



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SINBIÓTICOS.
EFECTOS SOBRE LA SALUD Y REGULACIÓN**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

VICTOR SERGIO SERRANO CASAS



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: AMELIA MARIA DE GUADALUPE FARRES GONZALEZ SARAVIA

VOCAL: PROFESOR: MARTHA GILES GOMEZ

SECRETARIO: PROFESOR: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

1ER. SUPLENTE: PROFESOR: SANDRA PAOLA SANCHEZ RODRIGUEZ

2° SUPLENTE: PROFESOR: VALENTIN GOMEZ GARCIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. AMELIA MARIA DE GUADALUPE FARRES GONZALEZ SARAVIA.

SUSTENTANTE (S):

VICTOR SERGIO SERRANO CASAS.



ÍNDICE

I. RESUMEN.....	01
II. OBJETIVOS.....	02
1. ANTECEDENTES.....	03
1.1 Alimentos funcionales	03
1.2 Nutracéuticos.....	04
1.3 El reto de utilizar un ingrediente funcional.....	05
2. MICROBIOTA INTESTINAL.....	06
2.1 Composición de la microbiota intestinal	06
2.2 Función.....	09
2.2.1 Papel protector de la microbiota contra infecciones y agentes tóxicos	09
2.2.2 Mecanismos protectores de la microbiota intestinal normal contra las enfermedades intestinales del huésped	11
2.3 Mecanismos de patogenicidad de bacterias en el intestino.....	12
2.3.1 Evolución del proceso infeccioso	13
3. PROBIÓTICOS.....	15
3.1 Definición.....	15
3.2 Microorganismos.....	17
3.2.1 <i>Lactobacillus</i> spp.	18
3.2.2 <i>Bifidobacterium</i> spp.	19
3.2.3 <i>Enterococcus</i> spp	20
3.2.4 Otras cepas probióticas	21
3.3 Mecanismo de acción	22
3.3.1 Mecanismos de interacción entre los probióticos y células epiteliales intestinales.....	23
3.3.2 Producción de bacteriocinas por BAL.....	25
3.4 Producción.....	28
4. PREBIÓTICOS	30
4.1 Definición.....	31
4.2 Clasificación oligosacáridos	30
4.3 Mecanismo de acción	36
4.4 Producción.....	38
4.4.1 La incorporación de prebióticos en los alimentos	38



5. SINBIÓTICOS.....	43
5.1 Definición	43
5.2 Mecanismo de acción	44
5.3 Producción.....	46
6. TECNOLOGÍAS USADAS EN LA PRODUCCIÓN.....	49
6.1 Vehículos	49
6.1.1 La leche o productos lácteos como vehículos	51
6.1.2 Vehículos no lácteos	51
6.1.2.1 Frutas y vegetales.....	52
6.1.2.2 Cereales y soya	54
6.1.2.3 Productos cárnicos	56
6.2 Liofilización y secado por aspersion.....	57
6.3 Encapsulación	59
6.3.1 Objetivos y definición de la encapsulación	60
6.3.2 Los materiales utilizados para encapsular células probióticas.....	61
7. EFECTOS SOBRE LA SALUD	65
7.1. Diarrea en niños y adultos	65
7.2 Enfermedad inflamatoria del intestino	68
7.3 Síndrome del intestino irritable.....	71
7.4 Riesgo de cáncer de colon.....	76
8. LEGISLACIÓN EUROPEA.....	78
8.1 Requisitos previos para un reclamo de la salud	77
8.2 Las funciones fisiológicas gastrointestinales beneficiosas	79
8.3 Efectos benéficos para la microbiota intestinal.....	81
8.4 Efectos benéficos para el sistema inmunológico	82
8.5 Declaraciones de propiedades saludables en estudios con intervención humana.....	84
8.6 Totalidad de pruebas	84
8.7 Retos específicos en el contexto de probióticos.....	85
8.7.1 Viabilidad	85
8.8 ¿Por qué las declaraciones de salud sobre la aceptación de probióticos y prebióticos no se aceptan?.....	87
9. LEGISLACIÓN EN MÉXICO Y ACCIÓN PUBLICITARIA.....	89
9.1 Etiquetado y especificaciones	89



9.1.1 Productos lácteos	90
9.2 El mercado nacional	91
9.2.1 Nestlé	92
9.2.2 Danone.....	93
9.2.3 Yakult.....	93
9.2.4 Otros productos.....	95
III CONCLUSIONES	96
IV. BIBLIOGRAFÍA	98



INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Índice de tablas.

Tabla 1. Evolución Histórica de la definición de Probióticos.....	16
Tabla 2. Algunos ejemplos de microorganismos que son considerados probiótico.....	18
Tabla 3. Ejemplos de cepas probióticas en productos.....	28
Tabla 4. Información sobre algunos proveedores de probióticos.....	29
Tabla 5. Información sobre algunos proveedores de prebióticos.....	42
Tabla 6. Métodos de dispersión para la encapsulación de probióticos.....	64
Tabla 7. Efecto de los carbohidratos de la dieta sobre las infecciones intestinales en los humanos.....	66
Tabla 8. Indicaciones basadas en la evidencia de probióticos y prebióticos en gastroenterología.....	67
Tabla 9. Efectos prebióticos y sinbióticos en enfermedad inflamatoria intestinal....	71
Tabla 10. Síntomas de alarma (no presentes en SII) y estudios sugeridos.....	72
Tabla 11. Efectos prebióticos y el síndrome de intestino irritable (SII).....	75
Tabla 12. Efectos considerados benéficos en función del tracto gastrointestinal.....	80
Tabla 12. Características de los productos comercializados por Yakult en México.....	94

Índice de figuras

Figura 1. La anatomía del tracto gastrointestinal, los principales grupos de <i>phylum</i> de bacterias y su abundancia en cada nicho.	08
Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de interacción que puede tener un probiótico.....	24
Figura 3. Oligosacáridos manufacturados a partir de lactosa (Gal: galactosa; Glu: glucosa; Fru: fructosa).....	33



Figura 4. Posibles mecanismos de acción de los prebióticos y su efecto
en la salud.....37

Figura 5. Modelo de acción directa de los oligosacáridos en la prevención
de infecciones.....39

Figura 6. Metodología para el desarrollo de un nuevo alimento sinbiótico.....48

Figura 7. Factores que podrían afectar la fisiología de probióticos.50

Figura 8. Plan general que describe los pasos para producir microcápsulas.....62

RESUMEN.

La demanda de alimentos funcionales ha aumentado debido a la nueva filosofía de alimentación, que busca un beneficio más allá de los nutrientes que puede ofrecer un producto. Este trabajo monográfico de actualización tiene como fin mostrar el panorama actual de los probióticos y prebióticos en la industria alimentaria, así como las más recientes definiciones propuestas tanto por investigadores de esta área, como por los organismos de legislación alimentaria mundial.

En primer lugar se abordan los términos de alimento funcional y nutracéutico como antecedentes inmediatos, seguido por los estudios más recientes acerca de la microbiota intestinal normal del adulto humano; esto nos sirve de referencia para analizar el término de probiótico, así como los microorganismos involucrados y las propiedades funcionales que estos aportan cuando son consumidos por un individuo.

En seguida se desarrolla el tema de los prebióticos, analizando las definiciones actuales, la clasificación de oligosacáridos, la producción mundial actual y las propiedades funcionales que aporta su consumo. En base a la evolución de los términos probiótico y prebiótico, se aborda el tema de los sinbióticos, tomando en cuenta los avances más recientes y los puntos básicos para la formulación de un alimento de este tipo, así como su producción. El uso de tecnologías recientes para la producción principalmente de probióticos es de gran importancia, ya que fomentan un estudio más detallado del mecanismo de acción, así como de la sobrevivencia de los microorganismos. Se revisan métodos como son la encapsulación, la liofilización y el tipo de matriz alimentaria que se usa como vehículo de entrega.

Los efectos benéficos de estos componentes en los alimentos se abordan desde la perspectiva en pruebas con humanos adultos sanos y enfermos. Se abordan temas específicos, como lo son la enfermedad inflamatoria del intestino, el síndrome del intestino irritable y el riesgo de cáncer de colon. Para cerrar este trabajo, se analiza la legislación correspondiente para estos ingredientes funcionales, particularmente de la Unión Europea como un caso especial actual, así como la legislación y el consumo de productos específicos en México.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Mostrar el panorama actual de los probióticos, prebióticos y sinbióticos en la industria alimentaria, así como la investigación científica que se lleva a cabo para su producción, consumo y legislación.

Objetivos particulares.

- Mostrar el papel en la salud de la microbiota intestinal, analizando su composición, función y su rol protector inmunológico, comparándolo con el proceso de infección bacteriana intestinal para determinar los puntos clave de la utilización de microorganismos benéficos como probióticos.
- Establecer la definición actual de probiótico y las características que debe cumplir para que sea considerado como tal; revisar los géneros de bacterias relevantes que han sido estudiadas detalladamente, así como su producción en el mercado mundial.
- Hacer una revisión general de los prebióticos y sinbióticos partiendo de su definición, clasificación y producción, así como el mecanismo de acción en el sistema gastrointestinal.
- Conocer las últimas tendencias en la producción de probióticos.
- Revisar los estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* de las enfermedades gastrointestinales que tienen como tratamiento el uso de probióticos, prebióticos y sinbióticos.
- Comparar la legislación de la Unión Europea con la del país para estos productos, abordando los temas de reclamos de salud y validación de pruebas.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.

“Que tu alimento sea tu medicina y tu medicina sea tu alimento” – Hipócrates, 500 A.C.

La nutrición en los seres vivos y en especial en el hombre, es imprescindible para su salud física y mental e indispensable por su actividad diaria y productividad. Hoy en día, la filosofía de alimentación estimula a los consumidores a buscar un beneficio más allá de nutrir, sino de ingerir aquellos alimentos que además puedan prevenir o contribuir al tratamiento de ciertas enfermedades. Este es el principio fundamental del concepto de un alimento funcional.

1.1 Alimentos funcionales.

La alimentación de los seres humanos es el conjunto de procesos biológicos, psicológicos y sociológicos que se relacionan con la ingestión de alimentos que proveen al organismo de los nutrientes que necesita, y logran la satisfacción intelectual, emocional, estética y sociocultural que es indispensable para tener una vida plena.

El interés por parte del consumidor en incluir en su alimentación algunas alternativas que contribuyan a mejorar su estado de salud y bienestar, ha llevado a que la industria alimentaria presente oportunidades para el mercado de los alimentos funcionales, ya que estos contribuyen a prevenir y contrarrestar el riesgo de algunas enfermedades, al ser incluidos como parte de una dieta saludable.

Japón fue el primer país que dispuso una legislación alimentaria para regular su consumo (Foods for Specified Health Use, FOSHU), y los define como: “Alimentos procesados que contienen ingredientes que ayudan a funciones corporales específicas, además de nutritivas” y clasifica a estos alimentos en 12 categorías entre las cuales se encuentran las bacterias lácticas (SERNAC, 2004).

La Union Europea define un alimento funcional: “Si contiene un componente alimenticio (sea o no un nutriente) con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, cuyos efectos positivos justifican que puede reivindicarse que es funcional (fisiológico) o incluso saludable”.

La Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos define a los alimentos funcionales como: “Alimentos modificados, o que tengan un ingrediente que demuestre una acción que incremente el bienestar del individuo o disminuya los riesgos de enfermedades, más allá de la función tradicional de los nutrientes que contiene”. Sin embargo, en este país, los alimentos funcionales no están legalmente definidos. Hasta la fecha, las Leyes de Etiquetado y Educación Nutricional, y la de Suplementos Dietarios, Salud y Educación, constituyen el marco para el tratamiento particular de cada caso.

La FDA (Food and Drug Administration) aprueba los productos alimenticios en función de su uso y de la información sobre salud que se encuentra en el rótulo del envase. En las etiquetas de los alimentos y de los suplementos dietéticos está permitido incluir dos tipos de declaraciones:

- Información sobre estructura y función, que describe los efectos en el funcionamiento normal del cuerpo.
- Información sobre reducción de los riesgos de enfermedades que impliquen una relación entre los componentes de la dieta y un trastorno de la salud, siempre y cuando haya sido permitida por la FDA y se halle respaldada por un número importante de pruebas científicas.

En el caso de México, no existe una norma oficial o documento donde se regule el uso de alimentos funcionales. En el capítulo 9 se aborda este aspecto regulatorio.

1.2 Nutracéuticos.

Se conoce con este término a “los componentes de un alimento que proveen beneficios para la salud de los seres humanos o para la prevención o tratamiento de enfermos afectados por determinados padecimientos o malestares”. Generalmente son productos elaborados a partir de alimentos para ser comercializados en forma de píldoras, polvos u otras presentaciones (Birute *et al.*, 2009).

Los nutracéuticos son extraídos de fuentes naturales que se caracterizan mediante procesos biotecnológicos para conservar sus propiedades originales sin hacer ningún tipo de manipulación química.

Su clasificación se determina:

- ✓ Por los nutrimentos que contiene, según se trate de carbohidratos, grasas, aminoácidos, vitaminas y nutrimentos orgánicos.
- ✓ Por los compuestos químicos que contienen: como fibra dietética, isoflavonas, antioxidantes, carotenos, licopenos, compuestos fenólicos, fosfolípidos, fitoesteroles y ácidos grasos omega 3 y 6.
- ✓ Probióticos: por contener microorganismos benéficos.

En virtud de sus propiedades biológicas, algunos de estos bioderivados actúan como medicamentos potenciales y pueden prescribirse como coadyuvantes terapéuticos con fines preventivos o curativos (Ross *et al.*, 2006; Biruete *et al.*, 2009).

En Estados Unidos el 47% de los hombres y el 50% de las mujeres toman diariamente vitaminas, nutrimentos inorgánicos, extractos herbales y otros suplementos. La creciente industria de los nutracéuticos surge en la intersección de los sectores alimentario, farmacéutico y agrícola, y es probable que influya en el futuro de todos ellos de modo significativo. Los nutracéuticos han evolucionado la ciencia de los alimentos y la nutrición y se han involucrado en el tratamiento de ciertas enfermedades y la reducción del riesgo de padecer éstas (Biruete *et al.*, 2009).

1.3 El reto de utilizar un ingrediente funcional.

Cuando se superan los retos tecnológicos, sensoriales y comerciales; y se logra demostrar tanto en el laboratorio como clínicamente que un ingrediente puede presentar un beneficio para la salud, queda el obstáculo de la aprobación por parte de las agencias regulatorias de salud en cada país. Las autoridades no sólo deben verificar que un ingrediente es inocuo, sino además comprobar la veracidad de sus supuestos beneficios a partir de su consumo, en las dosis establecidas. Legalmente muchos de estos productos al ser nuevos no tienen historial de uso, además no tienen función tecnológica (espesante, conservador, antioxidante, saborizante, etc) por lo que no se les puede considerar aditivos. En muchos países existen procesos legales claros para la aprobación de un aditivo, pero no de un ingrediente (USDA, 2009). En el capítulo 8 se revisará detalladamente el aspecto legal en Europa y en México se hará en el capítulo 9 de este documento.

CAPÍTULO 2. MICROBIOTA INTESTINAL.

El tracto gastrointestinal está compuesto por diferentes secciones o subdivisiones, a partir de la cavidad oral, el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y el intestino grueso (ciego, colon y recto). Una comunidad bacteriana distinta se puede encontrar en cada sección (Russell *et al.*, 2011).

2.1 Composición de la microbiota gastrointestinal.

El microbioma humano es un término que alude a los genomas de todos los microorganismos que viven en nuestro cuerpo, es decir, nuestra microbiota. El microbioma intestinal se define como la totalidad de los microorganismos (arqueas, hongos, virus, y bacterias), sus elementos genéticos (genomas) y las interacciones que se llevan entre sí en el intestino humano (Eammon, 2011).

Cuando un individuo nace, el tracto intestinal es estéril, pero las bacterias entran en el intestino con la primera toma de leche materna. Después de la infancia la composición del microbioma intestinal permanece relativamente constante. Los factores que influyen en este proceso son la microbiota materna, la dieta (bebés alimentados con seno materno vs alimentados con fórmula), tipo de parto, la gestación completa o prematuros, la exposición ambiental y las intervenciones clínicas, ya sea un tratamiento con antibióticos o cirugía gastrointestinal. Cabe destacar que la microbiota intestinal tiene, en general, una capacidad considerable para recuperarse cuando se ve afectada. (Eammon, 2011; Marchesi, 2011).

Estómago y duodeno. Alojamos números muy bajos de microorganismos: $< 10^3$ de células bacterianas por gramo de contenido a causa de la actividad motriz propulsiva física y los efectos antimicrobianos del ácido gástrico en el estómago y en el intestino delgado proximal.

Fundamentalmente se encuentran lactobacilos y estreptococos. Las secreciones ácidas, biliares, y pancreáticas suprimen la mayoría de los microbios ingeridos, lo que impide la colonización estable.

Yeyuno e íleon. Los recuentos bacterianos de colonias puede ser altos, alrededor de 10^9 UFC / mL proximal a la válvula íleo-cecal, con predominio de organismos Gram-negativos y anaerobios. Al cruzar en el colon, la concentración de bacterias y la variedad de la microbiota entérica cambia radicalmente.

Intestino grueso. Existen concentraciones de hasta 10^{12} UFC / mL, compuestas principalmente por anaerobios como *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium*, siendo las bacterias anaerobias las predominantes al sobrepasar a las bacterias aerobias en un factor desde 100-1000:1. A través de todo el trayecto del intestino, la composición de la microbiota también demuestra variación a lo largo de su diámetro con ciertas bacterias que tienden a adherirse a la superficie de la mucosa, mientras que otros predominan en el lumen.

La microbiota bacteriana normal entérica influye en una gran variedad de funciones intestinales y desempeña un papel clave en la nutrición, en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial, en el desarrollo de la inmunidad de las mucosas y en el metabolismo del hospedero.

La microbiota humana es un ecosistema muy complejo que puede llegar a contener más de 400 especies de bacterias, y tan sólo en el intestino delgado distal y el colon existe una amplia diversidad de bacterias, así como entre 10^{13} y 10^{14} microorganismos. Para dar una idea de su abundancia baste decir que aproximadamente el 50% del volumen de nuestras heces son bacterias que viven en el colon y que son arrastradas con los desechos de la digestión (Eammon, 2011).

En la figura 1 se puede observar la distribución de los grupos de bacterias presentes en cada una de las partes que forman el tracto gastrointestinal.

Los géneros predominantes en la microbiota intestinal, identificados por métodos moleculares, incluyen *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Dorea*, *Bacteroides*, *Alistipes* y *Bifidobacterium*. Dentro de la microbiota intestinal que es conocida, sólo unos pocos de los grandes grupos de bacterias se encuentran en altos niveles en las heces, los cuales incluyen a los anaerobios estrictos como *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* y *Peptostreptococcus*.

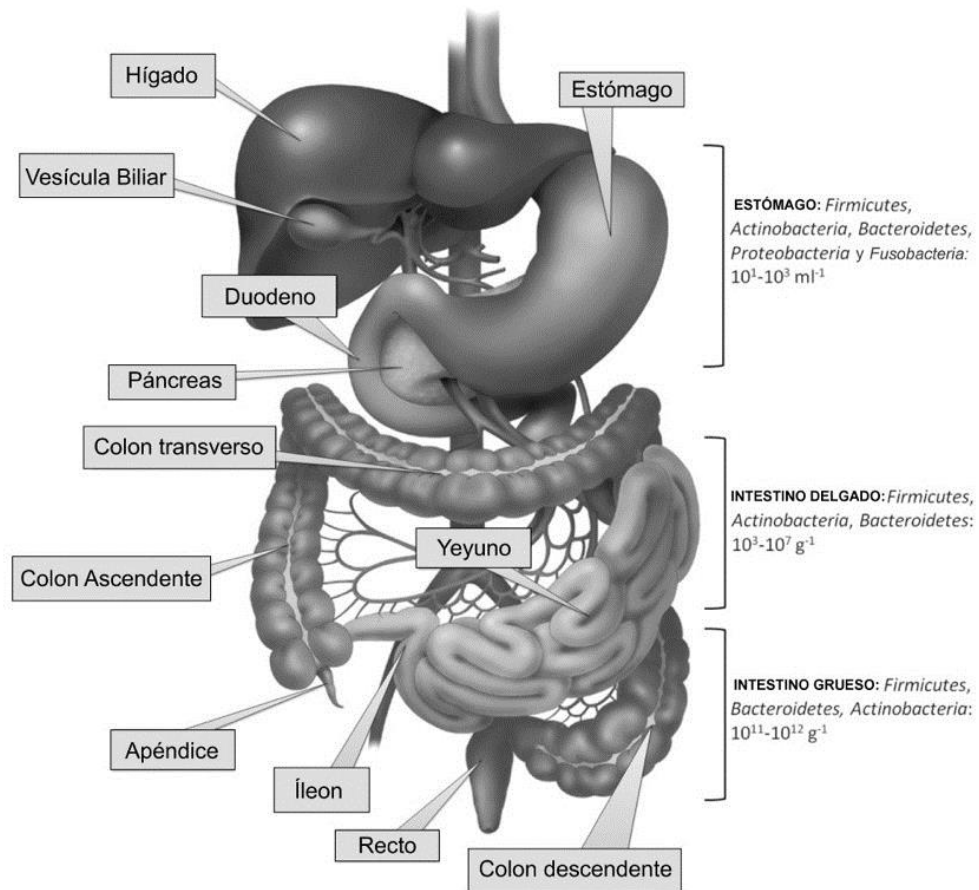


Figura 1. La anatomía del tracto gastrointestinal, los principales grupos de *phylum* de bacterias y su abundancia en cada nicho. (Marchesi, 2011).

La microbiota intestinal tiene muchas funciones importantes, tales como la síntesis de nutrientes, la digestión y la absorción, la estimulación inmune y el control de patógenos. En los seres humanos y ratones, se ha informado que la aparición de la obesidad se asocia con cambios en la abundancia relativa de los dos *phyla* dominantes de bacterias en el intestino, los Bacteroides y Firmicutes (Russell *et al.*, 2011).

2.2 Función.

2.2.1 Papel protector de la microbiota contra infecciones y agentes tóxicos.

El tracto gastrointestinal constituye una de las principales zonas de contacto con agentes ambientales potencialmente nocivos (bacterias, virus, toxinas y alérgenos) y desempeña una función primordial en la defensa del organismo frente a éstos. Su función protectora depende de los componentes estructurales y funcionales de la mucosa intestinal, del sistema inmune asociado y de sus interacciones con la microbiota intestinal residente y en tránsito (Sanz *et al.*, 2006).

Es indudable que ésta es una de las acciones más importantes desarrolladas por la microbiota intestinal. Nos asegura una protección contra las infecciones y la colonización del tracto digestivo por organismos patógenos que ingresan al intestino a través de los alimentos. Uno de los mecanismos de defensa del cuerpo está basado en el efecto barrera de la microbiota intestinal; las bacterias indeseables pueden ser completamente eliminadas o pueden subsistir en el tracto gastrointestinal en niveles insuficientes de población para efectos patogénicos amenazantes (Soriano, 2007).

Las células del epitelio intestinal, el moco que cubre la mucosa, el flujo sanguíneo que la irriga y las secreciones (fosfolípidos, bilis, péptidos antimicrobianos, etc.) constituyen de forma conjunta una barrera física y química que contribuye a la defensa del hospedero. El moco está integrado por mucinas (glucoproteínas), que son potenciales sitios de adhesión para las bacterias. La síntesis y la composición de las mucinas están reguladas genéticamente en cada individuo; además, las bacterias intestinales pueden contribuir a la regulación del repertorio de mucinas mediante la modificación de la expresión génica de glucosiltransferasas del hospedero y por regulación de sus propias enzimas glucolíticas.

Los patógenos normalmente alteran la permeabilidad intestinal, mientras que las bacterias comensales benéficas y los probióticos pueden contribuir al restablecimiento de ésta y de las uniones intercelulares, y favorecer la proliferación celular. La síntesis de péptidos antimicrobianos (defensinas) y proteasas implicadas en su activación en las células Paneth constituye un mecanismo adicional de defensa del hospedero frente a agentes patógenos. Tanto la producción de las defensinas como de las enzimas que las activan

puede ser modulada por la microbiota comensal y por bacterias probióticas. Por el contrario, algunos patógenos están desarrollando mecanismos de resistencia a esta barrera mediante la reducción de la expresión de dichos péptidos (Sanz *et al.*, 2006).

Sin embargo, cuando ocurren desbalances en la microbiota intestinal, los patógenos exógenos, y en su caso, también los patógenos endógenos, pueden desarrollarse y contribuir en el inicio de infecciones. Además, ciertas bacterias en la microbiota pueden tener efectos negativos sobre la salud del hospedero como resultado de varias actividades enzimáticas. Por ejemplo, en caso de un desbalance de la microbiota, la actividad de la β -glucuronidasa de ciertas bacterias puede incrementarse, lo que trae consigo la liberación de sustancias potencialmente carcinogénicas. También ciertas enzimas relacionadas al metabolismo del nitrógeno pueden degradar triptófano, indoles, nitratos y aminas secundarias, a derivados que tienen potencial carcinogénico (Soriano, 2007).

2.2.2 Mecanismos protectores de la microbiota intestinal normal contra las enfermedades intestinales del hospedero.

Producción de sustancias inhibitorias. Las bacterias de la microbiota intestinal normal producen una variedad de sustancias que son inhibitorias tanto para las bacterias Gram-negativas como positivas. Ellas producen componentes antimicrobianos (bacteriocinas), ácidos grasos volátiles, ácidos orgánicos y ácido láctico que reducen el pH intestinal. Estos componentes reducen el número de organismos patógenos viables en el tracto gastrointestinal (Soriano, 2007).

Bloqueo en los sitios de adhesión. La adherencia y colonización son cruciales para la exclusión competitiva de patógenos. La colonización también llevará a la modulación inmune. Por lo tanto, el contacto directo con las células epiteliales del intestino es un prerrequisito para algunos efectos probióticos sobre el sistema inmune. Estos ayudan al incremento de la actividad fagocítica leucocitaria contra las enterobacterias, un efecto que fue detectado siguiendo la administración de cepas probióticas en individuos sanos.

La microbiota intestinal compite directamente con los microorganismos patógenos intestinales por los sitios epiteliales de recepción en el tracto gastrointestinal; y así previene la adhesión y la colonización del tracto gastrointestinal de estos microorganismos potencialmente patógenos.

El uso de *Lactobacillus* GG a dosis de 10^{10} UFC viables por día y levaduras del género *Saccharomyces boulardii* a dosis de 1g por día permitió la colonización del intestino y la inducción de los efectos benéficos (Soriano, 2007).

Competencia por los nutrientes. La microbiota intestinal compite directamente con los organismos intestinales patógenos por los nutrientes esenciales para su sobrevivencia y multiplicación; siendo así inhibidora del crecimiento potencial y multiplicación de estos microorganismos (Soriano, 2007).

La estimulación de la inmunidad El sistema inmune asociado a la mucosa intestinal se considera el principal órgano inmunológico del organismo. Está constituido por tejido linfoide organizado, como los nódulos linfáticos mesentéricos y las placas de Peyer, y por linfocitos difusamente distribuidos a través de la lámina propia y el epitelio.

El sistema inmune asociado al intestino es capaz de reconocer determinados agentes exógenos (p. ej., componentes estructurales o toxinas microbianas) y secretar mediadores celulares (p. ej., inmunoglobulinas, citocinas, etc.) responsables del desencadenamiento de la respuesta inmune. La secreción de inmunoglobulina A (IgA) es una de las primeras defensas de la mucosa frente a microorganismos patógenos y su inducción en las placas de Peyer y la lámina propia depende de su interacción con la microbiota comensal. Asimismo, el tejido linfoide asociado al intestino y las células epiteliales poseen receptores (toll-like receptors) capaces de reconocer ciertas moléculas bacterianas, entre las que se encuentran los polisacáridos y los ácidos teicoicos. El mecanismo por el cual el hospedero es capaz de discriminar entre la microbiota comensal y la patógena se desconoce, pero se supone que existen distintas secuencias señal en los dos grupos de microorganismos cuyo reconocimiento por el hospedero desencadena, a su vez, diversas respuestas (proinflamatorias o no). La microbiota comensal se considera implicada en el desarrollo de la estructura y la funcionalidad del epitelio intestinal y, especialmente, de la inmunidad celular y humoral durante el periodo neonatal. Los ensayos de colonización intestinal realizados con animales libres de gérmenes han demostrado la correlación entre dicho

proceso y el desarrollo del sistema inmune. Además, recientes estudios han demostrado que la colonización intestinal está asociada a la maduración de la inmunidad humoral, particularmente a la producción de células secretoras de inmunoglobulina A y M en recién nacidos (Sanz *et al.*, 2006).

2.3 Mecanismos de patogenicidad de bacterias en el intestino

La patogenicidad es la propiedad de una bacteria para producir enfermedad infecciosa en un hospedero, siendo la virulencia la expresión de dicha capacidad. La enfermedad infecciosa es el resultado de un desequilibrio entre los factores de virulencia de una cepa bacteriana particular y los mecanismos de defensa de un determinado hospedero en contra de este último (Kuhn *et al.* 2002).

