



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO DEL AUTOENSAMBLADO DE LACTOFERRINA Y
PECTINAS DE BAJO METOXILO EN LA SUPERFICIE DE
Lactobacillus acidophilus LAC-361 : SOBREVIVENCIA Y
ANTAGONISMO CONTRA *Clostridium difficile***

Por

NANCY CAROLINA RODRÍGUEZ MUNGUIA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo Sonora

Agosto de 2014

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de la QBC. Nancy Carolina Rodríguez Munguía, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Directora de Tesis



Dra. Luz Vázquez Moreno
Asesora



Dr. Humberto González Ríos
Asesor



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Asesor

Dra. Evelia Acedo Félix
Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la ayuda otorgada para realizar estos estudios.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A. C.), por aceptarme dentro de su programa de maestría.

A la Coordinación de Docencia de CIAD, por la beca otorgada para realizar estos estudios, también a la Dra. Gloria Yépiz, a Verónica Araiza, Argelia Marín y Laura García por sus atenciones y asesorías en todos los trámites realizados.

Con mucho cariño, agradezco a la Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort por haberme aceptado en su equipo de trabajo y darme la oportunidad de ser parte de esta investigación, por dirigir de la mejor manera este logro en mi vida, por sus lecciones, sus asesorías, todo su tiempo, por contribuir de muchas maneras a mi formación profesional, y sobre todo por el cariño y atenciones que tuvo siempre conmigo. Gracias por la confianza Dra. Gaby durante este tiempo. Gracias por todo.

A cada uno de mis maestros miembros del comité de tesis

Al personal de laboratorio y a los doctores Verónica Mata, Evelia Acedo, Mayra de la Torre, Jaime Lizardi, Aarón González, por facilitarme sus instalaciones y reactivos. Pero sobre todo gracias a la Dra. Luz Vázquez Moreno haberme permitido trabajar en el Laboratorio de Bioquímica de Proteínas, por aportar sus conocimientos, por toda su ayuda y amabilidad que siempre me brindo.

Al Dr. Humberto González por sus asesorías estadísticas en todo momento que lo necesite, por darme siempre un espacio de su tiempo con gran amabilidad.

A la M. en C. Ana María Domínguez Vergara por asesorarme en el análisis de resultados, técnicas de experimentos realizados, y manejo de equipos de laboratorio (Zetasizer, Lector Elisa, entre otros). Por compartir momentos importantes en mi vida y sobre todo por la amistad que hemos formado durante mi estancia en la maestría.

Al M. en C. Antonio Orozco por su asesoría en el manejo del calorímetro y su accesibilidad y confianza en todo momento, por hacerme sentir parte de su equipo de trabajo.

A la M. en C. María del Refugio Robles Burgueño por su asesoría en el manejo del liofilizador y equipos de laboratorio, por su ayuda, su amabilidad y sus buenas atenciones en todo momento.

A la M. en C. Ana Lilia López Duarte, M. en C. Rosina Cabrera y al Dr. Jorge Rocha por sus asesorías en el manejo de equipos, consejos académicos y por la amabilidad con la que siempre me apoyaron.

A la M. en C. Leticia Félix por su asesoría y recomendaciones para la activación y manejo de *Clostridium difficile*.

A la M. en C. Ana Arely González por su asesoría en el manejo de bases de datos para la obtención de artículos, por su amistad, su tiempo, sus consejos y discusiones académicas que ayudaron a mi formación

A la M en C. Ana María Guzmán Partida por sus atenciones y por asistirme siempre que lo necesitaba.

A mis compañeros de Laboratorio que fueron formando parte importante de mi vida sin que yo lo buscara Cindy, Abril, Idalia, Martín, Daniel, Mireya, Sergio, Carolina, Andre-i, porque a pesar del trabajo siempre hicimos un ambiente de armonía, ayuda y amistad.

A la maestría en general porque reafirmo los lazos de amistad y genero nuevos. Gracias a mis amigos Ernesto, Aaron, Esme, Karla, Majo, Víctor, Jonathan, Jorge, Yorya, Rogelio, Cindy, Anna, Jorge, Ale, por formar parte de mi vida.

DEDICATORIA

Dedico con mucho amor este trabajo mis padres, Franklin Gerardo Rodríguez Cota y Ana Ruth Munguía Papachoris, las personas que más admiro, gracias por amarme tanto y otorgarme las armas para salir adelante y ser quien soy, ustedes son la razón de todos los éxitos que llegue a alcanzar en la vida. Así como también a mis hermanos Franklin y Ana Ruth que siempre han estado junto a mi dándome ánimos y cariño son los mejores hermanos del mundo, a Paulito y Anita que me cambiaron la vida desde el momento que los vi por primera vez.

Especialmente dedico también mi trabajo y mi esfuerzo a mi mejor amigo, mi compañero, mi novio eterno, mi esposo y mi todo Ernesto Gallardo Espinoza por su amor y su inigualable apoyo, por estar conmigo en cada etapa de este proyecto, siendo un pilar fundamental de mi vida.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tablas.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Diarreas Asociadas al Uso de Antibióticos.....	3
1.2 Mecanismos de Acción de <i>Clostridium difficile</i>	5
1.3 Tratamientos Recomendados Para Diarreas por <i>C. difficile</i>	6
1.3.1 Tratamiento Estándar.....	6
1.3.2 Necesidad de Terapias y Tratamientos Alternativos.....	7
1.4 Uso de Probióticos en Diarreas Asociadas a <i>C. difficile</i>	8
1.4.1 Actividad de Especies de <i>Lactobacillus</i> contra <i>C. difficile</i>	10
1.4.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	11
1.5 Viabilidad y Estabilidad de Probióticos en Alimentos.....	12
1.6 Encapsulamiento e Inmovilización.....	13
1.7 Autoensamblado Molecular como Alternativa al Encapsulamiento...	14
1.7.1 Matrices Potenciales para el Recubrimiento de Probióticos por Autoensamblado.....	16
1.7.2 Lactoferrina.....	16
1.7.3 Pectinas de Bajo Metoxilo.....	17

CONTENIDO (continuación)

CAPITULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
2 Hipótesis.....	18
2.2 Objetivos.....	19
2.2.1 Objetivo General.....	19
2.2.2 Objetivos Específicos.....	19
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Esquema General de Trabajo.....	20
3.2 Materiales.....	22
3.3 Bacterias y Condiciones de Cultivo.....	22
3.4 Inhibición <i>In vitro</i> por Difusión en Placa del Probiótico contra <i>Clostridium difficile</i>	23
3.4.1 Efecto de las Suspensiones Bacterianas	23
3.4.2 Efecto de los Metabolitos Bacterianos.....	24
3.5 Confirmación de la Pureza de Lactoferrina.....	25
3.6 Efecto de la Lactoferrina en el Crecimiento de <i>L. acidophilus</i>	25
3.7 Recubrimiento por Autoensamblado Molecular.....	26
3.8 Caracterización Físicoquímica	29
3.8.1 Determinación de la Carga Superficial.....	29
3.8.2 Morfología	29
3.9 Efecto de la Liofilización en la Supervivencia del Probiótico Recubierto.....	29
3.10 Efecto del Almacenamiento a Bajas Temperaturas en la Supervivencia del Probiótico Recubierto.....	30
3.11 Efecto de las Condiciones Gastrointestinales Simuladas <i>In Vitro</i>	30

CONTENIDO (continuación)

3.12	Efecto del recubrimiento en la Adhesión de <i>L. acidophilus</i> a Mucinas Intestinales.....	32
3.13	Efecto del recubrimiento en la Capacidad Antagónica de <i>L. acidophilus</i> Recubierto contra <i>C. difficile</i>	35
3.14	Recuperación metabólica del probiótico recubierto sometido a altas y bajas temperaturas.....	35
3.15	Efecto del Recubrimiento en la Fase de Retardo del Crecimiento de <i>L. acidophilus</i>	37
3.16	Análisis Estadístico.....	37
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		39
4.1	Inhibición In Vitro de Diferentes <i>Lactobacillus</i> contra <i>C. difficile</i>	39
4.2	Confirmación de la Pureza de Lactoferrina.....	42
4.3	Efecto de la Lactoferrina en el Crecimiento de <i>L. acidophilus</i>	43
4.4	Recubrimiento por Autoensamblado.....	45
4.5	Caracterización de los Recubrimientos.....	46
4.5.1	Determinación de la Carga.....	46
4.5.2	Morfología.....	47
4.6	Efecto de la Liofilización en la Supervivencia del probiótico recubierto.....	48
4.7	Efecto del Almacenamiento a Bajas Temperaturas en la Supervivencia del Probiótico Recubierto.....	50
4.8	Efecto de las Condiciones Gastrointestinales Simuladas <i>In Vitro</i>	51
4.9	Efecto del Recubrimiento en la Adhesión de <i>L. acidophilus</i> a Mucinas Intestinales.....	53

CONTENIDO (continuación)

4.10	Efecto del Recubrimiento en la Capacidad Antagónica de <i>L. acidophilus</i> Recubierto contra <i>C. difficile</i>	54
4.11	Recuperación Metabólica del Probiótico Recubierto Sometido a Altas y Bajas Temperaturas.....	56
4.12	Efecto del Tratamiento en el Inicio del Crecimiento de <i>L. acidophilus</i>	58
	CAPITULO V. RESUMEN DE HALLAZGOS Y CONCLUSIONES	61
5.1	Resumen de Hallazgos.....	61
5.2	Conclusión.....	62
	Referencias.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema general de trabajo	21
2	Diagrama del Recubrimiento de <i>L. acidophilus</i> LAC361 por autoensamblado molecular con lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo	28
3	Esquema de simulación de las condiciones gastrointestinales humanas	31
4	Esquema de la adhesión de <i>L. acidophilus</i> a mucinas intestinales	33
5	Actividad antagónica de <i>L. acidophilus</i> LAC-361 contra <i>C. difficile</i> (A) sobrenadantes sin neutralizar (B) sobrenadantes neutralizados.....	40
6	Antagonismo de metabolitos de <i>L. acidophilus</i> LAC-361 contra <i>C. difficile</i>	41
7	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras para confirmar la pureza de lactoferrina bovina usada en el estudio.....	42
8	Curvas de crecimientos de <i>L. acidophilus</i> LAC-361 en caldo MRS-cys en presencia de diferentes concentraciones de lactoferrina	43
9	Efecto de la concentración de lactoferrina bovina en la fase de retardo (Lag) de crecimientos de <i>L. acidophilus</i> en caldo MRS-cys	44
10	Cambios en el potencial zeta en <i>L. acidophilus</i> LAC361 al recubrirlo con 5 capas de la combinación lactoferrina-pectinas de bajo metoxilo	46
11	Distribución de la carga superficial del <i>L. acidophilus</i> LAC 361 recubierto	47
12	Micrografías de <i>L. acidophilus</i> recubierto por autoensamblado molecular de lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo.....	48
13	Sobrevivencia a la liofilización.....	49

LISTA DE FIGURAS (continuación)

14	Efecto del recubrimiento en la sobrevivencia de <i>L. acidophilus</i> LAC-361 en condiciones gastrointestinales simuladas.....	52
15	Efecto del recubrimiento en la adherencia de <i>L. acidophilus</i> LAC-361 a mucinas intestinales	54
16	Halos de inhibición de <i>L. acidophilus</i> contra <i>C. difficile</i> . Efecto del recubrimiento en la actividad antagonica contra <i>C. difficile</i>	55
17	Respuesta de la actividad metabólica en relación a distintas temperaturas de diferente intensidad.....	57
18	Curvas de crecimientos de <i>L. acidophilus</i> LAC-361 en cultivos frescos y obtenidos de bacterias liofilizadas (recubiertas y no recubiertas.....	58
19	Efecto del Tratamiento en el Inicio del Crecimiento de <i>L. acidophilus</i>	60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Porcentaje de sobrevivencia de <i>L. acidophilus</i> LAC 361 almacenado a -40 °.....	51

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser administrados oralmente en cantidades adecuadas, pueden controlar el crecimiento de patógenos que causan diarreas por tratamientos prolongados con antibióticos, como *Clostridium difficile*. Una alternativa para la aplicación y consumo de probióticos es usar a los alimentos como vehículo. Sin embargo, su sobrevivencia se ve comprometida debido a diferentes estreses. En este estudio se usó el autoensamblado molecular para proteger a *Lactobacillus acidophilus* LAC-361 que en este estudio inhibió el crecimiento de *C. difficile*. Para promover el autoensamblado, se aprovechó la carga superficial del LAC-361 (- 9.7 mV) y se añadieron sucesivamente lactoferrina (Lf, carga +) y pectinas de bajo metoxilo (PBM, carga -). Se autoensamblaron un total de 5 capas, para recubrir individualmente al probiótico. El proceso de ensamble se siguió midiendo el potencial zeta, cada vez que se añadió una capa. En seguida se liofilizaron, se determinó su carga final, se observó su morfología por microscopia electrónica de barrido. Posteriormente se evaluó la sobrevivencia a la liofilización, al almacenamiento a -40 ° C y a las condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*. La sobrevivencia se determinó por cuenta en placa, usando agar MRS-cys. También, se ensayó el efecto del recubrimiento en la adhesión del LAC-361 a mucinas intestinales; se usaron ensayos ligados a lectinas, similares a ELISA (ELLAS). Además, se investigó el efecto del recubrimiento en la actividad antagónica del probiótico contra *C. difficile*, se evaluó la capacidad de restablecimiento metabólico de la bacteria por calorimetría isotérmica y sobre la fase de retardo en el crecimiento de LAC-361. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: la carga final después de 5 recubrimientos fue de +18.9 mV. Se observaron agrupaciones de bacterias similares a las de las bacterias no recubiertas. La sobrevivencia de las bacterias recubiertas fue significativamente ($P < 0.05$) mayor a la de las bacterias no recubiertas, en todos los estreses aplicados. Después de la liofilización, la sobrevivencia fue mayor (71.6 %, $P < 0.05$) que la de las bacterias no recubiertas (50.5%). A los 90 días

de almacenamiento a -40 °C las bacterias recubiertas presentaron una sobrevivencia del 70% y las no recubiertas 42%. Al simular las condiciones gastrointestinales *in vitro* se observó una menor ($P < 0.05$) disminución de la viabilidad en las bacterias recubiertas (2.44 Log UFC/g) que la de las bacterias no recubiertas (3.64 Log UFC/g). El recubrimiento de *L. acidophilus* LAC-361 con Lf y PBM no afectó su capacidad de adhesión a las mucinas del colon, ni la actividad antagónica contra *C. difficile*, aunque la recuperación metabólica de las bacterias recubiertas y las no recubiertas, fue similar ($P > 0.05$). Sin embargo, las curvas de crecimiento mostraron que la fase de retardo de las bacterias recubiertas fue 38 % más corta ($P < 0.05$) que la de las bacterias no recubiertas. Con los resultados anteriores se concluye que el recubrimiento por autoensamblado con 5 capas de la combinación Lf y PBM, protege a las bacterias de la liofilización, de las bajas temperaturas y de las condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*, sin afectar la capacidad del probiótico para unirse a las mucinas intestinales, ni su actividad antagónica contra *C. difficile*.

