gastrointestinal superior. En dicho lugar, sirve como sustrato fermentable para las bacterias beneficiosas del intestino, como las bifidobacterias y lactobacilos. Estas bacterias utilizan la inulina como fuente de alimento, lo que promueve su crecimiento y multiplicación, mejorando así el equilibrio de la microbiota intestinal. Además, este proceso de fermentación produce ácidos grasos de cadena corta, como el butirato, que son beneficiosos para la salud intestinal y tienen efectos antiinflamatorios (Chean et al., 2021).

La interacción del prebiótico de inulina de achicoria y el sistema gastrointestinal *in vitro* ofrece un enfoque integral para comprender y mejorar la salud gastrointestinal (Ackerberg et al., 2012).

La promoción de una microbiota intestinal equilibrada y funcional mediante la modulación de estos componentes puede tener implicaciones significativas para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con el SGI. La investigación continua en este campo proporcionará información crucial para desarrollar estrategias dietéticas y terapéuticas dirigidas a mejorar la salud gastrointestinal y, por ende, la salud general de los niños (Ku et al., 2016).

En resumen, la inulina de achicoria actúa como un sustrato fermentable para las bacterias beneficiosas del intestino, promoviendo su crecimiento y multiplicación. Esto contribuye a mejorar el equilibrio de la microbiota intestinal y a mantener una buena salud digestiva, gracias a la producción de ácidos grasos de cadena corta que tienen efectos beneficiosos para el intestino (Chean et al., 2021).

1.4.Objetivos

Objetivo general:

- Evaluar la capacidad prebiótica de la inulina de achicoria en suplementos para niños 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 inóculo en la fase intestinal del SGI.
- Comparar la proliferación de bacterias lácticas en muestras de suplementos alimenticios para niños con y sin adición de la 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 suplementos para niños en el DMQ.
- **Hipótesis alternativa (H₁):** La inulina de achicoria presenta una capacidad prebiótica significativa en suplementos para niños en el DMQ.

2. METODOLOGÍA

Para efectos de este estudio, se tomaron en cuenta dos etapas, una primera etapa donde se realizó una revisión bibliográfica para converger diferentes métodos y optimizar la simulación del SGI. Por otro lado, la segunda etapa consistió en la adaptación y simulación del SGI haciendo uso de tres fases como se muestra en la Ilustración 1.

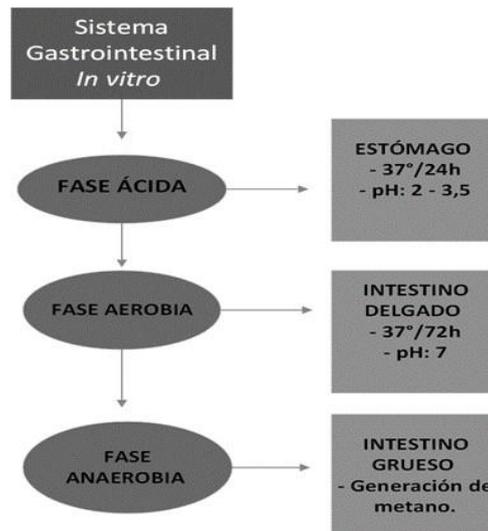


Ilustración 1: Diagrama de flujo Sistema Gastrointestinal In vitro (SGI)

- Fase ácida: Simula las condiciones del estómago, incluyendo la acidez gástrica, ajustando factores como el pH (Peñaherrera et al., 2022).
- Fase intestinal: Se imitan las condiciones del intestino delgado, en donde se produce la digestión (Peñaherrera et al., 2022).
- Fase colónica: Representa el intestino grueso, centrándose en la fermentación bacteriana y la formación de productos finales de la digestión (Peñaherrera et al., 2022) (Heredia Gutiérrez et al., 2021).

Estas fases permiten evaluar la digestión y la interacción microbiana, brindando una representación más completa de la digestión y la absorción en el tracto intestinal *in vitro* (Peñaherrera et al., 2022).

Para realizar la comparación de la capacidad prebiótica se implementaron tres matraces control (sin prebióticos) vs diez matraces (con prebióticos). Esta diferencia entre las muestras control y las experimentales se debe a la limitación del tamaño de la incubadora en la que se realizó el ensayo.

2.1. Fase ácida (Estómago)

Para comenzar con la Fase 1 se agregó 200mL de agua en un matraz Erlenmeyer y una solución ácida, específicamente 1,5mL de ácido clorhídrico con un pH ajustado a aproximadamente 2,5 a 3,0 para simular las condiciones gástricas. Adicionando sales como un buffer: K_2HPO_4 con 1,09 gramos y 2,14 gramos de H_2KPO_4 . Seguido de la incorporación de 15g de carne molida junto 15g de frutas trituradas en matraces de control, realizando el procedimiento por triplicado (Peñaherrera et al., 2022).

Para los diez matraces con prebióticos, se añadió lo mencionado anteriormente más 10g de suplemento para niños que contiene prebióticos, siguiendo las indicaciones de la etiqueta.



Paso 1



Paso 2



Paso 3



Paso 4



Paso 5

Ilustración 2. Esquema gráfico de la fase ácida: Paso 1-Ajuste de pH, Paso 2- se agregó las sales, Paso 3-Agregar la carne, Paso 4- mix de frutas, Paso 5- (no se realiza en los matraces control) Se adiciona la dosis establecida de suplemento para niños con prebióticos de acuerdo con la etiqueta.