2.3.1 Evolución del proceso infeccioso

Se denomina infección a la multiplicación en el interior del hospedero de la bacteria patógena. En la mayoría de las infecciones por bacterias se diferencian las siguientes fases:

Colonización en el punto de entrada. Nuestra piel y mucosas intactas son una barrera muy eficaz contra la invasión de bacterias patógenas. Aunque constantemente interactuamos con miles de bacterias como parte de nuestra microbiota natural, sólo unas pocas especies son capaces de fijarse específicamente, reproducirse en nuestra piel y mucosas, y colonizarlas. En la mayoría de los casos es necesario que la bacteria patógena colonice la o las puertas de entrada para que posteriormente sea capaz de invadir al hospedero. La adhesión de las bacterias patógenas a las células del hospedero se realiza a través de receptores específicos que se enlazan firmemente con estructuras de la superficie bacteriana, adhesinas, de modo que las bacterias adheridas no sean arrastradas por el moco u otros mecanismos para su excreción. Es por eso que las adhesinas son factores de virulencia de las especies bacterianas patógenas. (Brooks *et al.*, 2008).

Algunas bacterias patógenas, especialmente Gram-negativas, emplean como adhesinas las fimbrias comunes. Así es como se adhieren, por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*. Muchas

bacterias Gram-positivas se adhieren mediante proteínas de la pared. *Streptococcus pyogenes*, por ejemplo, emplea las proteínas M y F de la pared, mientras *Staphylococcus aureus* se adhiere a través de proteínas y de los ácidos teicóicos de la pared. También las cápsulas y las biopelículas pueden ser adhesinas. *Pseudomonas aeruginosa*, por ejemplo, se adhiere a superficies lisas mediante los polisacáridos mucosos que excreta y crece formando biopelículas. *Streptococcus mutans* excreta glucano para adherirse a la superficie de esmalte de los dientes (Brooks, G *et al.*, 2008).

Invasión. Desde la puerta de entrada colonizada unas pocas especies causan daño mediante las toxinas secretadas que actúan a distancia en otros tejidos pero sin provocar invasión. El clásico ejemplo de proceso exclusivamente toxigénico es *Corynebacterium diphtheriae*. Esta bacteria se adhiere a la faringe donde se reproduce localmente, pero excreta una toxina diftérica que a través de la sangre alcanza el corazón, riñón y otros tejidos provocando los síntomas de la difteria.

Diseminación. Las bacterias patógenas pueden utilizar como vía de diseminación los vasos sanguíneos o los linfáticos para acceder rápidamente a los órganos y tejidos internos. La diseminación ocurre desde los puntos de entrada y se favorece en tejidos contiguos.

Algunos géneros de bacterias como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, y *Pseudomonas*, se extienden siempre por los espacios intercelulares del hospedero y para ellas evadir la fagocitosis es vital por lo que suelen presentar cápsulas como principal factor de virulencia. Otras son capaces de invadir y multiplicarse dentro de las células del hospedero. En la mayoría de los casos la multiplicación intracelular es una estrategia facultativa por parte de las bacterias para evadir los anticuerpos, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella* o *Brucella*. En el caso de los géneros *Rickettsia*, *Coxiella* y *Chlamydia*, la intracelularidad es obligada puesto que estas bacterias han perdido la capacidad de reproducirse autónomamente fuera de las células (Brooks *et al.*, 2008).

Superación de los mecanismos de defensa: una vez en el interior del hospedero y situadas en su tejido u órgano blanco, las bacterias patógenas para poder reproducirse

deben superar con éxito los distintos mecanismos que opone el sistema inmune a la invasión. En la mayoría de los individuos estos mecanismos son eficaces y controlan las infecciones bacterianas; sin embargo las especies patógenas han adquirido y mantenido durante su evolución estructuras o estrategias para evadir la fagocitosis, la acción lítica del complemento, los anticuerpos o la citotoxicidad, y estas estructuras son por tanto importantes factores de virulencia (Kuhn *et al.*, 2002).

Adaptación a las condiciones del hospedero. Los factores nutricionales que escasean *in vivo* en el entorno de la bacteria limitan su crecimiento. Para la mayoría de las especies patógenas el elemento limitante es el hierro porque dicho elemento en su forma libre es muy escaso en la sangre, encontrándose en su mayor parte ligado a proteínas del hospedero. Por eso las especies y cepas más virulentas han desarrollado unos sistemas enzimáticos de alta eficacia para fijar hierro en competencia con la lactoferrina o transferrina en el hospedero denominados sideróforos. Tener sideróforos permite a la bacteria patógena reproducirse a gran velocidad aventajando a los mecanismos inmunes por lo que son factores de virulencia importantes (Brooks *et al.*, 2008).

Daño: Las bacterias parásitas necesitan vivir a cuenta del hospedero pero no necesariamente causándole un daño aparente. De hecho, muchas infecciones por bacterias “patógenas” son por completo asintomáticas. Es decir, infección no es siempre sinónimo de enfermedad infecciosa. Por desgracia en algunos casos la infección da lugar a un daño directo provocado por las bacterias o sus productos, y también a veces la respuesta inmune específica frente a esa infección es causa indirecta de daño al hospedero. Durante la invasión de tejidos las bacterias pueden provocar directamente la lisis de células del hospedero y algunas producen exotoxinas que por diversos mecanismos enzimáticos dañan o destruyen muchas otras células. Las bacterias Gram-negativas además, produzcan o no exotoxinas, siempre poseen un componente tóxico en el lipopolisacárido de su membrana externa, llamada endotoxina. Los mecanismos de respuesta inmune frente a la infección bacteriana (inflamación, activación del sistema del complemento, la citotoxicidad, etc) cuando se producen en exceso o la infección se vuelve crónica, pueden resultar dañinos para las células del hospedero (Brooks *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2002).

CAPITULO 3. PROBIÓTICOS.

La naturaleza protectora de ciertos microorganismos, en particular de las bacterias lácticas presentes en alimentos y bebidas fermentadas tiene una larga historia. Los humanos han venido consumiendo cultivos de bacterias vivas durante siglos en forma de leche fermentada sin ningún tipo de conocimiento de los ingredientes activos o cómo funcionan (Kolida y Gibson, 2011).

Hace un siglo, en 1908, Elie Metchnikoff, científico ruso, premio Nobel, y profesor del Instituto Pasteur en Paris, postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL), ofrecían beneficios a la salud que llevaban a la longevidad. Sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal y utilizando microorganismos útiles para sustituir a los microbios proteolíticos como *Clostridium*, productores de sustancias tóxicas que surgen de la digestión de proteínas, entre las que se encuentran fenoles, indoles, y amoníaco. Desarrolló entonces una dieta con leche fermentada por la bacteria, a la que denominó “bacilo búlgaro” (OMGE, 2008).

3.1 Definición.

Es difícil identificar con certeza la primera vez que el término probiótico fue utilizado, pero se cree que una de las primeras citas fue por Vergin (1954), quien sugería que el equilibrio microbiano intestinal puede ser afectado tras el uso de antibióticos y que podría ser restaurado por una dieta de probióticos, incluidos en los alimentos fermentados. El término fue reintroducido en 1965 por Lilly y Stillwell quienes definieron a los probióticos como "sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos ", el antónimo de antibióticos.

En la tabla 1 se muestra algunas definiciones de “probiótico” que fueron propuestas en su tiempo por los investigadores en el área. Actualmente la definición más aceptada es de la FAO, la cual define a los probióticos como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un efecto benéfico sobre la salud del hospedero (FAO/WHO, 2001).

Tabla 1. Evolución histórica de la definición de probióticos.	
Bacterias específicas de la fermentación del yogurt que mejoran el balance microbiano intestinal.	Metchnikoff (1907)
Sustancias excretadas por un microorganismo para estimular el crecimiento de otro.	Lilly y Stillwell (1965)
Sustancias que tienen efecto benéfico en animales por su contribución al balance de la microbiota intestinal.	Parker (1974)
Alimentos suplementados con microbios vivos que benefician al hospedero animal a través de la mejora del balance microbiano intestinal.	Fuller (1989)
Cultivos únicos o mixtos de microbios vivos que, aplicados a humanos, afectan benéficamente al hospedero a través de la mejoría de la microbiota microbiana indígena intestinal.	Havenaar (1991)
Ingredientes alimentarios microbianos vivos que son benéficos para la salud (eficacia y seguridad científicamente documentada).	Salminen (1998)
Preparaciones celulares microbianas vivas o componentes celulares que tienen un efecto benéfico en la salud humana.	Salminen (1999)
Microbios vivos o inactivados que tienen efectos documentados en la reducción del riesgo de enfermar o como tratamiento coadyuvante.	Isolauri (2002)

Tomada de Barrio, 2006.

Los principales criterios que debe cumplir un microorganismo para ser caracterizado como probióticos son (Dunne *et al.*, 2001; Tannock 1998):

- ✓ Aunque ciertos probióticos comercialmente disponibles no son de origen humano, se cree que si un probiótico está aislado del tracto gastrointestinal humano es más seguro para el consumo y puede ser más efectivo en el ecosistema intestinal.
- ✓ Generalmente se busca que los a los microorganismos utilizados se les otorgue la clasificación GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA. Estos ingredientes, aditivos o alimentos son aquellos que han demostrado ser seguros para el consumo humano a través de procedimientos científicos o mediante la experiencia basada en el uso común en los alimentos, así como sobre la base de una historia sustancial del consumo por un número importante de individuos. Por ejemplo, las bifidobacterias y lactobacilos tienen una larga historia de consumo seguro, sin efectos nocivos para la salud humana.
- ✓ Los probióticos deben ser preparados a gran escala y en una forma viable. Para esto, es muy importante el vehículo específico de entrega.
- ✓ Los probióticos tienen que ser resistentes a la acidez gástrica y la toxicidad de ácidos biliares. Un pH gástrico bajo es uno de los principales mecanismos de

defensa del hospedero frente a microorganismos ingeridos, incluyendo probióticos.

- ✓ Los probióticos deben adherirse a las células intestinales humanas y a la mucosa intestinal. Esto mejora la sobrevivencia y la multiplicación en el intestino y puede promover la exclusión competitiva de posibles patógenos potenciales de la mucosa gastrointestinal.
- ✓ Los probióticos deben producir sustancias antimicrobianas contra patógenos intestinales para la restauración de una composición de la microbiota saludable.
- ✓ Los probióticos deben ser seguros en los alimentos y durante el uso clínico, incluso en individuos inmunodeficientes.
- ✓ Los probióticos deben tener eficacia y seguridad demostradas en estudios aleatorios y controlados con placebos en humanos.

En la actualidad, la idea de introducir cepas microbianas que tengan un potencial benéfico para el hospedero y mejorar su bienestar, es ampliamente aceptada, sin embargo, los microorganismos ingeridos debe sobrevivir las barreras fisiológicas que un patógeno común se encuentra. Como tal, tienen que sobrevivir el paso a través del estómago y el intestino delgado, hasta llegar al colon, donde tienen que competir con la microbiota intestinal ya establecida del hospedero.

3.2 Microorganismos

Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más usadas como probióticos, sin embargo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *E. coli* y *Bacillus* también son utilizadas con este fin (ver tabla 2). Las bacterias ácido lácticas (BAL) se clasifican según su morfología celular y la vía de fermentación utilizada para metabolizar la glucosa. No están muy extendidas, sus hábitats naturales son muchas plantas y son también una parte de la microbiota gastrointestinal (Abadías *et al.*, 2008). Estas bacterias se han encontrado en los alimentos fermentados tradicionales y actualmente se usan en procesos fermentativos controlados a nivel industrial. Son importantes para la industria alimentaria debido a su capacidad para transformar los azúcares fermentables en ácido láctico, etanol y otros metabolitos, los cuales cambian las características del producto al reducir el pH y la creación de condiciones desfavorables para el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos ya sea en productos alimenticios como en la microbiota intestinal humana. Se dividen en homofermentativas,

que producen ácido láctico como metabolito principal y heterofermentativas, que también producen etanol y dióxido de carbono. Algunas cepas de BAL aisladas de alimentos fermentados se han utilizado como probióticos debido a su resistencia al paso por el tracto gastrointestinal, así como la adhesión al epitelio y la prevención del crecimiento o la invasión de bacterias patógenas en el intestino animal. Entre los géneros de BAL más importantes son *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*. *Lactobacillus acidophilus* ha sido considerado como los lactobacilos predominantes en el tracto intestinal de los seres humanos sanos, y por lo tanto es el organismo más comúnmente usado en productos probióticos (Rivera y Gallardo, 2012).

En términos estrictos, sin embargo, el término “probiótico” debe reservarse para los microorganismos vivos que han demostrado en estudios controlados con humanos para producir un beneficio a la salud (OMGE, 2008).

Tabla 2. Algunos ejemplos de microorganismos que son considerados probióticos.		
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Otros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>thermophilus</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

Tomada de Senock *et al.*, 2005.

3.2.1 *Lactobacillus* spp.

El estudio del vínculo entre los lactobacilos y la salud humana comienza desde el siglo pasado cuando Metchkinoff comenzó a estudiar la relación entre los microorganismos que se encontraban en la leche fermentada. Aunque los alimentos que contienen lactobacilos probióticos son de consumo generalizado, todavía hay más información fragmentaria

sobre su diversidad, ecología y funcionalidad en términos de impacto en el hospedero. Los lactobacilos forman parte del ecosistema humano, además de los microorganismos autóctonos, los lactobacilos alóctonos también se adquirieron principalmente de los alimentos ingeridos y del ecosistema bucal. Hay 145 especies reconocidas dentro del género *Lactobacillus* que pertenecen al *phylum* de los Firmicutes (Stiles y Holzapfel, 1997; Claesson, 2008).

Típicamente, los lactobacilos seleccionados para la aplicación de probióticos son elegidos por su resistencia al paso a través del tracto gastrointestinal superior.

Hasta ahora, los lactobacilos intestinales importantes en muestras de heces de adultos son *Lactobacillus ruminis*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. paracasei*, y *L. reuteri*, así como relacionados a alimentos *L. sakei* y *L. curvatus* (Reuter, 2001; Heilig *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2007).

En muestras de heces infantiles se han aislado varias especies, especialmente de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. salivarius* (Satokari *et al.*, 2001). Los niveles de lactobacilos son bajos en el colon o en las heces, por lo general 0,2-1% de la microbiota total. El predominio de los lactobacilos cultivables en el estómago y, sobre todo el intestino delgado, que se obtiene de la autopsia, endoscopia, o biopsia en pacientes y voluntarios, sugiere que la abundancia de los lactobacilos es muy variable entre los individuos (Mueller *et al.*, 2006).

3.2.2 *Bifidobacterium* spp.

Las bifidobacterias se aislaron por primera vez de las heces de lactantes humanos, esto lo describe Tissier en la década de 1900, las cuales se asociaron con un tracto intestinal sano, debido a su superioridad numérica en lactantes amamantados comparada con lactantes alimentados con fórmula, los cuales sufrieron más a menudo de diarrea. Esta asociación se basa en una serie de observaciones experimentales, incluyendo el papel de estas especies en la regulación de la homeostasis intestinal y la modulación de las respuestas inmunitarias locales y sistémicas. Las bifidobacterias rápidamente colonizan el intestino de la mayoría de los lactantes durante los primeros días o semanas de vida debido a la selección por el pecho o leche de fórmula. En los bebés lactantes,

Bifidobacterium brevis es una especie frecuentemente detectada, seguida de *B. infantis*, *B. longum* y *B. bifidum* (Russell *et al.*, 2011).

En humanos adultos, la proporción de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal es de apenas un 3% de la microbiota total. La concentración de estas bacterias va disminuyendo gradualmente y los *Bacteroides* y *Eubacterium* van llegando a ser predominantes, aunque *Bifidobacterium* sigue siendo una parte vital de la microbiota. Un estudio en adultos de Europa nos dice que el contenido de bifidobacterias es aproximadamente del 4.4% respecto a la microbiota fecal y es la especie *B. longum* de las más comúnmente encontradas. En la vejez, las bifidobacterias se reducen en número, mientras que el de *Clostridium* y otras especies van en aumento. La composición global fecal de un individuo cambia con la edad, y en sujetos de edad avanzada se ha detectado una disminución en el número total de bifidobacterias y en la diversidad de especies. Esto puede jugar un papel en la susceptibilidad de estas personas a una enfermedad infecciosa (Russell *et al.*, 2011).

3.2.3 *Enterococcus* spp.

Los enterococos pertenecen a las bacterias del ácido láctico (BAL) y son de importancia tanto para la fermentación, como para el deterioro de los alimentos; por ejemplo pueden ser responsables del deterioro de productos cárnicos cocidos, pero también pueden contribuir al desarrollo de la maduración y el aroma de ciertos quesos o embutidos fermentados que a menudo se producen en el Mediterráneo. Sin embargo otras cepas de enterococos, por el contrario, están asociadas con las infecciones nosocomiales y causantes de enfermedades en humanos, tales como bacteriemia, endocarditis o infecciones del tracto urinario (Leavis *et al.*, 2004; Franz *et al.*, 2011).

El papel de estos microorganismos en la enfermedad humana plantea problemas para su uso seguro, ya sea como titulares en la producción de alimentos para consumo humano o como probióticos. Los estudios sobre la incidencia de factores de virulencia de los enterococos han demostrado que incluso los aislados de alimentos y otras fuentes naturales como las verduras, también pueden contener factores de virulencia y resistencia a los antibióticos (Leavis *et al.*, 2004).

La naturaleza tolerante de los enterococos con respecto a la sal y el pH, da lugar a niveles altos de crecimiento de estas bacterias en los alimentos fermentados. Sus propiedades benéficas y tecnológicas, tales como su impacto positivo sobre la maduración y la producción de aroma de las carnes fermentadas y la producción de aroma en quesos, así como de degradación de oleuropeína en las aceitunas, hace que estas bacterias sean interesantes para el desarrollo de cultivos iniciadores o cultivos co-iniciadores en la producción de tales alimentos. Sin embargo, la asociación de los enterococos con enfermedades humanas ha llevado a advertir su desarrollo como cultivos iniciadores, de modo que las aplicaciones industriales hasta la fecha han sido insignificantes. Entre los enterococos presentes en el tracto gastrointestinal, se encuentra a *E. faecalis* como especie predominante, aunque en algunos individuos y en algunos países, *E. faecium* puede predominar en este ecosistema (Franz *et al.*, 2011).

Los probióticos establecidos que incluyen enterococos son *E. faecium* SF68 ® (NCIMB 10415, producido por Cerbios-Pharma SA, Barbengo, Suiza) y *E. faecalis* Symbioflor 1 (Symbiopharm, Herborn, Alemania). Ambas cepas se producen en forma de preparados farmacéuticos.

La seguridad en el uso de los enterococos como probióticos es una preocupación válida. Por un lado, sus efectos promueven la salud y en algunas cepas tienen una larga historia de uso seguro. Por otro lado, se sabe que son patógenos oportunistas y son una causa frecuente de infecciones nosocomiales. Además, pueden llevar a resistencias a antibióticos al transferir elementos genéticos que codifican en casos específicos (Franz *et al.* 2011).

3.2.4 Otras cepas probióticas.

Saccharomyces boulardii. Es una levadura no patógena, y solamente es migratoria en el intestino humano, lo cual significa que no establece residencia en la membrana mucosa del tracto intestinal como los lactobacilos o las bifidobacterias. Al pasar por el intestino esta levadura tiene la habilidad de desplazarse agresivamente en las especies de levadura y bacterias patógenas; al mismo tiempo que no daña la microbiota intestinal normal.

S. boulardii es descrito como un probiótico que tiene la habilidad de afectar benéficamente el delicado balance de las bacterias intestinales y también tiene la capacidad de prevenir o reducir los efectos dañinos de organismos patógenos. El mecanismo de acción probiótica es probablemente por la producción de ácido láctico y acético; los cuales reducen el pH intestinal siendo así, inhibidores del crecimiento de bacterias y levaduras patógenas. También propicia a un buen medio ambiente para las bacterias intestinales residentes (lactobacilos y bifidobacterias). Hay algunos reportes en la literatura médica de infecciones (septicemia) en pacientes comprometidos inmunológicamente después del tratamiento con *S. boulardii* (Soriano, 2007).

3.3 Mecanismo de acción.

El uso de suplementos probióticos intenta reparar las deficiencias en el ecosistema gastrointestinal, sin añadir nada que no esté presente bajo condiciones naturales. Los probióticos suprimen la acción de los microorganismos patógenos por diferentes mecanismos. Establecen una competencia tanto por los nutrientes, como por los sitios de adherencia a las células del tracto digestivo, producen metabolitos tóxicos para otros microorganismos y crean en el intestino condiciones adversas para el desarrollo de los patógenos (OMGE, 2008).

Los probióticos inducen un conjunto de efectos metabólicos benéficos en el intestino. Ellos suprimen o disminuyen las reacciones que dan lugar a la producción de metabolitos tóxicos y carcinogénicos, estimulan las reacciones enzimáticas relacionadas con los procesos de detoxificación de sustancias producidas o ingeridas, son capaces de estimular sistemas enzimáticos o sustituir a los no presentes por deficiencias genéticas, además, pueden sintetizar vitaminas u otros nutrientes ausentes o no presentes en cantidades suficientes en la dieta (Prats, 2007).

Tienen efecto hipocolesterolemizante, reducen la absorción de sustancias tóxicas e incrementan la utilización digestiva de los alimentos. Los probióticos estimulan el sistema inmune mediante la activación de los macrofágos, la estimulación de las células inmunocompetentes o por la elevación de la concentración de inmunoglobulinas. Si se tiene en cuenta que el intestino humano tiene una superficie de 400 m² y que en él se localiza entre el 70 y el 80 % de la actividad inmune del organismo, el efecto de los

probióticos es de gran importancia sobre éste. El uso continuo de estos puede reforzar la inmunidad no específica de los animales y en consecuencia, los tratamientos infecciosos pueden reducirse (Prats, 2007).

Dentro de los beneficios no inmunológicos destacan la digestión de los alimentos y competencia con los patógenos por los nutrientes, la alteración del pH para crear un ambiente local desfavorable para patógenos, producción de bactericinas, fagocitar radicales superóxido, estimula la producción epitelial de mucina, aumenta la función de barrera intestinal, compite por adherencia con los patógenos y modifica las toxinas de origen patógeno (OMGE, 2008).

En la figura 2 se pueden observar una variedad de interacciones que van desde las metabólicas o de nutrientes a las de función inmune adaptativa de la mucosa. El esquema presentado no pretende proporcionar una visión completa. Las interacciones metabólicas pueden ocurrir en el nivel de interacción con microbiota endógena (competencia /cooperación en el metabolismo de nutrientes, digestión,) y con células de la mucosa (células epiteliales especialmente), proporcionando productos de fermentación como ácidos orgánicos que sirven de nutrientes para las células del hospedero. Las interacciones con las células epiteliales incluyen los efectos sobre la función de barrera, que puede incluir la modulación de la producción de mucina, o los efectos que conducen a la modulación de la función de unión fuerte, la actividad del sistema inmune innato, o apoptosis epitelial. La interacción con la mucosa del sistema inmune adaptativo es complicada por la complejidad del reconocimiento de los microorganismos asociados a patrones moleculares (Kleerebezem y Vaughan, 2009).

3.3.1 Mecanismos de interacción entre los probióticos y células epiteliales intestinales.

- La inducción de la síntesis de proteínas citoprotectoras de choque térmico.

Cuando las células epiteliales intestinales (CEI), están en contacto con el calor, el estrés osmótico, o la oxidación, activan un sistema de "tolerancia al estrés", basada en la inducción de proteínas de choque térmico (*hsp*). Las proteínas de choque térmico en el intestino incluyen *hsp25* (que estabiliza actina) y *hsp72* (que evita la desnaturalización de células). Estos mecanismos ayudan a mantener uniones estrechas entre las CEI, promoviendo así la función de la barrera de la mucosa. Los probióticos en el intestino inducen la producción de estas proteínas citoprotectoras (Aureli, *et al.*, 2011).

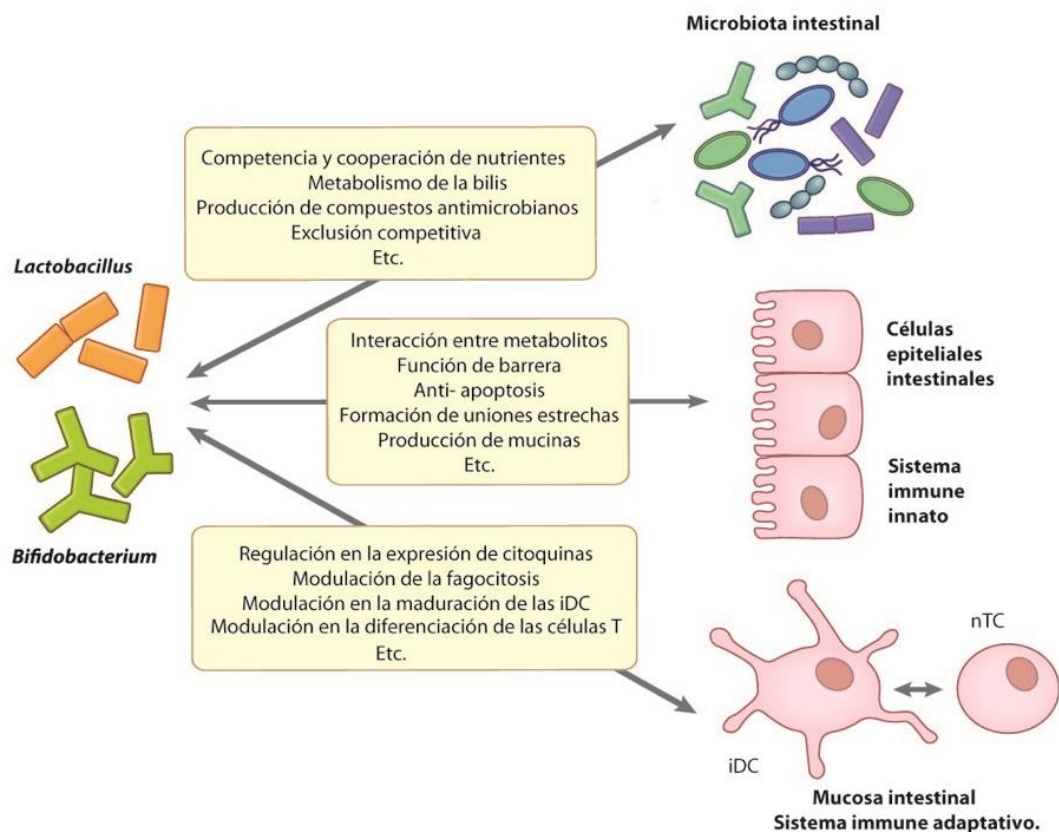


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de interacción que puede tener un probiótico (Kolida y Gibson, 2011).

- Modulación de los sistemas de señalización de la inflamación en CEI

Las CEI están equipadas con sistemas de señalización para activar la respuesta inmune y se enfrentan a una gran variedad de estímulos. La NFκB representa el sistema principal, que está presente en el citoplasma en su forma inactiva, unido a moléculas inhibitoras de la IκB por medio de fosforilación. En presencia de estímulos pro-inflamatorios, la IκB, se separa, por lo tanto, permite a NFκB migrar desde el citoplasma al núcleo, activando la transcripción de genes específicos. Algunos probióticos modulan la degradación de IκBα mientras que otros estimulan la NFκB para aumentar la secreción de citocinas. *Lactobacillus plantarum* inhibe la actividad de NFκB y la degradación de IκB *in vitro*. Otro

objetivo molecular modulado por los probióticos es PPAR γ , un receptor nuclear que puede regular el nivel de inflamación intestinal y, en particular, puede jugar un papel en el alivio de algunas enfermedades inflamatorias intestinales mediante la inhibición de la actividad de NF κ B (PPAR γ está presente en pequeñas cantidades en las CEI de los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino, o síndrome del intestino irritable). El tratamiento con cepas específicas de probióticos pueden aumentar la expresión de PPAR γ y por lo tanto, disminuir la inflamación en pacientes con EII (Aureli *et al.*, 2011).

- Regulación de la apoptosis

Algunos probióticos pueden regular la apoptosis de las CEI. *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 puede activar una proteína con anti-apoptóticos de acción. Algunos experimentos han demostrado que LGG activa la producción de dos proteínas, p75 y p40, que promueven la proliferación celular y activan la proteína Akt anti-apoptótica. La capacidad de los probióticos para regular la apoptosis también puede representar una estrategia útil para el control de las infecciones intestinales.

- La modulación de los sistemas de señalización de los macrófagos.

A nivel intestinal, los probióticos modulan diferentes sistemas de señalización de los macrófagos, con efectos sobre la inmunidad de la mucosa (Aureli *et al.*, 2011).

3.3.2 Producción de bacteriocinas por las BAL.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) especialmente lactobacilos, han adquirido especial atención debido a la producción de bacteriocinas. Estas sustancias son estructuras proteicas (pueden ser monómeros o polipéptidos) que poseen actividad antimicrobiana. Aunque las bacteriocinas podrían ser categorizadas como antibióticos, no lo son. La principal diferencia entre las bacteriocinas y antibióticos es que las primeras restringen la actividad metabólica de las cepas relacionadas con las especies productoras, mientras los antibióticos por otro lado, tienen un espectro de actividad más amplio. Además, las bacteriocinas se sintetizan ribosómicamente y son producidas durante la fase exponencial del crecimiento, mientras que los antibióticos son generalmente metabolitos secundarios (Zacharof *et al.*, 2012).