Palabras clave: probióticos, recubrimiento capa por capa, lactoferrina, pectinas de bajo metoxilo, sobrevivencia.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that when administered orally in adequate amounts can control the growth of pathogens such as *Clostridium difficile* that cause diarrhea after prolonged antibiotic treatments. An alternative for their intake is the use food as a vehicle. However, their survival is compromised by various stresses. In this study the molecular self-assembly is used to protect *Lactobacillus acidophilus* LAC-361, proven to inhibit the growth of *C. difficile* growth. To promote self-assembly, LAC-361 surface charge was used (- 9.7 mV) and lactoferrin (Lf + load) and low methoxyl pectins (PBM, load -) were successively added. Five layers were self-assembled, for individually coating the probiotic. The process was followed by measuring the zeta potential, each time a layer was added. Coated bacteria was lyophilized. At the final loading was determined by measuring the zeta potential, while morphology by scanning electron microscopy. Afterwards, determinations included survival after lyophilization, storage at -40 °C, as well as after in vitro simulated gastrointestinal conditions. Survival was determined by plate counts, using MRS-cys agar. Coating effect on adhesion of LAC-361 to intestinal mucins was also tested; using an enzyme linked lectin assay (ELLA). Furthermore, the probiotic coating effect on the antagonistic activity against *C. difficile* was investigated, as well as the bacteria metabolic restoring ability by isothermal calorimetry, and the LAC-361 growth lag phase was evaluated. The results obtained were as follows, the charge after five coatings was +18.9 mV. Bacterial groupings similar to those of uncoated bacteria were observed. Survival of coated bacteria was significantly ($P < 0.05$) higher than that of uncoated bacteria in all tested stresses. The survival of the coated bacteria after lyophilization was higher (71.6%, $P < 0.05$) than the lyophilized uncoated bacteria (50.5%). After 90 days of storage at -40 °C, coated bacteria showed a survival of 70%, while in the bacteria uncoated reached only 42%. After simulating gastrointestinal conditions in vitro, a minor ($P < 0.05$) decrease in viability of coated bacteria was recorded (2.44 log CFU / g) than in uncoated bacteria (3.64 log CFU / g). Coating of *L.*

acidophilus LAC-361 with PBM with Lf did not affect their ability to adhere to colonic mucins, neither their antagonistic activity against *C. difficile*, also metabolic recovery on both bacteria was similar ($P>0.05$). However, growth curves showed that the lag phase of coated bacteria was 38% shorter ($P<0.05$) than in uncoated bacteria. Based on the above results we concluded that coating by self-assembly with five layers of the Lf and PBM combination, protects bacteria from lyophilization, cold temperature storage and gastrointestinal conditions simulated in vitro, without affecting neither their probiotic ability to adhere to intestinal mucins, nor their antagonistic activity against *C. difficile*.

Keywords: probiotics, coating layer by layer, lactoferrin, low methoxyl pectins, survival.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser suministrados al humano, en cantidad suficiente, producen un efecto benéfico a la salud. Entre estos efectos se encuentra el inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos que causan diarreas, como *Clostridium difficile*.

Existe evidencia científica de que las preparaciones orales de algunas especies de probióticos afectan el crecimiento de *C. difficile* y disminuyen la duración de las diarreas que provocan, las cuales se asocian a la disminución que estos medicamentos provocan en las poblaciones de la microbiota intestinal benéfica. Una manera de provenir estas diarreas sería el consumo de probióticos usando alimentos o bebidas, como vehículo. Sin embargo los procesos y estreses a los que se somete el alimento durante su vida de anaquel y durante su paso por el tracto gastrointestinal, podrían afectar la viabilidad de los probióticos. Es por ello que se usan diferentes métodos de encapsulamiento o recubrimiento con matrices grado alimenticio para protegerlos (Singh *et al.*, 2011). Una técnica de recubrimiento de reciente aplicación en los alimentos es el autoensamblado molecular, que consiste en proteger a un bioactivo, a través de la formación de varias capas de electrolitos de carga opuesta. Ello se logra principalmente a través de la formación de moldes autoensamblados a los que después se les introduce el bioactivo que se busca proteger (Surawicz, 2003). Sin embargo, esto hace más costoso el encapsulamiento y no podría ser usado para encapsular probióticos porque los canales que se forman en la cápsula no retendrían al microorganismo (Surawicz, 2003).

En el caso de los probióticos el proceso pudiera simplificarse aprovechando que su pared celular se encuentra cargada negativamente. Entre los electrolitos

potenciales a cubrir esta pared y a seguir formando capas se encuentran algunas proteínas y carbohidratos como lactoferrina, quitosanos, alginatos, pectinas de bajo metoxilo, etc. Excepto por el quitosano, estas moléculas no se han usado para el autoensamblado, pero si, como matrices para encapsulamiento (Singh *et al.*, 2011). Aprovechando su carga, podrían interactuar con la pared celular. Ello permitirá recubrir de manera individual a las bacterias adicionándoles el número de capas necesarias para protegerlas de diferentes estreses y para retardar su liberación en el tracto gastrointestinal.

Por todo lo anterior el objetivo general de este trabajo fue determinar el efecto del autoensamblado de lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo en la sobrevivencia de *L. acidophilus* LAC-361 y en su efecto antagónico contra *C. difficile*.

CAPÍTULO I ANTECEDENTES

1.1 Diarreas Asociadas al Uso de Antibióticos

La mayoría de los casos de diarreas asociadas al uso de antibióticos (DAA) se debe a las alteraciones que éstos producen en la microbiota intestinal. Estos medicamentos, al no ser específicos, provocan una reducción de las poblaciones de bacterias benéficas, que permite la proliferación de patógenos oportunistas resistentes, que por lo general son los causantes de casos pocos severos de DAA (Antunes *et al.*, 2011; Beaugerie *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando el microorganismo que prolifera es el *Clostridium difficile* (15 al 39 % de los casos), la DAA se vuelve persistente, pudiendo derivar en diferentes grados de colitis e incluso provocar la muerte (Moreira *et al.*, 2006; Guarner, 2007).

Los tratamientos con antibióticos de amplio espectro son los que pueden producir DAA; el riesgo aumenta proporcionalmente al tiempo del tratamiento y la diarrea puede ocurrir hasta 12 semanas después de la exposición al antibiótico (Bartlett, 2002; McFarland, 1999). Las poblaciones más susceptibles son los adultos mayores de 65 años, los infantes y los pacientes inmunocomprometidos (Bartlett, 2002).

La frecuencia de la DAA varía dependiendo del antibiótico usado. Ocurre entre el 2 al 20% de los pacientes que recibieron cefalosporinas de segunda y tercera generación, fluorquinolonas, macrólidos, clindamicinas o tetraciclinas; en el 5 a 10% de los que recibieron ampicilina y en el 10 al 25 % a los que se les trató con la combinación co-amoxiclav que es una mezcla de amoxicilina y ácido clavulánico (Bartlett, 2002; McFarland, 1999). Otros factores adicionales que aumentan el riesgo de la DAA son los largos periodos de hospitalización, los tratamientos con inhibidores de la bomba de protones, el uso de tubos nasogástricos, la hospitalización y la cirugía gastrointestinal previa (Beaugerie *et al.*, 2004).

Aunque las investigaciones recientes han fallado en identificar antibióticos de alto riesgo, las cefalosporinas, β -lactamas clindamicina y más recientemente las quinolonas, han sido asociadas con la diarrea producida por *C. difficile* (DACD) (Badger *et al.*, 2012; Weiss *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2003). Además, la exposición acumulativa de diferentes antibióticos, aumenta el riesgo (Bartlett *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 20011).

En Canadá se observó un aumento de la mortalidad por DACD del 1.5 % de los casos registrados en 1997 a 6.9 % en 2004 (Bourgault *et al.*, 2006). En Estados Unidos de Norteamérica los rangos de mortalidad en 1999 fueron de 5.7 por millón de habitantes, aumentando a 23.7 para 2004 (Redelings *et al.*, 2007). En México, existe poca información sobre DACD. Camacho-Ortíz (2009) reporta 5 casos por cada 1000 egresos entre 2003 y 2007. Por otro lado, a partir de 2003, se ha observado a nivel mundial, un aumento considerable en las DACD, asociado a la emergencia de la cepa hipervirulenta BI/NAP1/027. Bajo condiciones *in vitro*, esta nueva cepa produce 20 veces más toxinas, que los ribotipos anteriores de *C. difficile* (Rupnik *et al.*, 2009).

Debido a lo anterior, en los países desarrollados han aumentado los esfuerzos para prevenir la infección. Actualmente se promueve a), un aumento de la higiene ambiental en los hospitales; b), la racionalización en la

administración de antibióticos y c), el aislamiento de los pacientes con diarrea (Naaber *et al.*, 2004; Enoch *et al.*, 2011; EuiOhy *et al.*, 2013).

1.2 Mecanismos de Acción de *Clostridium difficile*

C. difficile es un bacilo Gram positivo esporulado, anaerobio estricto que en 1978 fue asociado por primera vez a enfermedad en humanos (Freeman *et al.*, 2010; Sunenshine *et al.*, 2006). Causa infección en el colon que se manifiesta como un cuadro diarreico (Freeman *et al.*, 2010).

Las cepas de *C. difficile* que producen diarreas, son portadoras de una transferasa denominada toxina binaria, que está formada por dos subunidades denominadas toxinas A y B (Rodríguez-Pardo *et al.*, 2013). Estas moléculas son proteínas que se unen a receptores localizados en la superficie de los colonocitos (Surawicz, 2003; Bouza *et al.*, 2006; EuiOhy *et al.*, 2013). La toxina A es citotóxica y enterotóxica; sus efectos son muy similares a los de la toxina que produce el cólera. El mecanismo patogénico de la toxina binaria aún no está del todo esclarecido, sin embargo, parece ser que interviene aumentando la capacidad de adhesión de las células de *C. difficile* (Bouza *et al.*, 2006). Además, actúa a nivel del citoesqueleto celular, provocando la pérdida de líquidos, y por tanto, la diarrea (Carroll *et al.*, 2011). La toxina B muestra mayor citotoxicidad que la toxina A (Bouza *et al.*, 2006). Las dos se codifican en un locus de patogenicidad junto con los reguladores de su expresión (EuiOhy *et al.*, 2013).

Después de la unión a los receptores de los colonocitos, las toxinas se internalizan al citoplasma donde alteran al citoesqueleto, inactivando proteínas de unión a GTP (guanosin trifosfato) (Rho, Rac y CD42) y produciendo la muerte celular. La inactivación de las proteínas se produce por la monoglicosilación de una treonina reactiva que establece un enlace coordinado con un catión divalente, crítico para la unión de GTP (Voth y Ballard, 2005). La

toxina A provoca su efecto a nivel intestinal, mientras que la B tiene un tropismo celular más amplio. La unión y la internalización de las toxinas conducen al aumento de la permeabilidad de la barrera epitelial y, consecuentemente, la diarrea (Ephraim *et al.*, 2013). También produce hemorragias ocasionales y, en algunos casos, coadyuvan a la necrosis celular del tubo digestivo (Bouza *et al.*, 2006).

1.3 Tratamientos Recomendados para Diarreas por *C. difficile*

1.3.1 Tratamiento Estándar

El tratamiento estándar para controlar las DACD consiste en suspender el antibiótico que se ha utilizado por tiempo prolongado (Leffler y Lamont, 2009). Después de esto se recomienda la administración de metronidazol o vancomicina (Cohen *et al.*, 2010). La guías de tratamiento en Estados Unidos de Norteamérica indican 500 mg diarios de metronidazol durante 10 a 14 días, para diarreas de leves a moderadas y 125 mg cada 6 h durante 10 a 14 días de vancomicina, para diarreas severas (Cohen *et al.*, 2010). En Europa se administran 100 mg de teicoplanina diarios como tratamiento adicional. Este fármaco es un glicopéptido con actividad similar a la vancomicina. Como complementos se usan 20 000 a 25 000 U de bacitracina cada 6 h de 7 a 10 días y de 250 a 500 mg de ácido fusídico cada 8 h de 7 a 10 días (Bauer *et al.*, 2009). Los tratamientos europeos no están disponibles en América y en cualquiera de los casos la administración debe ser por vía oral.

1.3.2 Necesidad de Terapias y Tratamientos Alternativo

La vancomicina y el metronidazol han sido el tratamiento de diarreas por *C. difficile* (DACD) por más de 25 años. Sin embargo, su uso también afecta a la salud intestinal por disminuir las poblaciones de la microbiota benéfica y porque no tiene efecto sobre el *C. difficile* en estado esporulado (Wilcox *et al.*, 1998). Debido a lo anterior, se estima que del 20 al 25 % de los pacientes que responden al tratamiento estándar inicial, presentan una recurrencia de diarrea después de 2 semanas de que éste se termina (Barbut *et al.*, 2000). Más del 50 % de estas recaídas son provocadas por la misma cepa de *C. difficile* que produjo la primera diarrea. Ello porque no pudo ser eliminada totalmente durante el tratamiento, debido a la capacidad del patógeno para formar esporas. Al encontrar las condiciones adecuadas, las esporas germinan y el patógeno prolifera sin la resistencia natural de la MGI, debido a que ésta tarda hasta 3 meses en restablecerse (McFarland, 2005).