Dentro de las 24h se midieron los grados brix para comprobar la digestión de carbohidratos y el funcionamiento del SGI.

2.2. Fase aerobia (Intestino delgado)

Se emuló la fase del intestino delgado mediante la incorporación de los productos resultantes de la fase ácida gástrica en el mismo matraz. El pH ácido se ajustó a un valor neutro, alrededor de 7, mediante la adición de aproximadamente 3g de Hidróxido de Potasio (KOH) puro. Luego, se inoculó el sistema con 2g de compost, introduciendo una variedad de microorganismos en condiciones aeróbicas. El proceso se mantuvo a una temperatura de 37°C durante un período de 72 horas. La forma para comprobar el crecimiento de microorganismos dentro de los matraces fue mediante la densidad óptica con un espectrofotómetro a 600nm (Peñaherrera et al., 2022) (Chean et al., 2021).

2.3. Fase anaerobia (Intestino grueso)

Se añadió en una concentración de 1,36 mL de *lactobacillus*, la cepa se tomó de una muestra de la UISEK, bacterias lácticas aisladas de agua de reservorio.

En esta etapa anaerobia, orientada a la producción de CO₂, puesto que, los *lactobacillus* producen este tipo de gas. El matraz se selló con un globo en la boquilla para visualizar el intercambio de gases, con el propósito de evaluar la eficiencia del sistema a tal punto que inflara el globo en la parte superior del matraz. Para simular las condiciones del intestino grueso, los matraces se incubaron a 32°C durante un período de 72 horas, manteniendo un pH de 7 (Peñaherrera et al., 2022) (Gómez-Aldapa et al., 2023).



Ilustración 3: Fase anaerobia, generación de CO₂, técnica de intercambio de gases

Al finalizar el SGI después de un periodo de 72 horas, se procedió a la recolección de muestras de la etapa terminal del sistema gastrointestinal in vitro.

2.4. Cultivo

A continuación, se llevaron a cabo diluciones seriadas en tubos de ensayo que abarcaron desde 1:10 hasta 1:10,000,000 (10^{-7}). Las diluciones que oscilaron entre 1:10,000 y 1:10,000,000 se cultivaron mediante el uso de una micropipeta con $25\mu\text{L}$ de la muestra en los tubos de ensayo en placas de Petri que contenían 25mL de medio MRS, especialmente formulado para el crecimiento de bacterias lácticas (Peñaherrera et al., 2022).

Se llevaron a cabo cuatro cultivos a partir de cada matraz, tanto de los matraces control como de los matraces con prebióticos, generando un total de 52 cultivos mediante el método de extensión con un asa de Digrafsky. Las cajas Petri se incubaron a 37 °C durante dos días. Posteriormente se realizó el conteo de colonias en cada caja Petri para determinar su concentración celular (UFC/mL)(Ayala Monter et al., 2018).

Análisis estadístico

Al final con los datos que se reportaron se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias de la concentración de UFCs en los matraces control y los matraces con prebióticos, adicionalmente se realizó una prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre ambos grupos, para lo cual se utilizó el software estadístico en Infostat versión 2020 (Di Rienzo, et al, 2020).

3. Resultados

3.1. Funcionamiento del SGI

En la fase ácida del sistema gastrointestinal *in vitro*, el uso de HCl permitió la ruptura de carbohidratos de cadena larga, lo que incrementó la cantidad de azúcares en la mezcla, siendo un indicativo de una digestión efectiva. En la ilustración 4, se observan los grados brix de cada uno de los matraces con prebióticos durante la fase ácida, donde se observa que en cada uno de ellos la cantidad de azúcares es superior a 10,2°, siendo los matraces 4 y 10 donde se obtuvo la mayor concentración de azúcares (14,2°), como se observa en la ilustración 4.

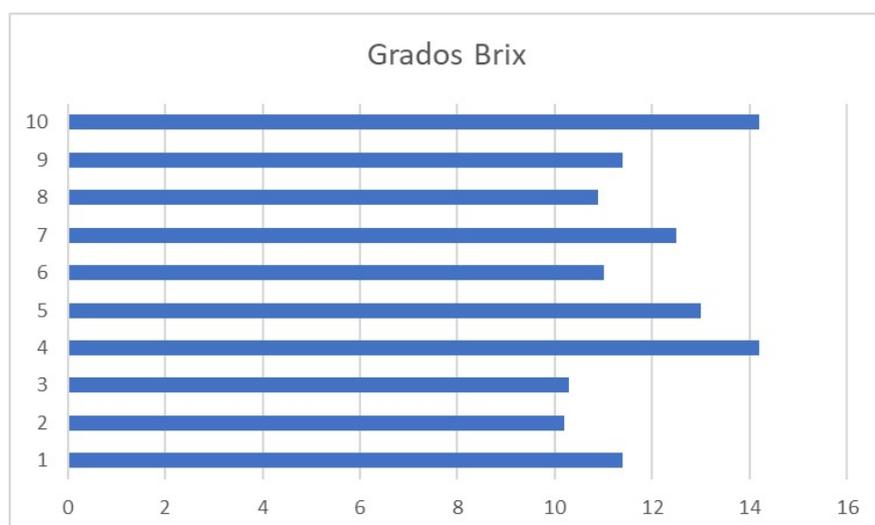


Ilustración 4: Cantidad obtenida de grados Brix en cada matraz con prebióticos durante la fase ácida

3.2.Densidad óptica

Mediante un espectrofotómetro, se midió la densidad óptica en cada uno de los matraces a una longitud de onda de 600 nm, para calcular la absorbancia. Esto indica un aumento en el crecimiento microbiano, evidenciado en la densidad celular. En las Tablas 1 y 2 se muestra la densidad óptica medida al inicio y final de la fase aeróbica de la simulación del sistema gastrointestinal *in vitro*, que tuvo una duración de 72 horas. Donde se observa un aumento de la densidad óptica tanto en los matraces control y los matraces con prebióticos.