Las bacteriocinas se pueden aplicar en la industria alimentaria como conservadores naturales. El uso de las BAL y de sus productos metabólicos se considera generalmente como seguro (GRAS). La aplicación de los compuestos antimicrobianos como una barrera natural contra los agentes patógenos y evitar el deterioro de los alimentos causadas por agentes bacterianos, ha demostrado ser eficaz. Se pueden dividir en tres clases principales (Zacharof *et al.*, 2012).

Clase I Los lantibióticos: Son un grupo de sustancias peptídicas que contienen las estructuras características de los aminoácidos lantionina o metil-lantionina (policíclicos tioéter), así como los aminoácidos insaturados deshidroalanina y el ácido 2-aminoisobutírico. El principal representante de esta clase es la nisina, que es producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y se compone de 34 residuos de aminoácidos. Debido a la naturaleza ácida de su molécula, la nisina es completamente estable en solución a pH 2,0 y se puede almacenar durante mucho tiempo en el intervalo de temperatura de 2-7 °C, mientras que por encima de pH 7,0 su inactivación se produce incluso a temperatura ambiente (Balciunas *et al.*, 2013). Los estudios toxicológicos mostraron que la ingesta de la nisina no causa ningún efecto tóxico para los seres humanos con una dosis letal estimada (DL50) de 6950 mg / kg (próxima a la de la sal), cuando se administran por vía oral (Jozala *et al.*, 2007).

La nisina se ha estado utilizando en gran medida en la industria alimentaria como agente antibotulínico en queso, huevos líquidos, salsas y alimentos enlatados. Se exhibe una acción de amplio espectro antimicrobiano contra *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y otros patógenos. El mecanismo de acción consiste en la interferencia de la síntesis de la pared celular y formación de poros en la membrana celular. La nisina es la única bacteriocina aprobada para aplicación en alimentos por la Organización para la Agricultura y la Alimentación / Organización Mundial de la Salud (FAO / OMS) en 1969. Los productos lácteos pueden contener nisina como aditivo alimentario para el queso fundido en una concentración de hasta 12,5 mg / kg de nisina pura. Además, se incluye como ingrediente bioconservante en la lista europea de aditivos alimentarios, donde se le asignó el número E234 (Balciunas *et al.*, 2013).

Clase II. Se compone de pequeños péptidos termoestables (<10 kDa) con una estructura helicoidal anfifílica que permite su inserción en la membrana citoplasmática de la célula

diana, promoviendo así la despolarización de la membrana y la muerte celular (Zacharof *et al.*, 2012).

Existe una primer subclase que se compone de bacteriocinas que muestran alta especificidad contra *L. monocytogenes*. La pediocina PA-1, que se compone de 44 residuos de aminoácidos, se detectó inicialmente en *Pediococcus acidilactici* y desde entonces, otras cepas y especies de pediococos fueron descritos como productores de pediocina. Por lo general, son termoestables (121° C/15 min) y resistente a la liofilización y el almacenamiento a -20 ° C durante largos períodos de tiempo. Estos compuestos tienen actividad antimicrobiana selectiva, ya que no muestran antagonismo con *Leuconostoc* y *Lactococcus*, pero si lo existe con *C. perfringens*, *Clostridium botulinum*, *S. aureus* y en especial las especies del género *Listeria* (Balciunas *et al.*, 2013).

En una segunda subclase se incluye a bacteriocinas heterodiméricas, es decir, bacteriocinas que requieren la actividad combinada de dos péptidos. Normalmente, los genes están situados en el mismo operón y expresaron simultáneamente, y los dos péptidos actúan en combinación con frecuencia que muestra una importante acción sinérgica. Su mecanismo de acción implica también la disipación del potencial de membrana y una disminución en la concentración de ATP intracelular. Estos péptidos tienen una actividad muy baja cuando se emplean individualmente (Balciunas *et al.*, 2013).

Las bacteriocinas que pertenecen a una tercer subclase tienen un enlace covalente entre C y N terminales, lo que resulta en una estructura cíclica (Kawai *et al.*, 2004). La enterocina AS-48, circularin A y reuterin 6 son representantes de esta subclase.

Clase III. Esta reúne grandes bacteriocinas termolábiles (> 30 kDa) que tienen actividad compleja y estructura de la proteína. Su mecanismo de acción es diferente de los de otras bacteriocinas, en que promueven la lisis de la pared celular del microorganismo diana. Su porción N-terminal es homóloga a una endopeptidasa implicada en la síntesis de la pared celular, mientras que la parte C-terminal es responsable del reconocimiento de la célula diana (Zacharof *et al.*, 2012).

3.4 Producción.

En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de cepas probióticas que actualmente son comercializadas en productos, la tabla 4 muestra información sobre algunos proveedores mundiales de probióticos.

Tabla 3. Ejemplos de cepas probióticas en productos.		
Cepa (designaciones alternativas)	Nombre de marca	Fabricantes.
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 <i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Chr. Hansen
		Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter y Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru™ Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536 <i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Morinaga Milk Industry
		Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Mutaflor	Ardeypharm
		Chr. Hansen
		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001 <i>Lactobacillus casei</i> CRL431	Actimel,	Danone/Dannon
	DanActive	Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1) <i>Lactococcus lactis</i> L1A	LC1 Norrmejerier	Nestlé
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATTC 55730 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Retueri	BioGaia Biologics
	Vifit y otros	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21 <i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	Verum	Norrmejerier
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>) lio	DiarSafe, Ultralevure y otros	Wren Laboratories, Biocodex, y otros
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 y <i>Lactobacillus casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ International
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 y <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansen
Analizado como mezcla: VSL#3 (mezcla de 1 cepa de <i>Streptococcus thermophilus</i> , cuatro <i>Lactobacillus</i> spp y tres cepas de <i>Bifidobacterium</i> spp)	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011	A'Biotica y otros	Institut Rosell

Tomado de OMGE, 2008.

Tabla 4. Información sobre algunos proveedores de probióticos.		
Compañía	Descripción	URL
Biogaia	El cultivo de <i>Lactobacillus reuteri</i> viene en tres formas diferentes, prácticas para el productor: polvo liofilizado, DVS liofilizado (Direct Vat Set) gránulos, y gránulos congelados.	www.biogaia.com
Bio K +	Productor y vendedor de la mezcla de probióticos incluyendo <i>L. acidophilus</i> y <i>L. casei</i> .	www.biokplus.com
Chr. Hansen	La gama de cultivo de probiótico de la marca “nu-trish” consiste en Probio-Tec, Yo-Fast, y otras mezclas de cultivo con un perfil de viscosidad bien definido que fermenta rápidamente.	www.chr-hansen.com
Cerbios-Pharma	Productor de <i>Enterococcus</i> LAB SF 68.	www.cerbios.ch
Danisco	La división de cultivos produce, desarrolla, y comercializa cultivos de inicio, medios, coagulantes, y enzimas para queso, lácteos frescos, y otros productos alimentarios, y también provee cultivos probióticos para alimentos y suplementos, así como protectores de alimentos naturales.	www.danisco.com
Danone	Productor de varias marcas de productos lácteos fermentados que contienen probióticos.	www.danone.com
DSM	La línea Lafti de probióticos está formulada para garantizar su estabilidad, capacidad de sobrevida, y concentración, y contiene <i>L. acidophilus</i> (Lafti L10), <i>L. casei</i> (Lafti L26), y <i>Bifidobacterium</i> (Lafti B94).	www.dsm.com
Lallemand	Este proveedor canadiense suministra probióticos y biosuplementos para los nutraceuticos, alimentos funcionales, e industrias farmacéuticas.	www.lallemand.com
Probi	Esta compañía biotecnológica desarrolla y patenta cepas probióticas, entre las que se incluyen <i>L. plantarum</i> 299v y <i>L. rhamnosus</i> 271. <i>L. plantarum</i> 299 todavía no ha sido lanzada al mercado, pero está en la fase de obtención de licencia.	www.probi.com
Procter & Gamble	“Align” es un suplemento probiótico producido por P&G en cápsulas las cuales contienen <i>Bifidobacterium infantis</i> 35624.	www.aligngi.com
Valio	El probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG es el más investigado en el mundo y Danone recibió recientemente la licencia para comercializarlo en el mercado del yogurt en Estados Unidos. La familia GEFILUS, que contiene LGG, se comercializa a nivel mundial.	www.valio.fi
VSL Pharmaceuticals	VSL#3 es una mezcla de ocho cepas con 450 mil millones de bacterias vivas por paquete.	www.vsl3.com
Winlove	La compañía vende mezclas de cepas de probióticos para diferentes indicaciones.	www.winlove.com

El alcance que han tenido los probióticos en los últimos años está en expansión y presenta una de las mayores tasas de crecimiento dentro del mercado global de los “alimentos funcionales”. El número de nuevos productos aumenta cada año y, los progresos de la tecnología de alimentos permite su incorporación a productos variados.

CAPÍTULO 4. PREBIÓTICOS.

Gracias a la investigación metodológica y fundamental de los microbiólogos, existe un inmenso progreso reciente en la comprensión de la microbiota intestinal. Un gran número de estudios de intervención con humanos que se han realizado han demostrado que el consumo dietético de ciertos productos alimenticios puede resultar en cambios estadísticamente significativos en la composición de la microbiota intestinal en línea con el concepto prebiótico. Así, el efecto prebiótico es un hecho científico bien establecido.

4.1 Definición.

Un prebiótico se define como "un ingrediente alimentario no digerible que afecta benéficamente al hospedero mediante la estimulación selectiva del crecimiento y / o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y por lo tanto mejora la salud del éste" (Gibson y Roberfroid ,1995).

En 2004, los mismos autores redefinen el término prebiótico como "un ingrediente fermentado selectivamente que permite cambios específicos tanto en la composición, como en la actividad de la microbiota del tracto gastrointestinal, otorgando al hospedero bienestar y salud" (Gibson y Roberfroid, 2004).

La definición actualmente aceptada en 2008 por la ISAPP (International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics) define "Un prebiótico es un ingrediente alimenticio fermentado selectivamente, que como resultado provoca cambios específicos, en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, lo que confiere beneficio(s) a la salud del hospedero" (Rastall, 2010).

Los criterios para la clasificación de un prebiótico son:

- Compuestos con resistencia a la acidez gástrica, la hidrólisis por las enzimas digestivas de mamíferos y la absorción gastrointestinal;
- La fermentación por la microbiota intestinal;

- La estimulación selectiva del crecimiento y / o actividad(es) de uno o un número limitado de bacterias intestinales benéficamente asociados con la salud y el bienestar (Roberfroid, 2010).

4.2 Clasificación de oligosacáridos.

Los dos principales sustratos fermentables de origen alimenticio son los carbohidratos no digeribles y proteínas que escapan a la digestión en el intestino delgado. De éstos, la fermentación de hidratos de carbono es más favorable energéticamente, lo que conduce a un gradiente de la utilización del sustrato espacialmente a través del colon.

Los principales sustratos para el crecimiento bacteriano son carbohidratos no digeribles que resisten la hidrólisis superior intestinal y la absorción. Los carbohidratos no digeribles comprenden almidón resistente y dextrinas resistentes, fibra alimentaria (pectinas, arabinogalactanos, la goma arábica, la goma guar y la hemicelulosa), oligosacáridos no digeribles (por ejemplo rafinosa, estaquiosa, fructanos de inulina (FI), galactanos y mananos), así como porciones de los disacáridos no digeridos (por ejemplo lactosa) y alcoholes de azúcar (por ejemplo lactitol). El almidón resistente, las fibras dietéticas y también algunos oligosacáridos no digeribles se fermentan por una amplia gama de las bacterias del colon, aunque el grado de su hidrólisis varía. Sin embargo, algunos oligosacáridos no digeribles que entran en el colon son rápida y selectivamente fermentados (por ejemplo rafinosa, y galactanos) por un pequeño número de bacterias (bifidobacterias y lactobacilos) (Roberfroid, 2010).

Existen varios hidratos de carbono comercializados como prebióticos en todo el mundo, sin embargo sólo hay cuatro que están bien apoyados por datos de buena calidad de los ensayos en humanos. Estos son los fructanos inulina (FI) y fructooligosacáridos (FOS), los galactooligosacáridos (GOS), y el disacárido sintético lactulosa. En la figura 3 se pueden observar los oligosacáridos que son sintetizados a partir de lactosa.

Los fructanos.

La inulina es un polisacárido de la forma $\text{Glc } \alpha\text{-(1-2)-} [\beta \text{ Fru } 1\text{-2}]_n$, en la que $n > 10$. La estructura base de la inulina, los fructooligosacáridos (una versión de menor peso molecular) han sido los oligosacáridos más documentados por su efecto sobre

bifidobacterias intestinales y son considerados importantes sustratos prebióticos. Se producen en grandes cantidades en varios países y se agregan a varios productos como galletas, bebidas, yogures, cereales para el desayuno, y los edulcorantes. El término fructooligosacáridos se puede utilizar para representar dos diferentes tipos, ya sea derivados de inulina por hidrólisis, o por síntesis a partir de sacarosa. Los derivados de la inulina, FOS son de la forma $\text{Glc } \alpha\text{-(1-2) } [\beta \text{ Fru } 1\text{-2}]_n$, en la que $n = 2\text{-}9$. Los FOS derivados de sacarosa están en gran parte compuestos por una mezcla de tres oligosacáridos, es decir: (Glc-Fru_2) , (Glc-Fru_3) , y (Glc-Fru_4) . (Rastall, 2010)

Estudios realizados en cultivo por lote en donde muestras fecales fueron incubadas con inulina, FOS, almidón, povidexrosa, fructosa, y pectina durante 12 horas, han demostrado que hay un mayor número de bifidobacterias cuando se utiliza FOS e inulina, lo que indica la naturaleza prebiótica de estos sustratos y a su vez la preferencia de estos con respecto a la glucosa (Rastall, 2010; Roberfroid, 2010).

Galactooligosacáridos.

Los Galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos que contienen galactosa que de la forma $\text{Glc } \alpha\text{-(1-4)-[Gal } \beta \text{ 1-6] }_n$, en la que $n = 2\text{-}5$, y se producen a partir de medios de reacción con exceso de lactosa mediante la actividad transgalactosidasa de la enzima β -galactosidasa (Gänzle, 2012).

El término galactooligosacáridos tiende a ser utilizado genéricamente para cualquier mezcla de oligosacáridos derivados de la actividad por transgalactosilación de las β -galactosidasas. Los primeros informes de la fabricación y la evaluación de GOS utilizando la síntesis de éstos por una reacción de transgalactosilación se produjeron utilizando β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Gänzle, 2012). En la figura 3 se muestran los diferentes tipos de reacciones donde se parte de la lactosa para sintetizar algunos oligosacáridos prebióticos.

El producto comercial Oligomate® 55 se prepara utilizando beta-galactosidasas de *A. oryzae* y *Streptococcus thermophilus* y contiene 36% de tri-, tetra-, penta-, y hexa-galacto oligosacáridos, 16% de disacáridos de galactosil glucosa y galactosil galactosa, 38% de monosacáridos y 10% de lactosa.

La empresa láctea holandesa Campina Friesl fabrica un producto conocido como Vivinal® GOS, el cual se realiza mediante la enzima de *Bacillus circulans*, Como resultado se obtiene un producto con 59% de GOS y 41% de glucosa, galactosa y lactosa. Los oligosacáridos presentes son predominantemente disacáridos (19%) y trisacáridos (23%). Más recientemente, Clasado® Ltd ha comenzado a producir un BiMuno®. Este es un producto en polvo que contiene 52% de galactooligosacáridos. El producto se produce con β -galactosidasas de *Bifidobacterium bifidum* (Rastall, 2010).

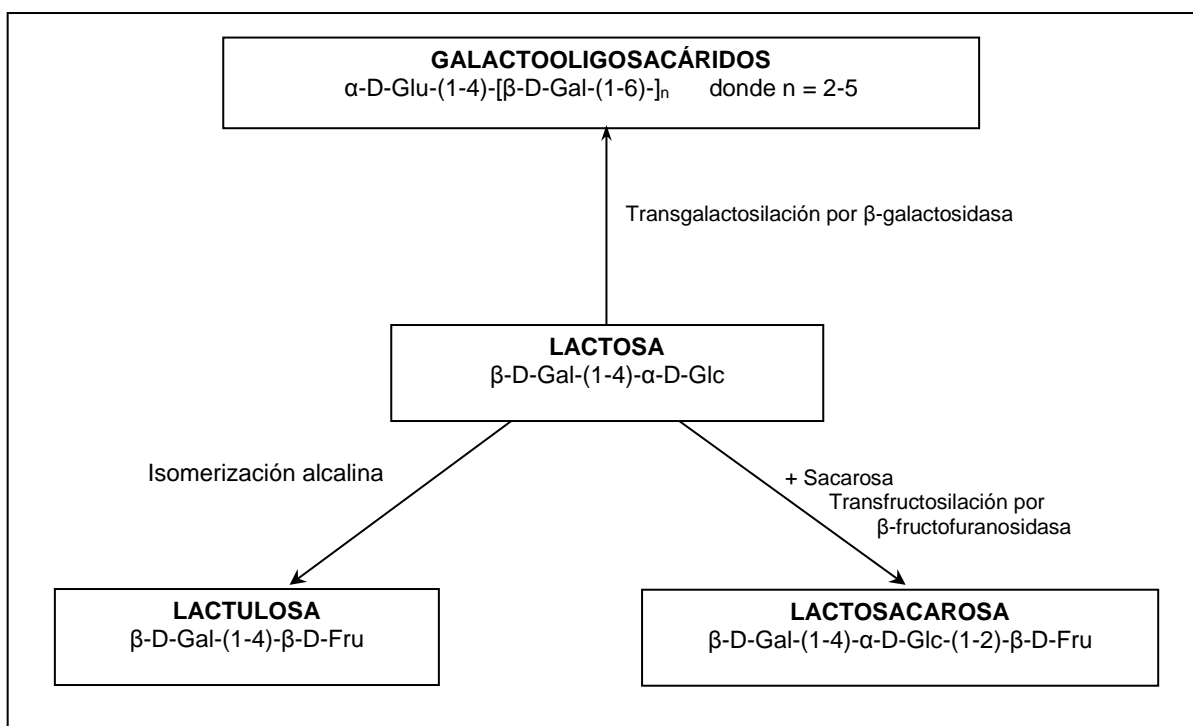


Figura 3. Oligosacáridos manufacturados a partir de lactosa (Gal: galactosa; Glc: glucosa; Fru: fructosa).

La lactulosa.

La lactulosa es un disacárido sintético con fórmula β -D-Gal-(1-4)- α -D-Fru. La lactulosa fue originalmente utilizada como un laxante, ya que no se hidroliza o se absorbe en el intestino delgado; también ha recibido la atención como un prebiótico potencial. Estudios han demostrado que la lactulosa aumenta el número de lactobacilos y bifidobacterias y disminuye el número de los Bacteroides en muestras mixtas de cultivos fecales. A pesar de que la lactulosa parece ser un prebiótico muy prometedor, todavía no se ha distribuido

ampliamente como tal. Cuenta con un mercado establecido como un producto médico para el estreñimiento y al parecer tienen mucho valor en el sector de la alimentación. (Rastall, 2010).

Los prebióticos emergentes

Hay varios otros oligosacáridos prebióticos en el mercado mundial, principalmente en Japón, que no tienen datos sólidos de estudios en humanos para apoyar a su condición de prebióticos. Con frecuencia, sólo se han llevado a cabo pequeños estudios de éstos, y la microbiología depende a menudo de las técnicas basadas en el cultivo. Es interesante ver cómo estos productos se desarrollan hacia un futuro.

Xilooligosacáridos.

Los xilooligosacáridos (XOS) son cadenas de moléculas de xilosa unidas por enlaces β -[1-4], aunque pueden estar sustituidos con arabinosil, restos acetilo, o restos glucuronil. Se producen por la hidrólisis enzimática de xilano de madera de abedul, avena, o mazorcas de maíz y los productos comerciales generalmente consisten de xilobiosa, xilotriosa, y xilotetraosa. Los XOS se utilizan principalmente en Asia, particularmente en Japón, donde son permitidos por la FOSHU (Alimentos para Uso de salud especificado). Los principales fabricantes son Suntory en Japón y Shandong Long live Biotechnology en China. Están disponibles en formas de alta pureza que contienen hasta 95% de XOS. Estos están siendo ampliamente utilizados en el mercado asiático, y se adicionan en una amplia gama de productos alimenticios, donde su estabilidad en calor (hasta 100 ° C) y acidez (pH 2,5-8,0) da una ventaja sobre otros prebióticos.

Los XOS no han sido especialmente bien estudiados en términos de su actividad prebiótica. Se han estudiado *in vitro* utilizando sistemas de cultivo por lotes, donde han demostrado ser muy selectivos para las bifidobacterias. Los primeros estudios probados en humanos han sido llevados a cabo en Japón, son no controlados y en pequeñas cantidades de sujetos involucrados (Rastall, 2010; Roberfroid, 2010).

Almidón resistente.

El almidón resistente es el término que se utiliza para la fracción de éste que no es digerido en el tracto gastrointestinal superior y que alcanza el colon para ser fermentada por la microbiota colónica. Hay cuatro clases de almidón resistente. RS1 es el almidón en forma físicamente inaccesible, tales como granos enteros y semillas; RS2 es almidón granular como el del plátano verde, papa y legumbres; RS3 es el almidón retrogradado que se encuentra en las papas cocidas, pan, etc; RS4 es almidón químicamente modificado tal como los ésteres de almidón. Además del almidón resistente que cae dentro de estas categorías, hay que considerar los productos de degradación de oligosacáridos de la digestión en el tracto gastrointestinal superior que pueden actuar como prebióticos en el colon (Rastall, 2010).

Oligosacáridos de soya.

Los principales oligosacáridos contenidos en la soya son la rafinosa y estaquiosa, los cuales resisten la digestión en el tracto gastrointestinal humano. Estudios realizados han demostrado que en cultivos puros, la rafinosa es promotora del crecimiento de *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. longum*, y *Bact. fragilis*, pero no por *E. coli* o *C. difficile*. Los oligosacáridos de soya actualmente no pueden ser considerados como prebióticos ya que no hay suficiente evidencia, y hay una necesidad de evaluar estos materiales en estudios bien diseñados en humanos (Rastall, 2010; Bang *et al.*, 2007).

Gluco-oligosacáridos.

Este nuevo grupo de oligosacáridos se ha sintetizado enzimáticamente, usando la glucosil-transferasa de *Leuconostoc mesenteroides*, para transferir las moléculas de glucosa a partir de la sacarosa donante, a un aceptor a saber, la maltosa. La fructosa a partir de la molécula de sacarosa es liberada, dejando una mezcla de gluco-oligosacáridos de diversos grados de polimerización. La mezcla compuesta es aproximadamente de 18% de mono-, di-, y trisacáridos, 18% de tetrasacáridos, 33% de pentasacáridos y 31% hexa y heptasacáridos que comprenden unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -(1-6) y α -(1-2) (Rastall, 2010).

Isomalto-oligosacáridos.

Los Isomalto-oligosacáridos (IMO's) se componen de monómeros de glucosa unidas por enlaces α -(1-6) glucosídicos. Una mezcla comercial conocida como isomalto-900 ha sido producida mediante la incubación de α -amilasa, pululanasa, y α -glucosidasa con almidón de maíz. Los oligosacáridos principales en esta mezcla son isomaltosa [Glc α -(1-6) Glc], isomaltotriosa [Glc α -(1-6) Glc α -(1-6) Glc] y panosa [Glc α -(1-6) Glc α -(1-4) Glc].

Los estudios *in vitro*, han mostrado resultados para el crecimiento de forma selectiva de las bifidobacterias con IMOs. Con el modelo de tres etapas del intestino se ha demostrado que IMOs de cadena más larga obtenidos por hidrólisis de dextrano da como resultado una microbiota que además de producir ácido láctico, facilita la generación de butirato. Como este se piensa que es metabolito deseable de la función del colon, puede ser que IMOs podría considerarse prebióticos eficaces (Rastall, 2010).

Lactosucrosa.

La lactosucrosa (LS) es un trisacárido no reductor [Gal β -(1-4) Glc α -(1-2) β -Fru], que es sintetizado por la reacción de transferencia de la β -fructosidasa usando sacarosa como donante y receptor. Existe una variedad de formas que son fabricadas por la empresa Ensuiko Sugar Refining Company and Hayashibara Shoji, Inc.

Hay muy pocos datos publicados sobre el potencial prebiótico de la LS, y no hay ningún ensayo a gran escala utilizando técnicas microbiológicas modernas. Se ha demostrado que la LS es selectiva para bifidobacterias en adultos sanos alimentados con LS en 8 g / día. Sin embargo, un estudio en enfermedad inflamatoria intestinal (EII) con una dosis de 8,5 g / día no mostraron ningún efecto bifidogénico los pacientes (Rastall, 2010; Roberfroid, 2010).

4.3 Mecanismo de acción.

El efecto prebiótico ha demostrado asociarse con modulación de biomarcadores y actividades del sistema inmune. Se ha demostrado que, en la nutrición infantil, el efecto prebiótico incluye un cambio significativo de composición de la microbiota intestinal, especialmente un aumento de las concentraciones fecales de bifidobacterias. Esto mejora

la calidad de las heces de forma concomitante (pH, frecuencia y consistencia), reduce el riesgo de gastroenteritis e infecciones, mejora el bienestar general y reduce la incidencia de los síntomas alérgicos tales como eczema atópico. En la figura 4 se observan algunos mecanismos de interacción del prebiótico cuando se encuentra en el organismo del hospedero.

La ingesta en la dieta de productos alimenticios particulares con un efecto prebiótico ha sido demostrada, especialmente en adolescentes, pero también provisionalmente en mujeres postmenopáusicas, para aumentar la absorción de calcio. Los datos recientes, tanto de los modelos experimentales y de estudios en humanos, apoyan los efectos benéficos de los productos alimenticios particulares con propiedades prebióticas en la homeostasis energética, la regulación de la saciedad y la ganancia de peso corporal (Roberfroid, 2010).

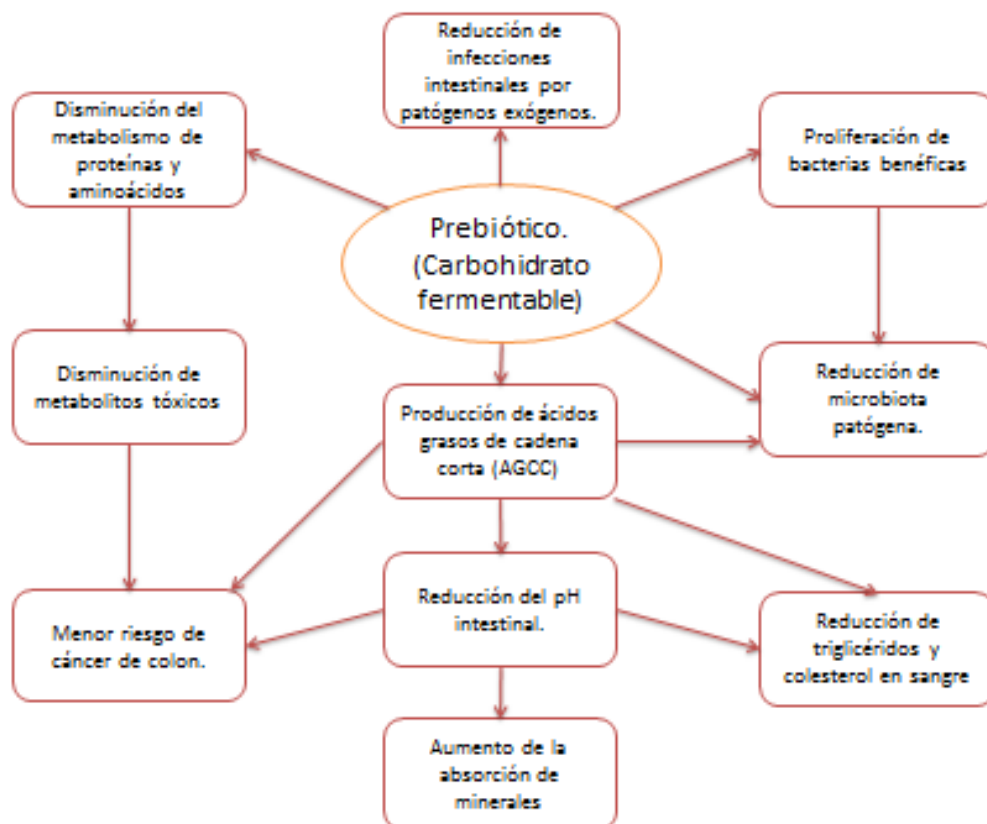


Figura 4. Posibles mecanismos de acción de los prebióticos y su efecto en la salud.

Los efectos anti-infecciosos de los oligosacáridos, se relacionan con su acción sobre la microbiota intestinal benéfica del hospedero. Es decir, con el soporte en el crecimiento de los lactobacilos y las bifidobacterias, que permite excluir a los patógenos del tracto gastrointestinal a través de a) la competencia por los sitios de adhesión en la mucosa, b) la disminución del pH, debida a la producción de los AGCC y c), la producción de sustancias inhibitoras como las bacteriocinas. Por otro lado, hay evidencia de que los lactobacilos y las bifidobacterias pueden modular el sistema inmune del hospedero, desencadenando una respuesta de defensa contra la infección.