Las recaídas se tratan eficientemente con el mismo antibiótico usado para tratar el primer episodio (Cohen *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha observado que el 24 % de los pacientes vuelve a enfermar y que en ellos, el riesgo de una tercera recaída aumenta hasta el 65 %, sin que el cambio de tratamiento resulte efectivo (McFarland, 2005).

A partir del año 2003 ha crecido el interés por estudiar tratamientos alternativos para la DACD, debido a la alta recurrencia y al aumento de la mortalidad producida por esta enfermedad. Los esfuerzos se dirigen hacia a), encontrar tratamientos que eliminen al patógeno esporulado; b), aumentar la respuesta inmune del paciente hacia el patógeno y sus toxinas y c), recuperar la disbiosis o desbalance intestinal, restableciendo las poblaciones de bacterias benéficas. Este último punto es de mayor interés para nuestro trabajo.

1.4 Uso de Probióticos en Diarreas Asociadas a *C. difficile*

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando son administrados vía oral en cantidad suficiente, producen efectos benéficos a la salud de su hospedero (FAO/WHO 2002). La cantidad o dosis suficiente varía entre géneros y especies de microorganismos, oscilando entre $10^6 - 10^{11}$ UFC/g (Vasiljevic y Shah, 2008; Shanahan *et al.*, 2007). Los probióticos han sido aislados del intestino humano y se administran oralmente en preparaciones médicas o se incorporan a los alimentos. El fin principal es recuperar el balance microbiano y la salud intestinal. Dependiendo de género y especie, también pueden usarse para prevenir y tratar algunas enfermedades. Para humanos, los probióticos más utilizados son las bifidobacterias y los lactobacilos (FAO/WHO 2002).

El uso de probióticos para la prevención y tratamiento de las DACD ha cobrado gran interés a partir de la década pasada. Ello debido a que estas bacterias poseen múltiples mecanismos de acción que pueden afectar al *C. difficile*. Por ejemplo, algunas especies de bifidobacterias y lactobacilos inhiben el crecimiento de este patógeno, produciendo antimicrobianos como las bacteriocinas y los ácidos grasos de cadena corta (McFarland, 2005). Otras especies protegen el epitelio intestinal, induciendo un aumento en la secreción de mucinas del colon, que evitan la colonización por patógenos. Por otro lado, para reducir la diarrea, los probióticos estimulan la absorción de agua vía canales de cloro. También modulan el sistema inmune de su hospedero, disminuyendo la inflamación o aumentando la expresión de inmunoglobulinas dirigidas contra la toxina A de *C. difficile* (McFarland, 2009). *Saccharomyces boulardii* previene la unión de las toxinas A y B de *C. difficile*, al intestino (Parkes *et al.*, 2009).

Los probióticos han demostrado ser seguros para la mayoría de las poblaciones que presentan diarreas por *C. difficile* y además, se ha probado que existe poca interacción con los fármacos para su tratamiento (McFarland,

2009; Parkes *et al.*, 2009). Sin embargo, existen reportes de bacteremias y fungemias adquiridas por translocación de los probióticos desde el tracto gastrointestinal, hacia otras áreas del organismo (Libby *et al.*, 2009). Esto ha ocurrido principalmente en pacientes severamente inmunocomprometidos como enfermos de cáncer o infectados con el virus HIV (Makarewicz, 2008; Gifforf y Kirkland, 2006). En estas personas el riesgo de translocación es alto, debido, en el primer caso, a los efectos de la quimioterapia y en el segundo, a la disminución de las células CD4 (Libby *et al.*, 2009). Por lo tanto, el uso de probióticos en estas personas deberá ser considerado con precaución.

En pacientes con DACD, en los que no existen las enfermedades antes mencionadas, el efecto del consumo de probióticos muestra varias ventajas ante otros tratamientos. Éstas incluyen los mecanismos de acción contra patógenos ya mencionados. Además, los probióticos pueden sobrevivir en el órgano diana y presentan una buena relación en cuanto a riesgo-beneficio, comparados con los efectos secundarios que pueden causar otros tratamientos. Sin embargo, los efectos más importantes que se consideran para usar probióticos en las DACD son: su capacidad para modular al sistema inmune del hospedero y la recuperación de la eubiosis intestinal que inducen a través de su consumo.

En general los probióticos ofrecen una estrategia prometedora para la prevención y tratamiento de las diarreas asociadas a *C. difficile* (McFarland *et al.*, 2009). En particular, las cepas de *Lactobacillus sp* parecen poseer actividad potencial para prevenir las diarreas ocasionadas por este microorganismo (Hickson, *et al.*, 2011).

1.4.1 Actividad de Especies de *Lactobacillus* contra *C. difficile*

Como ya se mencionó, los Lactobacilos se encuentran entre las especies de probióticos más usadas para consumo humano. El consumo de *Lactobacillus casei* ha demostrado disminuir la incidencia de diarreas asociadas con el empleo de ampicilina y eritromicina (Arribas *et al.*, 2008). Por otro lado, *L. reuteri* inhibe el crecimiento de *C. difficile* debido a la síntesis de la bacteriocina reuterociclina. Ésta es un derivado del ácido tetramérico, que disipa selectivamente la membrana de bacterias Gram positivas (Gänzle *et al.*, 2004; Hurdle *et al.*, 2011). *L. plantarum* también presenta actividad antagónica contra la cepa patógena de *C. difficile*, debido a la producción de sustancias antimicrobianas (Klarin *et al.*, 2008).

Las sustancias antimicrobianas que producen los probióticos, han mostrado un efecto significativo sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Para determinar el efecto de la combinación metronidazol-probiótico, Wullt (2003), realizó un estudio con 21 pacientes a los que se suministró la combinación 3 veces al día durante 10 días. Doce pacientes recibieron metronidazol y *L. plantarum* y a los 9 restantes, se les añadió un placebo en vez del lactobacilo. Los pacientes del grupo en el que se utilizó la cepa probiótica presentaron la interrupción de diarrea en 5 a 10 días después de comenzar el tratamiento. Además, no pudo detectarse en ellos la presencia de la toxina de *C. difficile* entre los días 11 a 13 del tratamiento. En cambio, en el grupo que consumió el placebo la duración de la diarrea fue mayor y hubo mayor porcentaje de recurrencia. En resumen, la administración enteral de esta bacteria probiótica, pudo reducir la incidencia de desarrollar este tipo de diarreas.

El consumo de *L. rhamnosus* GG inhibió el crecimiento de *C. difficile* de manera dosis dependiente, mientras que el de *L. plantarum* 299v disminuyó significativamente la incidencia de diarreas provocadas por este patógeno

(Ephraim *et al.*, 2013; Wullt *et al.*, 2003). Por otro lado, Hickson *et al.*, (2011) probaron que la mezcla de *L. casei*, *L. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, redujo la duración de diarreas asociadas a *C. difficile*. En un grupo de ancianos se demostró que el consumo de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* también lo hace. Además, en el 78 % de los individuos tratados con placebo se detectaron las toxinas del patógeno, mientras que sólo estuvieron presentes en el 46% de los que consumieron la mezcla probiótica (Plummer *et al.*, 2010).

1.4.2 *Lactobacillus acidophilus*

L. acidophilus es una bacteria probiótica del genero *Lactobacillus*, la morfología típica de estas bacterias benéficas cuando se encuentran en agar MRS, presentan un aspecto circular y de color blanquecino, las bacterias presentan negativo el ensayo de catalasa y positivo para la tinción Gram, en la cual se observan bacilos o varillas que pueden estar dispuestos en cadenas cortas. *L. acidophilus* se distingue de las otras bacterias del mismo género, por su incapacidad de fermentar lactosa, manitol y sorbitol (Abo *et al.*, 2012).

Entre los efectos benéficos de *L. acidophilus*, se encuentra la capacidad que tiene para inhibir el crecimiento de *C. difficile*. Black *et al.* (1991) observaron esta inhibición, así como la eliminación de las recaídas clínicas causadas por colitis pseudomembranosa inducida por el patógeno. Kaur *et al.* (2011) mostraron que el recuento de *C. difficile* se redujo significativamente en murinos que recibieron *L. acidophilus*. La reducción fue más efectiva ($P < 0.05$), cuando además del probiótico se usó un tratamiento previo con antibióticos (lanzoprazol). Por otro lado, la administración de *L. acidophilus* ayudó a reducir la producción de toxinas. La toxina A se detectó únicamente en el 33.3% y la toxina B en el 50% de los animales.

1.5 Viabilidad y Estabilidad de Probióticos en Alimentos

Existen dos maneras de consumir probióticos: a) directamente como preparaciones médicas en forma de polvos o líquidos estabilizados, o b) usando a los alimentos como vehículos de estos microorganismos. Este último punto es el de nuestro interés. Los alimentos más usados como acarreadores de probióticos son los productos lácteos. Sin embargo, el surgimiento de evidencia clínica sobre los beneficios que estas bacterias producen a la salud y la demanda de poblaciones que no consumen lácteos, ha acelerado su incorporación en jugos, vegetales, cereales, chocolates, polvos para bebidas, entre otras (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010; Weinbreck *et al.*, 2010).

La incorporación de probióticos en nuevas matrices alimentarias y el mantenerlos vivos durante su vida de anaquel, son retos importantes para la industria. La viabilidad de los microorganismos puede perderse durante el proceso de manufactura, el transporte o el almacenamiento del alimento (Vesterlund *et al.*, 2012). Algunos factores ambientales tales como temperatura, oxígeno, humedad, pH y la presencia de otros cultivos (iniciadores o no), también afectan a la sobrevivencia del probiótico. Esto constituye un contratiempo, ya que para que ejerza su efecto, debe llegar vivo y en cantidad suficiente, al colon (FAO/OMS, 2001). La estrategia industrial para compensar la pérdida de viabilidad es añadir una cantidad excesiva de probióticos a los alimentos. Sin embargo, esta práctica disminuye la factibilidad económica y además puede afectar a las propiedades organolépticas del alimento (Makinen *et al.*, 2012; Grattepanche *et al.*, 2008). Por tanto, es deseable otras alternativas para mejorar la sobrevivencia de los probióticos.

Con respecto a los efectos benéficos de los probióticos, la dosis diaria se mide en unidades formadoras de colonias (UFC), que representan a las células viables. Existe controversia sobre la cantidad diaria recomendada ya que depende de la especie. Generalmente se manejan dosis entre 10^6 y 10^{11} UFC.

Según Crittenden (2009), los probióticos se incorporan a los alimentos en concentraciones de 10^7 a 10^8 UFC/g. En el caso de productos o alimentos deshidratados, los probióticos se añaden liofilizados, en concentraciones de alrededor de 10^{11} UFC/g. Las preparaciones pueden ser relativamente estables. Sin embargo, durante el almacenamiento la viabilidad decrece debido a la baja actividad de agua, al daño provocado por el oxígeno y a las variaciones de la temperatura; el almacenamiento a temperatura ambiente afecta de manera importante a la sobrevivencia de los microorganismos (Vesterlund *et al.*, 2012). Una alternativa para conservar la viabilidad de los probióticos añadidos a los alimentos, es encapsularlos o inmovilizarlos en matrices grado alimenticio (Anal y Sinfh, 2007).

El encapsulamiento debe diseñarse para que, además de proteger al microorganismo, lo libere en condiciones controladas. Además, la cápsula debe conservar cierta permeabilidad, la cual dependerá del método de encapsulamiento, la composición de las capas, la fuerza iónica, el número de capas, entre otros (Priya *et al.*, 2011).

1.6 Encapsulamiento e Inmovilización

La inmovilización y el encapsulamiento consisten en el atrapamiento de células en una matriz de grado alimenticio, generalmente reconocidas como seguras (GRAS) (Vidhyalakshmi *et al.*, 2009). En los últimos años los términos inmovilización y encapsulamiento se utilizan en la mayoría de la literatura publicada indistintamente siendo necesario definirlos (Perez-Leonard *et al.*, 2013; Vidhyalakshmi *et al.*, 2009). El encapsulamiento es la tecnología que envuelve y cubre completamente a los probióticos con una matriz, sin que exista exposición superficial del microorganismo, al medio externo (Jiménez,

2010). De esta manera las bacterias quedan contenidas en el centro de una cápsula (Kailasapathy, 2002; King, 1995).

La inmovilización consiste en atrapar los microorganismos dentro o a través de una matriz, los cuales son cubiertos pero no necesariamente envueltos por la matriz pudiendo existir exposición superficial de los mismos (De Vos *et al.*, 2010). Esto se refiere a la captura de material dentro o a lo largo de una matriz donde un pequeño porcentaje de material inmovilizado puede estar expuesto en la superficie (King, 1995; Vidhyalakshmi *et al.*, 2009).

Una tercera posibilidad de impartir protección al microorganismo es utilizar el fenómeno de autoensamblado molecular para recubrir al microorganismo individualmente (Priya *et al.*, 2011).

1.7 Autoensamblado Molecular como Alternativa al Encapsulamiento

El autoensamblado molecular es un proceso que se usa para encapsulamiento en la miniaturización de aparatos electrónicos. Se basa en la formación de estructuras a través de interacciones locales no-covalentes. Éstas, se establecen entre los componentes, sin necesidad de dirección externa (Decher *et al.*, 1992). Posteriormente se ha utilizado para atrapar células y levaduras, con el fin de realizar estudios bioquímicos (Kietzmann, *et al.*, 2009).