Tabla 1.

Datos De Densidad Óptica

Valores tomados al inicio y final de la fase aerobia.

<u>Matraces control</u>	<u>Inicial</u>	<u>Final</u>
C1	0,9	1,6
C2	0,1	1,9
C3	0,9	1,7

Tabla 2.

Datos De Densidad Óptica

Valores tomados al inicio y final de la fase aerobia

<u>Matraces con prebióticos</u>	<u>Inicial</u>	<u>Final</u>
M1	1,1	1,9
M2	0,9	1,6
M3	0,9	1,7
M4	1,1	1,9
M5	1,1	1,8
M6	1	1,6
M7	0,9	1,6
M8	0,9	1,6
M9	0,9	1,7
M10	1	1,9

3.3. Conteos celulares

En la Tabla 3 se muestran los valores de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Lactobacillus* y la concentración celular (UFC/ml) en los matraces control (sin prebióticos), en cuatro diferentes diluciones: 1:10000. 1:100 000, 1:1000 000 y 1:10 000 000.

Tabla 3.

Controles

Conteo celular de las UFC, desviación estándar y promedio de las colonias provenientes de los matraces control sin adición de prebióticos.

<u>Dilución</u>	<u>Número de colonias</u>			<u>Promedio de</u>	<u>Desviación</u>	<u>Concentración</u>
	C1	C2	C3	<u>colonias</u>	<u>estándar</u>	<u>celular (UFC/mL)</u>
1:10 000	206	300	197	234,33	57	9,40E+07
1:100 000	117	125	105	116	10	4,60E+08
1:1000 000	47	49	43	48	3	1,90E+09
1:10 000 000	26	15	31	29	8	1,10E+10

Nota: El rango máximo es de 300 UFC con una concentración celular expresada en notación científica.

Por otro lado, la Tabla 4 muestran los valores de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Lactobacillus* y la concentración celular (UFC/ml) en los matraces con prebióticos, en cuatro diferentes diluciones: 1:10 000. 1:100 000, 1:1000 000 y 1:10 000 000. En donde se observan valores muy similares a los obtenidos en los matraces control, para lo cual se aplicaron pruebas de estadística inferencial para determinar si existen diferencias estadísticas entre los matraces control y con prebióticos.

Tabla 4.

Matraces con prebióticos

Control celular de las UFC, desviación estándar y promedio de las colonias provenientes de los matraces con suplemento para niños

<u>Dilución</u>	<u>M1</u>	<u>M2</u>	<u>M3</u>	<u>M4</u>	<u>M5</u>	<u>M6</u>	<u>M7</u>	<u>M8</u>	<u>M9</u>	<u>M10</u>	<u>Promedio</u>	<u>Concentración celular</u>
1:10 000	300	300	100	300	101	157	167	180	210	248	206,3	8,30E+07
1:100 000	300	300	59	111	77	64	89	70	42	50	116,2	4,60E+08
1:1000 000	80	75	68	27	30	46	54	29	38	43	49	2,00E+09
1:10 000 000	40	59	65	10	27	38	43	1	30	20	33,3	1,30E+10

Nota: El rango máximo es de 300 UFC con una concentración celular expresada en notación científica.

Para obtener la concentración celular se realizó una ecuación con el número de colonias obtenidas en cada cultivo:

$$\frac{\#UFC}{25\mu L \text{ caldo}} \times \frac{1000\mu L}{1mL} \times Fd$$

Ecuación 1: Concentración celular, dónde: #UFC (Número de colonias), Fd (Factor de dilución)

3.4. Análisis Estadístico Inferencial

Se analizaron los datos obtenidos de los conteos celulares con un parámetro de confianza del 95%, contrastando la diferencia que existe entre las medias de los controles y los matraces con prebióticos en cada una de las diluciones, mediante una prueba de ANOVA y Tukey en Infostat versión 2020. Los resultados de dichas comparaciones se pueden ver a continuación desde la Ilustración 5 hasta la Ilustración 13.

Dilución ($1 \cdot 10^{-4}$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NUM. UFC	13	0.13	0.00	36.79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8322.21	3	2774.07	0.45	0.7217
DILUCION	8322.21	3	2774.07	0.45	0.7217
Error	55146.10	9	6127.34		
Total	63468.31	12			

Ilustración 5. ANOVA para dilución 10^{-4}

En la ilustración 5 se observan los resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado para determinar diferencias significativas entre las medias de los matraces control y matraces con prebióticos en la dilución $1 \cdot 10^{-4}$. Como se puede observar el valor de p obtenido es mayor a 0,05 por lo que podemos concluir que no existen diferencias significativas

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=304.23341

Error: 6127.3444 gl: 9

DILUCION	Medias	n	E.E.	
C2_1:10000	300.00	1	78.28	A
M_1:10000	206.30	10	24.75	A
C1_1:10000	206.00	1	78.28	A
C3_1:10000	197.00	1	78.28	A

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

Ilustración 6. Test de Tukey para dilución 10^{-4}

De igual manera, en la Ilustración 6 se observa el resultado obtenido en una prueba de Tukey con la finalidad de encontrar subgrupos entre las medias de la dilución $1 \cdot 10^{-4}$. Debido a que la tabla nos muestra que todos están agrupados dentro de un mismo grupo (A), esto nos indica que no existe diferencia estadística significativa entre las medias de dicha dilución.