Una acción más específica y directa de los prebióticos, para prevenir la infección, es su capacidad de actuar como análogos solubles de los receptores del tracto gastrointestinal, a los que se unen bacterias Gram-negativas. Para algunos investigadores este es el elemento principal de la protección de los oligosacáridos contra la infección. El principio se basa en el reconocimiento proteína-carbohidrato que se establece entre las lectinas microbianas y los glicoconjugados de la superficie celular. Lo anterior permite a la bacteria adherirse y posteriormente colonizar e invadir al epitelio intestinal. Este es el mecanismo que siguen, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Helicobacter jejuni*, y algunas especies de *Salmonella* y *Shigella*. La figura 5 indica cómo el oligosacárido sería capaz de prevenir la adhesión bacteriana y por tanto la infección (Domínguez *et al.*, 2009).

4.4 Producción

Naturalmente, los oligosacáridos están presentes en diversos alimentos; sin embargo es común que la matriz original no sea el vehículo adecuado para que puedan ser aprovechados al máximo, es por esta razón que se realiza la extracción de estos carbohidratos de su fuente, seguidos de una purificación y después puedan ser incorporados aquellos que son prebióticos, en la producción de alimentos funcionales.

4.4.1 La incorporación de prebióticos en los alimentos

Con el fin de ser incorporados en productos alimenticios, los prebióticos no deben afectar negativamente a las propiedades organolépticas del producto y ser estables durante el procesamiento de alimentos. Este último comprende esencialmente los procedimientos que implican altas temperaturas, pH bajo, o una combinación de los dos, y las condiciones que favorecen las reacciones de Maillard. Éstas tienen lugar entre los azúcares

reductores y los aminoácidos a altas temperaturas, resultando en la producción de compuestos de peso molecular alto y bajo, además de afectar a las propiedades organolépticas de los alimentos (Charalampopoulos y Rastall, 2012).

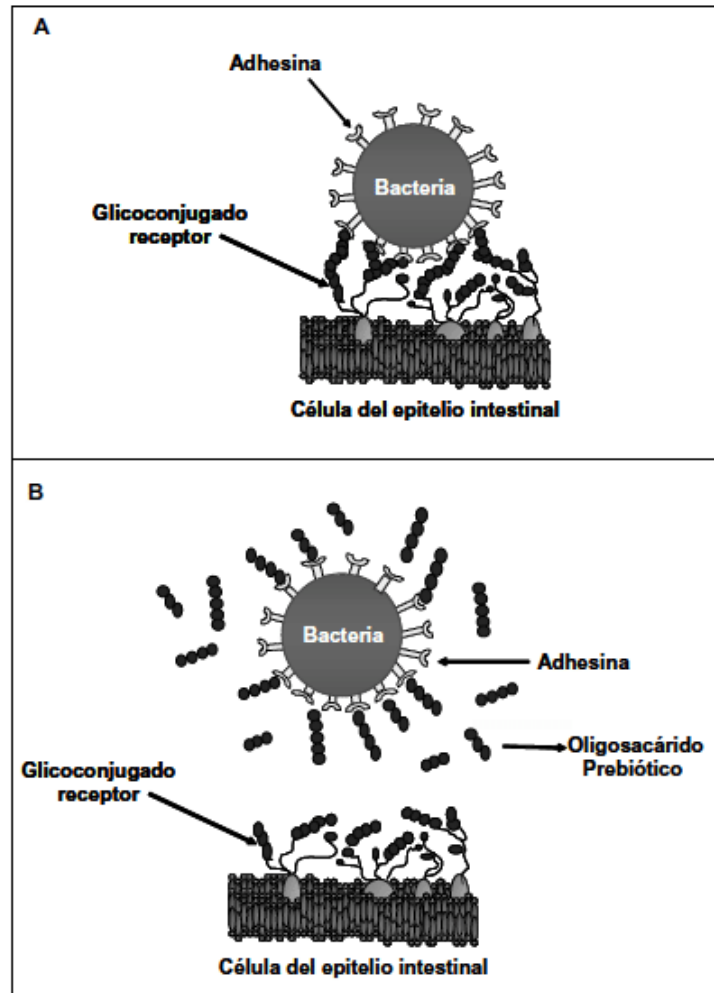


Figura 5. Modelo de acción directa de los oligosacáridos en la prevención de infecciones. A) Las adhesinas bacterianas reconocen a los receptores oligosacáridos en las células del epitelio intestinal. B) Inhibición de la adhesión bacteriana por prebióticos con estructuras similares a los glicanos receptores (Domínguez *et al.*, 2009).

Los GOS, en general, son muy estables a condiciones ácidas y temperaturas elevadas y por esta razón pueden ser potencialmente una opción para la incorporación en alimentos ácidos o que lleven tratamiento térmico, tales como yogures, leches fermentadas, suero

de leche, zumos de frutas pasteurizados, y productos de panadería, aunque su principal aplicación comercial es en las fórmulas infantiles, en los que están presentes en alrededor de 6.0-7.2 g/l, junto con 0,6-0,8 g/l de FOS (Charalampopoulos y Rastall, 2012).

La inulina y los FOS son menos estables que otros oligosacáridos en condiciones de pH bajo y altas temperaturas, especialmente la combinación de los dos. En condiciones muy ácidas, el enlace $\beta(2-1)$ entre unidades de fructosa puede estar parcialmente hidrolizado. En un estudio, usando zumos de frutas como matriz del alimento, se concluyó que los FOS son susceptibles a la hidrólisis durante la pasteurización, e incluso se pueden degradar más de un 80%, dependiendo de las condiciones. La baja estabilidad de los FOS en pH ácido, especialmente a temperaturas altas ($> 70^{\circ}\text{C}$), podría explicarse por el hecho de la fragilidad de los enlaces glicosídicos (Charalampopoulos y Rastall, 2012).

Otro aspecto tecnológico importante de los prebióticos es su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del producto alimenticio. Entre los prebióticos comerciales, la inulina se usa ampliamente en la industria alimentaria como un sustituto de la grasa o modificador de la textura. Tiene solubilidad moderada en agua (10% soluble a temperatura ambiente), que es conveniente para su incorporación en los sistemas de alimentación líquidos, tiene un sabor neutro y es ligeramente dulce (menos de 10% en comparación con la sacarosa). Debido a las propiedades anteriores, se utiliza principalmente en productos lácteos bajos en grasa como las leches fermentadas, yogures, postres lácteos, quesos y helados, como un sustituto de la grasa, y en productos horneados como un modificador de textura, a menudo en combinación con fibras alimenticias.

El uso de la inulina como sustituto de la grasa es particularmente adecuado, ya que contribuye a la palatabilidad del alimento, la razón de esto es por sus propiedades gelificantes; en una concentración elevada ($> 25\%$ en agua para la inulina nativa y $>15\%$ para la inulina de cadena larga) forma un gel debido a la formación de una red de partículas cristalinas. Más específicamente, después de mezclar con agua, se forma un gel blanco y cremoso, lo que proporciona una textura untada y la sensación en la boca de un producto graso suave. Las propiedades fisicoquímicas de inulina dependen considerablemente de su grado de polimerización, cadenas con grado de polimerización

(DP>10) forman un gel más fuerte, ya que al tener una solubilidad más baja, se cristalizan más rápidamente (Charalampopoulos y Rastall, 2012).

Los FOS por el contrario son mucho más solubles que la inulina (hasta 85% soluble a temperatura ambiente). Son bastante dulces (30-35% en comparación con la sacarosa) y tienen propiedades tecnológicas similares a los jarabes de sacarosa y glucosa, y como resultado, se utilizan con frecuencia como sustitutos de azúcar. Han sido aplicados en una variedad de productos lácteos, ya que son los ingredientes ideales para dar mayor dulzor con menos calorías y aumentar el valor funcional sin comprometer el sabor y la sensación en la boca de los productos. También se utilizan en productos horneados y panes para sustituir el azúcar y para retener la humedad en el producto.

En lo que respecta a los Gluco-oligosacáridos, hay pocos ejemplos comerciales que los contengan en productos alimenticios, y muy poca información sobre el impacto de los mismos en las propiedades físico-químicas de la industria alimentaria. Estos son, como otros oligosacáridos, muy solubles en agua, ligeramente dulces (30 - 35% en comparación con la sacarosa) y se puede utilizar para mejorar las propiedades de textura de los productos lácteos, tales como yogures. También son ingredientes adecuados para su uso en productos de panadería y horneado, debido a su capacidad de retención de humedad, así como en los zumos de frutas debido a su estabilidad frente a pH bajo (Charalampopoulos y Rastall, 2012)..

Como nota final, debe ser resaltada la importancia de llevar a cabo una investigación más a fondo sobre el impacto tanto de los prebióticos establecidos y emergentes en las propiedades de textura, reológicas, sensoriales y nutricionales cuando son aplicados a los productos alimenticios.

En la tabla 5 se muestran algunos ejemplos de compañías proveedoras de oligosacáridos y su fuente de obtención.

Tabla 5. Información sobre algunos proveedores de prebióticos.

Compañía	Descripción	URL
Abaran Materias Primas S.L.	Producción de Inulina.	http://www.afca-aditivos.org/fitxa.asp?p_assoc=101
Comercial Química Massó S.A.	Dedicada a la producción de probióticos, prebióticos (lactulosa y lactoferrina) y péptidos.	http://www.cqmasso.com/
GTC Nutrition	Los fructo-oligosacáridos (scFOS) de cadena corta de NutraFlora son fibras prebióticas naturales derivadas de la caña de azúcar o remolacha azucarera.	www.gtcnutrition.com
Innova Food S.L.	Producción de inulinas y fructooligosacáridos de la raíz de achicoria.	http://www.innovafood.net/
Megafarma S.A. de C.V.	Producción de inulinas y fructooligosacáridos de la raíz de achicoria.	http://www.megafarma.com.mx
National Starch	El almidón resistente basado en maíz de marca Hi-Maize tiene múltiples efectos benéficos – entre ellos, que actúa como prebiótico para la salud digestiva.	www.hi-maize.com
Orafti	BeneoSynergyl es un prebiótico patentado único en su tipo, con inulina enriquecida con oligofructosa, utilizado en el proyecto pionero SynCan que estudia la relación entre los sinbióticos y el cáncer de colon.	www.orafiti.com
Solvay	Productor de lactulosa (Duphalac) para el tratamiento de la constipación y la hepatoencefalopatía.	www.solvay.com
Sensus	La inulina Frutafit y los fructo-oligosacáridos (FOS) son fibras dietéticas con propiedades bifidogénicas/prebióticas, adecuadas para una serie de sistemas de alimentos como aporte de fibra, para reducir las calorías, y suplantar azúcares y grasas.	www.sensus.us

CAPÍTULO 5. SINBIÓTICOS.

La palabra sinbiótico deriva del griego "συν" y "βίος", que literalmente se traducen en conjunto y de la vida. El uso de las dos palabras juntas también implica la sinergia.

El término en inglés "synbiotic" no tiene una traducción concreta al español, ya que por las reglas gramaticales de la real academia española se traduciría a "simbiótico", sin embargo este término remite a la simbiosis entre dos organismos, lo cual es un concepto diferente al que se refiere la unión del probiótico y prebiótico.

Con base en la evolución de los términos probióticos y prebióticos, un sinbiótico consiste de probióticos (que son microorganismos vivos presentes en cantidades adecuadas que confieren un beneficio a la salud en el hospedero), y prebióticos (los componentes no viables de alimentos, ingredientes o suplementos que modulan selectivamente la microbiota de los ecosistemas digestivos, además de que mejoran la supervivencia y la implantación de los probióticos en el tracto gastrointestinal mediante la estimulación selectiva del crecimiento y /o mediante la activación del metabolismo de una o un número limitado de bacterias que mejoran el bienestar de hospedero) (Kolida y Gibson, 2011).

5.1 Definición.

El concepto sinbiótico se introdujo por primera vez, junto con el de prebióticos como "mezclas de probióticos y prebióticos que afectan benéficamente al hospedero al aumentar la supervivencia microbiana mediante la implantación de suplementos dietéticos microbianos en el tracto gastrointestinal, estimulando selectivamente el crecimiento y /o activando el metabolismo de una o un número limitado de bacterias, lo que mejora el bienestar y promueve la salud del hospedero "(Gibson y Roberfroid, 1995).

Desde la primera introducción de este concepto en 1995, los sinbióticos no han sido redefinidos. Su definición se ha desarrollado como resultado de los cambios en las definiciones de los probióticos y prebióticos, sin embargo también es necesario un marco más riguroso para los sinbióticos.

Sobre la base de la definición actual, existen dos tipos de enfoques sinbióticos:

- ✓ Complementaria, mediante el cual el probiótico se elige en función específica de acuerdo a los efectos benéficos deseados en el hospedero y el prebiótico es elegido de forma independiente para aumentar selectivamente las concentraciones de la microbiota en general. El prebiótico puede promover el crecimiento y la actividad de los probióticos, pero sólo de manera indirecta dentro del rango de su objetivo.
- ✓ Sinérgico, por lo que el probiótico es elegido específicamente de acuerdo a los efectos benéficos sobre el hospedero, pero el prebiótico es elegido para estimular el crecimiento y la actividad específica del microorganismo seleccionado. Aquí, el probiótico se selecciona para tener una mayor afinidad por el prebiótico y se elige para mejorar su supervivencia y el crecimiento en el hospedero. También puede aumentar los niveles de microbiota gastrointestinal benéfica, pero el objetivo principal es la ingestión de probióticos (Kolida y Gibson, 2011).

Ambos enfoques pueden, directa o indirectamente, cumplir con la definición de sinbiótico. Sin embargo, el enfoque sinérgico es el más relevante con la definición actual de sinbiótico. Los dos enfoques tienen implicaciones diferentes. Por ejemplo, el enfoque complementario dirige por separado el bienestar del hospedero con un probiótico y un prebiótico. Debido a esto, cada componente debe ser administrado en una dosis tal, que provoque un efecto deseable a través del vehículo de administración. Una relativamente alta dosis de prebióticos (comúnmente más de 6g d⁻¹ para adultos) es requerida para mediar un efecto sobre la microbiota intestinal, en la mayoría de los casos, excluyendo la opción de encapsulación. Con un enfoque sinérgico, el sinbiótico se percibe como un sólo producto, mediante el cual el papel principal del prebiótico es mejorar la supervivencia y la implantación de los probióticos. La consecuencia es que la dosis necesaria de prebiótico puede estar limitada a este solo efecto, y como tal se requiere una dosis menor del probiótico (Kolida y Gibson, 2011).

5.2 Mecanismo de Acción.

Estudios realizados en la administración de sinbióticos han dado como resultado un aumento en el número de microorganismos benéficos en la microbiota intestinal.

Casiraghi *et al.*, (2007) investigaron el efecto de un producto lácteo sinbiótico que contiene 10^7 UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* 74-2, 10^7 UFC/mL de *Bifidobacterium lactis* 420, y 2% de Raftiline (inulina, DP10, Orafti) en 26 adultos sanos, en un estudio aleatorizado, controlado con placebo. Los aumentos significativos de lactobacilos y bifidobacterias en las muestras fecales, se observaron después de la ingestión del sinbiótico.

Dos estudios recientes han investigado los efectos en voluntarios sanos de edad avanzada. Bartosch *et al.*, (2005) investigaron una fórmula sinbiótica que contiene un total de aproximadamente 3.5×10^{10} UFC de *Bifidobacterium bifidum* BB-02 y 3.5×10^{10} UFC *B. lactis* BL-01 y 6g de Sinergia 1 en una cápsula de gelatina en 18 voluntarios sanos de edad avanzada en un estudio doble ciego, aleatorizado y controlado. La intervención aumentó la frecuencia de las deposiciones y cuenta de bifidobacterias y lactobacilos en la materia fecal. Al final del estudio, tres semanas después de la interrupción del tratamiento, al menos uno de los probióticos todavía era detectable en las heces. Ouwehand *et al.*, (2009) investigaron el efecto de 2×10^9 UFC/g *L. acidophilus* NCFM (Danisco) en combinación con 5 g de Lactitol en un estudio paralelo, doble ciego, controlado con placebo, a 51 voluntarios sanos de edad avanzada. Se observaron aumentos significativos en cuenta fecal de bifidobacterias y lactobacilos.

Básicamente, el mecanismo de acción de los sinbióticos es la unión tanto de los efectos benéficos de los probióticos y los efectos específicos de los prebióticos para la cepa con la que está en conjunto, ya que parte de la colonización exógena de los probióticos combinados con prebióticos aumenta la acción de los primeros en el tracto intestinal. Posteriormente, se desencadena la acción de los probióticos en el individuo a quien sea administrada la fórmula sinbiótica (Raizel *et.al.*, 2011).

Debido a los efectos beneficiosos producidos por los probióticos y prebióticos, ha habido un interés considerable por la industria y por los investigadores en el desarrollo de productos alimenticios y estudios, respectivamente, y los microorganismos que contienen estos ingredientes funcionales.

Existen posibles indicaciones de eficiencia de sinbióticos en situaciones clínicas como son: la diarrea viral aguda, diarrea del viajero, las infecciones y las complicaciones de la

infección gástrica por *Helicobacter pylori*, encefalopatía hepática, diarrea en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, síndrome del intestino irritable, diarrea en pacientes con nutrición enteral a través de una sonda nasogástrica, radioterapia que involucra la pelvis, enfermedad inflamatoria intestinal, alergia, carcinogénesis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, estreñimiento, salud urogenital de la mujer, la reducción del colesterol plasmático y los triglicéridos, la densidad mineral y la estabilidad ósea particularmente (Raizel *et.al.*, 2011).

Además se proponen varios efectos como resultado del consumo de alimento sinbiótico, entre las que destacan: la reducción de las citocinas proinflamatorias, estimulación del sistema inmunológico y reducción de las infecciones intestinales. Sin embargo, se necesitan más estudios aleatorios, doble ciego, para demostrar la mayor parte de los beneficios sugeridos por la literatura, así como para determinar la seguridad, dosis, posibles efectos secundarios y los tipos de compuestos específicos para diversas enfermedades (Kolida y Gibson, 2011; Raizel *et.al.*, 2011).

5.3 Producción.

La figura 6 resume los pasos sugeridos para establecer la eficacia de los componentes probióticos y prebióticos y por un producto sinbiótico final. En pocas palabras, cada ingrediente alimentario/ microorganismo presente en la fórmula sinbiótica debe estar totalmente caracterizado utilizando las últimas tecnologías disponibles. Los criterios para cada grupo se establecen en conjunto con las determinaciones de seguridad tanto para el probiótico como para el prebiótico, así como una combinación de los dos. La eficiencia tanto *in vitro* como *in vivo* tendrá que ser examinada. La especificidad del prebiótico para la estimulación selectiva del/los probiótico(s) seleccionado(s) también debe establecerse. Las indicaciones del potencial de crecimiento de un probiótico sobre un sustrato seleccionado pueden obtenerse a través de una exploración genómica de los espectros de la glicosidasa del microorganismo, que puede permitir una selección racional de los prebióticos potenciales. La eficacia sinbiótica debe establecerse realizando estudios *in vivo*, estudios doble ciego, estudios aleatorios, controlados con placebo y con seres humanos. (Kolida y Gibson, 2011).

Las curvas de crecimiento experimentales proporcionan información sobre un prebiótico para alcanzar las más altas tasas de crecimiento y los rendimientos de células para el probiótico. Sin embargo, estos experimentos son limitados en el grado de información que pueden proporcionar, ya que no examinan la interacción con la demás microbiota del comensal y no puede proporcionar información sobre la afinidad de la microbiota restante para el prebiótico seleccionado. (Kolida y Gibson, 2011).

Los componentes probióticos y prebióticos de la formulación deben ser probados por sí solos, en primera instancia, seguidos de pruebas en conjunto. Este tipo de experimentos proporcionan información sobre cada uno de los componentes y si puede mediar un efecto sobre la microbiota fecal cuando se utilizan solos, así como si la combinación sinbiótica puede mediar un efecto superior. El uso de metodologías con base molecular, provee información sobre la supervivencia del probiótico en un entorno mixto fecal durante el período de fermentación, así como obtener el mecanismo de la actividad sinbiótica, sinérgica, o complementaria.

La eficacia sinbiótica debe establecerse realizando estudios *in vivo*, estudios doble ciego, estudios aleatorios, controlados con placebo y con seres humanos. Para los estudios en humanos, es importante que el sinbiótico sea administrado, de preferencia, con la formulación que va a ser comercializada, ya que refleja cómo puede influir, no sólo en la vida de anaquel, sino también en la supervivencia de los probióticos y los impactos potenciales en el hospedero (Kolida y Gibson, 2011).

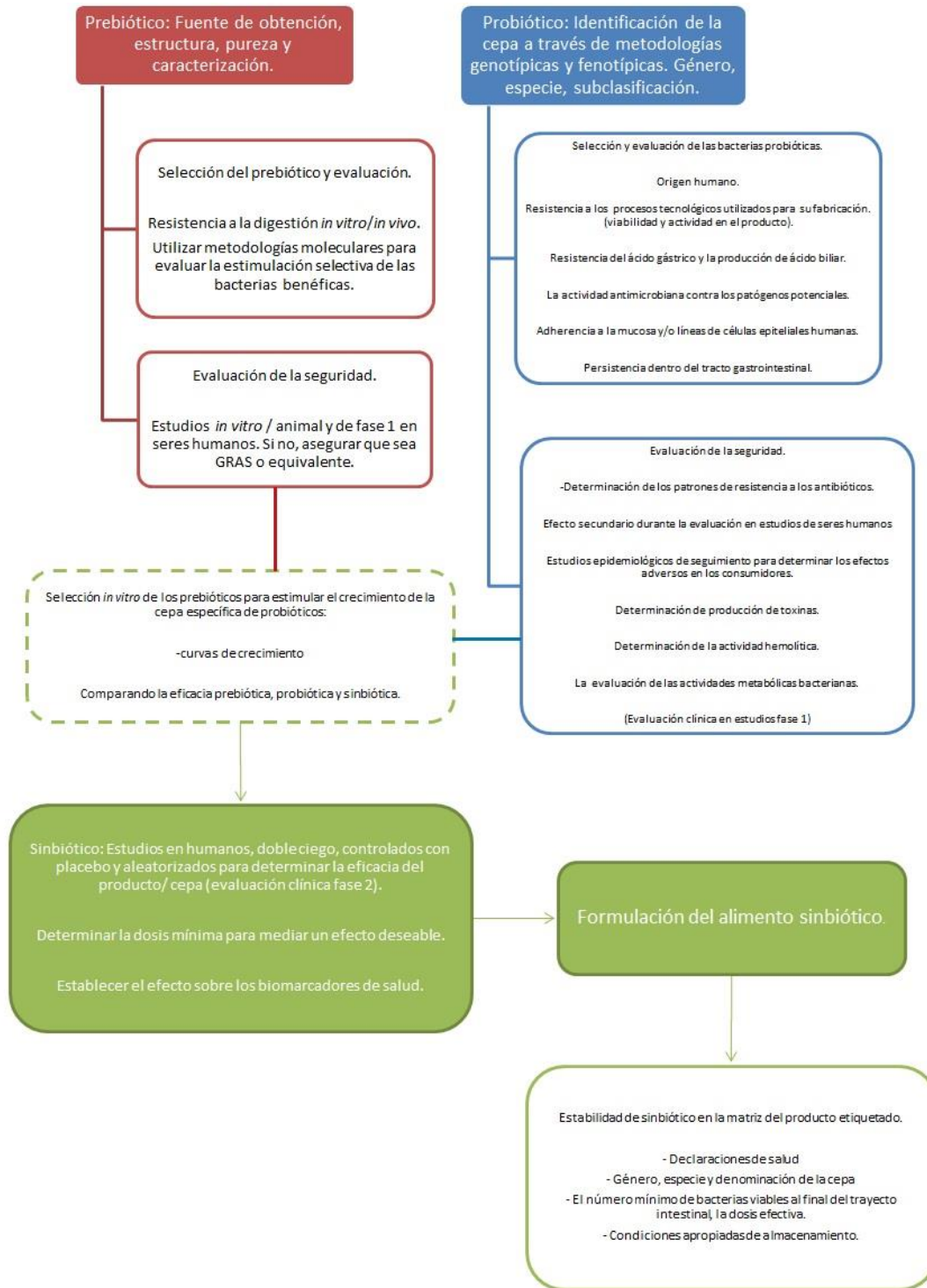


Figura 6. Metodología para el desarrollo de un nuevo alimento sinbiótico (Kolida y Gibson, 2011).

CAPITULO 6. TECNOLOGÍAS USADAS EN LA PRODUCCIÓN.

6.1 Vehículos

Los alimentos y bebidas han sido últimamente un vehículo importante para los probióticos, debido a la manera drástica en que se ha ampliado la opción de su consumo en la dieta humana. Los productos lácteos, principalmente el yogurt, son los vehículos más populares, y los microorganismos más utilizados en estos productos por lo general son de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Actualmente, más del 80% de los yogures disponibles en los Estados Unidos contienen cultivos probióticos adicionales, aunque es probable que no para todos estos cultivos añadidos hayan quedado demostrados efectos en la salud del consumidor. La inclusión de los probióticos en los alimentos y bebidas es una opción atractiva para las empresas interesadas en productos nuevos y saludables. Las bacterias probióticas también se añaden a otros productos lácteos y alimentos no lácteos y bebidas tales como yogures, helados, quesos, chocolates, barras de cereal, y jugo (Sanders y Marco 2010).

Una razón probable por la que hacen falta estudios acerca de las contribuciones de los alimentos en la función de los probióticos se debe a que estos son considerados como un ingrediente funcional, pero la matriz de distribución o vehículo de entrega no se considera relevante para la declaración de la actividad funcional (figura 7). Sin embargo, el vehículo puede influir en la funcionalidad del probiótico de muchas maneras, incluyendo la inducción de cambios en la composición celular y el estado fisiológico de los probióticos, el suministro de otros ingredientes complementarios fisiológicamente activos como fibras y productos finales de fermentación (ácidos orgánicos, bacteriocinas o péptidos bioactivos) (Rivera *et al.*, 2010).

En un contexto adicional, para considerar la importancia de determinadas formulaciones de alimentos probióticos, debe considerarse que los productos probióticos se consumen como parte de una dieta que contiene una gran cantidad de alimentos diversos. Sin embargo, los patrones dietéticos no están normalmente considerados en los ensayos clínicos de los probióticos, y las diferencias en la dieta podrían explicar que en algunos de los individuos observados, se encuentren variaciones de estudio a estudio.

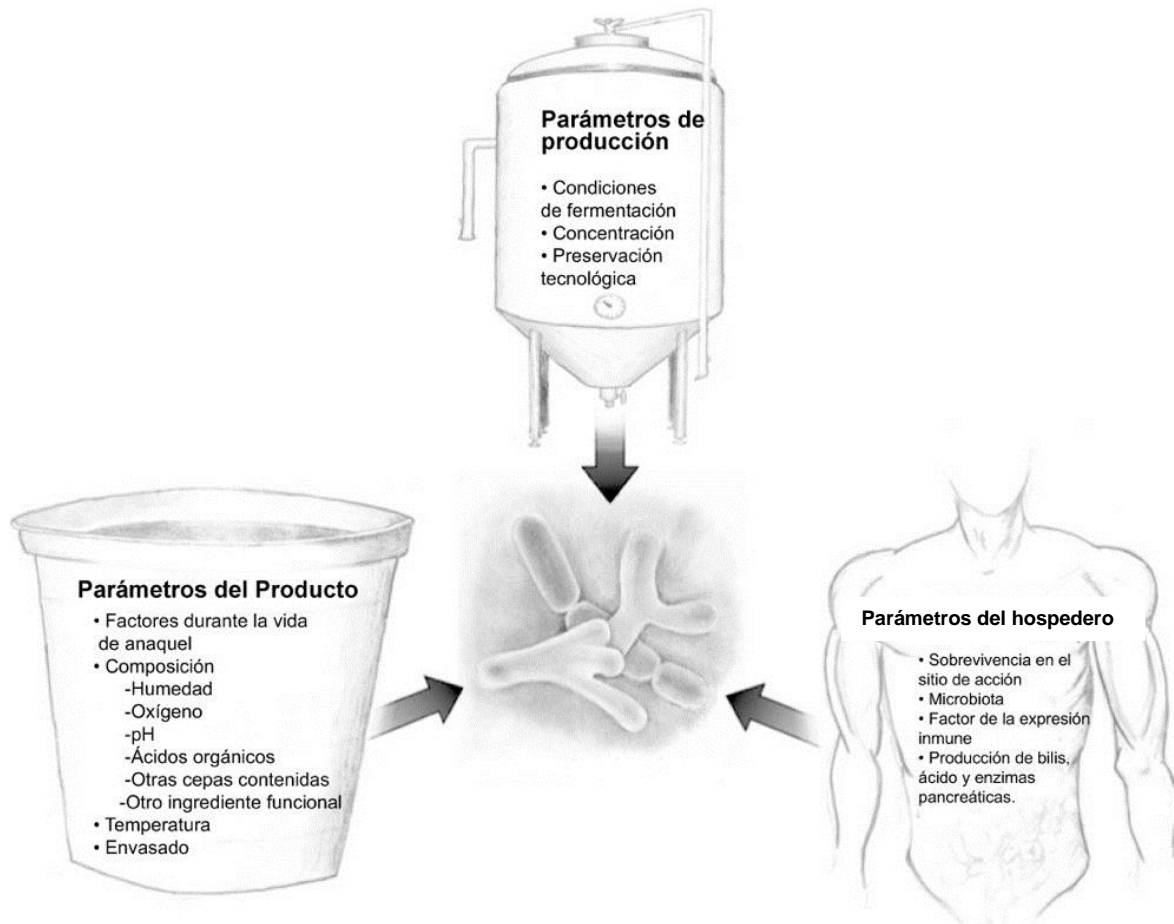


Figura 7. Factores que podrían afectar la fisiología de probióticos. La fisiología de los probióticos influye a su vez, en el impacto en la funcionalidad y la estabilidad *in vivo*, de acuerdo a la cepa específica. (Sanders y Marco 2010).