Los recubrimientos obtenidos por este método forman paredes resistentes y porosas, cuyo tamaño depende del número de capas que se añadan (Sagis *et al.*, 2008). La técnica se conoce como autoensamblado ya que la cápsula se genera mediante la atracción de polielectrolitos con cargas opuestas (Decher *et al.*, 1992). Los materiales para formar la cápsula pueden ser micromoléculas orgánicas, macromoléculas, biopolímeros o coloides (Kietzmann, *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). Entre las aplicaciones biológicas de este tipo de encapsulamiento se encuentran la liberación controlada de

medicamentos, compuestos del sabor y compuestos bioactivos (Wang *et al.*, 2008).

La fuerza mecánica y la permeabilidad de las cápsulas puede controlarse modificando el número de capas o cambiando las características de los materiales de encapsulamiento (Sagis *et al.*, 2008). El pH del microambiente será fundamental para la integridad de las microcápsulas (Déjugnat y Sukhorukov, 2004; Kietzmann *et al.*, 2009). Estos factores deben considerarse para que una cápsula que contenga probióticos, no se disgregue en el estómago sino en el intestino, para que pueda liberar al microorganismo en el colon (Priya *et al.*, 20011).

El recubrimiento por autoensamblado molecular, podría ser una técnica eficiente para proteger a los probióticos añadidos a los alimentos. Sobre todo a aquellos que deben permanecer en condiciones de deshidratación (Priya *et al.*, 2011). Las principales ventajas serían a) se requiere de poca energía; b) el número de capas es controlable (Priya *et al.*, 2011); c) se puede aprovechar la carga superficial de la pared celular de la bacteria para depositar una o varias capas de electrolitos de carga opuesta. Esta última ventaja permitiría generar un recubrimiento individual, para cada bacteria (Annan, 2008; Poortinga *et al.*, 2002). Priya *et al* (2011) recubrieron *L. acidophilus* con una combinación de diversas capas de quitosano y carboximetil celulosa. Usaron una combinación de 3 y 7 capas y posteriormente sometieron los recubrimientos a varios estreses. Encontraron que el recubrimiento con 3 capas no fue suficiente para preservar la viabilidad del probiótico, mientras que con 7 capas no permitía su liberación. Un comportamiento similar se observó en nuestro grupo de trabajo al usar lactoferrina y proteínas de suero lácteo (López Barretero, 2014). Por lo que podría suponerse que un número de capas intermedio entre 3 y 7, pudiera ser más conveniente.

1.7.1 Matrices Potenciales para el Recubrimiento de Probióticos por Autoensamblado

La selección del material adecuado para recubrir a los probióticos es fundamental para sus características funcionales, su liberación y sobrevivencia (Pérez-Leonard *et al.*, 2013). Las características de un recubrimiento ideal son: a) tener grado alimenticio b) impartir baja viscosidad a altas concentraciones; c) baja higroscopicidad para facilitar su manipulación y evitar la aglomeración; d) ejercer la máxima protección contra condiciones adversas como luz, pH, oxígeno, humedad entre otros. Para el caso del autoensamblado, debe usarse un electrolito (Priya *et al.*, 2011; Pérez-Leonard *et al.*, 2013).

1.7.2 Lactoferrina

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína multifuncional que une hierro. Perteneciente a la familia de las transferrinas (Serrano, 2007; Adlerova *et al.*, 2008; Sherman *et al.*, 2014). Es la principal proteína de suero de la leche de los mamíferos, y también se encuentra presente en otras secreciones como saliva, lagrimas, el moco de las vías respiratorias y los gránulos secundarios de los neutrófilos (Sherman *et al.*, 2014). La Lf es monomérica, de masa molecular 80 kDa. Contiene alrededor de 703 aminoácidos que se encuentran doblados en dos lóbulos globulares. Estos lóbulos son los extremos carboxilo y amino terminales, que se encuentra unidos por una α -hélice (Adlerova *et al.*, 2008). La Lf exhibe carga positiva conferida por la secuencia de aminoácidos básicos presentes en el extremo amino terminal (Serrano, 2007). La Lf es GRAS, se aísla a partir del suero de queso y se encuentra disponible comercialmente; además presenta la características de autoensamblarse (Tomita *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, es un buen candidato para nuestro estudio.

1.7.3 Pectinas de Bajo Metoxilo

Las pectinas son un grupo de polisacáridos localizados en la pared primaria y lámina media de las células vegetales. Se encuentran en mayor medida en el tejido parenquimatoso de frutas y verduras. Son heteropolisacáridos constituidos por residuos de ácido α -galacturónico parcialmente esterificados con grupos metilos. Estos residuos pueden presentar cadenas laterales de arabinosa, galactosa y ramnosa. Constituyen un 20-35% de los polímeros componentes de la pared celular (Ridley *et al.*, 2001). Existen dos tipos de pectinas: pectinas de alto índice de metoxilo (HM), o de alto éster, y pectinas de bajo índice de metoxilo (LM) o de bajo éster (Reginald, 1991).

Las pectinas de bajo metoxilo, muestran una esterificación de los grupos carboxilos menor al 50 %. Al estar cargadas negativamente, presentan una alta reactividad con Ca, iones y sales divalentes. Su carga negativa también podría aprovecharse para la formación de capas por autoensamblado (Cannon, *et al.*, 2008).

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Un recubrimiento de cinco capas de la combinación pectinas de bajo metoxilo y lactoferrina, adicionado por autoensamblado molecular, será suficiente para proteger al *L. acidophilus* LAC-361 de la liofilización y de las condiciones gástricas simuladas, preservando además, su actividad antagónica contra *C. difficile*.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

Determinar el efecto del autoensamblado de lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo en la sobrevivencia de *L. acidophilus* LAC-361 y en su efecto antagónico contra *C. difficile*.

2.2.2 Objetivos Particulares

- a) Determinar el efecto antagónico *in vitro* de *L. reuteri*, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* y *L. acidophilus*, contra *C. difficile*.
- b) Determinar el efecto de diferentes concentraciones de lactoferrina en el crecimiento de los probióticos que muestren efecto antagónico.
- c) Recubrir a los probióticos individualmente con 5 capas totales de lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo, utilizando la técnica de autoensamblado molecular.
- d) Caracterizar las cápsulas obtenidas por carga, topología.
- e) Caracterizar por carga y morfología y evaluar la sobrevivencia de los probióticos recubiertos, después de someterlos a los siguientes estreses: liofilización, almacenamiento a -40 °C y simulación de las condiciones gastrointestinales
- f) Determinar el efecto del recubrimiento en la adhesión de *L. acidophilus* LAC-361 a las mucinas del colon y en su actividad antagónica contra *C. difficile*.
- h) Probar mediante calorimetría isotérmica el restablecimiento de la actividad metabólica después de un estrés por manejo de temperatura.

CAPITULO III.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Esquema General de Trabajo

En la figura 1 se muestra el esquema general de trabajo. La primera etapa consistió en seleccionar al lactobacilo con mayor actividad antagónica contra *C. difficile*. Se probó la actividad de *L. reuteri* SD2112 (ATCC 55730), *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), *L. plantarum* LP39 (ATCC 14913) y *L. acidophilus* LAC-361. Una vez elegido el probiótico, se evaluó el efecto de la presencia de lactoferrina en su crecimiento. Posteriormente se recubrió al microorganismo mediante autoensamblado molecular usando lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo y se caracterizó el recubrimiento, determinando su carga y morfología, así como la sobrevivencia a la liofilización, almacenamiento a bajas temperaturas y a las condiciones gastrointestinales simuladas. Además se ensayó el efecto del recubrimiento en la adhesión del probiótico a mucinas intestinales y sobre su actividad antagónica. Se evaluó la capacidad de restablecimiento metabólico de la bacteria midiendo la respuesta al estrés por temperatura por calorimetría isotérmica. Finalmente evaluó el efecto del tratamiento en el inicio del crecimiento de *L. acidophilus*.

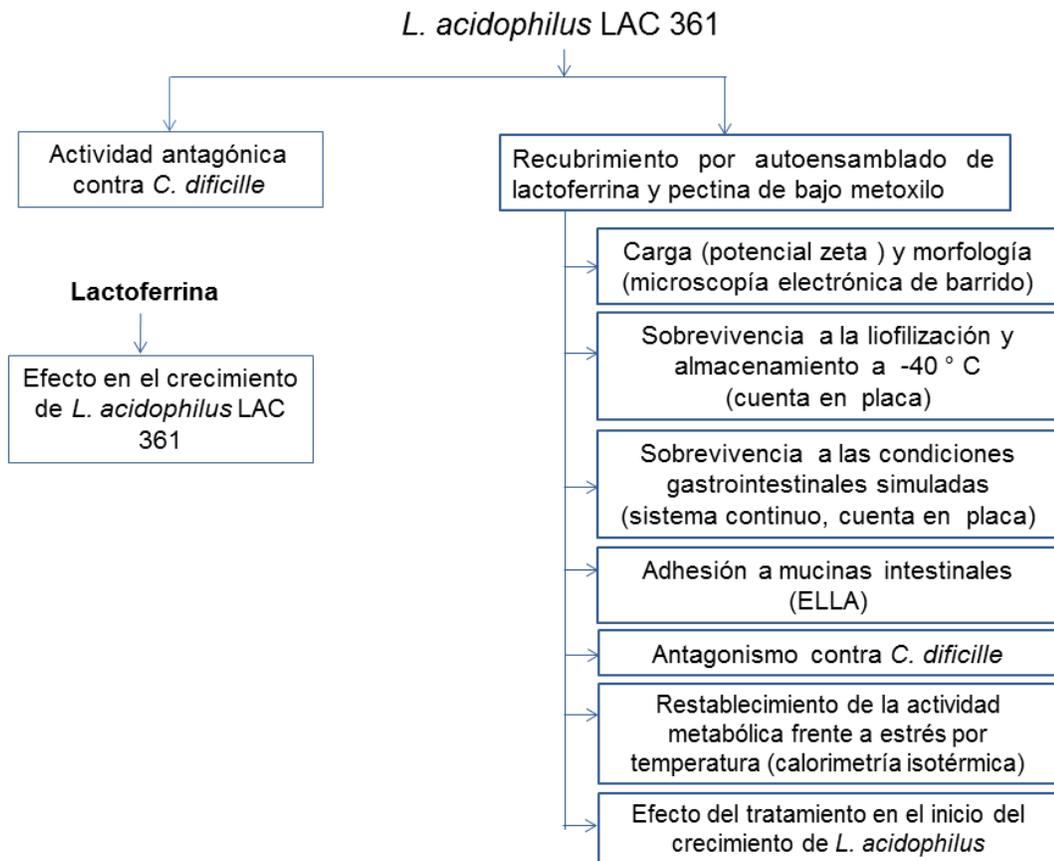


Figura 1. Esquema general de trabajo

3.2 Materiales

Los medios de cultivo se adquirieron en Difco (Difco Laboratories/Becton, Dickinson and Company, MD, USA). Para el crecimiento de los lactobacilos se usaron caldo y agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS, 1960) adicionado con 0.5 % de cisteína (Cys). Para *C. difficile* se usaron caldo y agar clostridial reforzado. La lactoferrina fue donada por Morinaga Milk Industry (Morinaga Milk Industry Co., LTD., Kanagawa-Pref, Japón). El resto de los reactivos se obtuvo de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO USA), a menos que se especifique otra cosa.

3.3 Bacterias y Condiciones de Cultivo

El estudio se llevó a cabo con 5 especies microbianas diferentes. Se adquirieron 4 cepas de la colección ATCC (American Type Culture Collection): *Lactobacillus reuteri* SD2112 (ATCC 55730), *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), *L. plantarum* LP39 (ATCC 14913), *Clostridium difficile* (ATCC BAA-1875). *L. acidophilus* LAC361 fue donada por Morinaga Milk (Morinaga Industry Co., Japón). Los lactobacilos liofilizados se inocularon individualmente en 5 mL de caldo MRS, conteniendo 0.5% de L-cisteína (MRS-cys). Se incubaron a 37 °C, en anaerobiosis, durante 24 h. Después de una nueva resiembra en viales de crio-cultivo de 1.5 mL bajo las mismas condiciones de cultivo, se añadió a cada vial 20% de glicerol estéril y se almacenaron a -40 °C para su uso posterior.

La pastilla liofilizada de *C. difficile* se resuspendió en 5 mL de medio clostridial con rezasurina al 0.025%. Se incubó a 37 °C en condiciones de anaerobiosis durante 48 h y se volvió a resembrar. Se revisaron las características morfológicas de las colonias en placa y el patrón de cambios

característicos en la coloración del caldo clostridial, así como observaciones microscópicas, para descartar contaminación del cultivo por otros microorganismos. Posteriormente se almacenó en viales de criocultivo de 1.5 mL añadiendo a cada vial 20% de glicerol estéril como crioprotector para permanecer a -40 °C para su uso posterior.

3.4 Inhibición *In vitro* por Difusión en Placa del Probiótico contra *Clostridium difficile*

La capacidad de *Lactobacillus reuteri* SD 2112, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* LP39 y *L. acidophilus*, para inhibir el crecimiento de *Clostridium difficile* se evaluó por la técnica difusión en placa de agar. Se hicieron 2 tipos de ensayos: a) con suspensiones bacterianas de probióticos y b) con los metabolitos de los probióticos, a partir de los sobrenadantes del cultivo bacteriano.

3.4.1 Efecto de las Suspensiones Bacterianas

Para probar las suspensiones bacterianas se usaron cajas Petri que contenían agar infusión cerebro corazón (BHI). La cepa de *C. difficile* se cultivó en anaerobiosis en medio clostridial con rezasurina durante 28 h a 37 °C (Weese *et al.*, 2004). Se tomó crecimiento bacteriano con un asa estéril y se ajustó su contenido a 10³ UFC/mL con un nefelómetro de McFarland. De esa suspensión se tomaron 2 mL para cubrir las cajas Petri conteniendo agar BHI. Posteriormente las placas se dejaron secar a 37 °C en una campana de flujo laminar.