Dilución ($1 \cdot 10^{-5}$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NUM. UFC	13	2.3E-03	0.00	85.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	203.32	3	67.77	0.01	0.9991
DILUCION	203.32	3	67.77	0.01	0.9991
Error	87887.60	9	9765.29		
Total	88090.92	12			

Ilustración 7. ANOVA para diluciones 10^{-5}

Para la dilución $1 \cdot 10^{-5}$ se obtuvieron resultados de la prueba de ANOVA, como se observa en la Ilustración 7 donde se aprecia un valor de $p > 0,05$. Este valor de p nos demuestra la inexistencia de una diferencia significativa entre las medias de los matraces control y matraces con prebióticos.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=304.23341

Error: 6127.3444 gl: 9

DILUCION	Medias	n	E.E.	
C2_1:10000	300.00	1	78.28	A
M_1:10000	206.30	10	24.75	A
C1_1:10000	206.00	1	78.28	A
C3_1:10000	197.00	1	78.28	A

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

Ilustración 8. Test de Tukey para diluciones 10^{-5}

En la Ilustración 8 se puede observar los resultados de la prueba de Tukey correspondientes a la dilución $1 \cdot 10^{-5}$. Debido a que las medias están representadas por una misma letra (A), esto nos indica que se encuentran en un mismo grupo y por lo tanto no existen diferencia estadística significativa entre sí.

Dilución ($1 \cdot 10^{-6}$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NUM. UFC	13	0.01	0.00	40.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	35.08	3	11.69	0.03	0.9923
DILUCION	35.08	3	11.69	0.03	0.9923
Error	3434.00	9	381.56		
Total	3469.08	12			

Ilustración 9. ANOVA para diluciones 10^{-6}

En la Ilustración 9 se puede apreciar los resultados del análisis ANOVA para la comparación de medias entre los conteos celulares obtenidos de los matraces control y con prebióticos. Como se puede observar en la tabla, el valor de p sigue siendo mayor a 0,05 por lo que podemos determinar que no existe diferencia estadísticas significativa.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=75.91885

Error: 381.5556 gl: 9

DILUCION	Medias	n	E.E.
M_1:1000000	49.00	10	6.18 A
C2_1:1000000	49.00	1	19.53 A
C1_1:1000000	47.00	1	19.53 A
C3_1:1000000	43.00	1	19.53 A

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

Ilustración 10. Test de Tukey para diluciones 10^{-6}

En el test de Tukey que se muestra en la Ilustración 10 se puede ver cómo, la letra (A) a la derecha de la media de los grupos comparados no cambia, por lo tanto, no contamos con una diferencia estadística significativa entre los conteos celulares obtenidos de los matraces control y los matraces con prebióticos.

Dilución ($1 \cdot 10^{-7}$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NUM. UFC	13	0.08	0.00	64.55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	333.59	3	111.20	0.27	0.8421
DILUCION	333.59	3	111.20	0.27	0.8421
Error	3640.10	9	404.46		
Total	3973.69	12			

Ilustración 11. ANOVA para diluciones 10^{-7}

Como se observa en los resultados del análisis ANOVA para la dilución $1 \cdot 10^{-7}$ figurados en la Ilustración 11, el valor de p continúa siendo mayor a 0,05, por lo que, podemos afirmar que en esta comparación de medias de los conteos celulares no existe una diferencia estadística significativa.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=78.16389

Error: 404.4556 gl: 9

DILUCION	Medias	n	E.E.	
M_1:10000000	33.30	10	6.36	A
C3_1:10000000	31.00	1	20.11	A
C1_1:10000000	26.00	1	20.11	A
C2_1:10000000	15.00	1	20.11	A

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

Ilustración 12. Test de Tukey para diluciones 10^{-7}

En el test de Tukey para el factor de dilución $1 \cdot 10^{-7}$ que se observa en la Ilustración 12, se puede apreciar que todas las medias están dentro de la misma letra (A) mostrando que no existe una diferencia estadística significativa al comparar las medias de los conteos celular de los matraces control y matraces con prebióticos.

Nota: En cada caso se tomó en cuenta la Diferencia mínima significativa (DMS) y el parámetro de confianza del test de Tukey.

4. Discusión

4.1. Acondicionamiento del SGI

Para comenzar con el ensayo *in vitro* se estipuló algunas adaptaciones para mejorar la especificidad del SGI con el de seres humanos. Uno de los cambios empezó en la fase estomacal usando ácido clorhídrico concentrado, como jugo gástrico dentro del SGI y frutas trituradas (Heredia Gutiérrez et al., 2021).

Las adaptaciones aplicadas en el SGI no afectan en la digestión de la fase estomacal, alcanzando datos muy similares con el SGI de referencia, comprobándolo con la obtención de grados Brix (Ilustración 4) reportando datos superiores a 10,2° (Peñaherrera, 2022).