Por ejemplo, en los trabajos hechos con animales para evaluación de los efectos probióticos, no siempre se ha tomado en cuenta el vehículo y en su lugar el microorganismo probiótico se proporciona a los animales en solución salina o medio de crecimiento. Los pocos estudios que se han realizado comparando las matrices de alimentos sugieren que la leche fermentada probiótica podría aumentar la funcionalidad de éstos. (Sanders y Marco 2010).

Al considerar las contribuciones del formato de los alimentos probióticos en la funcionalidad, una consideración clave es la presencia de ingredientes bioactivos, que pueden proporcionar beneficios independientes al aumentar o disminuir la eficacia de los probióticos. Estos ingredientes se pueden añadir, o estar naturalmente presentes en el

alimento. Tales ingredientes pueden incluir prebióticos, fibras, enzimas, vitaminas, minerales y aditivos alimentarios como conservadores o sabores. Dado que en los estudios clínicos rara vez se controlan interacciones entre los componentes funcionales de los alimentos probióticos, se sabe poco sobre las actividades de aditivos o sinérgicos así como deducir el modo en que posiblemente tengan efectos positivos o negativos.

6.1.1 La leche o productos lácteos como vehículo de entrega.

La leche es un excelente ejemplo de un alimento funcional que puede contribuir a los beneficios para la salud y sobrevivencia para las bacterias probióticas. La leche bovina ofrece una nutrición completa, siendo una fuente de proteínas, ácidos grasos y carbohidratos, así como vitaminas y minerales. La leche bovina es también una fuente de compuestos bioactivos, incluyendo al calcio, oligosacáridos, glicoesfingolípidos, lactoferrina, inmunoglobulinas, etc. (Jay, 2003).

La proteólisis de proteínas de la leche por algunas cepas de *Lactobacillus* resulta en algunos péptidos bioactivos que muestran propiedades inmunoestimulantes similares a las que confieren los opiáceos, y recientemente la producción de ácido linoleico conjugado se demostró en el Dahi (alimento fermentado de leche de búfala de consumo habitual en la India), que contiene *L. acidophilus* NCDC 14 y *L. casei* NCDC 19 (Sanders y Marco 2010).

A pesar de que las leches fermentadas y yogures son portadoras comunes de los probióticos en los ensayos clínicos, la lógica detrás de la entrega de los probióticos en este tipo de alimentos se debe principalmente a la alta aceptación del consumidor de productos lácteos como portadores naturales de las bacterias que viven en éstos y porque la leche es considerada de un valor benéfico, más que como un vehículo apropiado de los probióticos que haya sido verificado para mejorar la salud humana (Jay, 2003).

6.1.2 Vehículos en productos no lácteos.

Existe una demanda creciente de productos probióticos no lácteos por parte del consumidor. Esto puede ser por diversas razones, como la inaccesibilidad de productos lácteos, la intolerancia a la lactosa, por el contenido de colesterol presente en estos

productos, o por otras razones particulares. Las nuevas tecnologías han permitido incorporar a los microorganismos probióticos en las bebidas o algunas formas de preparados.

Como se mencionó antes, desde hace siglos se ha utilizado la fermentación como un método de conservación, ya que mejora la calidad o modifica el sabor de los cereales, frutas, verduras, legumbres y carne. El proceso de fermentación consiste en cultivos mixtos, tales como levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y hongos; los alimentos fermentados tradicionales son una fuente abundante de microorganismos y algunos de ellos presentan características probióticas (Blandino *et al.*, 2003).

Cuando los probióticos se añaden a los alimentos fermentados, es importante tener en cuenta que algunos factores pueden influir en la supervivencia y la actividad del producto al entrar en el tracto gastrointestinal del consumidor. Estos factores son:

- El estado fisiológico del microorganismo probiótico añadido, dependiendo de su aislamiento en la fase logarítmica o la fase de crecimiento estacionario,
- La concentración en el momento del consumo, ya que varios estudios han revelado que algunos productos comerciales no mantienen adecuadamente sus poblaciones viables de bacterias probióticas durante la vida de anaquel.
- Las condiciones físicas durante el almacenamiento del producto,
- La composición química del producto para que los probióticos sean añadidos: actividad de agua, pH, carbono, nitrógeno, minerales y contenido de oxígeno afectan al rendimiento de estas bacterias en el entorno de alimentos fermentados,
- Las posibles interacciones entre los probióticos y los microorganismos de los cultivos iniciadores, debido a la producción de bacteriocinas, el antagonismo y sinergismo (Rivera *et al.*, 2010).

6.1.2.1 Frutas y verduras.

Los avances tecnológicos han hecho posible alterar algunas características estructurales de las frutas y hortalizas mediante la modificación de las matrices de los componentes en los alimentos de una manera controlada; esto podría hacer que los sustratos sean ideales para el cultivo de los probióticos, ya que contienen nutrientes benéficos, tales como

minerales, vitaminas, fibra dietética y antioxidantes, además de carecer de los alérgenos lácteos que pueden impedir el consumo en ciertos segmentos de la población. Hay un interés por el desarrollo de jugos de fruta como bebidas funcionales con probióticos, sin embargo el perfil de sabores no es atractivo para todo el público, ya que se han reportado contenidos inadecuados de aromas (perfumería, productos lácteos) y sabores (amargo, salado) en el caso de *Lactobacillus plantarum* al ser añadido a los zumos. Estudios sensoriales muestran que los consumidores prefieren las características sensoriales del zumo de naranja convencional que aquellos que contienen probióticos, sin embargo pueden estar enmascarados por la adición de jugos de frutas tropicales (Rivera *et al.*, 2010).

Los investigadores han informado de que la viabilidad celular depende de las cepas utilizadas, las características del sustrato, el contenido de oxígeno y la acidez final del producto. De acuerdo con Sheehan y col. (2007), cuando se añade *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* a jugo de naranja, piña y arándano, se observaron diferencias en cuanto a su resistencia frente al ácido. Todas las cepas evaluadas sobrevivieron durante mayor tiempo en el jugo de naranja y de piña en comparación con el arándano. *L. casei*, *L. rhamnosus*, y *L. paracasei* mostraron una gran resistencia al sobrevivir a niveles superiores a 10^7 UFC / mL en el jugo de naranja y por encima de 10^6 UFC / mL en el jugo de piña durante al menos 12 semanas. Sin embargo, después de la pasteurización térmica a 76°C durante 30 s, y 90°C durante 1 min, además de un tratamiento de alta presión de 400 MPa durante 5 min, *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. paracasei* no eran capaces de resistir los tratamientos necesarios para lograr un zumo estable en los niveles $> 10^6$ UFC / mL (Sheehan *et al.*, 2007).

Las diferentes especies de microorganismos muestran diferentes sensibilidades hacia el pH del sustrato, a la acidificación en los productos fermentados, los productos del metabolismo, a la temperatura y a las condiciones del tracto gastrointestinal. En general, de acuerdo con los estudios de probióticos reportados, el crecimiento y la viabilidad de las células en las frutas y verduras depende de las cepas utilizadas, acidez final y la concentración de ácido láctico y acético del producto (Rivera *et al.*, 2010).

6.1.2.2 Los cereales y soya.

Los granos de cereales son considerados como una de las más importantes fuentes de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y fibra para la gente de todo el mundo; además, se pueden utilizar como fuentes de carbohidratos no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento de los lactobacilos y las bifidobacterias presentes en el colon actuando como prebióticos. Los cereales contienen fibra soluble en agua (tales como β -glucano y arabinoxilano), oligosacáridos (como galacto-y fructooligosacáridos) y almidón resistente, y por lo tanto se han sugerido para cumplir con el concepto prebiótico. La calidad nutricional de los granos es a veces inferior en comparación a la leche debido a su menor contenido de proteína, la deficiencia de ciertos aminoácidos esenciales (lisina), baja disponibilidad de almidón, la presencia de antinutrientes (ácido fítico, taninos y polifenoles) y la naturaleza de los granos (Rivera *et al.*, 2010).

Estos compuestos pueden variar ampliamente en su estructura química y función, por lo tanto, la fermentación se ha postulado para disminuir el nivel de algunos polisacáridos y oligosacáridos no digeribles, mejorar la calidad de la proteína y el nivel de lisina, además algunos aminoácidos pueden ser sintetizados y la disponibilidad de vitaminas del grupo B puede ser mejorado. La fermentación también proporciona condiciones óptimas de pH para la degradación enzimática de minerales fitato y liberación de factores de crecimiento, tales como manganeso (que es un importante factor de crecimiento de BAL), hierro, zinc y calcio (Blandino *et al.*, 2003).

Existe una multitud de productos fermentados a partir de cereales que se han elaborado a lo largo de la historia, para la nutrición humana, pero sólo recientemente han sido reportadas las características probióticas de los microorganismos implicados en estos cereales. Las cepas de *L. plantarum*, *Candida rugosa* y *Candida lambica* aisladas de una tradicional bebida búlgara a base de cereales, exhiben propiedades probióticas, son resistentes a la concentración de la bilis al 2%, lo que les permite sobrevivir la toxicidad de bilis durante su paso por el sistema gastrointestinal (Rivera *et al.*, 2010).

La avena es una de las principales fuentes de β -glucano, que es reconocido como el principal componente funcional de fibra en cereales. Se ha informado de que *L. reuteri*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* crecieron bien en sustratos a base de avena. Angelov *et al.*, (2006) utilizan el grano entero de avena con *L. plantarum* para obtener

una bebida fermentada que combina los beneficios de salud de un cultivo probiótico con el β -glucano, prebiótico de la avena. Los recuentos de células viables después de 24 días de almacenamiento refrigerado a 4-6 °C fueron de 10^{10} UFC/ mL. Se encontró que la adición de edulcorantes diferentes a la sacarosa no tuvo ningún efecto sobre el proceso de fermentación o sobre la viabilidad del cultivo durante el almacenamiento del producto. La vida útil de la bebida de avena bajo condiciones de refrigeración se estimó en 21 días (Angelov *et al.*, 2006).

De la soya, la legumbre más importante en la dieta asiática tradicional, se sabe que es rica en proteínas de alta calidad. A pesar de su gran presencia en la dieta, tiene algunas limitaciones, como un sabor desagradable del frijol para algunos procesos de alimentos, y su contenido de rafinosa y estaquiosa que produce flatulencias. La fermentación ha sido una opción tradicional para aumentar la digestibilidad de los productos de soya y mejorar el sabor de ésta. *L. plantarum*, *Streptococcus lactis*, y *Leuconostoc. lactis* se han encontrado como parte de la microbiota de la soya, pero no hay ninguna información sobre sus características probióticas. Los experimentos que estudian la supervivencia de los probióticos indican que la leche de soya es un buen sustrato para las bacterias tales como la *L. casei*, *L. helveticus*, *L. fermenti*, *Lb. fermentum*, *L. reuteri*, y *L. acidophilus* (Rivera *et al.*, 2010).

Las bacterias probióticas por lo general no crecen rápidamente en la leche de vaca. Por lo tanto en la fabricación de yogurt no se alcanzan los números altos de cultivos iniciadores deseables. Los estudios indican que la leche de soya es un buen sustrato para las bacterias probióticas, y se sugiere que algunos probióticos crecen mejor con cultivos de yogurt en un sustrato a base de soya. Farnworth *et al.*, (2007) utilizó una mezcla de *S. thermophilus* y *L. Delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como cultivos iniciadores para inocular leche de vaca y la bebida de soya, con *L. rhamnosus*, *L. johnsonii* y bifidobacterias, fueron necesarias doce horas para alcanzar un pH de 4,3 en ambos casos. Las cepas iniciales crecieron bien en la bebida de soya y su población se estabilizó después de las 6 y 10 h de incubación a $41\pm 1^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Se reportó que el pH se redujo más rápidamente en la bebida de soya que en la leche de la vaca. Esto sugiere una mayor tasa de producción de ácidos orgánicos en la bebida de soya que en la leche, sin embargo los datos de HPLC no lo confirmaron, por lo que las tasas más altas aparentes de acidificación observadas en las mezclas de soya sugirieron la posibilidad de una

amortiguación inferior de la proteína de soya, en comparación con leche. La presencia de los probióticos *L. rhamnosus* y *L. johnsonii* no afectó el patrón de crecimiento de las cepas de yogurt. *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, las cuales no crecieron bien en las bebidas de soya al principio, pero después de las 4 h de incubación, su crecimiento mejoró de manera significativa. Esto podría ser debido a la caída del pH más rápido de la bebida de soya que es favorable para el crecimiento de los lactobacilos.

Estos datos sugieren que algunos de los elementos simbióticos de la relación entre las dos cepas de yogurt, que están bien documentados en la fermentación de la leche podrían ocurrir en la bebida de soya también. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tiene actividad proteolítica, y los aminoácidos resultantes ayudan al crecimiento de bacterias no proteolíticas. El crecimiento de los probióticos en ambos yogures puede ser dependiente de la liberación de aminoácidos por otras bacterias. Los análisis mostraron que estos microorganismos utilizan los diferentes carbohidratos presentes para apoyar su crecimiento, ya que a pesar de que crecen en sustratos de soya, siguen siendo una pequeña fracción de la población total cuando se lleva a cabo el arranque en el proceso del yogurt (Farnworth *et al.*, 2007).

6.1.2.3 Productos Cárnicos.

Se ha demostrado que la carne es un excelente vehículo para los probióticos. La capacidad amortiguadora de la carne puede ser debido a un pH elevado del microambiente de las bacterias que viven en la superficie; además, de proteger a las BAL contra la acción letal de la bilis (Rivera *et al.*, 2010).

Los microorganismos implicados en la fermentación de embutidos incluyen especies de BAL, Gram-positivas, cocos catalasa positiva, mohos y levaduras. Como regla general, son cepas facultativas heterofermentativas, que producen ácido láctico a partir de hexosas, tales como glucosa y la lactosa, como su producto metabólico (sólo a través de la glicólisis) (Leroy *et al.*, 2006).

Las cepas BAL que se emplean habitualmente en cultivos iniciadores de la carne incluyen *L. casei*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentosaceus*. Los cultivos iniciadores adicionales son funcionales ya que ofrecen

propiedades benéficas en comparación con los cultivos clásicos de arranque y representan una forma de mejorar y optimizar el proceso de fermentación, así como generar productos más sabrosos, más seguros y saludables (Amor y Mayo, 2007).

Algunos estudios han demostrado que los microorganismos probióticos sobreviven mal en los alimentos fermentados, no obstante éstos pueden ser encapsulados en la matriz de productos como las salchichas que consisten en carne y grasa. Probióticos como *L. reuteri* y *B. longum* pueden ser microencapsulados en alginato y ser una opción en la formulación de los productos cárnicos fermentados, sin embargo, su acción inhibidora contra algunos microorganismos patógenos podría reducirse. Debido al proceso de fabricación, las salchichas fermentadas contienen un alto número de BAL, pero no se consideran como probióticos (Leroy *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2010).

6.2 Liofilización y secado por aspersión.

La deshidratación se usa comúnmente como un proceso para estabilizar los probióticos, además de facilitar su almacenamiento, manipulación, transporte y su posterior uso en alimentos funcionales. La liofilización es la técnica más extendida para la deshidratación de cultivos probióticos y productos lácteos, mientras que el secado por aspersión se ha efectuado en un número limitado de cultivos probióticos.

La liofilización es la remoción de agua (sublimación) de las células congeladas (sólidas) a presión reducida. Si se utiliza como conservación, es uno de los métodos más efectivos, pues los microorganismos pueden mantener su viabilidad por veinte años o más (Meng *et al.*, 2008).

Como los requisitos de procesamiento asociados con la liofilización son más suaves que el secado por aspersión, se ha observado que existen mayores tasas de supervivencia de los probióticos en polvos liofilizados. Alrededor del 60-70% de las células sobreviven a la etapa de congelación, que pueden vivir a través de la etapa de deshidratación. Existen dos métodos de congelación: lenta y rápida. Durante la congelación lenta, el proceso daña a las células gradualmente a medida que el hielo se forma fuera de la célula, mientras que la congelación rápida puede evitar los efectos de soluto y la contracción celular excesiva (Meng *et al.*, 2008).

Ya que la producción a escala comercial de cultivos liofilizados es un proceso caro, con rendimientos bajos, existe como alternativa barata el secado por aspersion, produciendo mayores tasas de generación de deshidratados (Zamora, *et al.*, 2006).

El proceso de secado por aspersion implica la inyección del medio de secado por aspersion a alta velocidad a temperaturas de hasta 200°C, que luego a través de una boquilla conduce a la formación de gránulos. En consecuencia, este proceso da como resultado la exposición del medio de secado a altas temperaturas durante un corto período de tiempo, que puede ser perjudicial para la integridad de células bacterianas vivas. Durante el secado por aspersion, las células bacterianas encuentran el estrés por calor, además de los otros factores de estrés ya mencionados que caen sobre la liofilización y la deshidratación, es decir, la exposición al oxígeno y el estrés osmótico. El efecto de secado por aspersion en la membrana celular también puede conducir a un aumento de la permeabilidad de la célula, lo cual puede resultar en la pérdida de componentes intracelulares en el medio (Zamora *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2008).

Las condiciones de almacenamiento como temperatura, contenido de humedad, humedad relativa, composición, contenido de oxígeno, la exposición a la luz y los materiales de almacenamiento tienen una gran influencia en la supervivencia de los probióticos deshidratados, por lo que las condiciones de almacenamiento adecuadas son esenciales para mantener viables los microorganismos liofilizados y secados por aspersion.

La viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento en polvo es inversamente proporcional a la temperatura de almacenamiento. Bruno y Shah (2003) demostraron que a -18°C es la temperatura óptima para el almacenamiento a largo plazo de los probióticos liofilizados al maximizar la viabilidad de las bifidobacterias, mientras que una temperatura de almacenamiento de 20°C no es adecuada, resultando en una reducción significativa en los recuentos de células viables (Bruno y Shah, 2003)

La rehidratación de los probióticos es el último paso crítico para la reactivación de las células después de la deshidratación. El proceso de reconstitución en agua se puede dividir en cuatro etapas: humectación, inmersión, dispersión, y la disolución. Entre estos pasos, la humectación de las partículas es muy a menudo para controlar el paso de la reconstitución. La solución de rehidratación en sí mismo (en términos de la osmolaridad,

pH y fuente de energía nutricional), así como las condiciones de rehidratación (en términos de temperatura de rehidratación y volumen) puede afectar significativamente la tasa de recuperación al estado viable, y así influir en las tasas de supervivencia. (Meng *et al.*, 2008).

Para obtener resultados óptimos, se recomienda secar las células en la fase estacionaria del crecimiento, así como rehidratar lentamente. Los estudios han demostrado que los medios de rehidratación también pueden influir de manera significativa en la recuperación del probiótico. Los medios complejos van a beneficiar la recuperación total de las células en comparación con soluciones amortiguadoras o de poco enriquecimiento (Meng *et al.*, 2008).

6.3 Encapsulación

Las bacterias probióticas se han incorporado en una amplia gama de alimentos, incluyendo no sólo productos lácteos (como yogurt, queso, helados, postres lácteos), sino también en los productos no lácteos (como el chocolate, cereales y zumos) (anal y Singh, 2007). La viabilidad de las células de los probióticos es de suma importancia ya que para que sus efectos benéficos sobre la salud del hospedero sean reales, deben mantenerse con vida hasta su lugar de acción. Muchos informes indican que hay una mala supervivencia de las bacterias probióticas en productos que contienen las células libres (de Vos *et al.*, 2010). Es por esta razón que actualmente el enfoque de gran interés en este ámbito es el de proporcionar a las células probióticas una barrera física para resistir condiciones ambientales adversas (Kailasapathy, 2009). La microencapsulación (ME) es una tecnología que permite la protección de las células bacterianas (Borgogna *et al.*, 2010).

Sin embargo, la ME de células probióticas requiere algunos procesos específicos que complican la fabricación del producto alimenticio y aumentan su costo. Existen muchos retos al considerar la ME de las células vivas como las de los probióticos, no solo en la selección de la cepa y la cantidad que se requiere para tener efectos positivos, sino también la estabilidad de las células durante las etapas de procesamiento y almacenamiento y, finalmente, los efectos, sobre las propiedades sensoriales de los alimentos (Champagne y Fustier, 2007b).

6.3.1 Objetivos y definición de la encapsulación.

La encapsulación es un proceso fisicoquímico y mecánico para atrapar una sustancia dentro de un material con el fin de producir partículas con diámetros que van desde milímetros hasta unos pocos nanómetros. La encapsulación de componentes bioactivos se puede utilizar en muchas aplicaciones en la industria alimentaria: el control de la reacción oxidativa, enmascarar sabores, colores y olores, proporcionando una liberación sostenida y controlada, que extienda la vida útil. La sustancia encapsulada llamada material del núcleo se dispersa en una matriz llamada recubrimiento o cáscara. Este material de soporte debe ser de calidad alimentaria y capaz de formar una barrera para proteger la sustancia encapsulada (Chen y Chen, 2007).

La encapsulación da estructura y permite la creación de nuevas funciones o sistemas innovadores para los productos probióticos. La tecnología de encapsulación de células vivas probióticas ha evolucionado a partir de la tecnología de inmovilización de cultivo celular utilizada en la industria biotecnológica. Los probióticos presentan dos tipos de problemas cuando se considera la encapsulación: su tamaño (típicamente entre 1 y 5 μm de diámetro), que excluye de inmediato las nanotecnologías, y el hecho de que debe mantenerse su viabilidad. Este último aspecto ha sido crucial en la selección de la tecnología apropiada de ME. Varias tecnologías se pueden aplicar en la encapsulación de probióticos y cada uno de ellos proporciona microcápsulas con diferentes características en términos de tamaño y alcance. Por ejemplo, la emulsificación permite la producción de una amplia gama de tamaño de partículas desde 0,2 hasta 5000 μm mientras que, la extrusión tiene un intervalo más pequeño de tamaño, pero no proporciona partículas con diámetros inferiores a 300 μm (Champagne y Fustier, 2007).

Los estudios han reportado baja viabilidad de los probióticos en los productos lácteos tales como yogurt y postres lácteos congelados debido a la concentración de ácido láctico y ácido acético (pH bajo), la presencia de peróxido de hidrógeno, y el alto contenido de oxígeno (De Vos *et al.*, 2010). La encapsulación ha sido investigada para la mejora de la viabilidad de los microorganismos en los productos lácteos y el tracto gastrointestinal. La viabilidad de las células probióticas encapsuladas depende de las propiedades fisicoquímicas de las cápsulas. De hecho, el tipo y la concentración del material de revestimiento, tamaño de partícula, los números iniciales de células y cepas bacterianas

son algunos parámetros que son importantes para este proceso; además se busca permitir la liberación de éstos en un estado metabólicamente activo y viable en el intestino (Chen y Chen, 2007).

Las micropartículas obtenidas tienen que ser insolubles en agua para mantener su integridad en la matriz del alimento y en la parte superior del tracto gastrointestinal y, por último, deben permitir la liberación progresiva de las células durante la fase intestinal.

Como se muestra en la figura 8, la tecnología de encapsulación se lleva a cabo generalmente en tres etapas. El primer paso consiste en la incorporación del componente bioactivo en una matriz que puede ser líquida o sólida. En el caso de que el núcleo sea líquido, la incorporación será una disolución o una dispersión en la matriz mientras que si el núcleo es sólido, la incorporación será una aglomeración o adsorción. Para el segundo paso, la matriz de líquido se dispersa mientras que una solución se pulveriza sobre la matriz sólida. El último paso consiste en la estabilización, ya sea por un proceso químico (polimerización), por un proceso fisicoquímico (gelificación) o un proceso físico (evaporación, solidificación, coalescencia) (Burgain *et al.*, 2011).

6.3.2 Los materiales utilizados para encapsular células probióticas.

Alginato. El alginato es un polisacárido natural extraído de diversas especies de algas y compuesto de los ácidos β -D- manurónico y α - L-gulurónico. La composición de la cadena varía en cantidad y en la distribución secuencial de acuerdo con la fuente del alginato y esto influye en sus propiedades funcionales como material de apoyo. Los hidrogeles de alginato se utilizan ampliamente en la encapsulación de células y el alginato de calcio se prefiere para la encapsulación de probióticos debido a su simplicidad, el costo, la biocompatibilidad y la baja toxicidad. Sin embargo, algunos inconvenientes se atribuyen al uso de alginato; por ejemplo, las perlas de alginato son sensibles al medio ácido en las condiciones del estómago. Por lo regular se usan mezclas de alginato con almidón (Burgain, J. *et al.*, 2011).

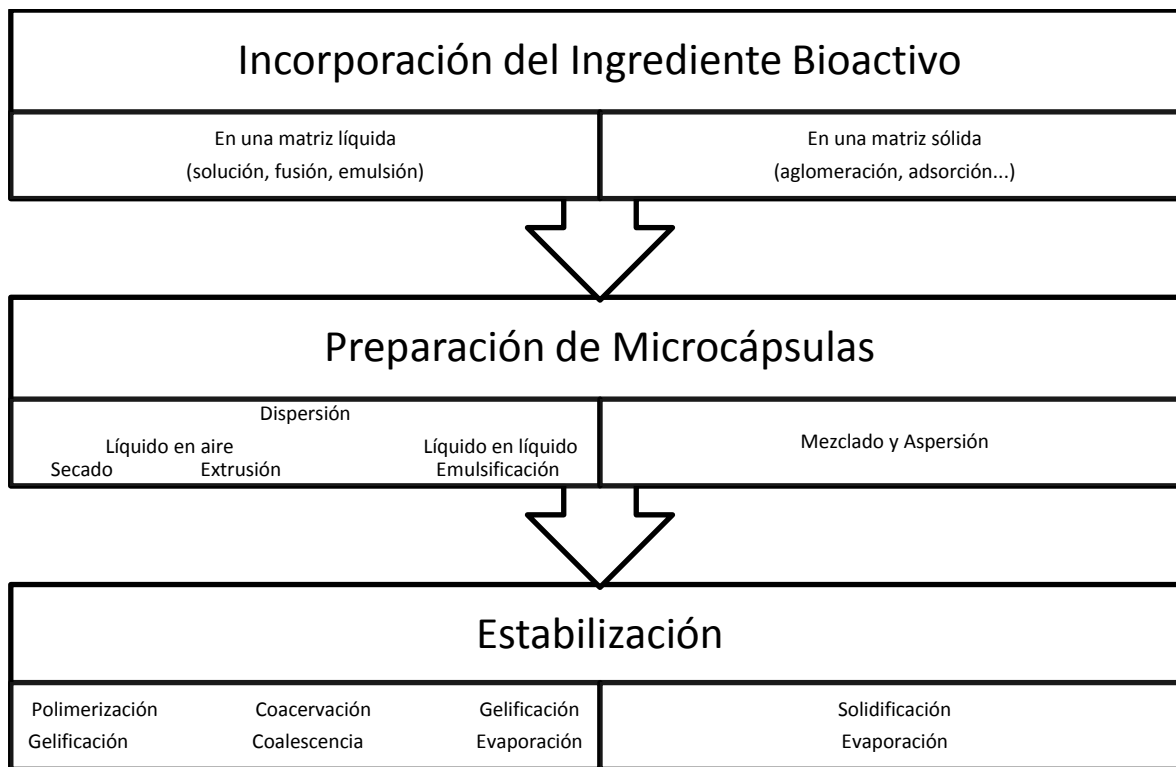


Figura 8. Plan general que describe los pasos para producir microcápsulas (Burgain *et al.*, 2011).

Goma de gelana y goma de xantano. La goma de gelana es un polisacárido microbiano derivado de *Pseudomonas elodea* que está constituido por una unidad repetitiva de cuatro monómeros que son glucosa, ácido glucurónico, glucosa y ramnosa. Se ha utilizado una mezcla de goma xantano-gelana para encapsular células probióticas y al contrario del alginato, la mezcla presenta una alta resistencia a condiciones ácidas.

κ-carragenina. La κ-carragenina es un polímero natural que se utiliza comúnmente en la industria alimentaria. La tecnología que emplea el compuesto requiere una temperatura comprendida entre 40 y 50 ° C en el que las células se añaden a la solución de polímero. Al enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se produce la gelificación y, a continuación, las micropartículas se estabilizan mediante la adición de iones de potasio. La encapsulación de células probióticas en la κ-carragenina mantiene las bacterias en un estado viable, pero los geles producidos son frágiles y no son capaces de resistir las tensiones (Burgain *et al.*, 2011).

Ftalato acetato de celulosa. Debido a que tiene una naturaleza segura, el ftalato acetato de celulosa se utiliza para controlar la liberación de fármacos en el intestino. La ventaja de este componente es que no es soluble a pH ácido (menos de 5) pero es soluble a un pH superior a 6. La encapsulación de bacterias probióticas utilizando ftalato acetato de celulosa proporciona una buena protección para los microorganismos en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Quitosano. El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de unidades de β -(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina que se puede polimerizar en presencia de aniones y polianiones. Este componente no ha mostrado un buen rendimiento para aumentar la viabilidad celular por encapsulación y preferiblemente se utiliza como cubierta. De hecho, la encapsulación de bacterias probióticas con alginato y un recubrimiento de quitosano proporcionan una protección en condiciones simuladas de tracto gastrointestinal y por lo tanto, es una buena forma de entrega de células bacterianas viables para el colon.