En cada placa seca se hicieron 5 pozos de 9 mm de diámetro con un horador. Cuatro pozos externos y uno central. En los pozos externos se añadieron 130 µL con alguna de las suspensiones de probióticos a ensayar. En

el pozo central se colocó MRS-cys sin medio de cultivo, para usarlo como control. Cada probiótico se cultivó de manera individual en caldo MRS-cys a 37 °C, durante 18 h.

El efecto inhibitorio contra *C. difficile* se determinó después de incubar las cajas a 37 °C durante 48 h. Se tomó en cuenta el diámetro de los halos de inhibición (Schoster *et al.*, 2013). Se hicieron 2 observaciones por caja para cada probiótico, en dos repeticiones independientes, teniéndose un total de 4 observaciones.

3.4.2 Efecto de los Metabolitos Bacterianos

Para los ensayos con los metabolitos de las bacterias se prepararon los sobrenadantes de la siguiente manera: Las bacterias se cultivaron individualmente a 37 °C en 10 mL de caldo MRS durante 18 h. Los cultivos se centrifugaron a 3500 rpm, 20 min y 4 °C y se lavaron tres veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) a las mismas condiciones de centrifugación. Posteriormente, las células se resuspendieron en PBS, ajustando el contenido de bacterias a una densidad óptica de 0.220 a 600nm (DO₆₀₀). Un mililitro de esta suspensión se inoculó en 9 mL de caldo MRS y se incubó a 37 °C durante 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h o 6 días. Al término del periodo, los cultivos se centrifugaron a 3500 g, durante 10 min. El sobrenadante obtenido se esterilizó por filtración, usando membranas de 0.2 µm (Schoster *et al.*, 2013). Con el fin de comprobar la ausencia de bacterias, se prepararon por separado, inóculos de ambas alícuotas en agar soya tripticasa suplementado con sangre de bovino al 5% (agar sangre).

Una vez estéril el sobrenadante se dividió en dos alícuotas, una de ellas neutralizada a pH 7.0 con NaOH 5mM. Las dos alícuotas preparadas se congelaron a -40 °C para su uso posterior (Schoster *et al.*, 2013).

Para el ensayo de inhibición se aplicaron los sobrenadantes en los pozos localizados en la periferia de las placas. El pozo de en medio sirvió de control y contenía MRS estéril con pH ajustado, dependiendo de la alícuota utilizada. Cuando se usaron alícuotas neutralizadas se utilizó caldo MRS con pH de 6,8, cuando no, el pH del MRS se ajustó a 3,9 con HCl 5 mM. El diámetro del halo de inhibición se midió después de incubar durante 24 h a 37 °C.

3.5 Confirmación de la Pureza de Lactoferrina

La confirmación de la pureza de la lactoferrina usada en este estudio, se determinó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS PAGE), en un gel de poliacrilamida al 10% de acuerdo a Laemmli (1970). Se usó una cámara MightSmall (Pharmacia, Suecia) cargándose con 20 µg de proteína por pozo. Para evaluar la masa de la proteína se utilizaron estándares de masa molecular de amplio rango BioRad (Hercules CA, USA). Los geles se corrieron a 80 volts en una fuente de poder BioRad Power Pac 3000 y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie y se deshidrataron en papel celofán para su conservación. Para el análisis de masas de las proteínas se usó un fotodocumentador Molecular imager Gel Doc XR+ y el software Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) que analizó en base a las masas de los estándares de masa molecular utilizados.

3.6 Efecto de la Lactoferrina en el Crecimiento de *L. acidophilus*

El efecto de la lactoferrina (Lf) en el crecimiento de *L. acidophilus* LAC 361 se determinó por la técnica de micro-dilución en placa, usando concentraciones de Lf desde 4 mg/mL hasta 0.4 µg/mL. La inoculación del microorganismo se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (Class II, Labconco, MI, USA). Se colocaron 100 µL de caldo MRS-cys en los pocillos de placas de cultivo

estériles tipo ELISA y se añadieron otros 100 μ L de inóculo. Este último se preparó ajustando la concentración del probiótico con Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.2 a una OD de 0.70 a 600 nm en una concentración aproximada de 1.5×10^9 UFC/ mL. La cinética de crecimiento se determinó a 37°C, durante 24 h, en un espectrofotómetro Anthos Zenyth 340st (Alcobendas, Madrid). Se efectuaron lecturas de la muestra cada 30 min a 620 nm con agitación constante cada 20 s para promover el crecimiento bacteriano. Como controles se usaron caldo MRS-cys sin inóculo y caldo MRS-cys con inóculo, sin lactoferrina. El análisis se hizo por duplicado con 3 observaciones por tratamiento en cada réplica. Para establecer diferencias en el crecimiento de las bacterias se usó el programa DMFit (Dynamic Modeling 3.0, USDA Agricultural Research Service, USA).

3.7 Recubrimiento por Autoensamblado Molecular

Para realizar el autoensamblado se determinó primero la carga superficial del *L. acidophilus* LAC 361 a fin de determinar cuál sería el primer electrolito a agregar. La bacteria se sembró e incubó en caldo MRS-cys durante 24 h a 37 ° C. Para recuperar la biomasa se hizo una centrifugación a 3000 rpm por 15 min a 25 °C (IEC Clinical Centrifuge, USA), se descartó sobrenadante y se hicieron 3 lavados con solución salina fisiológica estéril (NaCl 0.9%) en las mismas condiciones. Posteriormente, la concentración del probiótico se ajustó a una densidad óptica de 0.300 a 600 nm (aproximadamente 1×10^7 UFC) en solución salina fisiológica estéril y se midió su potencial Z. Se hicieron 100 corridas en cada uno de 3 ensayos independientes, usando el equipo Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, U.K.).

Por separado, se prepararon soluciones individuales de Lf y pectinas de bajo metoxilo en agua deionizada y PBS. Se ajustaron a diferentes pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) y concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 y 2 mg/mL), para determinar su

potencial Z. Las condiciones óptimas para el proceso de recubrimiento se encontraron con soluciones de 2mg/ mL de Lf y de 1mg/ mL de pectinas de bajo metoxilo; ambas en agua deionizada a pH de 7.0.

El recubrimiento del probiótico se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Priya *et al.* (2011), con modificaciones. Para la disposición de la primera capa protectora sobre *L. acidophilus* LAC361, se hizo una mezcla 1:1 de la bacteria ajustada y la solución de Lf; se dejó en agitación suave (220 rpm) durante 15 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se midió el potencial Z para corroborar el autoensamblado de la Lf. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm (Allegra 6R Beckman, USA) durante 15 min a 4 ° C, se descartó el sobrenadante, se lavó una vez con agua deionizada y la biomasa se resuspendió en este solvente. Se midió nuevamente el potencial Z para asegurar que la capa de Lf continuara ensamblada. Para la segunda capa se hizo nuevamente una mezcla a proporción 1:1 con la biomasa resuspendida usando en este caso la solución de pectinas de bajo metoxilo. Se siguió el mismo procedimiento que en la primera capa. La tercera, cuarta y quinta capas se obtuvieron repitiendo el procedimiento descrito con anterioridad, alternando Lf, PBM y Lf, respectivamente. La figura 2 resume el procedimiento.

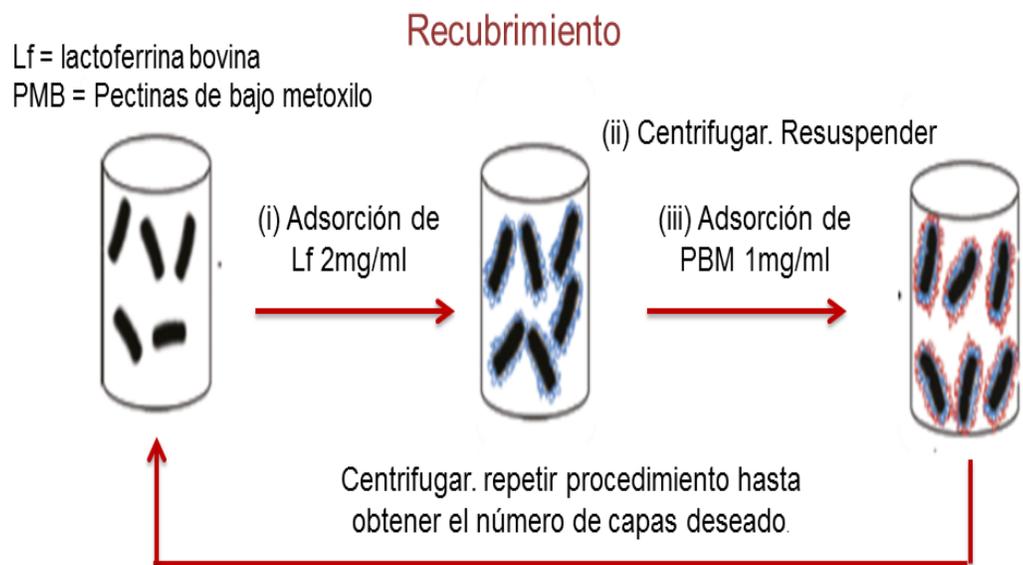


Figura 2. Diagrama del Recubrimiento de *L. acidophilus* LAC361 por autoensamblado molecular con lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo

La solución obtenida al final, que contenía al probiótico recubierto, se congeló en N₂ líquido y se liofilizó a -50 °C (Virtis Benchtop Virtis Benchop 6.6 SP Industries, Gardinier, NY, USA) para almacenarla a -40°C hasta su análisis.

3.8 Caracterización Fisicoquímica

3.8.1 Determinación de la Carga Superficial

Para conocer la estabilidad de las capas añadidas al probiótico se determinó la carga superficial a los recubrimientos liofilizados y almacenados a -40 °C. Se prepararon soluciones de 1 mg/mL de los recubrimientos y se determinó su potencial zeta como se describió anteriormente.

3.8.2 Morfología

La morfología del probiótico recubierto se determinó mediante microscopia electrónica en el Laboratorio de Microscopia de Alta Resolución de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Se usó un microscopio de barrido JEOL-JSM-5900LV (JEOL USA, Inc). Las muestras se deshidrataron y se montaron en cilindros de aluminio sobre cintas de grafito y se recubrieron con una capa de oro de 60 Å de espesor. La morfología superficial de las bacterias se obtuvo utilizando alto vacío y un detector de electrones. Se usó un voltaje de aceleración de 10 KV, y una distancia de la lente al plano focal (WD) de 10 mm.

3.9 Efecto de la Liofilización en la Sobrevivencia del Probiótico Recubierto

Para conocer el efecto de la liofilización en la viabilidad del probiótico recubierto se usó la técnica de dilución en placa. Se pesó 1 mg de bacterias recubiertas y se sembró en agar MRS-cys. Los ensayos se hicieron por duplicado con dos observaciones para cada dilución. Las bacterias no recubiertas fueron utilizadas como control.

3.10 Efecto del Almacenamiento a Bajas Temperaturas en la Supervivencia del Probiótico Recubierto

Para conocer el efecto de las bajas temperaturas sobre los probióticos recubiertos, se almacenaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 días. Posteriormente se hizo una cuenta por dilución en placa con agar MRS-cys, inoculando 1mg de bacteria. Los ensayos se hicieron por duplicado con dos observaciones para cada dilución. El control utilizado fue la bacteria libre liofilizada almacenada a las mismas condiciones.

3.11 Efecto de las Condiciones Gastrointestinales Simuladas *In Vitro*

Las condiciones gastrointestinales se simularon usando el sistema continuo de Tobey (2001), con las modificaciones propuestas por Mendoza-Madrigal (2009). El sistema se armó con 2 matraces que se mantuvieron a 37°C y con agitación (Figura 3). En el primer matraz se simuló el contenido gástrico y en el segundo el contenido intestinal. Se usó un tapón horadado para hacer la toma de muestra. Ambos matraces se comunicaron por medio de una manguera conectada a una bomba peristáltica que simuló el movimiento intestinal. Previamente se hicieron análisis de cuenta en placa para asegurar que la cantidad de microorganismos inoculada tanto del probiótico recubierto como de su control fueran aproximadamente iguales (1×10^7 UFC/g). El experimento se hizo por duplicado dentro de una campana de flujo laminar. Se usó la bacteria libre liofilizada como control.

Las condiciones del fluido gástrico se simularon preparando 30 mL de NaCl al 0.5%, a la que se le añadieron 3 g / L de pepsina de mucosa gástrica porcina, y 4 g / L de mucina gástrica. El pH se ajustó a 2.2 (Sartorius Professional Meter

PP-20, Alemania) con HCl. Como vehículo acarreador del probiótico recubierto se usó Vida Suero Oral (Glucosa 20.0 g, Cloruro de potasio 1.5 g, Cloruro de sodio 3.5 g y Citrato trisódico dihidratado 2.9 g), Se añadieron 10 mL del suero preparado disolviendo un sobre de 27.9 g en 1000 mL de agua purificada (de garrafón) El probiótico recubierto (1×10^7 UFC/mL) se mezcló con el acarreador y el fluido gástrico donde permaneció 90 min. Cada 30 min se obtuvo una muestra para determinar la sobrevivencia del probiótico usando la técnica de dilución en placa como se ha descrito previamente.

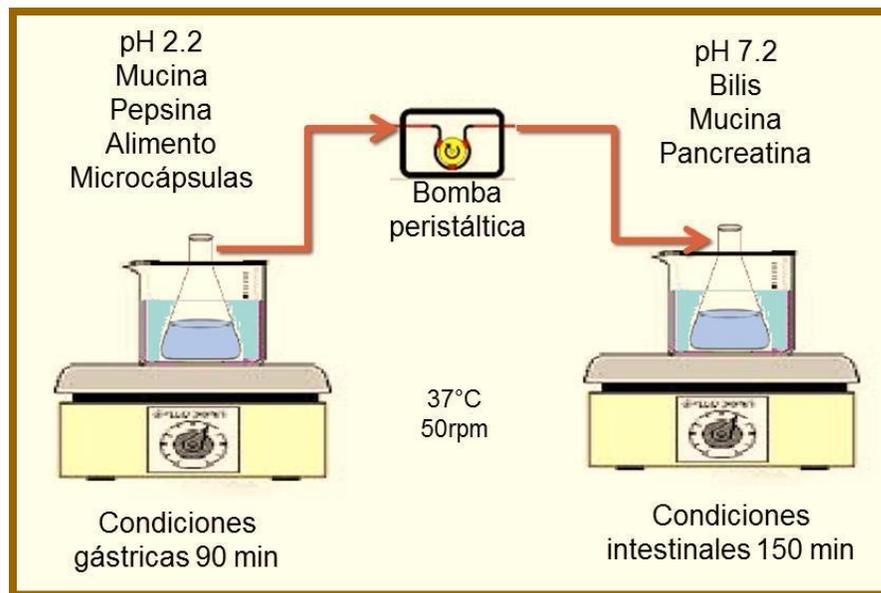


Figura 3. Esquema de simulación de las condiciones gastrointestinales humanas. Tomado de López-Barretero (2014).