La velocidad de digestión a comparación de otros SGI puede proporcionar información sobre cómo la presencia de alimentos afecta el proceso digestivo y la liberación de grados Brix óptimos para la dinámica de digestión simulada. (Peñaherrera, 2022).

Posteriormente en la fase tres (intestino grueso) se requirió el uso de *Lactobacillus* los cuales, siguiendo el estudio de Peñaherrera en el 2022, se pueden obtener mediante 3g de heces, sin embargo, se decidió inocular una cantidad cercana mediante una muestra de *Lactobacillus* cultivada a partir de agua de reservorio en el laboratorio de la UISEK. Según los resultados obtenidos por Peñaherrera en 2022, cada gramo de heces contiene alrededor de 10^9 unidades de *Lactobacillus*. La selección de la cantidad de muestra se basó en dos factores principales: la densidad de la muestra y la cantidad específica de bacterias que se necesitaba inocular en el estudio (Mccartney et al., 1996) (Peñaherrera, 2022). Al calcular la densidad de la muestra, se calculó en 1,37 g/mL, y utilizando los resultados del estudio de Peñaherrera, se determinó que se necesitaba inocular de $3 \cdot 10^9$ g de *Lactobacillus*. Teniendo en cuenta que el peso de cada bacteria es de aproximadamente $6,25 \cdot 10^{-10}$ g, se calculó que sería necesario inocular 1,36

militros de la muestra. Este hallazgo subraya la importancia de considerar tanto la densidad de la muestra como la cantidad de bacterias deseada al diseñar experimentos microbiológicos. Además, destaca la necesidad de realizar cálculos precisos para garantizar que los resultados sean consistentes y confiables. Los estudios previos, como los de McCartney et al. (1996) y Peñaherrera (2022), respaldan estos hallazgos y proporcionan una base sólida para futuras investigaciones en este campo.

4.2. Efecto prebiótico

Varios estudios comentan la eficacia de la inulina de achicoria como prebiótico, sin embargo, la dosis diaria es de 20g de inulina de achicoria pura para tener un cambio significativo en el sistema digestivo, en comparación al suplemento para niños en el cual no se especifica la cantidad de inulina de achicoria en los 10g de dosis diaria del suplemento para niños como tal que se recomienda en la etiqueta (Gallardo, Hernández, 2009).

Los factores como la acidez del estómago pueden afectar la capacidad prebiótica para llegar al intestino en cantidades suficientes para ejercer su efecto deseado, dicho argumento puede plantear dudas sobre la eficiencia real de estos suplementos para proporcionar el soporte prebiótico necesario. (Rubio et al., 2008)

La concentración celular más baja en algunos matraces puede indicar posibles efectos inhibitorios o selectivos de los prebióticos en ciertas cepas bacterianas. Otro aspecto por considerar es el hecho que en la mayoría de las investigaciones sobre los efectos a largo plazo de los suplementos para niños en la infancia es limitada. La mayoría de los estudios se centran en resultados a corto plazo, lo que hace difícil evaluar completamente su efectividad y sostenibilidad, se necesitan más investigaciones que aborden la duración de los efectos positivos y si estos persisten a lo largo del tiempo (Garretto et al., 2020).

El suplemento que se utilizó presenta en su contenido "*Saccharomyces cerevisiae*" un posible probiótico, al estar presente en la fórmula para niños debería representar mayor incremento de

bacterias lácticas, no obstante, pH entre $2,5 \pm 0,2$ se observa una disminución de su crecimiento en el 30% lo que puede indicar que su crecimiento no fue óptimo considerando que la cantidad del mismo dentro de los 10g de dosis recomendada no es lo suficiente para contrarrestar el 30% de pérdida sin que los prebióticos puedan proliferar estas bacterias de forma más eficiente (Rubio et al., 2008).

Debido a que no se toma en cuenta en la etiqueta la concentración del probiótico mencionado se debería realizar los cálculos correspondientes para adicionar ya sea, una cantidad proporcional de "*Saccharomyces cerevisiae*" o aumentar la cantidad de inulina de achicoria dentro del producto para mantener el efecto prebiótico que se enuncia en las etiquetas de estos productos (Rubio et al., 2008).

Se toma en cuenta que el suplemento para niños es liofilizado, es distribuido en polvo para diluir 10g en 240mL de agua, sin embargo, tomando en cuenta su presentación se puede hablar sobre la capacidad de rehidratación de los polvos que juegan un papel crucial en la viabilidad de los microorganismos tras la liofilización, ya que, este proceso es esencial para su recuperación. Las células que han sufrido una lesión subletal podrían no tener la capacidad de reparar dicho daño si la rehidratación se realiza en condiciones inadecuadas. En este contexto, las propiedades específicas de rehidratación se convierten en un factor determinante, ya que, influyen directamente en la capacidad de las células microbianas para superar las lesiones y restaurar su funcionalidad durante el paso crítico de revitalización post-liofilización (Xu, 2016). Al rehidratarse el suplemento para niños usado en este estudio existe una posibilidad de la generación subletal en las células que corresponden a la inulina de achicoria, ya que, estas células podrían no tener la capacidad para repararse una vez a través del proceso de rehidratación. De esta forma podemos determinar que la presentación liofilizada en la que se encuentra este suplemento podría reducir la supuesta capacidad prebiótica del mismo. Así mismo, se podrían explorar otras formas de presentación de este mismo producto, como por

ejemplo, desarrollar un producto ya rehidratado que aporte la misma capacidad prebiótica enunciada en el suplemento utilizado en este estudio (Xu, 2016).