Almidón. El almidón es un polisacárido que consiste en un gran número de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos. El almidón se compone principalmente de amilosa, un polímero lineal de unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos α -(1-4) y de amilopectina, un polímero ramificado de unidades de glucosa con enlaces glucosídicos α -(1-4) y ramificaciones α -(1-6). El almidón resistente es el almidón que no es digerido por las enzimas pancreáticas (amilasas) en el intestino delgado. El almidón resistente puede llegar al colon donde se fermenta y esta especificidad proporciona una buena característica de entrega para una mejor liberación de las células bacterianas en el intestino grueso. Además, por su funcionalidad prebiótica, el almidón resistente puede ser utilizado por las bacterias probióticas en el intestino grueso. Finalmente, el almidón resistente es una superficie ideal para la adhesión de las células probióticas a los gránulos de almidón lo cual puede mejorar la entrega de los probióticos en un estado metabólicamente activo en el intestino (Burgain *et al.*, 2011).

Proteínas de la leche. Las proteínas lácteas son vehículos naturales para las células de probióticos y debido a sus propiedades estructurales y físicoquímicas pueden ser utilizadas como un sistema de entrega. Por ejemplo, las proteínas tienen excelentes propiedades de gelificación y esta especificidad ha sido explotada recientemente para encapsular las células probióticas debido a su biocompatibilidad (Burgain *et al.*, 2011).

En la tabla 6 se muestra un resumen con los diferentes tipos de métodos de dispersión que se han utilizado para la encapsulación de probióticos.

Atomización	Secado por aspersión	Se prepara una solución que contiene las células vivas y la matriz de polímero disuelta. Las matrices de polímeros son generalmente de goma arábiga y almidones, ya que tienden a formar micropartículas esféricas durante el proceso de secado. Las ventajas de secado por aspersión son la rapidez y el costo relativamente bajo del procedimiento. Una desventaja es el uso de alta temperatura que no es compatible con la supervivencia total de las bacterias.
	Congelación y secado por aspersión.	Combina pasos de liofilización y secado por aspersión. Las células se encuentran en una solución que se atomiza en frío a través de la un líquido criogénico como nitrógeno líquido. Este paso genera una dispersión de gotitas congeladas, las cuales pasan a un secador de congelación. Tiene la ventaja de proporcionar un tamaño controlado, las desventajas incluyen un gran uso de energía, tiempo de procesamiento largo y un costo que es 30-50 veces más caro que el secado por atomización
Emulsificación	Emulsificación y gelificación iónica	La emulsificación es una técnica química para encapsular células probióticas vivas usando alginato, carragenina y pectina como materiales de encapsulación. El principio de esta técnica se basa en la relación entre la fase continua y discontinua; así como el uso de un emulsificante, un agente tensoactivo y un agente solidificante. Las cápsulas obtenidas tienen un diámetro pequeño, sin embargo esto dependerá de la variación de la velocidad de agitación y la relación agua / aceite.
	Emulsificación y gelificación enzimática.	En algunos países, el uso de las gomas en productos lácteos no está permitido, la solución es el uso de proteínas de la leche, en las que los probióticos se encapsulan por medio de una gelificación enzimática inducida, ya que tienen excelentes propiedades de gelificación y son vehículos naturales para los probióticos. Este método da partículas esféricas insolubles en agua.
	Emulsificación y polimerización interfacial.	La técnica requiere la formación de una emulsión: en donde la fase discontinua contiene una suspensión acuosa con las células probióticas y la fase continua es un disolvente orgánico. Para iniciar la reacción de polimerización, se añade un agente biocompatible que es soluble en la fase continua. Las gotas obtenidas son cubiertas por una membrana delgada y fuerte.
Extrusión	<p>La extrusión es una técnica física para encapsular células utilizando hidrocoloides (alginato y carragenano) como materiales de encapsulación.</p> <p>La ME de células probióticas por extrusión consiste en proyectar la solución que contiene las células a través de una boquilla a alta presión. Si la formación de gotitas se produce de una manera controlada (en oposición a secado por aspersión), la técnica se conoce como granulación.</p> <p>La extrusión es un método simple y barato que utiliza una operación suave que no causa daño a las células probióticas y mantiene una alta viabilidad. La tecnología no implica disolventes nocivos y puede realizarse bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La desventaja más importante de este método es que es difícil de utilizar en las producciones de gran escala debido a la lenta formación de las microesferas.</p>	

CAPÍTULO 7. EFECTOS SOBRE LA SALUD.

En general, la evidencia clínica más fuerte a favor de los probióticos, prebióticos y sinbióticos está relacionada con su uso en mejorar la salud del intestino y estimular la función inmunitaria. Consiste en que estos componentes están destinados a ayudar a la microbiota intestinal que se aloja en el organismo naturalmente y a partir de ello traer beneficios a la salud del hospedero; sin embargo actualmente existe un nuevo enfoque, más allá de la salud, se va hacia la utilización de algunos preparados de estos componentes para contrarrestar la diarrea provocada por antibióticos, o como parte del tratamiento para la disbiosis vinculada a los antibióticos. Hay estudios que documentan los efectos probióticos en una serie de trastornos gastrointestinales y extraintestinales, incluyendo las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), el síndrome de intestino irritable (SII), las infecciones vaginales, y las alteraciones de la inmunidad. Algunos probióticos también han sido investigados en relación con el eczema atópico, la artritis reumatoide, y la cirrosis hepática.

Por ejemplo, en la tabla 7 se enumeran algunos estudios realizados con carbohidratos prebióticos que se administran para contrarrestar algunas infecciones intestinales, tanto como medio de prevención, así como en el tratamiento de éstas cuando ya se han desarrollado.

7.1 Diarrea en niños y Adultos

Se ha probado que varias cepas probióticas (ver Tabla 8), incluyendo *L. reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* DN-114 001, y *Saccharomyces cerevisiae* (*boulardii*) sirven para reducir la severidad y duración de la diarrea infecciosa aguda en niños. La administración oral de prebióticos acorta la duración de la enfermedad diarreica aguda en niños aproximadamente un día (OMGE, 2008).

Hay varios meta análisis de ensayos clínicos comprobados que muestran resultados consistentes en revisiones sistemáticas, sugiriendo que los probióticos son seguros y eficaces. La evidencia que surge de los estudios de gastroenteritis viral es la más convincente, que la evidencia en las infecciones bacterianas o parasitarias. Los mecanismos de acción son específicos de cada cepa (OMGE, 2008).

Tabla 7. Efecto de los carbohidratos de la dieta sobre las infecciones intestinales en los humanos.

Intervención	Dirigido a	Tipo de estudio	Observaciones relacionadas con la infección	Referencia
Mezcla de GOS de cadena corta y FOS de cadena larga durante los primeros 6 meses de vida.	Los niños con padres con antecedentes de atopía	Estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo.	Reducción del número de episodios de enfermedades infecciosas, e incidencia de infecciones recurrentes durante los 6 primeros meses de vida en la intervención de grupo	Arslanoglu <i>et al.</i> , 2007)
Mezcla de GOS de cadena corta y FOS de cadena larga durante los primeros 6 meses de vida.	Los niños sanos con historia familiar de atopía	Estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo.	Menos episodios de infecciones gastrointestinales, infecciones del tracto respiratorio y menor prescripción de antibióticos en el grupo de intervención a los 2 años de edad.	Arslanoglu <i>et al.</i> , 2008)
Fórmula que contiene una mezcla de GOS y FOS	Los bebés sanos	Prospectivo, aleatorizado, controlado con placebo, ensayo abierto.	Menos infecciones intestinales e infecciones respiratorias, posiblemente, en el grupo de intervención durante el primer año de vida	(Bruzese <i>et al.</i> , 2009)
Mezcla de 4 cepas bacterianas (mezcla de probióticos) dado a madres durante 4 semanas antes del parto y la mezcla de probióticos EBE +(mezcla sinbiótica) a los bebés de 6 meses después de su nacimiento	Las mujeres embarazadas con antecedentes de atopía y a sus bebés.	Aleatorizado, controlado con placebo, estudio de doble ciego.	Los antibióticos prescritos con menos frecuencia a los niños en el grupo simbiótica durante la intervención de 6 meses, y las infecciones respiratorias ocurrido con menos frecuencia en este grupo hasta seguimiento a los 2 años de edad.	(Kukkonen <i>et al.</i> , 2008)
FOS durante 30 días(además de tratamiento con antibióticos)	Pacientes consecutivos sufriendo de <i>Clostridium difficile</i> asociado a diarrea	Aleatorizado, controlados con placebo	La recaída de la diarrea fue menos frecuente en el grupo de intervención	(Lewis <i>et al.</i> , 2005a)
FOS durante tratamiento con antibióticos.	Pacientes ancianos (>65) con recepción de antibióticos de amplio espectro.	Aleatorizado, controlado con placebo	Los FOS fueron bien tolerados y hubo un aumento en la concentración de bifidobacterias en heces fecales.	(Lewis <i>et al.</i> , 2005b)
FOS en la dieta para los niños	Niños sanos de 7-19meses	Doble ciego, controlado con placebo	Disminución de los clostridios patógenos y una menor incidencia de diarrea durante la administración de suplementos	(Waligora-Dupriet <i>et al.</i> , 2007)
GOS en la dieta durante 1 semana previa al viaje y durante el viaje (mínimo 2 semanas)	Los adultos sanos que viajan a países con un alto riesgo de diarrea del viajero	Doble-cego controlado con placebo, aleatorizado	Baja incidencia y la menor duración de la diarrea del viajero. Menos dolor abdominal y una mejor evaluación de la calidad de vida en general.	(Drakoularakou <i>et al.</i> , 2010)

Tabla 8. Indicaciones basadas en la evidencia de probióticos y prebióticos en gastroenterología.			
Trastorno	Producto	Dosis Recomendada	Referencia
Tratamiento de diarrea aguda infecciosa en niños	<i>L. rhamnosus</i> GG	10^{10} – 10^{11} UFC, dos veces al día	Allen <i>et al.</i> , 2004
	<i>L. acidophilus</i> + <i>B. infantis</i> (Cepas infloran)	10^9 UFC cada uno, tres veces al día	
	<i>S. cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>) lio	200 mg, tres veces al día	
Tratamiento de diarrea aguda infecciosa en adultos	<i>Enterococcus faecium</i> LAB SF68	10^8 UFC, tres veces al día	Allen <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>) lio	250 mg, dos veces al día	Sazawal <i>et al.</i> , 2006
Prevención de diarrea asociada a antibióticos en niños	<i>L. rhamnosus</i> GG	10^{10} UFC, una o dos veces al día	Sazawal <i>et al.</i> , 2006
	<i>B. lactis</i> Bb12 + <i>S. thermophilus</i>	10^7 + 10^6 UFC/g de fórmula	
Prevención de diarrea asociada a antibióticos en adultos	<i>S. cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>) lio	1 g or 3×10^{10} UFC por día	Sazawal <i>et al.</i> , 2006
	<i>L. rhamnosus</i> GG	10^{10} – 10^{11} UFC, dos veces al día	Sazawal <i>et al.</i> , 2006
	<i>L. casei</i> DN-114 001 en leche fermentada con <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	10^{10} UFC, dos veces al día	Hickson <i>et al.</i> , 2007
	<i>L. acidophilus</i> CL1285 + <i>L. casei</i> Lbc80r	5×10^{10} UFC, una vez al día	Beausoleil <i>et al.</i> , 2007
Prevención de diarrea nosocomial en niños	<i>L. rhamnosus</i> GG	10^{10} – 10^{11} UFC, dos veces al día	Sazawal <i>et al.</i> , 2006
	<i>B. lactis</i> BB12 + <i>S. thermophilus</i>	10^8 + 10^7 UFC/g de fórmula	
	<i>B. lactis</i> BB12	10^9 UFC, dos veces al día	
	<i>L. reuteri</i> ATTC 55730	10^9 UFC, dos veces al día	
Prevención de diarrea por <i>C. difficile</i> en adultos	<i>L. casei</i> DN-114 001 en leche fermentada con <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	10^{10} UFC, dos veces al día	Hickson <i>et al.</i> , 2007
	<i>S. cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>) lio	2×10^{10} UFC por día	Sazawal <i>et al.</i> , 2006

Para la prevención de la diarrea en el adulto y en la pediátrica, solamente hay evidencia sugestiva que *Lactobacillus* GG, *L. casei* DN-114 101, y *S. boulardii* son eficaces en alguna situación específica. En la diarrea asociada a antibióticos, existen evidencias de la eficacia de *S. boulardii* o *L. rhamnosus* GG en adultos o niños que son administrados con antibióticos. La investigación reciente indicó la eficacia de *L. casei* DN-114 001 en pacientes adultos hospitalizados para la prevención de la diarrea asociada a los antibióticos y diarrea por *C. difficile* (Rask, L. *et al.*, 2012).

7.2 Enfermedad Inflamatoria del Intestino.

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un término colectivo para un grupo de afecciones intestinales idiopáticas tipificada por la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). La EII es un trastorno recidivante crónico asociado con la inflamación no controlada en el tracto gastrointestinal que se ha demostrado que predispone al desarrollo de cáncer colorrectal. Recientemente se ha estimado que la EII afecta a aproximadamente un millón de personas sólo en Norteamérica. Un factor subyacente en el desarrollo de estas enfermedades parece ser una respuesta inmune mal regulada a la microbiota de los individuos genéticamente susceptibles. Mientras la EC y CU caen bajo el término colectivo EII, estas condiciones pueden ser muy diferentes, respecto a la patogénesis, perfiles inflamatorios, síntomas y estrategias de tratamiento. La EC es predominantemente una respuesta inmune Th1 impulsada y caracterizada inicialmente por la interleucina (IL) -12 aumentado la expresión, seguida del interferón (γ -IFN) y el factor de necrosis tumoral (TNF α). La EC puede ocurrir en cualquier región del tracto gastrointestinal y se caracteriza por una inflamación transmural y granulomatosa. En contraste, la CU se cree que es una respuesta inmune de tipo Th2, lo que conduce a una mayor producción de citocinas proinflamatorias incluyendo IL-5. La CU se limita al colon y generalmente comienza en el recto y se extiende proximalmente, dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Para complicar aún más el diagnóstico de la EII, aproximadamente el 10% de los pacientes con ésta, presentan síntomas que no se pueden clasificar como típicos de la CU o ED. Estas condiciones se conocen como colitis indeterminada, y puede convertirse en CU o EC dependiendo de cómo progresa la enfermedad (Hanauer, 2006). Aunque la etiología de la EII no se entiende bien, los factores ambientales, genéticos e inmunológicos parecen jugar un papel importante en el desarrollo de ambas enfermedades (Danese *et al.*, 2004; Hanauer, 2006; Geier *et al.*, 2007).

Factores ambientales. La EII tiene una mayor prevalencia en países más desarrollados, u "occidentalizados" tales como Estados Unidos y Reino Unido (Loftus y Sandborn, 2002). El aumento del saneamiento y los estilos de vida dentro de estas regiones parecen aumentar el riesgo de desarrollar EII. Se ha propuesto que la exposición a condiciones antihigiénicas durante el desarrollo puede afectar el ambiente intestinal que dará lugar a un óptimo desarrollo y la regulación inmune de la mucosa, así como la prevención de una

respuesta inflamatoria en un futuro (Shanahan, 2004). Otro factor importante de riesgo ambiental para la EII es el tabaquismo. Curiosamente, el tabaquismo tiene efectos opuestos en la CU y EC en enfermos, ya que aumenta la probabilidad de recaída en los pacientes con EC que continúan fumando, mientras disminuye la incidencia de recaídas en pacientes con CU (Danese *et al.*, 2004.).

Factores genéticos. Los estudios en gemelos y dentro de las familias han determinado que los antecedentes genéticos pueden predisponer a un subconjunto de pacientes con el desarrollo de la enfermedad (Mathew y Lewis, 2004). En el caso de la EC, los estudios de relación genética han indicado que el gen CARD15 / NOD2 están ligados con la predisposición en el desarrollo de la EII. La evidencia reciente sugiere que los factores genéticos pueden jugar un papel más importante en la EC que en la CU con tasas de concordancia entre gemelos monocigóticos de 6-14% y 44 a 50% respectivamente (Geier *et al.*, 2007).

Factores inmunológicos. Se ha propuesto que la microbiota del individuo ha sido desempeña un papel importante en el desarrollo y progresión de la EII, como en general, se cree que uno de los factores subyacentes en la patogénesis de la EII es una elevada respuesta inmune a la microbiota comensal del hospedero. Otros factores inmunológicos que se cree que juegan un papel en el reconocimiento de antígenos, incluyen el exceso de actividad de los linfocitos efectores y las citocinas pro-inflamatorias, el fallo de los linfocitos reguladores y citocinas anti-inflamatorias para controlar la inflamación, y la resistencia de las células T a la apoptosis (Geier *et al.*, 2007).

La estrategia básica del tratamiento de la EII ha estado dirigida a suprimir las respuestas inflamatorias y, salvo los estudios de tratamiento con antibióticos, se ha prestado poca atención a modificar la microbiota intestinal. Aunque el uso de antibióticos parece ser el método más obvio para manipular la microbiota, sus desventajas en términos de falta de especificidad, riesgo de sobrecrecimiento de patógenos y desarrollo de resistencias hacen que se hayan investigado formas más sutiles y controladas como son la administración de prebióticos y probióticos. La modificación mediante probióticos ofrece la oportunidad no sólo de actuar desde el punto de vista microbiológico, sino también desde el punto de vista inmunológico. (Borruel, 2007).

Los estudios realizados sugieren que, además del efecto puramente competitivo con otras bacterias y la producción de sustancias antimicrobianas, los probióticos pueden modificar la relación epitelio-sistema inmunitario intestinal, ejerciendo un efecto inmunomodulador y que algunos de ellos podrían tener propiedades antiinflamatorias al interactuar con la mucosa intestinal. Así, la estrategia inmunomoduladora en la EII consistiría en revertir el desequilibrio entre los linfocitos T-helper y T-reguladores mediante la expansión de estos últimos. En último término, la producción de citocinas antiinflamatorias conduciría a la resolución de las lesiones y al equilibrio del sistema inmunitario (BorrueI, 2007).

Desde el punto de vista fisiopatológico, la utilización de probióticos es una buena alternativa terapéutica. Sin embargo, los estudios sólo han presentado resultados clínicos positivos en situaciones muy concretas. Los datos secundarios fisiopatológicos de los estudios clínicos sugieren un efecto beneficioso, aunque habrá que confirmarlo en estudios llevados a cabo con un mayor número de pacientes, o aplicando estrategias que consigan modificar de manera más eficaz la composición de la microbiota intestinal. (Geier *et al.*, 2007).

La investigación en la enfermedad inflamatoria intestinal mediante tratamientos sinbióticos se encuentra todavía en desarrollo. Es evidente, sin embargo, que cuando existe una selección informada del probiótico y prebiótico complementarios, los estudios experimentales han tenido éxito. La evidencia de estudios en animales indica que la eficacia puede ser dependiente de la cepa. La falta de estudios sobre la eficacia de los prebióticos contra la EII no nos permite especular sobre el mecanismo de acción en contra de este grupo de enfermedades (BorrueI, 2007).

En la tabla 9 se muestran algunos estudios donde el tratamiento para la enfermedad fueron usados formulaciones prebióticas y sinbióticas.

Tabla 9. Efectos prebióticos y sinbióticos en enfermedad inflamatoria intestinal				
Intervención	Dirigido a	Tipo de estudio	Observaciones	Referencia
Evaluar fructanos de inulina (12 g/día) junto con mesalazina durante 2 semanas	19 pacientes con CU activa asignados al azar	Estudio piloto, aleatorizado, con placebo	Sólo quince pacientes completaron el estudio, hubo una reducción en la actividad de la enfermedad, concentraciones significativamente más bajas de la calprotectina fecal (marcador inflamatorio).	Casellas <i>et al.</i> , (2007)
Evaluar sinbiótico (6 g/día de la Fructanos de Inulina y <i>Bifidobacterium longum</i>).	18 pacientes con CU activa, que fueron asignados al azar	Estudio aleatorio, controlado con placebo.	Menor grado de inflamación, aumento de bifidobacterias y mucosa; disminución de TNF- α y IL-1 α .	Furrie <i>et al.</i> , (2005)
Evaluar una fórmula entera semi-elemental que contiene Fructanos de inulina (4 g/L), durante 6 semanas.	Niños con EC alimentados por sonda nasogástrica como única fuente de nutrición	Estudio abierto	Hubo una reducción en la actividad de la enfermedad junto con las mejoras en los marcadores de inflamación, incluyendo la velocidad de sedimentación de eritrocitos reducida y la mejora de los análisis de glóbulos blancos.	Hussey <i>et al.</i> , (2003)
Evaluar sinbiótico (<i>Pediococcus pentoseceus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. paracasei</i> subsp 19, <i>L. plantarum</i> , 2,5 g β -glucanos, 2,5 g FI, 2,5 g de pectina, 2,5 g de almidón resistente) durante 12 meses	30 pacientes tras ser tratados quirúrgicamente de EC.	Estudio piloto, controlado con placebo.	Teniendo en cuenta el largo período de seguimiento, sólo nueve pacientes completaron el estudio (nueve de intervención y dos de control) y no hubo diferencias en las tasas de recaída entre los grupos.	Chermeshet <i>et al.</i> , (2007)
Evaluar el efecto del probiótico (3×10^{11} UFC de <i>B. breve</i> , 3×10^{11} UFC de <i>L. casei</i> , y $1,5 \times 10^{10}$ UFC <i>B. longum</i> al día) y el prebiótico psyllium (3.3 g tres veces al día) durante 10 meses	Pacientes con EC activa	Estudio abierto	En siete pacientes disminuyeron los síntomas; sin embargo el psyllium no es un prebiótico establecido, y no se determinó la capacidad de las cepas probióticas para su utilización.	Fujimori <i>et al.</i> , (2007)

7.3 Síndrome del Intestino Irritable.

El síndrome del intestino irritable (SII) es la queja más frecuentemente encontrada en las clínicas de gastroenterología en el mundo occidental, los pacientes sufren dolor abdominal persistente con diarrea o estreñimiento, gases y distensión abdominal por la cual, a pesar de una intensa investigación, ninguna causa puede ser descubierta. El pronóstico de SII es benigno, pero sus síntomas pueden imitar a los de condiciones más

graves, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal o de colon. Estos deben ser excluidos en cada caso, y ciertas señales de peligro, que pueden anunciar la presencia de enfermedades más graves, se enumeran en la Tabla 10, junto con las investigaciones necesarias para excluir una patología orgánica.

El SII es notable en que, a pesar de muchos años de investigación, todavía no está claro si es principalmente una condición cerebral y del sistema nervioso entérico que afecta el intestino, o un trastorno del intestino, que puede influir en el cerebro. Esto es en parte debido a la falta de criterios objetivos de diagnóstico por parte de los médicos que han causado una tendencia a agrupar a los casos de dolor abdominal sin causa aparente en una categoría común de "SII", produciendo confusión considerable. El dolor abdominal puede tener varias causas, ya que además de ser un problema intestinal, intervienen también demás factores tales como la ansiedad y la depresión, o problemas musculoesqueléticos (Forbes y Hunter, 2007).

Tabla 10. Síntomas de alarma (no presentes en SII) y estudios sugeridos.	
Síntomas de alarma	Estudios sugeridos
<p>Sangrado rectal</p> <p>Pérdida de peso</p> <p>Dolor abdominal o diarrea nocturna</p> <p>Anemia</p> <p>Fiebre</p>	<p>Conteo sanguíneo completo</p> <p>Urea y electrolitos</p> <p>Pruebas de función hepática y función tiroidea</p> <p>Albúmina de suero y calcio</p> <p>Proteína C-reactiva</p> <p>Transglutaminasa tisular</p> <p>Endoscopia o radiología de colon en pacientes > 45 años.</p>

¿Acaso es una condición que se produce en el sistema nervioso? Desde hace tiempo se cree ampliamente que los pacientes con SII reportan quejas intestinales como consecuencia de la agitación mental. Las correlaciones entre la SII y enfermedad mental son complicadas debido a la falta de verdaderas medidas de la severidad de la enfermedad y el hecho que de la mayoría de los pacientes no buscan ayuda médica. La ansiedad y la depresión son los trastornos psiquiátricos más frecuentes en este síndrome (Forbes y Hunter, 2007).

La evidencia de una causa cerebral del SII puede resumirse como sigue (Forbes y Hunter, 2007).

- Los factores psicosociales pueden afectar el SII a través de la ruta del sistema nervioso central (SNC).
- Los tratamientos como la psicoterapia, la hipnosis y los antidepresivos, son benéficos en algunos casos de SII.
- Los síntomas están ausentes durante el sueño cuando el SNC es menos activo.
- Las diferencias en el flujo sanguíneo del SNC se han detectado en las imágenes funcionales del cerebro en pacientes con SII.
- Los pacientes con SII tienen una mayor prevalencia de otros trastornos funcionales y psicomotores que podría tener una causa común de una mala función del SNC.

¿Es una condición que se produce en el intestino? La incidencia del SII es mayor después de las infecciones intestinales, con una incidencia de un año después de un episodio de gastroenteritis bacteriana de 4-12%, y un riesgo relativo 12 veces mayor que en personas sanas. Del mismo modo, existe un riesgo relativo de 4% para el desarrollo de SII durante los años siguientes después de un tratamiento con antibióticos. Tanto la infección y los antibióticos pueden dañar la microbiota intestinal, que en estudios del SII ha demostrado ser anormal. No ha sido detectado un patógeno en específico, pero en comparación con los controles, hay una microbiota inestable, con reducción en el número de lactobacilos y bifidobacterias, y un crecimiento excesivo de anaerobios facultativos. En la tabla 11 se muestran algunos estudios donde se utilizaron prebióticos en el tratamiento de la enfermedad.

Los primeros criterios utilizados para diagnosticar el SII fueron los publicados por Manning en 1978. Los aspectos fundamentales valorados por los “criterios de Manning” eran el dolor que se aliviaba con la defecación, un aumento de la frecuencia deposicional coincidente con la aparición del dolor, la presencia de heces más blandas coincidiendo con el dolor, la observación de distensión abdominal, la presencia de moco en las heces y la sensación de evacuación incompleta. En estudios posteriores se observó que, de estos seis criterios, los tres primeros tenían un mayor valor predictivo diagnóstico

mientras que los tres últimos eran de menor utilidad. Es de destacar, no obstante, que los criterios de Manning sólo consideraban la diarrea asociada al SII, sin tener en cuenta la posible presencia de estreñimiento (Zolezzi, 2007).

Posteriormente, en 1992, se acordaron otros criterios, en teoría más precisos y que además incluían al estreñimiento como uno de los posibles síntomas del SII: fueron los llamados “criterios de Roma”. En 1999 estos criterios fueron modificados con el fin de precisar aún más la definición del SII; se especificaba que la molestia o el dolor abdominal debían estar presentes al menos 12 semanas en los últimos 12 meses, además de las alteraciones en el hábito deposicional. Estos eran los “criterios de Roma II” que se han utilizado hasta hace poco. Estos criterios han resultado muy útiles a la hora de seleccionar pacientes para estudios fisiopatológicos o para incluir enfermos en ensayos clínicos; sin embargo, al ser excesivamente estrictos en los aspectos de duración y frecuencia de los síntomas, su utilización ha infraestimado la verdadera prevalencia del SII y, lo que es clínicamente más relevante, los ha hecho poco útiles en la práctica diaria. En este punto hay que remarcar que los criterios diagnósticos clínicos del SII deben ser aplicables tanto para estudios epidemiológicos, como para la práctica clínica o la selección de pacientes para ensayos clínicos. Por estos motivos se creó el “Comité Internacional de Trastornos Funcionales Intestinales Roma III” con el fin de modificar los criterios diagnósticos, mejorarlos y hacerlos más prácticos y accesibles (Zolezzi, 2007).

Los cambios principales de los criterios de SII de Roma III con respecto a los criterios previos de Roma II han sido los siguientes:

- Se ha modificado el tiempo de evolución necesario para establecer el diagnóstico; ahora basta con que los síntomas hayan aparecido al menos 6 meses antes y estar actualmente activos durante 3 meses. Este hecho los hace menos restrictivos que los utilizados en Roma II (12 semanas de síntomas en los últimos 12 meses);
- Los subtipos del síndrome del intestino irritable se han revisado de tal forma que la diarrea, el estreñimiento y el tipo mixto se determinan fundamentalmente por la consistencia de las heces; y
- El síndrome del dolor abdominal funcional se ha separado de los trastornos intestinales digestivos y ahora es una categoría independiente; el motivo es su

relación con alteraciones en el procesamiento nociceptivo a nivel central más que con alteraciones propiamente funcionales del intestino.

En la tabla 11 se muestran los estudios realizados usando los prebióticos en el tratamiento del síndrome de intestino irritable.