Al término del tiempo de incubación en condiciones gástricas la bomba peristáltica trasladó el contenido, al frasco conteniendo la solución intestinal simulada. La solución amortiguadora de fosfatos (30 mL) que se usó para simular las condiciones del intestino delgado contenía pancreatina (1 g/L), sales biliares (3 g/L) y mucina (4 g/L). el pH se ajustó a 7.2 con NaOH. El tiempo de incubación fue de 150 min a 37 °C y se tomaron lecturas cada 30 min. La viabilidad celular se midió por dilución en placa con dos observaciones para cada dilución. El estudio se hizo por duplicado, usando a las bacterias no recubiertas como control.

3.12 Efecto del Recubrimiento en la Adhesión de *L. acidophilus* a Mucinas Intestinales

Para determinar el efecto del recubrimiento en la adhesión de *L. acidophilus* a las mucinas del colon de porcino y bovino, se hizo un ensayo *in vitro* similar a ELISA denominado ELLA por sus siglas en inglés (Enzyme Linked Lectin Assay). Se usó biotina como reportero de las mucinas y el sistema avidina-peroxidasa para revelar la interacción. El principio se describe en la figura 4.

Para biotinar a las mucinas se siguió el procedimiento descrito por Sarabia-Sainz *et al.*, 2009). Por cada miligramo de mucina liofilizada se agregaron 200 µL de PBS a pH 7.2 para hidratarla. Se disolvieron 0.08 mg de biotina en 100 µL de dimetil sulfóxido contenidos en un frasco ámbar, y se agregó la mucina hidratada. La mezcla se incubó durante 2 h bajo agitación suave, en la oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla mucina-biotina se dializó extensivamente a 4°C para eliminar los restos de biotina que no reaccionaron. La mucina biotilada se congeló a -40 °C durante 24 h, luego se liofilizó y se almacenó a -40 °C hasta su uso. Primero se estableció la

sensibilidad de la prueba y posteriormente se hicieron los ensayos de interacción, comparando las características de adhesión de la bacteria libre liofilizada y la recubierta.

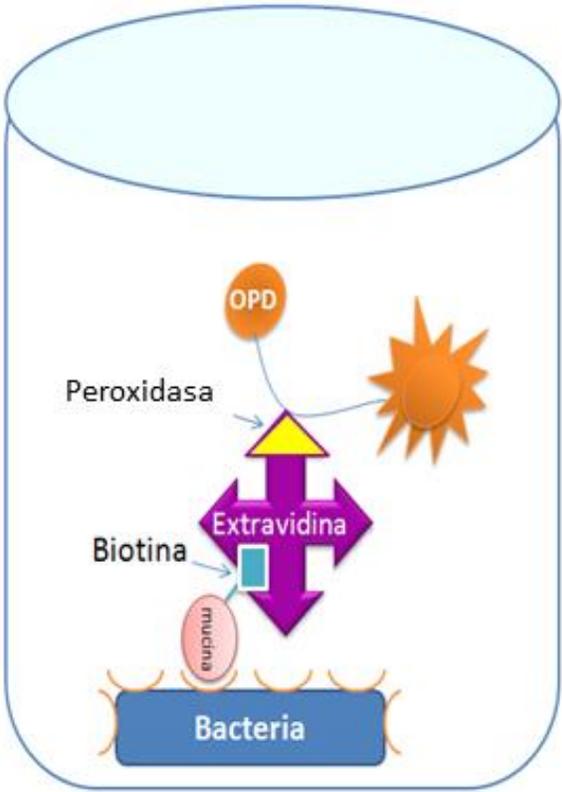


Figura 4. Esquema de la adhesión de *L. acidophilus* a mucinas intestinales

Para conocer las concentraciones adecuadas de mucina y bacteria a utilizar se llevó a cabo un análisis de interacción con cultivos frescos de *L. acidophilus* LAC 361 y mucinas del colon de porcino y bovino. Se usaron diferentes concentraciones de mucinas biotiniladas (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y de bacteria (2×10^6 , 2×10^7 y 2×10^8 UFC/mL) en PBS. Las concentraciones de bacteria se ajustaron en un espectrofotómetro a una absorbancia de a 0.5, medida a 660 nm . Se utilizaron cajas de ELISA de 96 pozos inmovilizando 100 μL por pozo de la bacteria ajustada. La inmovilización se llevó a cabo con glutaraldehído al 0.01%. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 min con PBS con 0.1% de Tween-20 (TPBS). Se bloquearon las interacciones no específicas con 200 μl de albúmina sérica bovina (BSA) al 1.5 % en PBS por pozo, incubando durante 18 h. Nuevamente se hicieron 3 lavados con TPBS.

Después de lavar se añadieron las mucinas biotiniladas y se dejó interaccionar por 2 h a 25 °C. Nuevamente se hicieron 3 lavados de 5 min con TPBS. Posteriormente se incubó (40 min, 25 °C) con avidina-peroxidasa (1:1000 en PBS), se lavó nuevamente y se reveló la interacción con ortofenilendiamina (OPD), leyendo la absorbancia a 450 nm en un lector Microplate reader 680 (BioRad, CA, USA). Los análisis se hicieron por duplicado con 24 observaciones por réplica. Se usó albúmina porcina biotinilada como control negativo.

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de mucina y bacteria para realizar el ensayo ELLA, se procedió a comparar de la interacción de *L. acidophilus* LAC 361 (cultivo fresco y cultivos obtenidos a partir de los probióticos liofilizados, tanto los recubiertos como los no recubiertos), con las mucinas del colon bovino y porcino. El ensayo de interacción se llevó a cabo como ya se describió, utilizando las concentraciones más adecuadas de mucina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de bacteria (2×10^8 UFC). Se leyó absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas ELISA 680 (BioRad, CA, USA). Los análisis se hicieron por duplicado con 24 observaciones por réplica.

3.13 Efecto del Recubrimiento en la Capacidad Antagónica de *L. acidophilus*

LAC 361 Recubierto contra *C. difficile*

El efecto del recubrimiento en la actividad antagónica del probiótico contra *C. difficile* se determinó usando un ensayo de inhibición, usando el sobrenadante del cultivo de *L. acidophilus* LAC 361, como se describió en la sección 3.4.2.

3.14 Recuperación Metabólica del Probiótico Recubierto Sometido a Altas y Bajas Temperaturas

La calorimetría isotérmica se realizó con un modelo de CSC 4100 DSC (Calorimetry Science Corporation, Spanish Fork, Utah). El equipo cuenta con cuatro celdas herméticas hastelloy de 1cm³, la sensibilidad es de ± 1 mW y una capacidad de análisis desde -30 hasta 130°C. Se realizaron dos estudios por separado, el primero para ver el efecto del estrés por frío y el segundo el del efecto del estrés por calor. Ya que el vehículo escogido para los probióticos en este estudio fue vida suero oral, primero se determinó la línea base para estos electrolitos, sometiendo una muestra de vida suero oral a los distintos tratamientos de estrés por temperatura, mismos a los que fueron sometidas las bacterias en el estudio.

Se trabajó con bacterias liofilizadas no recubiertas y recubiertas, que estuvieron almacenadas durante 2 meses a -40 °C. Para iniciar los ensayos, primero se reactivaron las bacterias sembrándolas en caldo MRS-cys, e incubándolas durante 24 h a 37 °C. Se inocularon aproximadamente 1×10^8 UFC/mL en vida suero oral, ajustando la biomasa a una absorbancia de 0.3 a una DO_{600nm}. Para hacer los ensayos en el equipo, se dejó una celda vacía y las

3 restantes se llenaron con 700 μL de la solución inoculada con el probiótico. El procedimiento de ajuste se realizó cada vez que se ensayó una temperatura de estrés distinta.

El efecto de la disminución de la temperatura en la recuperación metabólica del probiótico se ensayó iniciando con la solución inoculada, mantenida en un inicio a 37 °C, para después disminuir y mantener durante 90 min, a diferentes temperaturas (17, 7 y 4 °C) en experimentos por duplicado e independientes. Después de los 90 min y para cada caso, se restableció la temperatura a 37 °C. Durante este tiempo el aparato registró el calor generado por las bacterias para posteriormente determinar la recuperación metabólica del probiótico, después de que el estrés (diminución a diferentes temperaturas), fue aplicado. Un segundo set de experimentos se llevó a cabo de manera similar pero utilizando altas temperaturas (47, 57 y 67 °C).

Para cada temperatura, la recuperación metabólica se obtuvo a partir de los valores de calor generado entre los minutos 40 y 71, tiempo en el que los datos fueron más homogéneos. Para cada temperatura ensayada se obtuvo la media del calor registrado durante el minuto 40 al minuto 71. Para normalizarlos, se convirtieron en porcentaje con respecto a la generación de calor obtenida a 37 °C, la cual se tomó como el 100 %.

3.15 Efecto del Recubrimiento en la Fase de Retardo del Crecimiento de *L.*

acidophilus

El efecto del recubrimiento en el inicio del crecimiento de *L. acidophilus* LAC 361 se determinó por la técnica de micro-dilución en placa descrita en la sección 3.6. El experimento se hizo con cultivos frescos provenientes de los stocks de bacteria congelados con glicerol y con las bacterias no recubiertas y recubiertas que fueron liofilizadas al inicio del estudio y que permanecieron almacenadas durante 60 días a -40°C . Se usaron inóculos de 1 y 1.2 mg de bacteria. En condiciones de esterilidad, se colocaron 200 μL de caldo MRS-cys en los pocillos de placas de cultivo estériles tipo ELISA, con sus respectivos inóculos. La cinética de crecimiento se determinó a 37°C , durante 48 h, en un espectrofotómetro Anthos Zenyth 340st (Alcobendas, Madrid). Se efectuaron lecturas de la muestra cada 30 min a 620 nm con agitación cada 20 s, para promover el crecimiento bacteriano. Como control se utilizó caldo MRS-cys sin inóculo. El análisis se hizo por duplicado con 16 observaciones por tratamiento en cada réplica. Para establecer diferencias en el crecimiento de las bacterias se usó el programa DMFit (Dynamic Modeling 3.0, USDA Agricultural Research Service, USA).

3.16 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos de la inhibición por difusión en placa del probiótico contra *C. difficile*, el efecto de la concentración de lactoferrina en el crecimiento de *L. acidophilus*, el efecto de la liofilización en la sobrevivencia del probiótico recubierto, el efecto de las condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*, en la capacidad de adhesión de *L. acidophilus* a mucinas intestinales y el efecto del recubrimiento en la actividad antagónica de *L. acidophilus* recubierto contra *C. difficile*, fueron analizados mediante un análisis de varianza

(ANOVA) de una vía. Cuando hubo efecto significativo, las comparaciones de medias se realizaron por la prueba de Tukey-Kramer.

Los datos de la evaluación de los cambios de temperatura sobre la recuperación del probiótico, fueron ajustados a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 6 x 2 (6 temperaturas y dos estados del probiótico, libre o recubierto). El modelo estadístico incluyó el efecto fijo de la temperatura, el estado del probiótico y su interacción.

Para analizar el efecto del tratamiento en el inicio del crecimiento de *L. acidophilus* se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis (por no ajustarse a la normalidad), los tratamientos que presentaron diferencias significativas se compararon mediante la prueba de Z de Kruskal-Wallis.

Todas las significancias estadísticas fueron establecidas a un nivel de $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el paquete estadístico NCSS versión 2007.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Inhibición *In Vitro* de Diferentes *Lactobacillus* contra *C. difficile*

Para determinar cuál especie de *Lactobacillus* afectaba el crecimiento de *C. difficile* de manera más efectiva, se hicieron ensayos de inhibición usando suspensiones bacterianas o sus sobrenadantes. Los probióticos ensayados fueron *L. plantarum* LP39 (ATCC 14913), *L. reuteri* SD2112 (ATCC 55730), *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) y *L. acidophilus* LAC361. No se observaron halos de inhibición cuando se aplicaron las diferentes suspensiones de probióticos a los pozos (datos no mostrados). En cambio, los sobrenadantes del cultivo de *L. reuteri* y *L. acidophilus* LAC361, produjeron halos de inhibición, cuyo diámetro dependió del tiempo de incubación de la bacteria. En las figuras 5A y 5B se muestra el efecto del sobrenadante del cultivo de *L. acidophilus* LAC361. Se decidió continuar el estudio con este microorganismo, a solicitud expresa de la compañía que lo donó.

Se llevaron a cabo estudios con el sobrenadante tal y como se obtuvo del cultivo o neutralizando su pH con NaOH (figuras 5A y B, respectivamente). Ello con el fin de determinar si el efecto inhibitorio del probiótico se debía únicamente a la disminución del pH por la producción de ácido láctico o si había otras moléculas involucradas. Únicamente se observaron halos de inhibición en presencia del sobrenadante sin neutralizar, lo que es un indicio de que la inhibición se debió a la producción de ácidos por parte del probiótico (Schoster *et al.*, 2013).