De igual manera, en el contexto de microorganismos sometidos a liofilización, diversas investigaciones han destacado la rápida disminución de la tasa de supervivencia poco después de este proceso. Esta disminución se atribuye principalmente a condiciones inapropiadas de almacenamiento que resultan en un elevado contenido de humedad en el producto final. Además, la presencia de oxígeno en el envase puede inducir el fenómeno de oxidación a nivel de la membrana lipídica de los microorganismos, contribuyendo así a la disminución de su viabilidad post-lio (Rodríguez-Barona et al., 2016).

En el contexto de este estudio, la elección de empaque es de papel con un cierre resellable de plástico, no obstante, el empaque al vacío utilizando bolsas metalizadas de barrera al vapor emerge como una probable facilitadora de la viabilidad y, por ende, la estabilidad de los microorganismos. Este tipo de empaque no solo ayuda a reducir la humedad en el producto almacenado, sino que también minimiza la exposición al oxígeno, mitigando así el riesgo de oxidación lipídica (Rodríguez-Barona et al., 2016).

Por otro lado, el suplemento para niños no replica los nutrientes que se encuentran naturalmente en los alimentos, tomando en cuenta que la industria de los suplementos no está regulada tan rigurosamente como la de los medicamentos, esto representa significancia en la calidad y eficiencia del producto (Tufiño Díaz Pablo Raúl, 2016).

Aunque la prueba de ANOVA no reveló diferencias estadísticas significativas entre las muestras control y las muestras con prebióticos en el modelo in vitro del SGI, la interpretación debe ser cautelosa. Como se observa específicamente en las Ilustraciones 3 y 4 se puede apreciar que en la dilución $1 \cdot 10^{-4}$ existe una discrepancia con respecto al promedio de las UFC en el matraz control y el matraz con prebióticos. De acuerdo con la definición de un prebiótico este es un compuesto que estimula la proliferación de las bacterias probióticas, sin embargo, al

comparar el promedio de UFC contadas correspondientes a la dilución $1 \cdot 10^{-4}$ podemos observar que existe un número menor de UFC en los matraces con prebióticos con respecto a los matraces control (Mugambi et al., 2012).

Esta discrepancia puede tener su origen en varios factores, los cuales pueden variar desde la presentación liofilizada del suplemento hasta una posible oxidación debido a su empaquetado. Como se mencionó previamente, las células liofilizadas pueden sufrir una lesión subletal al momento de rehidratarse después de ser liofilizadas. Esta posible lesión puede desencadenar una reducción significativa del potencial prebiótico de la inulina de achicoria, lo cual explicaría el por qué existe un número menor de UFC en los matraces con prebióticos a comparación de los matraces control (Xu, 2016).

Por otro lado, el empaquetado de este suplemento también puede tener una influencia significativa en la discrepancia de estos valores. Como se mencionó anteriormente, el empaquetado de este suplemento corresponde a una bolsa de papel con un cierre resellable, lo cual permite un almacenamiento de oxígeno, el mismo que produce una oxidación lipídica de la membrana de las células de la inulina de achicoria, degradándola y disminuyendo su capacidad prebiótica. Este factor de oxidación se debe tomar en cuenta con un énfasis significativo puesto que afecta directamente la capacidad prebiótica supuestamente ofrecida por este suplemento y es sin duda una posible variable para explicar la discrepancia encontrada al comparar los conteos celulares de los matraces control con los matraces con prebióticos (Rodríguez-Barona et al., 2016).

Los resultados representan discrepancia, destacando la complejidad de las interacciones bacterianas en entornos simulados y resalta la importancia de una investigación continua para comprender completamente los factores que influyen en la proliferación de bacterias lácticas en el SGI. Sin embargo, su funcionalidad depende de la cantidad en la que se encuentre y que la dosis diaria sea regular (Hassan & Atiquzzaman, 2000).

5. Conclusiones

- La adaptación del SGI se logró con éxito para la proliferación de bacterias lácticas. Pueden sentarse bases para investigaciones futuras que se centren en la interacción de estas bacterias en un entorno que simula condiciones intestinales.
- Se obtuvieron bacterias lácticas aisladas a partir de agua de reservorio y se las utilizaron como inóculo en la fase intestinal de la simulación del SGI. Este paso es crucial para garantizar la reproductibilidad y la confiabilidad de los resultados en estudios de simulación gastrointestinal.
- La comparación de la proliferación de bacterias lácticas en muestras con y sin adición de suplemento para niños con inulina de achicoria, se llevó a cabo con la metodología establecida. Sin embargo, se observó que la proliferación de bacterias lácticas no alcanzó resultados proliferantes significativos de bacterias lácticas; por lo tanto, no hay evidencia para rechazar la hipótesis nula.
- Este estudio sugiere que, en condiciones *in vitro* y según la prueba de Tukey, el suplemento para niños con prebióticos no mostró un impacto estadísticamente significativo en comparación con los controles sin prebiótico en términos de números de colonia y concentración celular.
- En conclusión, mientras se logró una adaptación efectiva del SGI de referencia, la falta de proliferación que se esperaba de bacterias lácticas con el suplemento para niños indica la necesidad de revisar y ajustar la concentración de inulina de achicoria. Estos resultados proporcionan valiosa información para la optimización de futuros estudios que aborden la interacción del SGI y distintos productos con prebióticos.