Tabla 11. Efectos prebióticos y el síndrome de intestino irritable (SII).				
Intervención	Dirigido a	Tipo de estudio	Observaciones	Referencia
Altas dosis de Fructanos de Inulina (20 g durante 12 semanas)	Pacientes diagnosticados con SII	Estudio aleatorizado, controlado con placebo	Los síntomas del SII empeoraron. Las dosis grandes de todos los carbohidratos fermentables no se debe recomendarse a los pacientes de SII	Olesen y Gudmand Hoyer (2000)
Fructanos de Inulina de cadena corta a (2,5 g/día)	Pacientes diagnosticados con SII.	Estudio abierto, no controlado. (Los resultados subjetivos son propensos a tener sesgo).	Efecto positivo de un sinbiótico en las manifestaciones clínicas y la función intestinal	Dughera <i>et al.</i> , (2007)
Fructanos de inulina de cadena corta (5 g/día) durante 6 semanas	Sujetos asignados al azar y 105 pacientes con SII	Estudio prospectivo, aleatorizado, controlado con placebo	S redujo la incidencia y la intensidad de los síntomas en comparación con el placebo. También mejoró los trastornos funcionales digestivos.	Paineau <i>et al.</i> , (2008)
Evaluar ingrediente que muestra un efecto prebiótico durante 6 semanas.	44 sujetos escogidos al azar.	Estudio tipo Roma II	El tratamiento prebiótico mejoró significativamente la flatulencia, distensión abdominal y también aumentó la proporción de bifidobacterias en muestras fecales.	Silk <i>et al.</i> , (2009)

De acuerdo a los criterios de Roma III el SII se diagnostica por la presencia de dolor o molestia abdominal recurrente que debe estar presente al menos tres días por mes en los últimos 3 meses y asociarse a dos o más de los siguientes:

- Mejora con la defecación;
- El comienzo está asociado con un cambio en la frecuencia de las deposiciones;
- El comienzo está asociado con un cambio en la consistencia de las deposiciones.

En cuanto a los requerimientos de duración de las molestias hay que tener en cuenta que los criterios deben cumplirse durante los últimos tres meses y los síntomas haber comenzado un mínimo de seis meses antes del diagnóstico (Zolezzi, 2007).

7.4 Riesgo de cáncer de colon.

Las principales funciones fisiológicas que podrían estar relacionadas con el riesgo de cáncer incluyen el control de la proliferación celular epitelial y la diferenciación, la producción de nutrientes esenciales y / o componentes bioactivos de los alimentos, la prevención de la proliferación de organismos patógenos y la estimulación de la inmunidad intestinal.

Los productos finales de la fermentación proteolítica incluyendo compuestos fenólicos, aminas, amoníaco, compuestos N-nitrosos e indoles pueden ser tóxicos para el hospedero. Las cepas específicas de bacterias que se han implicado en la patogénesis del cáncer, incluyen *Streptococcus bovis*, *Bacteriodes*, *Clostridia* y *Helicobacter pylori*. A la inversa, algunas cepas de bacterias, incluyendo *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum*, se ha demostrado que inhiben el desarrollo de tumores en el colon inducibles por carcinógenos. Para los ensayos de intervención humana, el cáncer es un punto final poco práctico en cuanto al número de parámetros, duración, costo del estudio y las consideraciones éticas. Una estrategia alternativa empleada en los estudios recientes es el uso de biomarcadores precoces o intermediarios de cáncer tales como daño del ADN y la proliferación celular en la mucosa colónica y genotoxicidad de extractos fecales (Davis y Milner, 2009).

Existen estudios con modelos animales, sin embargo no se ha demostrado su efecto en ensayos con humanos. Se ha demostrado un aumento en el número de bifidobacterias y / o lactobacilos resultante de la utilización de probióticos, prebióticos o sinbióticos, que protege contra el daño inducido químicamente al ADN en el colon en modelos animales. (Davis y Milner, 2009). Varias cepas de lactobacilos y bifidobacterias fueron eficaces en la protección de ratas de este daño en el ADN. Ratas inoculadas con microbiota humana y alimentadas con una dieta que contiene lactulosa en comparación con las alimentadas con una dieta que contiene sacarosa, se observó que sus colonocitos tenían menos daño al ADN después del tratamiento oral con dimetilhidrazina. Más recientemente, otro

mecanismo plausible ha surgido en la combinación sinbiótica de almidón resistente, *L. acidophilus* y *B. lactis*. Estas investigaciones identificaron un aumento de la apoptosis de las células dañadas por carcinógenos en el colon de rata por el tratamiento en combinación. (Davis y Milner, 2009). En contraste, los probióticos no proporcionaron protección cuando se administró una dieta baja en almidón, ya que no tenía respuesta protectora en la ausencia del probiótico (Le *et al.*, 2005).

Además de un papel potencial en la prevención del cáncer, los probióticos también se han sugerido para mejorar el sistema inmunológico e inhibir el crecimiento de los tumores existentes. Por ejemplo, los probióticos que contienen BAL, aumentaron la tasa de supervivencia de los ratones inyectados con células tumorales, que se correlacionaban con un aumento de la inmunidad celular tal como se refleja por un aumento en el número de células T totales, células NK y MHC de clase II. Por otra parte, el peptidoglicano de *Lactobacillus* produjo una reducción dependiente de la dosis en el crecimiento de células de cáncer de colon CT26 en ratones a través de aumento de la apoptosis, pero no tuvo ningún efecto sobre la apoptosis de estas células *in vitro*, lo que sugiere que *in vivo* el efecto anti-tumorigénico puede haber sido mediado por una respuesta inmune (Davis y Milner, 2009).

Proporcionar prebióticos, probióticos o su combinación es conocido para inhibir focos de criptas aberrantes (FCA), la cual es una lesión preneoplásica debida al cáncer de colon. Por ejemplo, las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y baja en fibra, suplementadas diariamente con el probiótico *B. polyfermenticus* (3×10^8 UFC/1.3 g) tuvieron una reducción del 50% en la formación de FCA en comparación con las ratas alimentadas con la dieta de control (Park *et al.*, 2007).

Rafter *et al.*, (2007) evaluaron un suplemento alimenticio sinbiótico (fructanos de inulina y *L. rhamnosus* GG y *B. lactis* Bb12) durante 12 semanas en un estudio aleatorizado, doble ciego, con placebo controlado con pacientes con pólipos (tumoración o protuberancia que se proyecta en la superficie de una mucosa) o cáncer de colon. Se observó que la intervención redujo significativamente la proliferación colorrectal. Dada la correlación entre la proliferación colorrectal y riesgo de cáncer de colon, estos resultados sugieren que los sinbióticos podrían ser beneficioso para los pacientes con un mayor riesgo de cáncer.

Se deben realizar estudios con más profundidad respecto a la relación que existe entre la microbiota intestinal, la dieta y el riesgo de cáncer de colon en humanos. Existen aún muchas cuestiones sin contestar, incluyendo una mejor comprensión de cómo influye el fondo genético de un individuo en su microbiota, así como la intervención dietética para modificarla. Los estudios con modelos animales hasta no ser comprobados en humanos, siguen sin tener una validez científica ante la legislación mundial, como se verá en el siguiente capítulo.

CAPITULO 8. LEGISLACIÓN EUROPEA.

Durante las últimas dos décadas, los fabricantes de alimentos en Europa y otros países han adoptado una estrategia de venta de "alimentos funcionales", que dicen beneficiar la salud del consumidor. De hecho, no existe una definición oficial como tal y es por esta razón que los reguladores europeos, en su definición, están pidiendo que los fabricantes aporten evidencia científica que apoye estas afirmaciones, así como la implementación de un sistema de evaluación.

El 1 de julio de 2007, el Reglamento (CE) No. 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la nutrición y de propiedades saludables de los alimentos entró en vigor. Armoniza las disposiciones relacionadas con la nutrición y las propiedades saludables y sienta las bases para las reglas que rigen la autorización de declaraciones de propiedades saludables realizadas por los alimentos. Los antecedentes de la regulación residen en el concepto de protección y derechos del consumidor y sobre los desarrollos innovadores de los alimentos (Van Loveren *et al.*, 2012).

Los términos relativos a declaraciones de propiedades saludables en los reglamentos se definen en tres categorías diferentes. Los llamados del artículo 13.1 Declaraciones de propiedades saludables, también conocidas como las declaraciones de función, comprenden:

- a. El papel de un nutriente u otra sustancia en el crecimiento, el desarrollo y las funciones del cuerpo,
- b. Las funciones psicológicas y /o de comportamiento, y

- c. De adelgazamiento o el control del peso o una disminución de la sensación de hambre o un aumento de la sensación de saciedad o la reducción de la energía disponible de la dieta.

Estas afirmaciones deben estar basadas en principios científicos generalmente aceptados. Tales afirmaciones pueden incluir productos en los que generalmente se conoce la función y se relaciona con los fenómenos que tienen un impacto en la salud (Van Loveren *et al.*, 2012).

Otra categoría formada por el artículo 13.5 Declaraciones, comprende las afirmaciones basadas en la ciencia de reciente creación, es decir, que son nuevos y, posiblemente, también a base de productos, métodos o procesos patentados. En el futuro, éstos también pueden incluir productos probióticos y prebióticos y los datos de nuevo desarrollo en la salud y su beneficio.

Una tercera categoría incluye las siguientes áreas para las demandas de salud Artículo 14:

- a. La reducción del riesgo de enfermedad y
- b. Las declaraciones relacionadas con el desarrollo de los niños y la salud.

Un aspecto importante de esta categoría de declaraciones es que cualquier evidencia científica presentada debe ser demostrada en la población, dependiendo de su objetivo. En las afirmaciones de reducción de riesgos, un factor clave es que la reducción del riesgo debe ser demostrada en una población sana y basada en los cambios documentados en los biomarcadores asociados con la aceptación general del riesgo de enfermedad (Van Loveren *et al.*, 2012).

8.1 Requisitos previos para una declaración sobre la salud.

De acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1924/2006, el uso de declaraciones de propiedades saludables sólo se permitirá si el alimento/componente para el que se efectúa la declaración se ha demostrado que tiene un efecto fisiológico beneficioso. En la evaluación de cada solicitud, la EFSA (European Food Safety Authority) hace una evaluación científica para saber si el efecto que se alega se considera un efecto fisiológico beneficioso para la población destinataria. Para las declaraciones de función, un efecto benéfico puede estar relacionado con el mantenimiento o mejora de una

función. La reducción del riesgo de una enfermedad, se refiere a que el efecto benéfico (o alteración benéfica) de cierto componente o alimento, es sobre un factor de riesgo, no una reducción de la enfermedad como tal (Van Loveren *et al.*, 2012).

Este factor de riesgo está asociado a la posibilidad a padecer una enfermedad, y que puede servir como predictor de la evolución de ésta. Sea o no la alteración de un factor, se considera que es benéfico en el contexto de una reducción del riesgo de enfermedad depende del grado en que se establece:

- a. El factor de riesgo es un predictor independiente del riesgo de enfermedad (por ejemplo un predictor puede ser establecido a partir de la intervención y /o estudios de observación) y que
- b. La relación del factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad es biológicamente posible.

8.2 Las funciones fisiológicas gastrointestinales benéficas.

En relación con las funciones fisiológicas del tracto gastrointestinal, la EFSA considera que los siguientes constituyen efectos benéficos: contribución a la función normal del intestino, la reducción del malestar gastrointestinal, y la mejora en la digestión/absorción de los nutrientes en situaciones específicas (ver tabla 12).

Tabla 12. Efectos considerados benéficos en función del tracto gastrointestinal.		
Función normal	Reducción de molestias	Digestión/absorción de nutrientes
Aumento en la frecuencia de deposiciones.	Dolor abdominal	Digestión de lactosa en alimentos de los que forma parte.
Reducción del tiempo de tránsito.	Calambres	
Aumento de masa fecal.	Inflamación	Mejorar la absorción de Hierro
Heces más blandas, sin dar lugar a diarrea.	Sensación de evacuación incompleta	
	Borborismos	

(EFSA, 2011)]. (AESA, 2011).

8.3 Efectos benéficos para la microbiota intestinal.

En relación con la microbiota intestinal, la EFSA considera como un efecto benéfico la contribución a la defensa contra los patógenos, ya que su presencia en el tracto gastrointestinal puede causar infecciones. Por estas declaraciones las medidas que son consideradas apropiadas incluyen resultados clínicos relacionados con las infecciones gastrointestinales (por ejemplo, número de episodios y la severidad o duración de la infección) y / o reducción en la presencia de patógenos específicos, sus toxinas y otros factores de virulencia, siempre que su patogenicidad está bien establecida. De lo contrario, la evidencia de la patogenicidad de los microorganismos dirigidos por el alimento constituyente debe ser proporcionada. Aunque algunos grupos de bacterias que habitan en el tracto gastrointestinal humano, por ejemplo, las enterobacterias y clostridios, pueden incluir cepas patógenas, el grupo en su conjunto no se considera patógeno, sino más bien comensales (EFSA, 2011).

Otros parámetros, como la disminución del pH fecal, el aumento de la producción de ácidos grasos de cadena corta, y una reducción en la permeabilidad intestinal, no se consideran suficientes por sí solos, para justificar este tipo de reclamo a pesar de que pudieran aportar pruebas para el modo de acción de un alimento (o constituyente) y la plausibilidad biológica de la reclamación. Para la reducción del riesgo de enfermedades relacionadas con las infecciones gastrointestinales, las medidas adecuadas son relevantes e implican que las pruebas realizadas den como resultado la reducción de microorganismos patógenos específicos o sus toxinas en el tracto gastrointestinal, ya que su presencia constituye un factor de riesgo para las infecciones. La relevancia de tales deben justificarse en relación con el tipo de infección, por la magnitud de la reducción, y / o por la evidencia de una reducción en los resultados clínicos relacionados con las infecciones (Van Loveren *et al.*, 2012).

Para las declaraciones relacionadas con la composición de la microbiota, los cambios en el número de microorganismos no patógenos, incluidos los lactobacilos y las bifidobacterias, no se ha considerado un efecto benéfico si no va acompañado por un resultado benéfico fisiológico o clínico. Se considera que el mero paso de los microorganismos probióticos y su supervivencia en el tracto gastrointestinal no implica ninguna influencia benéfica sobre la fisiología del hospedero. Por otra parte, el

conocimiento científico actual es todavía insuficiente para definir los grupos de bacterias y la abundancia relativa de cómo sería una microbiota saludable. Se han realizado muchos esfuerzos para identificar las bacterias específicas que contribuyen a una microbiota normal mediante la comparación de la composición de las poblaciones sanas con una determinada enfermedad o poblaciones en riesgo de enfermedad. Por lo tanto, las asociaciones entre alteraciones en determinados grupos de bacterias y ciertas condiciones se han establecido, pero todas estas alteraciones no reflejan necesariamente la causalidad de la enfermedad subyacente. El uso de enfoques metagenómicos podrían contribuir a avanzar en la definición de lo que es una microbiota normal sobre una población base y su posible asociación con determinadas características fenotípicas del hospedero (por ejemplo, la edad o el índice de masa corporal (Van Loveren *et al.*, 2012; Sanz *et al.*, 2011)).

8.4 Efectos benéficos para el sistema inmunológico

En relación a las demandas sobre la función del sistema inmunitario, la EFSA considera una contribución al mantenimiento de una función inmune normal para constituir un efecto fisiológico benéfico, pero el aspecto específico de la función inmune, que es el objeto de la reivindicación, debe definirse más.

Los efectos benéficos específicos para las declaraciones que son aceptables incluyen una contribución a la defensa inmune contra patógenos y la resistencia inmunológica a los alérgenos. Las medidas apropiadas para la sustentación de una demanda relacionada con la defensa inmune contra patógenos incluyen:

- a. Cambios relevantes en los parámetros inmunológicos, junto con los resultados clínicos relacionados con infecciones o con puntos finales microbiológicos (por ejemplo, la reducción de patógenos y toxinas), como se describe para las declaraciones de defensa contra los patógenos, y
- b. Mejores respuestas en el aumento del número de individuos que alcanzan los niveles de protección contra las infecciones.

Para las declaraciones en función de la resistencia inmunológica a los alérgenos, las medidas adecuadas son los resultados clínicos relacionados con un tipo específico de la

alergia (por ejemplo, la incidencia, severidad y frecuencia de las manifestaciones alérgicas), la aplicación de procedimientos adecuados para el diagnóstico junto con la evaluación de los correspondientes parámetros inmunológicos. (Van Loveren *et al.*, 2012)

Los cambios en los marcadores de la función inmune (por ejemplo, en el número de diferentes subpoblaciones linfoides, las respuestas proliferativas de linfocitos, la actividad fagocítica de los fagocitos, la actividad lítica de las células asesinas naturales, y la producción de mediadores celulares) como se propone en muchas aplicaciones no han sido considerados efectos fisiológicos benéficos si no van acompañados por los resultados fisiológicos y clínicos. En el caso particular de los grupos poblacionales considerados de riesgo de la inmunosupresión (por ejemplo, los adultos mayores, las personas que experimentan el estrés o la práctica de ejercicio físico intenso o después de la exposición a la radiación UV), los estudios que muestran una mejoría en los síntomas y / o restauración o mantenimiento de los marcadores de inmunidad pueden ser considerados como apropiados.

Para las declaraciones sobre la reducción de un factor de riesgo para la alergia, las medidas que resultan apropiadas, pueden comprender las alteraciones en los marcadores inmunológicos acompañados de una mejora en los resultados clínicos relacionados con la alergia (por ejemplo, reducción en la incidencia, gravedad o frecuencia de las manifestaciones alérgicas).

Se han propuesto otras posibles declaraciones, como la reducción de la inflamación. En estos casos, la EFSA sólo considera aquellas en las que los cambios en los marcadores de inflamación asociados con el desarrollo de la enfermedad vayan acompañados de los resultados benéficos con pruebas fisiológicas o clínicas. En el contexto de una reducción del riesgo de enfermedad, una reducción en los niveles de los marcadores de inflamación también podría indicar un efecto fisiológico benéfico si se acompaña de una reducción en la incidencia de una enfermedad asociada con la inflamación crónica (EFSA 2011).

8.5 Declaraciones de propiedades saludables en estudios con intervención humana.

Los reclamos referentes a la documentación de la salud se basan principalmente en los estudios con intervención humana llevados a cabo en una población; antes de realizar estos, es importante establecer la razón de uso de una cepa probiótica o una combinación de cepas para obtener información sobre las propiedades preclínicas de éstas. De igual forma, es de vital importancia seleccionar la población dependiendo del objetivo que corresponda a la demanda prevista, así como de suma importancia el utilizar la misma dosis en todos los individuos.

Estos estudios se pueden clasificar de varias formas, sin embargo, la siguiente jerarquía constituye la base común de su realización:

- a. Estudios del tipo ciego, estudios aleatorizados controlados, estudios aleatorizados no controlados y estudios controlados sin aleatorizar,
- b. Estudios observacionales (se refiere a la imposibilidad que el investigador tiene de manipular la variable independiente), estudios de cohortes (se basan en un seguimiento en el tiempo de uno o más grupos humanos que difieren entre sí por la presencia de una o más variables independientes), estudios caso-control, estudios transversales, y
- c. Otros estudios humanos que se ocupan de los mecanismos de acción de determinadas sustancias.

Los estudios en humanos deben llevarse a cabo de acuerdo con las directrices internacionales, y deben proporcionar información sobre los marcadores o factores que son importantes o marcadores intermedios asociados con los extremos claros en la enfermedad o el área de la salud en el efecto que se alega (EFSA2009).

8.6 Totalidad de pruebas.

Tal como se especifica en la regulación de la salud europea, todos los reclamos deben ser justificados, teniendo en cuenta la totalidad de los datos científicos disponibles y la ponderación de las pruebas. Esto debe llevarse a cabo a partir de las condiciones específicas de uso. En particular, la evidencia total debe demostrar lo siguiente:

- a. El grado o la importancia del efecto declarado del alimento / componente para la salud humana;
- b. Si una de las causas científicas y efecto se puede establecer entre el consumo de alimentos o el componente de la alimentación y el efecto declarado en seres humanos (definir, por ejemplo, la fuerza, la consistencia, la especificidad, dosis-respuesta y plausibilidad biológica de la relación),
- c. La cantidad de consumo de alimento / ingrediente y el patrón requerido para obtener el efecto declarado. Cabe mencionar que la cantidad y porciones diarias deben ser tales que puede lograrse razonablemente como parte de una dieta equilibrada recomendada en los países europeos, y
- d. La población específica a la que se destina la demanda y el estudio de la población donde sea clara la evidencia que es representativa de la población objetivo (Van Loveren *et al.*, 2012).

8.7 Retos específicos en el contexto de probióticos.

Las tres áreas importantes de la normativa para la evaluación de las declaraciones de propiedades saludable para probióticos y prebióticos son los siguientes:

- a. La caracterización de la cepa o cada una de las cepas en una mezcla o combinación de probióticos y prebióticos (sinbióticos),
- b. La identificación de la relación entre los beneficios a la salud en una población general o de una parte determinada de ella, y
- c. La demostración de efectos sobre la salud en una población objetivo normal y saludable.

8.7.1 Viabilidad

La definición actual de la OMS de los probióticos les caracteriza como complementos alimenticios viables, pero la viabilidad se define por la mayoría de las autoridades reguladoras como “*culturability*” lo que se refiere a la capacidad de un microorganismo para ser cultivado. Esta capacidad depende de las condiciones de cultivo y como se ha demostrado en estudios, sólo una pequeña parte de la microbiota intestinal puede ser

cultivado. Sin embargo, estas bacterias pueden ser viables y no viables, incluso si las células están presentes pueden tener un efecto sobre la salud humana.

La determinación fiable de la viabilidad de bacterias probióticas en los productos es esencial, tanto en estudios en seres humanos, como en el control de la calidad del producto. En la mayoría de los análisis de regulación, el método de recuento en placa se ha utilizado tradicionalmente para controlar la viabilidad de las bacterias, pero hay varios inconvenientes. El método de recuento en placa requiere medios de cultivo específicos y tiempos de incubación relativamente largos, y se ve obstaculizada por dificultades técnicas en condiciones de incubación para las diferentes especies. Para muchas especies que residen en el tracto intestinal humano, ni siquiera hay un medio de crecimiento adecuado y conocido. Además, para microorganismos exigentes, tales como especies de *Bifidobacterium*, de origen intestinal que se utiliza cada vez más como probióticos, puede ser difícil encontrar un medio de crecimiento óptimo para un conteo fiable. Estas bacterias tienen requerimientos nutricionales y ambientales específicos y únicos para el crecimiento óptimo, y el conteo en placas para ciertas cepas puede variar cuando se cultivan en diferentes medios de cultivo rico. A menudo no es posible identificar a todos los medios con potencial de crecimiento para una cepa particular. Estas dificultades pueden llevar a una subestimación de las cuentas de probióticos reales (Van Loveren *et al.*, 2012).

Otro desafío importante recientemente informado para el método de recuento en placa es la presencia de las llamadas bacterias latentes, las cuales son incapaces de crecer en medios de cultivo convencionales, pero no obstante se pueden medir como viables usando ensayos citológicos. Dicha población inactiva puede existir en muchos productos probióticos y de alimentos, y una población similar se produzca en los ácidos biliares. Los informes recientes sugieren que las bacterias probióticas en un producto fermentado pueden permanecer latentes durante el almacenamiento prolongado. Las propiedades específicas de la cepa y los objetos de análisis, deberán tenerse en cuenta cuando los futuros métodos de conteo de diferentes cepas de probióticos sean elegidos, y esto también se debe considerar en el control reglamentario.

8.8 ¿Por qué las declaraciones de salud sobre la aceptación de probióticos y prebióticos no se aceptan?

A diferencia de Japón, donde las declaraciones de salud pueden estar basadas en la evidencia de los experimentos con animales, en Europa, la justificación de la salud requiere la evidencia de estudios en humanos. Esta es una razón primordial por la cual, a diferencia de Japón, las opiniones sobre pre y probióticos publicadas hasta el momento por la EFSA no han sido favorables. Para muchos microorganismos probióticos, otro tema principal ha sido la falta de caracterización. Aunque se sabe que los efectos son dependientes de la cepa, la información en la que las evaluaciones se hacen ha fracasado a menudo para proporcionar satisfactoriamente la caracterización de la cepa. Esto se refiere al artículo 13.1, 13.5 y 13.14. No obstante, también en este último tipo de declaraciones, las combinaciones de las bacterias a veces se han utilizado en los estudios, y las reivindicaciones actuales se han relacionado con cepas específicas, y viceversa. De lo contrario una combinación de cepas de bacterias se ha utilizado, y sólo una parte de ellos se han caracterizado suficientemente (Van Loveren *et al.*, 2012).

Para los microorganismos, así como prebióticos potenciales, un problema frecuentemente encontrado en las evaluaciones ha sido que la relación con los beneficios a la salud no se define. Cualquiera de las relaciones de salud reclamadas han sido demasiado generales, o fueron considerados por la EFSA como no benéfico. En este contexto, una de las principales razones para no conceder una opinión positiva ha sido que muchas declaraciones han declarado que el simple aumento de la proporción de lactobacilos o bifidobacterias en el intestino debe ser considerado como un efecto benéfico para la salud. La EFSA no ha aceptado este punto de vista y ha requerido la evidencia de los resultados benéficos clínicos. Esta información a menudo no ha sido proporcionada. Otros ejemplos de afirmaciones demasiado generalizadas han sido las declaraciones como "mejora la salud intestinal" o "estimula el sistema inmunológico."

Las declaraciones a veces han sido juzgados como no elegibles por la EFSA en las que han de referir al tratamiento de situaciones patológicas en lugar de mantener condiciones fisiológicas normales o reduciendo los factores de riesgo de enfermedades. Los efectos en los pacientes pueden, bajo ciertas circunstancias, ser aceptados como evidencia de los

efectos en la población general, pero afirma estar orientada sólo a ciertos sujetos, más allá del alcance de la regulación de las declaraciones que se consideraran elegibles. Algunas declaraciones se han orientado a reducir el riesgo de una enfermedad pero no han podido identificar factores de riesgo, y esto es necesario en la regulación de las declaraciones (Van Loveren *et al.*, 2012).

Otros estudios han fracasado debido a que han tenido fallas en su diseño. Los estudios no siempre han sido lo suficientemente aleatorios, las medidas para diseñar los estudios ciego no siempre han sido suficientes, y a menudo el análisis estadístico ha sido inadecuado. Una falla que se encuentra a menudo ha sido que muchas de las medidas han sido estudiadas, pero el análisis estadístico no se ha corregido para comparaciones múltiples.

Se han encontrado además, defectos en las medidas reales por ejemplo, la base inmunológica para la nariz que moquea o una erupción cutánea para corroborar la naturaleza alérgica de estas medidas ha estado ausente, o por ejemplo no se ha abordado la naturaleza infecciosa de la diarrea.

Toda una serie de retos han aparecido en el área de probióticos y prebióticos, mientras que las propiedades saludables no han sido establecidas de acuerdo con los requisitos reglamentarios. A pesar de extensos estudios en el área, el enfoque ha sido más allá del alcance de las normas aprobadas por el Parlamento Europeo.

Las herramientas de investigación por lo tanto debe ser redirigidas a las áreas que apoyan las declaraciones de salud en un futuro. Se debe aprender de la experiencia de las evaluaciones previas para hacer declaraciones de propiedades saludables de los probióticos y prebióticos, proporcionando asesoramiento a los consumidores y nuevas direcciones para ayudarles a tomar decisiones más saludables y desarrollar estilos de vida que contribuyen a su bienestar a largo plazo (Van Loveren *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 9. LEGISLACIÓN EN MÉXICO Y ACCIÓN PUBLICITARIA.

9.1 Etiquetado y especificaciones.

En México, las normas **NOM-086-SSA1-1994** Bienes y Servicios. Alimentos y Bebidas no Alcohólicas con Modificaciones en su Composición. Especificaciones Nutrimentales y la **NOM-043-SSA2-2005** Servicios Básicos de Salud. Promoción y Educación para la Salud en Materia Alimentaria. Criterios para Brindar Orientación; regulan las informaciones contenidas en las etiquetas de los productos alimentarios procesados, limitándose solamente a mencionar la descripción de la composición nutrimental del producto y sus valores calóricos, dejando al libre albedrío la responsabilidad por parte de los fabricantes, de demostrar y validar científicamente las Declaraciones relativas a la Salud. En el apartado 4.3.7 de la NOM-043-SSA2-2005 se menciona: "Se debe recomendar leer las etiquetas de los productos para conocer sus ingredientes, información nutrimental, contenido en peso y volumen, modo de uso, leyendas de conservación o leyendas precautorias, así como fecha de caducidad o de consumo preferente, según sea el caso", en este apartado se están refiriendo a *leyendas precautorias*, sin embargo no hay mención de la regulación de las otras leyendas que comprometen al consumo del alimento con una consecuencia favorable en la salud. Además, términos científicos en la alimentación como Probióticos, Prebióticos, Alimentos Funcionales, Nutracéuticos y Bio-ingredientes no fueron tomados en cuenta en esta norma, para describir los alimentos con características favorables para la Alimentación Saludable, ni tampoco se regula el uso de estos términos en la declaración de algún alimento.