Figura 5. Actividad antagónica de *L. acidophilus* LAC-361 contra *C. difficile* (A), sobrenadantes sin neutralizar.(B), sobrenadantes neutralizados

La figura 6 muestra los diámetros de los halos de inhibición con respecto al tiempo de incubación en el que se obtuvo el sobrenadante. Sólo se apreció inhibición contra *C. difficile* en los cultivos sin neutralizar. Además, en éstos últimos se presentaron diferencias debido al tiempo de incubación ($P < 0.05$). Se observó un halo mayor ($P < 0.05$) en el sobrenadante obtenido a las 48 h de incubación, el cual fue diferente al observado a las 12 y 24 h, pero fue similar a los observados a las 36 y 72 h de incubación ($P > 0.05$). Lo anterior pudo deberse a que a las 48 h de incubación se presenta la mayor producción de ácido láctico (Adamberg, 2003).

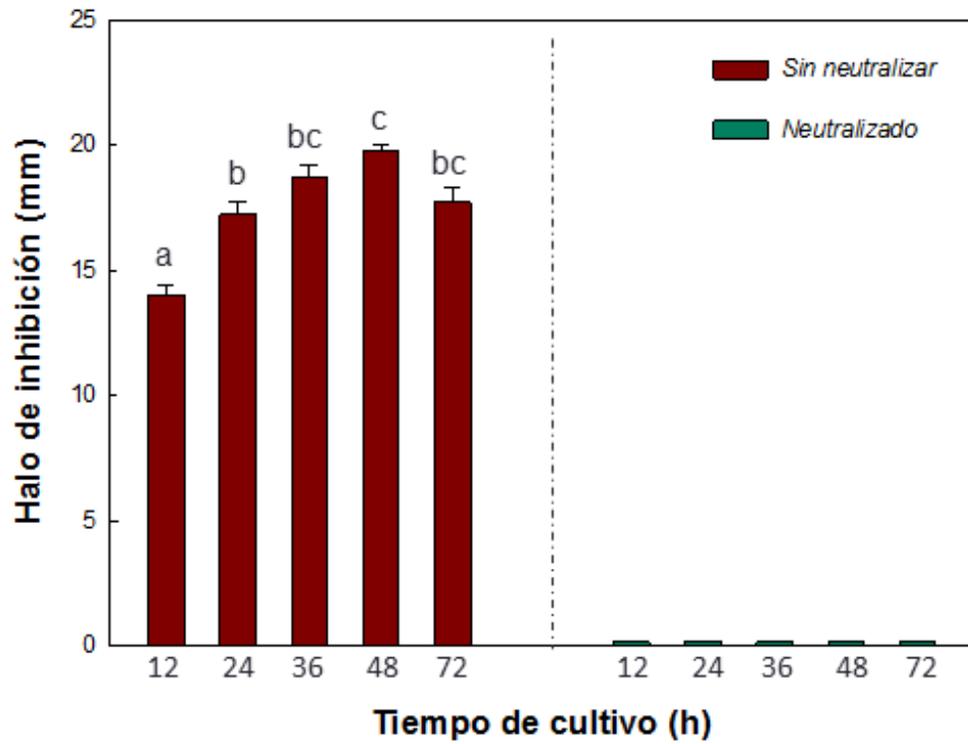


Figura 6. Antagonismo de los metabolitos de la fermentación de *L. acidophilus* LAC-361 contra *C. difficile*. ^{abc} Medias con diferente literal, indican diferencias ($P < 0.05$).

4.2 Confirmación de la Pureza de Lactoferrina

La figura 7 muestra la electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras del gel de poliacrilamida al 10% donde se cargó la lactoferrina usada en este estudio. En el carril 1 se aplicaron los estándares de masa molecular. En el carril 2 Lf bovina de Sigma, con pureza del 98 % y en el 3 la Lf usada en el estudio. En ambos casos se observó una banda mayoritaria de 79.8 ± 0.6 kDa cuya masa corresponde a la de la lactoferrina (García-Montoya *et al.*, 2012). Debido a lo anterior se concluye que el grado de pureza de la proteína usada para el estudio fue aceptable.

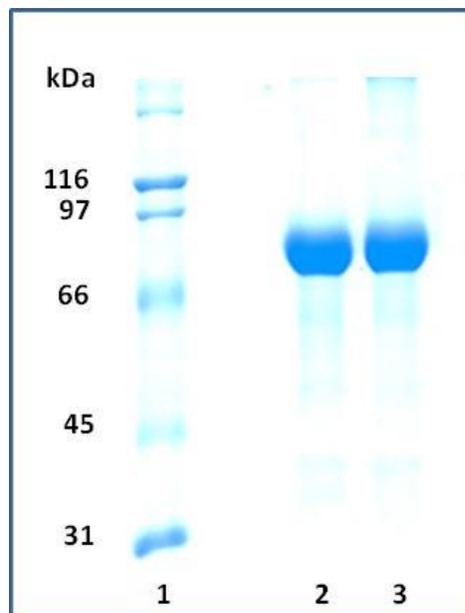


Figura 7. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras para confirmar la pureza de lactoferrina bovina usada en el estudio. Carril 1, estándares de masa molecular; Carril 2 lactoferrina bovina al 98% (Sigma Aldrich); carril 3 lactoferrina bovina donada para el estudio.

4.3 Efecto de la Lactoferrina en el Crecimiento de *L. acidophilus*

La figura 8 es un concentrado de las curvas de crecimiento de *L. acidophilus* LAC361 en presencia de diferentes concentraciones de lactoferrina. Se observó crecimiento a todas las concentraciones de Lf ensayadas. Sin embargo, hubo un retardo en el crecimiento del probiótico expuesto a las concentraciones de 1 y 4 mg/mL (figura 9).

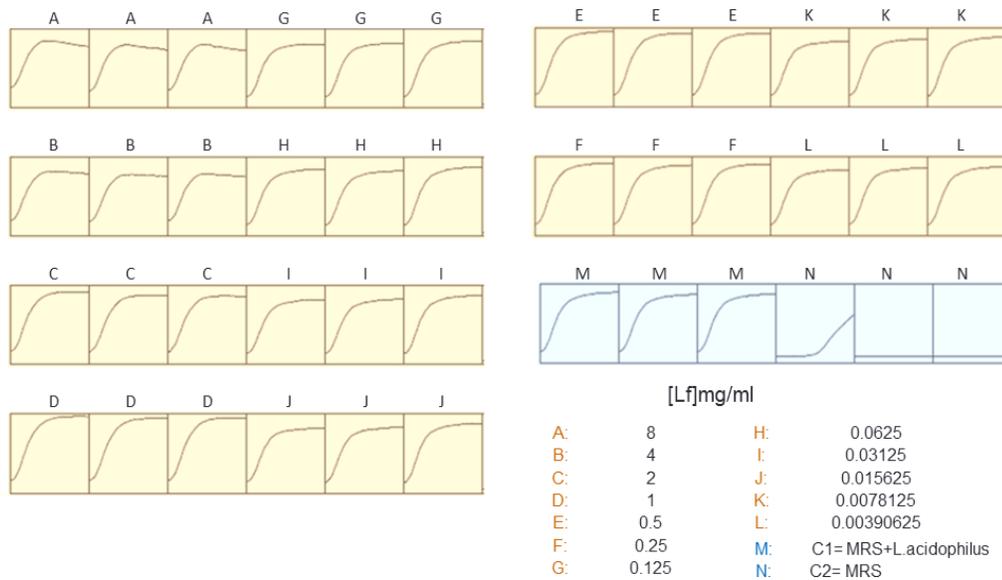


Figura 8. Curvas de crecimientos de *L. acidophilus* LAC-361 en caldo MRS+Cys en presencia de diferentes concentraciones de lactoferrina.

De acuerdo al análisis del programa DMFit, en estas concentraciones el tiempo en que los microorganismos permanecieron en la fase Lag en presencia de 4 mg/mL de lactoferrina fue (50) % más largo que la fase Lag del control, y del resto de las concentraciones ensayadas, mientras que en presencia de 2 mg/mL fue de 30% (figura 9). Este efecto bacteriostático también fue observado por Kim *et al.* (2004) a las mismas concentraciones, al usar otras cepas de *L.*

acidophilus y se debe a la capacidad de secuestrar Fe que tiene la molécula de lactoferrina (García-Montoya *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a que el efecto fue bajo, se puede inferir que la presencia de Lf como matriz de recubrimiento no afectaría significativamente al desarrollo de la bacteria.

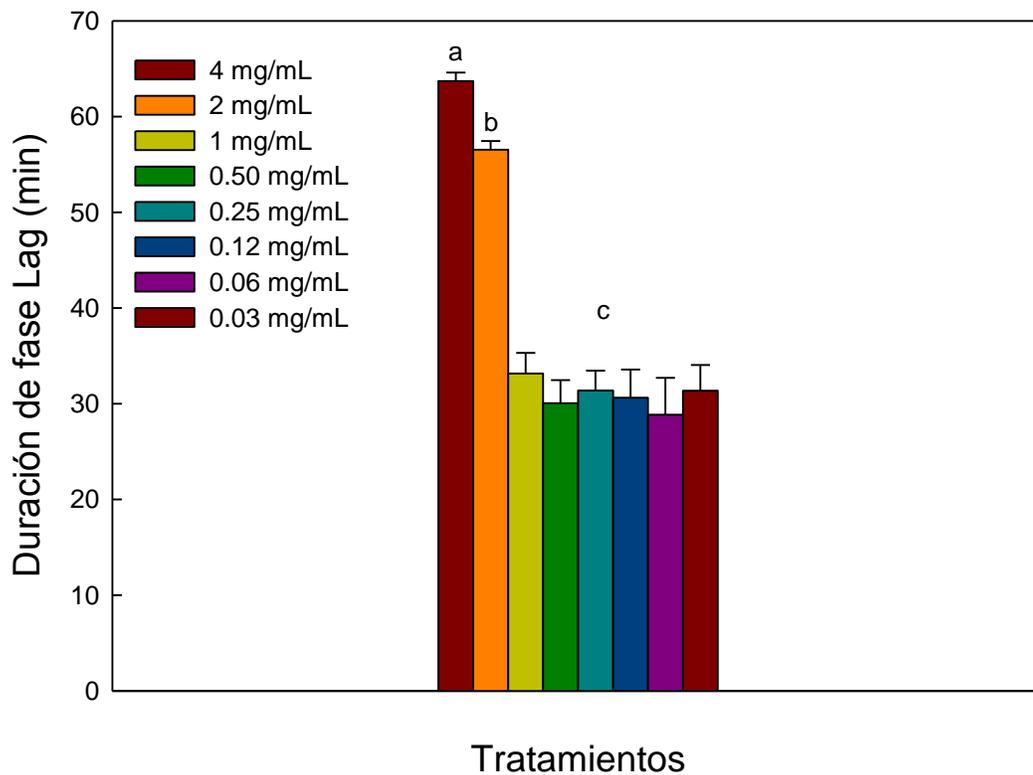


Figura 9. Efecto de la concentración de lactoferrina bovina en la fase de retardo (Lag) de crecimientos de *L. acidophilus* en caldo MRS-cys. ^{abc} Medias con diferente literal, indican diferencias respectivamente (P<0.05).

4.4 Recubrimiento por Autoensamblado

Para demostrar el autoensamblado de un electrolito sobre una superficie, se determina el cambio de la carga superficial a través de la cuantificación del potencial zeta (ζ). Éste mide el potencial eléctrico de la interface entre la solución que rodea a la partícula, en este caso la bacteria, y la capa adherida a la misma (Klodzinska *et al.*, 2010).

El potencial zeta de *L. acidophilus* LAC361 fue de -9.7 mV (figura 10). La carga superficial de las bacterias se origina a partir de la ionización de los grupos amino, carboxilo y fosfato, presentes en las moléculas de la pared celular y de los iones que absorbe la bacteria a partir del ambiente acuoso que la rodea (Poortinga *et al.*, (2002). Las proteínas, los fosfolípidos, el ácido teicoico y el teicurónico, son las principales moléculas que influyen en la carga de las bacterias Gram positivas. Esta carga es negativa y varía entre géneros y especies, dependiendo de la complejidad de su pared celular (van der Wal *et al.*, 1997). Otro factor que influye en la carga de la bacteria es la composición y pH del medio en que se encuentra (Schär-Zammaretti *et al.*, 2005).

Los potenciales zeta para la lactoferrina y las pectinas de bajo metoxilo a las condiciones de este estudio, fueron de +40.8 y -37.4, respectivamente. La primera capa que se añadió a la bacteria fue de lactoferrina, y se observó un cambio desde -9.7 hasta +3.0 mV (figura 10) al recubrirse. Este cambio en la carga superficial de la bacteria es un indicio de que parte de la Lf añadida permaneció interaccionando, aun después de los lavados correspondientes. En segundo lugar se añadió una capa de PBM y el autoensamblado se probó con el cambio de carga hasta - 45.1 mV; la siguiente capa fue de Lf cambiando nuevamente la carga (+19.5 mV). La adición posterior de la capa de PBM produjo un nuevo cambio hacia -43.9 mV y después de añadir la última capa (nuevamente Lf) se obtuvo una carga positiva de + 18.9mV.