6. Recomendaciones

- Realizar el SGI con heces humanas para lograr más exactitud considerando una previa aprobación por un comité de ética en investigación en seres humanos (CEISH).
- En futuras investigaciones se recomienda mantener un monitoreo continuo de las condiciones de simulación del SGI, como un control preciso del pH y conteo bacteriano para obtener una imagen completa de la dinámica en el SGI con y sin prebióticos.
- Llevar un registro detallado de los métodos utilizados, condiciones experimentales y resultados obtenidos.
- Si es posible validar los resultados obtenidos *in vitro* mediante estudios *in vivo*, para proporcionar una perspectiva más completa y realista de como los productos afectan a la microbiota intestinal y salud gastrointestinal.
- Realizar experimentos replicados con distintas marcas de suplementos para niños con prebióticos.
- Se recomienda realizar investigaciones adicionales para comprender mejor los posibles efectos y explorar aspectos más detallados de la microbiota intestinal en respuesta a estos suplementos.

7. Referencias bibliográficas

- Ackerberg, T. S., Labuschagne, I. L., & Lombard, M. J. (2012). The use of prebiotics and probiotics in infant formula. *South African Family Practice*, 54(4), 321–323.
<https://doi.org/10.1080/20786204.2012.10874243>
- Ayala Monter, M. A., Hernández Sánchez, D., Pinto Ruiz, R., González Muñoz, S. S., Bárcena Gama, J. R., Hernández Mendo, O., Torres Salado, N., Ayala Monter, M. A., Hernández Sánchez, D., Pinto Ruiz, R., González Muñoz, S. S., Bárcena Gama, J. R., Hernández Mendo, O., & Torres Salado, N. (2018). Efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento in vitro de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(2), 346.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4488>
- C Yoja Gallardo Navarro M En C Haydeé Hernández Unzón Mexico Df, M. E. (n.d.). *"APLICACIÓN DE INULINA DE DALIA Y DE ACHICORIA INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DEPARTAMENTO DE GRADUADOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS.*
- Chean, S. X., Hoh, P. Y., How, Y. H., Nyam, K. L., & Pui, L. P. (2021). Microencapsulation of *Lactiplantibacillus plantarum* with inulin and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and roselle juice. *Brazilian Journal of Food Technology*, 24.
<https://doi.org/10.1590/1981-6723.22420>
- Del Pilar, L., & Pardo, Z. (n.d.). *Evaluación de la capacidad prebiótica del Biopolímero Bilac®.*
- Dos Santos, V. M., de Lima, G. S., Leão, V. L. X. de S., da Silveira, K. C., & Stamford, T. L. M. (2021). Evaluation of physicochemical properties and viability of starter culture of liquid cheese whey-based frozen yogurts supplemented with inulin. *Ciencia Rural*, 51(12). <https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20201078>
- Dyshlyuk, L. S., Milentyeva, I. S., Asyakina, L. K., Ostroumov, L. A., Osintsev, A. M., & Pozdnyakova, A. V. (2024). Using bifidobacterium and propionibacterium strains in probiotic consortia to normalize the gastrointestinal tract. *Brazilian Journal of Biology*, 84. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256945>

- Fuyuki, A., Higurashi, T., Kessoku, T., Ashikari, K., Yoshihara, T., Misawa, N., Iwaki, M., Kobayashi, T., Ohkubo, H., Yoneda, M., Usuda, H., Wada, K., & Nakajima, A. (2021). Efficacy of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 in improving quality of life in patients with chronic constipation: A prospective intervention study. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 40(2), 105–114. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2020-073>
- Garretto, A., Miller-Ensminger, T., Ene, A., Merchant, Z., Shah, A., Gerodias, A., Biancofiore, A., Canchola, S., Canchola, S., Castillo, E., Chowdhury, T., Gandhi, N., Hamilton, S., Hatton, K., Hyder, S., Krull, K., Lagios, D., Lam, T., Mitchell, K., ... Putonti, C. (2020). Genomic Survey of *E. coli* From the Bladders of Women With and Without Lower Urinary Tract Symptoms. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02094>
- Gasaly, N., Riveros, K., Gotteland, M., Gasaly, N., Riveros, K., & Gotteland, M. (2020). Fitoquímicos: una nueva clase de prebióticos. *Revista Chilena de Nutrición*, 47(2), 317–327. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182020000200317>
- Gómez-Aldapa, C. A., Castro-Rosas, J., Guzmán-Ortiz, F. A., Acevedo-Sandoval, O. A., Rangel-Vargas, E., & Falfán-Cortés, R. N. (2023). Survival of alginate-microencapsulated *Lactobacillus paracasei* under gastrointestinal conditions in models in vitro and in vivo. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 22(3). <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio23112>
- Hassan, Mahbub., & Atiquzzaman, Mohammed. (2000). Performance of TCP/IP over ATM networks. In *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* (Vol. 57, Issue 4). Artech House. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000400012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Heredia Gutiérrez, A. B., Asensio Grau, A., Calvo Lerma, J., & Andrés Grau, A. M. (2021). *Simulación in vitro de la digestión gastrointestinal de alimentos*. <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/158446>
- Játiva-Mariño, E., Manterola, C., Roque Macias, :, & Narváez, D. (2021). Probióticos y Prebióticos. Rol en la Terapéutica de la Enfermedad Diarreica Aguda Infantil Probiotics and Prebiotics. Its Role in Childhood Acute Diarrheal Disease Therapy. In *Int. J. Morphol* (Vol. 39, Issue 1).