En esta misma norma, se lee : "El propósito fundamental de esta Norma es establecer los criterios generales que unifiquen y den congruencia a la Orientación Alimentaria dirigida a brindar a la población, opciones prácticas con respaldo científico, para la integración de una alimentación correcta que pueda adecuarse a sus necesidades y posibilidades. Así como elementos para brindar información homogénea y consistente, para coadyuvar a promover el mejoramiento del estado de nutrición de la población y a prevenir problemas de salud relacionados con la alimentación. La orientación alimentaria es prioritaria y debe proporcionarse a toda la población, es conveniente que atienda a los intereses del público

en general, de los grupos vulnerables en especial y que tome en cuenta a la industria y a otros grupos interesados”

Contrariamente, a este propósito, la población se encuentra verdaderamente vulnerable al no establecerse la regulación de frases que comprometen al alimento a uno o más de sus ingredientes, con su acción favorable en el mantenimiento de la salud. Quienes se encargan de la concepción de nuevos productos al mercado saben que se deben evaluar primeramente su inocuidad, pero además también se debe evidenciar el verdadero efecto de tal componente específico, con cantidades específicas.

Como se vio en el capítulo anterior, la EFSA establece que “las empresas alimentarias que efectúen una declaración en materia de nutrición o salud deben basarse en pruebas científicas generalmente aceptadas y justificarlas por esas pruebas”. Además, las autoridades competentes de los Estados miembros podrán pedir al operador de empresa alimentaria o responsable de la comercialización de los productos, todos los elementos y datos que validen sus declaraciones y certificarlos.

9.1.1 Productos lácteos.

En México, el consumo de probióticos o incluso de sinbióticos es a través de alimentos lácteos en su mayoría. La NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba, se encarga de clasificarlos.

En México por razones políticas, solo se ha logrado consensar el documento para establecer las características del Yogurt: *debe contener Streptococcus thermophilus y Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus* que son las bacterias acidolácticas específicas de este producto. Y al menos debe contener viables 10^7 UFC/g.

Es importante conocer que los productos, resultado de la fermentación de la leche con bacterias inocuas que causan la coagulación de la leche y cambian el valor de la acidez, se denominan leches fermentadas. Es muy importante mencionar que una leche fermentada debe tener bacterias lácticas vivas hasta el término de la fecha de caducidad. Actualmente se busca establecer una norma que incluya a las leches cuya fermentación se efectúe con bacterias probióticas, esta norma incluirá las denominaciones como hoy; Producto lácteo fermentado y Alimento lácteo fermentado.

La gran diferencia que existe con el Yogurt, es que en este tipo de productos, las leches fermentadas con probióticos, deben contener al menos 10^8 UFC/g y estas bacterias deben ser resistentes para llegar al intestino y colonizar temporalmente, dando como resultado un balance de bacterias en el tracto intestinal.

En la NOM-181-SCFI-2010, sólo se incluye en el Apéndice Informativo que las bacterias lácticas más comunes son:

Bifidobacterium bifidum, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*,
Bifidobacterium animalis, *Streptococcus salivarius* spp *thermophiles*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus helveticus* spp.*jugurti*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* spp.*paracasei*, *Lactobacillus casei* *Shirota*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* (LGG), *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus defensis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus reuteri*.

9.2 Mercado Nacional.

El mercado de los alimentos saludables en México se está desarrollando rápidamente debido al aumento del ingreso *per cápita* y la sensibilización de los consumidores por los beneficios de una dieta saludable. Este segmento del mercado se estima en cerca de mil millones de pesos por año y se espera que crezca a una tasa promedio anual de 10%. En la actualidad el 70% de los alimentos son de producción nacional y el 30% importados, de éstos el 65% proceden de Estados Unidos. Estos productos son principalmente productos de soya e ingredientes de soya, alimentos y suplementos de fibra, barras de energía y del tipo “listos para comer” (Industria Alimenticia, para los Procesadores de Alimentos Latinoamericanos, 2009).

Los principales consumidores de alimentos “buenos para la salud”, son de 20 años de edad a 50 años con ingresos suficientes para su consumo (un 5% de la población). En la actualidad, el segmento incluye alimentos tales como: bajo en calorías, baja en grasa, baja en carbohidratos, alta en fibra y alta en proteínas, enriquecidos con vitaminas, sin gluten, etc. Más allá de las barras nutricionales y otros alimentos “buenos para la salud”, como los sustitutos de alimentos, productos de panadería de grano entero, cereales, pastas y frutos secos / mezclas de granos, y muchos otros productos embotellados o enlatados, tienen buenas perspectivas. El sector de más rápido crecimiento es la de los

productos de soya (Industria Alimenticia, para los Procesadores de Alimentos Latinoamericanos, 2009).

9.2.1 Nestlé.

Nestlé es una empresa líder a nivel mundial en nutrición, salud y bienestar con operaciones en los cinco continentes. En 1930 Nestlé llega a México y se establece como importador de productos alimenticios. En 1935 se inaugura la primera fábrica en Ocotlán, Jalisco e inicia la producción industrial. Actualmente cuenta con 14 fábricas y 16 centros de distribución. Tiene una gran variedad que va desde bebidas, cafés, chocolates, helados, productos lácteos, nutrición infantil y alimentos para mascotas, entre otros. Algunos de los productos que se comercializan en México que en su declaración contienen probióticos o prebióticos son los siguientes (Nestlé, 2013).

Nestlé gastroprotect ®: Los Lactobacilos *La1*®, exclusivos de Nestlé®, son probióticos que cuentan con Sustento Científico de Estudios Clínicos, donde han demostrado efectividad en reducción de la inflamación gástrica. Nestlé declara que este producto ayuda a disminuir la gastritis (Causado por *Helicobacter pylori*), sin embargo no erradica el problema. Por ello es que se recomienda tomarlo diariamente, acompañado de una dieta correcta, un estilo de vida saludable, además de contar con el apoyo de un tratamiento médico adecuado y personalizado de un especialista en gastroenterología. Existen dos presentaciones, bebible de 110g y 228g, y batido con presentación de 120g y con cereal Fitness® de Nestlé® de 126g. Los sabores disponibles son: natural, fresa, durazno, ciruela pasa y manzana (Nestlé, 2013).

Svelty ®: Es una amplia línea de productos que por su perfil bajo en grasa y azúcar pueden incluirse en una dieta balanceada, junto con la práctica de actividad física. Contiene Actifibras®: las cuales son fibras prebióticas que pueden ayudar a regular el sistema digestivo. Cuenta con productos deslactosados.

Nido Excella Gold: Es un producto lácteo dirigido a la alimentación infantil que contiene grasa vegetal en polvo, adicionado de vitaminas (entre ellas A y D), minerales, oligofruktosa e inulina, probióticos (Bifidus BI, una combinación de *B. longum* y *L. rhamnosus*), ARA y DHA (Ácido docosahexaenoico).

9.2.2 Danone.

Grupo Danone que tiene sede en Francia, empieza sus actividades en México en el año de 1973 gracias a la asociación con un productor local Xalapa Industrial. Tres años después Xalapa Industrial cambia su denominación a Danone de México S.A.

Danone de México opera en el país desde 1977. En el año 1992 se inicia con la construcción de la planta de producción ubicada en Irapuato, Guanajuato. Dos años después se inaugura la Planta Irapuato, siendo la más moderna en América Latina. Danone de México es líder en el sector de productos lácteos frescos, comercializando 7 marcas de productos lácteos con éxito, sus productos son Yogurt Danone, Activia, Danonino, Danup, Vitalínea, Postres Danette y Gelatina Dany.

Activia® es un alimento lácteo fermentado y es el único que contiene el exclusivo probiótico Acti-Regularis® (*Bifidobacterium lactis* CNCM I-2494), que ayuda a mejorar la salud digestiva, reduciendo la sensación de inflamación. Se ha demostrado que el probiótico Acti-Regularis® sobrevive a través del tracto gastrointestinal, por lo que es capaz de llegar vivo al intestino en una gran cantidad. Activia llegó a México en 2003, y con su lanzamiento se crea el mercado de yoghurts que ofrecen beneficios para la salud digestiva. Activia es la marca #1 en alimentos lácteos fermentados bebibles, y cuenta con 13 sabores diferentes en este formato (Danone, 2013).

Otro producto probiótico de Danone es Flora®, el cual es un alimento fermentado que contiene *L. paracasei* y se presenta en dos sabores, fresa y natural.

9.2.3 Yakult.

Alrededor de 1930 en Japón, miles de personas murieron de desnutrición crónica, debido a la escasez de alimentos y a las infecciones intestinales, esto debido a la falta de higiene. El Dr. Minoru Shirota inició la investigación sobre bacterias lácticas, por lo que logró aislar y cultivar el *Lactobacillus casei*, mismo que fortaleció para sobrevivir a jugos gástricos y bilis; esta bacteria benéfica recibe el nombre de *Lactobacillus casei* Shirota, en honor a Dr. Shirota. Para ayudar a mejorar la salud de las personas, se comenzó la fabricación y venta de Yakult.

El producto llega a México en 1981, donde nace Yakult México, atendiendo el servicio a domicilio, es hasta 1982 que inicia la venta en tiendas de autoservicio y agencias. En 2002 la planta recibe la certificación HACCP y se introduce el producto Sofúl. En 2007 se introduce sofúl para beber y en 2008 Yakult 40LT. Actualmente la presencia mundial de Yakult abarca más de 33 países de Asia, Oceanía, América y Europa. En la tabla 13 se muestran los productos comercializados en México.

Tabla 13. Características de los productos comercializados por Yakult en México.				
Producto	Yakult	Yakul LT 40	Sofúl	Sofúl para beber
Definición	Producto lácteo fermentado que contiene más de 8 mil millones de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota que son capaces de llegar vivos a los intestinos mejorando las propiedades de la microbiota intestinal.	Producto lácteo fermentado con más de 40 mil millones de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota que son capaces de llegar vivos a los intestinos mejorando las propiedades de la microbiota intestinal, además no contiene azúcar.	Sofúl es un alimento lácteo fermentado de consistencia suave además por estar elaborado con leche aporta calcio y proteína.	Sofúl para beber un alimento lácteo fermentado, por estar elaborado con leche aporta calcio y proteína.
Uso	Es recomendable el consumo de 1 frasco de Yakult diariamente, ya que la bacteria coloniza temporalmente el intestino y de esta manera aseguramos su presencia constantemente.	Es recomendable el consumo diario para adultos con un intenso ritmo de vida.	Se recomienda el consumo de una copa diariamente. Cada copa de Sofúl contiene más de 100 millones de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Streptococcus thermophilus</i> por gramo y además aporta calcio y proteínas	Se recomienda el consumo de una copa diariamente. Cada copa de Sofúl contiene más de 100 millones de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Streptococcus thermophilus</i> por gramo y además aporta calcio y proteínas
Ingredientes	Agua, azúcar, 3.6% de leche descremada en polvo, glucosa, saborizante artificial y <i>Lactobacillus casei</i> Shirota .	Agua, fibra dietética (Polidextrosa), leche descremada en polvo, fructosa, glucosa, fibra de soya, saborizante artificial, sucralosa y <i>Lactobacillus casei</i> Shirota . Grasa de leche 0,04%. Sin azúcar.	Leche descremada en polvo, azúcar, crema de leche de vaca, grenetina, agar, goma xantano, saborizante artificial, cultivos lácticos (<i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Streptococcus thermophilus</i>). Variantes: Mango, Fresa y Manzana.	Leche descremada en polvo, azúcar, crema de leche, almidón, lactato de calcio, pectina, saborizante artificial, vitamina E, vitamina D y cultivos lácticos (<i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Streptococcus thermophilus</i>). Variantes: Fresa, Mango
Temperatura de conservación.	< 10 °C	4°C	4°C	4°C

9.2.4. Otros productos.

Existen otros productos lácteos de diferentes marcas que se presentan en forma de yogurt o leche fermentada que reportan contenido en probióticos.

Yoplait pro-digestión es un yogurt funcional que es lanzado para combatir el estreñimiento al contener el probiótico BB-12 (*Bifidobacterium lactis* Bb12) y ser adicionado con fibra. Los sabores de presentación son ciruela pasa, fresa y pera (Yoplait, 2013).

El Yoghurt Funcional Bebible o batido LALA BioBalan.ce contiene fibra y probióticos; y los sabores de presentación son ciruela pasa, piña-apio-nopal, papaya-naranja, arándano-aloe vera y nuez-frutos secos. LALACULT es una bebida láctea que contiene lactobacilos, contiene menos azúcar que los demás, sin ser light (Lala, 2013).

CONCLUSIONES.

La función de la microbiota intestinal, tiene un impacto directo en la salud del intestino, ya que es el órgano con más actividad inmunológica, y es una entrada a posibles agentes patógenos externos. Las adhesinas, cápsulas, biopelículas, endotoxinas, exotoxinas y los factores de virulencia, son mecanismos de patogenicidad que usan las bacterias para entrar al intestino, provocando la respuesta inmune específica frente a una infección. Frente a estos mecanismos, la microbiota intestinal actúa bloqueando los sitios de adhesión, con la competencia con nutrientes y la producción de sustancias inhibitorias, que impiden que las bacterias patógenas puedan colonizar el intestino y llevar a cabo el proceso de infección.

Existe un consenso en la literatura internacional y en la normatividad sobre los términos probióticos, prebióticos y sinbióticos. Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un efecto benéfico sobre la salud del hospedero”. Los prebióticos son “ingredientes alimenticios fermentados selectivamente que como resultado provocan cambios específicos, en la composición y / o actividad de la microbiota intestinal, lo que confiere beneficio(s) a la salud del hospedero”. Por último los sinbióticos se definen como “mezclas de probióticos y prebióticos que afectan benéficamente al hospedero al aumentar la supervivencia microbiana mediante la implantación de suplementos dietéticos microbianos en el tracto gastrointestinal, estimulando selectivamente el crecimiento y / o activando el metabolismo de una o un número limitado de bacterias, lo que mejora el bienestar y promueve la salud del hospedero

Sin embargo, no lo existe en la validez de los estudios que demuestran los efectos benéficos y, por lo tanto, en la “legalidad” de etiquetar los productos como benéficos para consumo humano. Los factores de conflicto son: la viabilidad de los microorganismos, vehículo y dosis administrada. El punto importante de conflicto es que la legislación europea requiere que los productos cuya mercadotecnia está enfocada a la salud sean evaluados con criterios farmacológicos, de estudios clínicos, mientras que en el resto de los países se aceptan como válidos estudios en animales y en modelos celulares.

La introducción de nuevas tecnologías en la producción de los probióticos, prebióticos y sinbióticos hace atractiva la opción de su consumo al haber toda una gama de productos nuevos, que se incluyen no solo en productos lácteos, sino ahora se añaden a otros productos como cárnicos, barras de cereal y jugo.

El uso de probióticos ha avanzado en el tratamiento de problemas clínicos. Los estudios más numerosos abordan problemas de diarrea en niños y adultos y se han obtenido mejores resultados más convincentes cuando el origen de la enfermedad es una gastroenteritis viral, más que una parasitaria o bacteriana. La especies de microorganismos con mejores resultados son *L. reuteri*, *L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* cuando se administran con mezclas de GOS y FOS.

En el caso de otro tipo de enfermedades, como la Enfermedad Inflamatoria Intestinal o el síndrome del intestino irritable, en las que intervienen varios factores, entre ellos los genéticos, inmunológicos y ambientales, el tratamiento es más complejo. La utilización de probióticos parece ser una buena alternativa terapéutica, sin embargo, los estudios sólo han presentado resultados clínicos positivos en situaciones muy concretas. Se ha trabajado generalmente con formulaciones prebióticas y sinbióticas, en las cuales se destacan el uso de inulina, FOS y la cepa *Bifidobacterium longum*, en donde se observa una reducción en la actividad de la enfermedad al mejorar los trastornos funcionales digestivos.

En lo que cabe a la regulación de estos productos, existen requerimientos que se piden a los productores de acuerdo a la región comercial. La Unión Europea, en su reglamento (CE) n ° 1924/2006, tiene bien definidos sus principios de aceptación, en un marco regulatorio avalado por la EFSA, donde se pide estrictamente la caracterización de la cepa y el prebiótico, la identificación del efecto benéfico y la demostración de éste sobre la salud en una población objetivo.

En México, no existe una regulación en forma para estos productos, por lo que se necesitan filtros más estrictos en cuanto a la comercialización de productos que declaran en su etiqueta beneficios a la salud. Reglamentar un producto fortalece su credibilidad y lo ayuda a consolidarse en el mercado internacional.

BIBLIOGRAFÍA.

ARTICULOS CIENTÍFICOS.

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I., (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J Food Microbiol* 123, 121–129.

Allen SJ, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, Dans LF (2004). Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD003048.

Amor, M.S., Mayo, B., (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci* 76, 138–146.

Anal A., Singh H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Technol* 18(5):240–51

Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R., Hristozova, T., (2006). Development of a new oat-based probiotic drink. *Int J Food Microbiol* 112, 75–80.

Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int Dairy J* 15, 399–409.

Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, M., Salvini, F., Zuccotti, J. (2011). Review: Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacol Res* 63; 366–376

Bang MH, Chio OS, Kim WK. (2007). Soyoligosaccharide increases fecal bifidobacteria counts, short-chain fatty acids, and fecal lipid concentrations in young Korean women. *J Med Food* 10:366–70

Balciunas, E., Castillo, F., Dimitrov, S., Gombossy, B., Converti, A., Pinheiro, R. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32; 134-142.

Barrio, A. (2006) Probióticos, prebióticos y sinbióticos. Definición, funciones y aplicación clínica en pediatría. *Rev Pediatr Aten Primaria*, No. 8 Supl 1:S99-118

Bartosch, S., Woodmansey, E., Paterson, J., McMurdo, M., Macfarlane, G., (2005). Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 40(1):28–37.

Beausoleil M, Fortier N, Guénette S, *et al* (2007). Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* C11285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Gastroenterol*; 21:732–6.

Birujete G. A., Juarez H. E., Sieiro, O. E., Romero, V. R., Silencio, B. J., (2009). Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Rev Mex de Pediatr*, Vol. 3, Núm. 3, 136-145

Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C., (2003). Review. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res Int* 36, 527–543.

Borrueal, N. (2007). Probióticos y prebióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol* 30(7):419-25

Bruno, F. A., & Shah, N. P. (2003). Viability of two freeze-dried strains of *Bifidobacterium* and commercial preparations at various temperatures during prolonged storage. *J Food Sci*, 68,2336–2339.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J., (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Eng*, 104, 467–483

Casellas F, Borrueal N, Torrejon A *et al.*, (2007) Oral oligofructose- enriched inulin supplementation in acute ulcerative colitis is well tolerated and associated with lowered faecal calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther* 25, 1061–1067.

Casiraghi MC, Canzi E, Zanchi R, Donati E, Villa L. (2007). Effects of a synbiotic milk product on human intestinal ecosystem. *J Appl Microbiol* 103(2):499–506.

Champagne, C., Fustier, P., (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr Opin Biotech* 18 (2), 184– 190.

Charalampopoulos, D., Rastall, R. (2012). Prebiotics in foods. *Curr Opin Biotech*, 23:187–191

Chen, M.J., Chen, K.N., (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Wiley-Blackwell*, 83–107.

Chermesh I, Tamir A, Reshef R *et al.*, (2007) Failure of Synbiotic 2000 to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 52, 385–389.

Claesson MJ, van Sinderen D, O'Toole PW. (2008). *Lactobacillus* phylogenomics—towards a reclassification of the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2945–54

Danese, S., Sans, M., Fiocchi, C. (2004). Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 3, 394–400.

Davis, C., Milner, J. (2009). Reviews: Current Topics. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem* 20, 743–752.

De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int Dairy J* 20 (4), 292–302.

Domínguez, A., Vázquez, L., Ramos, G. (2009). Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *ALAN*, vol.59, no.4, 358-368. ISSN 0004-0622.

Dughera L, Elia C, Navino M *et al.*, (2007) Effects of symbiotic preparations on constipated irritable bowel syndrome symptoms. *Acta Biomed* 78, 111–116.

Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D *et al.*, 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 73 (Suppl.):386S–92

Eamonn MM Quigley (2011). Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Curr Opin Pharmacol*, 11:593–603

EFSA.(2011). Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA J.* 9(4):1984

EFSA. (2009). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to non-characterized microorganisms pursuant to article 13(1) of regulation (EC) no. 1924/20061. *Sci. Opin.Panel Diet. Prod.Nutr. Allerg.*

FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Can: WHO.

Farnworth, E.R., Mainville, I., Desjardins, M.P., Gardner, N., Fliss, I., Champagne, C., (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *Int J Food Microbiol* 116, 174–181.

Forbes, A., Hunter, J. (2007) Irritable bowel syndrome. *Med.* 35(5):267-271.

Franz, C., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A., (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* 151, 125–140

Fujimori S, Tatsuguchi A, Gudis K, Kishida T, Mitsui K. (2007). High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22(8):1199–204

Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A. (2005) Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 54, 1346.

Gänzle, M. G (2012). Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *Int Dairy J* 22, 116-122

Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17:259-75

Gibson GR, Roberfroid MB. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:1401–12

Geier, M., Butler, R., Howarth, R. (2007) Review. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol* 115,1–11

Hanauer, S.B., (2006). Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 12 (Suppl 1), S3–S9.

Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans AD, de Vos WM. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 68:114–23

Hickson M, D'Souza AL, Muthu N.(2007). Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ*;335(7610):80.

Jozala, A. F., Andrade, M. S., Arauz, L. J., Pessoa, A., Jr., & Vessoni-Penna, T. C. (2007). Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. *Appl Biochem Biotech*, 136, 515-528.

Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J. (2004). Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, 70, 2906-2911.

Kleerebezem, M., Vaughan, E (2009). Probiotic and Gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular Approaches to Study Diversity and Activity. *Annu Rev Microbiol* 63:269–90
Hussey TA, Issenman RM, Persad R. (2003) Nutrition therapy in pediatric Crohn's disease patients improves nutritional status and decreases inflammation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37.

Kolida, S. y Gibson, G (2011). Synbiotics in Health and Disease, *Annu Rev Food Sci Technol* 2:373–93

Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Bird AR, Jackson M, Esterman A.(2005) A synbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J Nutr*, 135:996–1001.

Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J., Willems, R.J.L., (2004). A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* 186, 672–682

Leroy, F., Verluyten, J., de Vuyst, L., (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int J Food Microbiol* 106, 270–285..

Lilly DM, Stillwell RH. (1965). Probiotics: growth promoting substances produced by microorganisms. *Sci*; 147: 747–748.

Marchesi, Julian R., (2011). Human distal gut microbiome. *Env Microbiol* 13(12), 3088–3102

Meng, X., Stanton, C., Fitzgerald, G., Daly, C., Ross, R. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem* 106; 1406–1416

Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L. (2006). Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 72:1027–33

Olesen M & Gudmand-Hoyer E (2000) Efficacy, safety, and tolerability of fructooligosaccharides in the treatment of irritable bowel syndrome. *Am J Clin Nutr* 72, 1570–1575.

OMGE, G.P. (2008). Probióticos y prebióticos. España: *World Gastroenterology Organization*.

Ouwehand, A., Tiihonen, K., Saarinen, M., Putaala, H., Rautonen, N., (2009). Influence of a combination of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and lactitol on healthy elderly: intestinal and immune parameters. *Br J Nutr* 101(3):367–75.

Paineau D, Payen F, Panserieu S. (2008) The effects of regular consumption of short-chain fructo-oligosaccharides on digestive comfort of subjects with minor functional bowel disorders. *Br J Nutr* 99, 311–318

Park E, Jeon GI, Park JS, Paik HD (2007). A probiotic strain of *Bacillus polyfermenticus* reduces DMH-induced precancerous lesions in F344 male rat. *Biol Pharm Bull*; 30:569–74.

Prado, F., Parada, J., Pandey A., Soccol, C. (2008) Review: Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res Int* 41, 111–123

Prats, C. A., (2007). Probióticos: una alternativa natural como promotores de salud. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 38, No. 1, 49-53.

Rafter J, Bennett M, Caderni G *et al.*, (2007) Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 85, 488–496.

Rask, L., Ebersbach, T., Frøkiær, H. (2012) Prebiotics for prevention of gut infections. *Trends Food Sci Tech* 23, 70-82.

Rastall, R.A., (2010) Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture. *Annu. Rev Food Sci Technol* 1:305–39

Raizel, R., Santini E., Kopper, A., Domingos, A. (2011). Effects of probiotics, prebiotics and synbiotics consumption on the human organism. *Rev Saúde Publ*, 2, 66-74.

Reuter G. (2001) The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol* 2:43–53

Rolfe RD., (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*, 130: 396S–402S.

Ross JJ, Boucher PE, Bhattachayya SP, Kopecko DJ, Sutkowski EM, Rohan PJ., (2008) Considerations in the development of live biotherapeutic products for clinical use. *Curr Issues Mol Biol*; 10(1-2): 13-6

Rivera, Y., Gallardo, Y., (2010) Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol* 27, 1–11

- Roberfroid, M. (2010) Prebiotic effects. Metabolic and health benefits. *NS Brit J Nut. S* 1-63.
- Russell, D.A., Ross R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., (2011) Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 149, 88–105
- Sanders, M., Marco, M., (2010). Food Formats for Effective Delivery of Probiotics. *Annu Rev Food Sci Technol* 1:65–85
- Sanz, Y., Collado M.C., Dalmau, J., (2006) Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del hospedero frente a patógenos gastrointestinales. *Acta Pediatr Esp*; 64: 74-78
- Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. (2001). Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67:504–13
- Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S, Black RE (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis*;6:374–82.
- Senok, A., Ismaeel, A., Botta A. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infect* 11: 958–966
- Silk DBA, Davis A, Vulevic J *et al.*, (2009) Clinical trial: the effects of a transgalactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 29, 508–518.
- Sheehan, V.M., Ross, P., Fitzgerald, G.F., (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Sci Emerg Technol* 8, 279–284.
- SERNAC, D.d. (2004). Alimentos funcionales, Chile.
- Stiles ME, Holzapfel WH. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J Food Microbiol* 36:1–29
- Tannock GW. (1998). Studies on the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. *Int Dairy J* 8:527–33
- USDA, F.A. (2009) Market Snapshot: Healty Food. *EUA: Market Development Reports*.
- Van Loveren, H., Sanz, Y., Salminen, S., (2012) Health Claims in Europe: Probiotics and Prebiotics as Case Examples. *Annu Rev Food Sci Technol* 3:247–61
- Walter J, Loach D, Alqumber M, Rockel C, Hermann C *et al.*, (2007). D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100–23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ Microbiol* 9:1750–60

Zacharof, M., Lovitt, R. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. A Review Article. *APCBEE Procedia* 2, 50 – 56.

Zamora, L. M., Carretero, C., & Pares, D. (2006). Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Sci Tech Int* 12, 77–84.

Zolezzi A., F. (2007) Las Enfermedades Funcionales Gastrointestinales y Roma III. *Rev. Gastroenterol. Perú*; 27: 177-184

LIBROS

Brooks, G., Carrol, K., Butel, J. y Morse, S.; tr. por Stempa, O. y Enríquez, G., 2008. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 19ª edición, México, Editorial el Manual moderno. 157-159

Jay, J. *Modern Food Microbiology*. 6ª edition. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2003, New York. 143- 147.

CAPÍTULOS DE LIBRO.

Kuhn, M., Goebel, W., Phipott, D. y Sansonetti, P., 2002. Overview of the Bacterial Pathogens. **En:** Kaufmann, S., Sher, A., Ahimed, R., eds. *Immunology of Infectious Diseases*. ASM Press, Washington, D.C., 5-19.

Soriano, A. C., 2007. Prebióticos, probióticos y sinbióticos. **En:** Bussalleu R. A., Ramirez R. A., Tagle A. M., Eds. *Tópicos Selectos en Medicina Interna – Gastroenterología*. Perú. Sociedad Peruana de Medicina, capítulo 25.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Danone México [En línea] (Actualizado 20 de mayo de 2013).

Disponible en:

<https://www.danone.com.mx/> [Último acceso 13 de junio de 2013].

Federal Office for Consumer Protection and Food Safety, (2011). Feed additives: microorganisms. [Último acceso 19 de mayo de 2012]

Disponible en:

<http://www.bvl.bund.de>. 2011.

Industria Alimenticia para los Procesadores de Alimentos Latinoamericanos. Reporte especial México, 2009 [en línea] (Actualizado al 20 de Abril 2012)

Disponible en:

http://www.industriaalimenticia.com/Articles/Reportaje_Latinoamericano/BNP_GUID_9-5-2006_A_1000000000000668742 [Último acceso 23 de abril de 2012]

Lala México. [En línea] (Actualizado en noviembre 2012).

Disponible en:

<http://www.lala.com.mx/index.php?lang=es> [Último acceso el 13 de junio de 2013].

Nestlé México [En línea] (Actualizado 13 mayo 2013).

Disponible en:

<http://www.nestle.com.mx/> [Último acceso 13 de junio de 2013].

NORMA Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación.

Disponible en:

<http://www.institutodanone.org.mx/docs/NOM-043-SSAA2-2005.pdf>[Último acceso 18 de Septiembre de 2012]

Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.

Disponible en:

200.77.231.100/work/.../noms/2010/181scfi2010.pdf [Último acceso 18 de Septiembre de 2012]

Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.

Disponible en:

www.salud.gob.mx/unidades/di/nom/086ssa14.htm [Último acceso 18 de Septiembre de 2012]

Yakult México. [En línea]. (Actualizada en Mayo 2012)

Disponible en: <http://www.yakult.com.mx/> [Último acceso 20 de junio 2012]

Yoplait México. [En línea]. (Actualizado el 21 de marzo de 2013)

Disponible en:

<http://www.yoplait.com.mx/producto-yoplait-prodigestion.php> [Último acceso 13 de junio de 2013].