- Ku, S., Park, M. S., Ji, G. E., & You, H. J. (2016). Review on bifidobacterium bifidum bgn4: Functionality and nutraceutical applications as a probiotic microorganism. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17091544>
- Márquez Fernández, P. M., & Márquez Fernández, D. M. (2019). Functional foods: Current issues and trends. In *Vitae* (Vol. 26, Issue 1, pp. 6–7). Universidad de Antioquia. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v26n1a01>
- Mccartney, A. L., Wenzhi, W., & Tannock, G. W. (1996). Molecular Analysis of the Composition of the Bifidobacterial and Lactobacillus Microflora of Humans. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 62, Issue 12). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Mejean, C., Macouillard, P., Péneau, S., Hercberg, S., & Castetbon, K. (2013). Consumer acceptability and understanding of front-of-pack nutrition labels. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 26(5), 494–503. <https://doi.org/10.1111/jhn.12039>
- Mugambi, M. N., Musekiwa, A., Lombard, M., Young, T., & Blaauw, R. (2012). *Probiotics, prebiotics infant formula use in preterm or low birth weight infants: a systematic review*. www.clinicaltrialresults.org.
- Peñaherrera Velasco Francisco Xavier. (2022). “DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES IN VITRO EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ.”
- Rodríguez-Barona, S., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos. *Información Tecnológica*, 27(6), 135–144. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014>
- Rubio, A., Hernández, M., Aguirre, A., Sc, M., & Poutou, R. (2008). IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR IN VITRO DE PROPIEDADES PROBIÓTICAS EN CEPAS DE *S. cerevisiae* IN VITRO PRELIMINARY IDENTIFICATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF *S. cerevisiae* STRAINS. In *Rev.MVZ Córdoba* (Vol. 13, Issue 1).
- Sánchez Serrano Patricia. (2017). *Prebióticos en la mejora de la función gastrointestinal*.

Tufiño Díaz Pablo Raúl. (2016). *UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE JURISPRUDENCIA, CIENCIAS POLÍTICAS Y SOCIALES "LA PUBLICIDAD ENGAÑOSA DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS*.

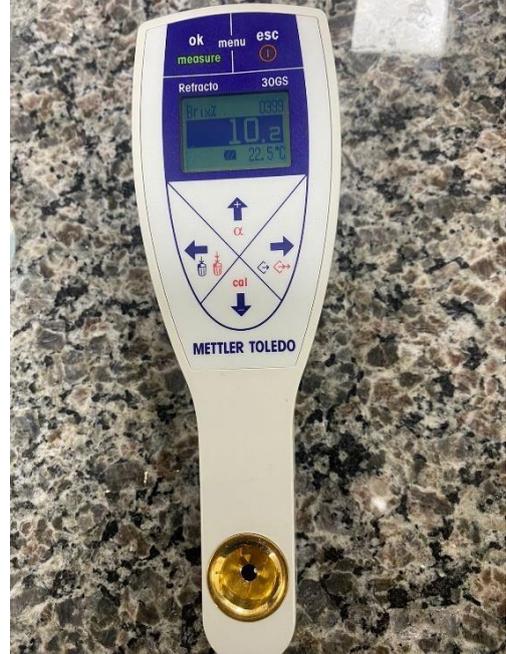
Xu, M. , G.-B. F. , D. M.-J. , & J. S. (2016). *Encapsulation of Lactobacillus casei ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. Journal of Food Engineering*.

Zamudio-Vázquez, V. P., Ramírez-Mayans, J. A., Toro-Monjaraz, E. M., Cervantes-Bustamante, R., Zárate-Mondragón, F., Montijo-Barrios, E., Cadena-León, J. F., Cázares-Méndez, J. M., Zamudio-Vázquez, V., Ramírez-Mayans, J., Toro-Monjaraz, E., Cervantes-Bustamante, R., Zárate-Mondragón, F., Montijo-Barrios, E., Cadena-León, J., & Cázares-Méndez, J. (2017a). Importancia de la microbiota gastrointestinal en pediatría. *Acta Pediátrica de México*, 1(1), 49. <https://doi.org/10.18233/APM1No1pp49-621323>

Zamudio-Vázquez, V. P., Ramírez-Mayans, J. A., Toro-Monjaraz, E. M., Cervantes-Bustamante, R., Zárate-Mondragón, F., Montijo-Barrios, E., Cadena-León, J. F., Cázares-Méndez, J. M., Zamudio-Vázquez, V., Ramírez-Mayans, J., Toro-Monjaraz, E., Cervantes-Bustamante, R., Zárate-Mondragón, F., Montijo-Barrios, E., Cadena-León, J., & Cázares-Méndez, J. (2017b). Importancia de la microbiota gastrointestinal en pediatría. *Acta Pediátrica de México*, 1(1), 49. <https://doi.org/10.18233/APM1No1pp49-621323>

8. Anexos

Refractómetro para medir grados Brix



Cultivos en cajas Petri