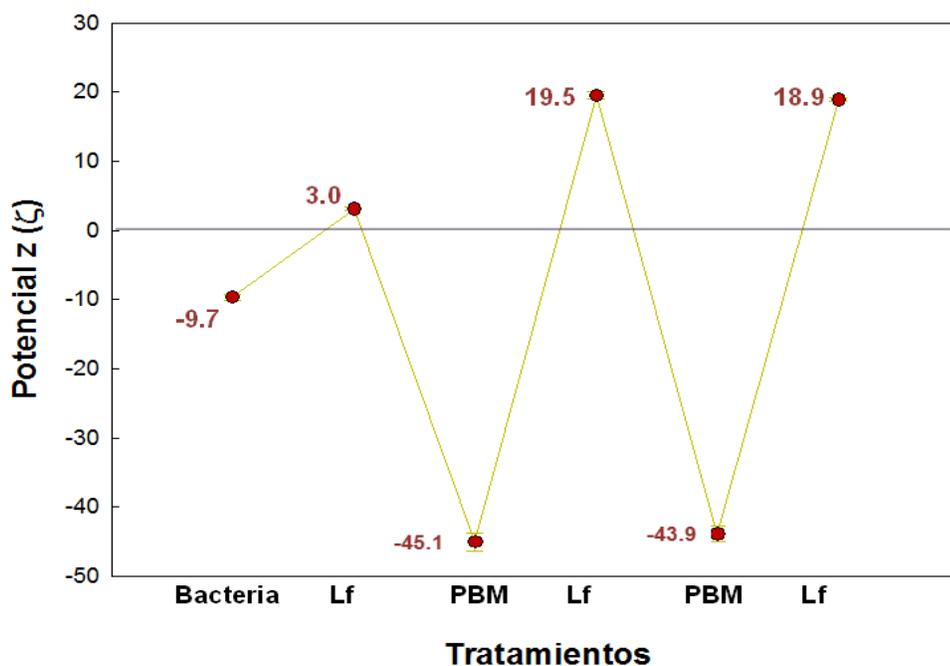


Figura 10. Cambios en el potencial zeta en *L. acidophilus* LAC361 al recubrirlo con 5 capas de la combinación lactoferrina-pectinas de bajo metoxilo. Media \pm error estándar de 3 repeticiones con 3 observaciones por réplica

4.5 Caracterización de los Recubrimientos

4.5.1 Determinación de la Carga Después de la Liofilización

Para determinar la estabilidad de la carga de los probióticos recubiertos, después de que se liofilizaron y reconstituyeron, se volvió a medir el potencial zeta. La figura 11 muestra que éste permaneció en el mismo valor que se obtuvo al añadirle la última capa de Lf (figura 10), es decir, una carga positiva de 18.9 mV.

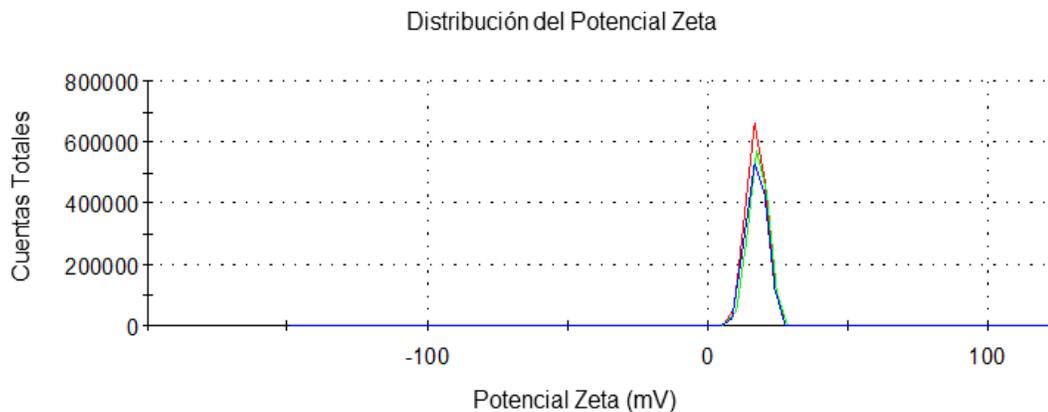


Figura 11. Distribución de la carga superficial del *L. acidophilus* LAC 361 recubierto después de la liofilización.

4.5.2 Morfología

Para conocer la morfología de los recubrimientos bacterianos liofilizados se tomaron micrográficas en microscopio electrónico de barrido (figuras 12 A y B) y se compararon con su control, las bacterias no recubiertas (figuras 12 C y D). En ambos casos se observaron agregados de bacterias cuya morfología es características para los lactobacilos liofilizados (Burgain et al., 2013). En el caso de los probióticos recubiertos se observaron algunos corpúsculos que pudieran ser agregados de los electrolitos. Por otro lado, en algunas secciones se observan partes continuas que pudieran estar relacionadas con el recubrimiento de la bacteria.

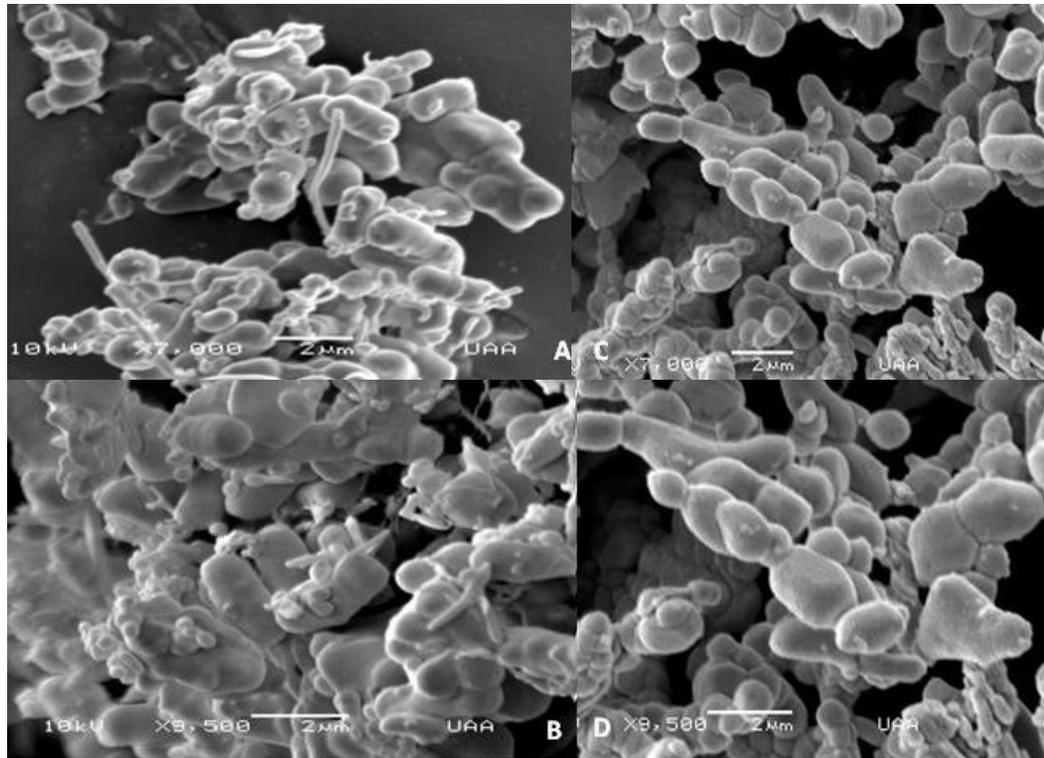


Figura 12. Micrografías de *L. acidophilus* recubierto por autoensamblado molecular de lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo. A y B, bacterias recubiertas; C y D bacterias no recubiertas.

4.6 Efecto de la liofilización en la sobrevivencia del probiótico recubierto

La viabilidad de las bacterias puede verse afectada a actividades de agua elevadas, ya que existe gran cantidad de agua libre disponible para que se lleven a cabo reacciones deteriorativas (Badui, 2006; Perdana *et al.*, 2012). Es por ello que para preservar y almacenar a las bacterias de uso industrial se las deshidrata mediante el proceso de liofilización. Está técnica de sublimación en condiciones de vacío, previene además, el efecto de las altas temperaturas (Carvalho *et al.*, 2004). Sin embargo, la liofilización produce un estrés oxidativo

que puede afectar al estado fisiológico de las células y por tanto, su sobrevivencia (Morgan *et al.*, 2006; Beal *et al.*, 2001; Panoff *et al.*, 2000).

Para comparar la resistencia a la liofilización se sometieron a este proceso la misma cantidad de bacterias no recubiertas y recubiertas iniciando con 8.3 Log UFC/g, Después de liofilizar las cuentas en el probiótico recubierto fueron de 5.73 Log UFC/g, mientras que en el probiótico libre liofilizado fueron casi 2 log menor ($P < 0.05$) (Figura 13). Lo anterior es un indicio de que el recubrimiento con lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo pudiera estar proporcionando una protección contra daños y lesiones a la membrana celular de las bacterias y frente al desequilibrio osmótico (Morgan *et al.*, 2006).

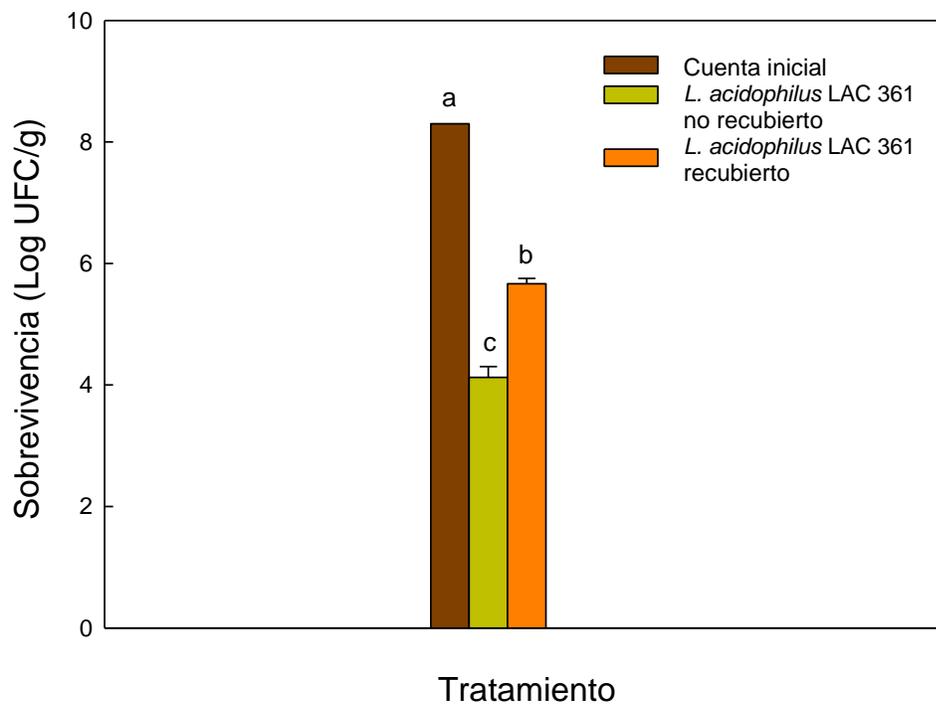


Figura 13. Sobrevivencia a la liofilización. ^{abc} Medias con diferente literal, indican diferencias ($P < 0.05$).

4.7 Efecto del Almacenamiento a Bajas Temperaturas en la Supervivencia del Probiótico Recubierto

La viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento es inversamente proporcional a la temperatura (Gardiner *et al.*, 2000). Los alimentos que contienen probióticos deben almacenarse preferentemente a temperaturas entre 4 y 5 ° C (Mortazavin *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando requieren conservarse por largos periodos, la temperaturas de almacenamiento debe ser menor o igual a -18°C (Bruno y Shah, 2003).

Los principales factores que afectan a la supervivencia de los probióticos almacenados a bajas temperaturas son la velocidad de congelación y de descongelación (Fowler y Toner, 2005). Se requiere de una congelación rápida y de una descongelación gradual, para que los cristales de hielo formados no dañen a la pared celular de la bacteria (Mohammadi *et al.*, 2011). Sin embargo, en el caso de este estudio, también puede ocurrir daño por estrés oxidativo, durante el almacenamiento, ya que las bacterias fueron liofilizadas (Morgan *et al.*, 2006).

Para determinar el efecto del almacenamiento prolongado a bajas temperaturas en la supervivencia, las bacterias recubiertas se mantuvieron a -40 °C durante 90 días. Al término del experimento se observó una menor disminución en la supervivencia de las bacterias recubiertas respecto a las bacterias no recubiertas (Tabla 1).

Inmediatamente después de liofilizar las bacterias recubiertas presentaron una supervivencia del 71%, mientras que en las no recubiertas fue del 52%. A los 90 días de almacenamiento a -40 °C las bacterias recubiertas presentaron una supervivencia del 70% y las no recubiertas 42%. Estos resultados son una evidencia de que el recubrimiento protegió al probiótico del

estrés por frío, ya que prácticamente no hubo diferencia en la sobrevivencia al principio y al final del experimento.

Tabla 1. Porcentaje de sobrevivencia de *L. acidophilus* LAC361 almacenado a -40 °C (Media \pm Error Estándar) ^{abc} Medias con diferente literal, indican diferencias (P<0.05).

<i>L. acidophilus</i> LAC 361	Sobrevivencia (%)	
	0 Días	90 Días
Recubierto	71 \pm 1 ^a	70 \pm 2 ^a
No recubierto	52 \pm 1 ^b	42 \pm 1 ^c

4.8 Efecto de las Condiciones Gastrointestinales Simuladas *In Vitro*.

Para determinar el posible efecto protector del recubrimiento ante los estreses del tracto gastrointestinal, se determinó la sobrevivencia del probiótico al simular las condiciones del estómago y del intestino in vitro. La figura 14 nos muestra los resultados obtenidos. Después de permanecer 90 minutos en condiciones gástricas la sobrevivencia de las bacterias recubiertas disminuyó 0.47 UFC/g, mientras que en las no recubiertas disminuyó 2.28 Log UFC/g. Lo anterior nos indica que el recubrimiento ejerció alguna protección contra el ácido estomacal y la pepsina.

Al simular las condiciones intestinales en presencia de enzimas y sales biliares, la sobrevivencia del probiótico recubierto y su control, continuaron disminuyendo, observándose una diferencia (P<0.05) entre ambos casos. La

disminución total en la viabilidad de las bacterias recubiertas fue de 2.44 Log UFC/g contra 3.6 Log UFC/g de las bacterias no recubiertas. Lo anterior es un indicio de que el recubrimiento protegió al probiótico de las enzimas pancreáticas y de la acción de las sales biliares. No obstante, las cuentas bacterianas fueron menores a las recomendadas ($>1 \times 10^6$), para generar un efecto pro-salud al consumidor. Debido a lo anterior, es recomendable añadir una mayor cantidad de bacterias al alimento para garantizar que llegue una cantidad suficiente al intestino grueso.

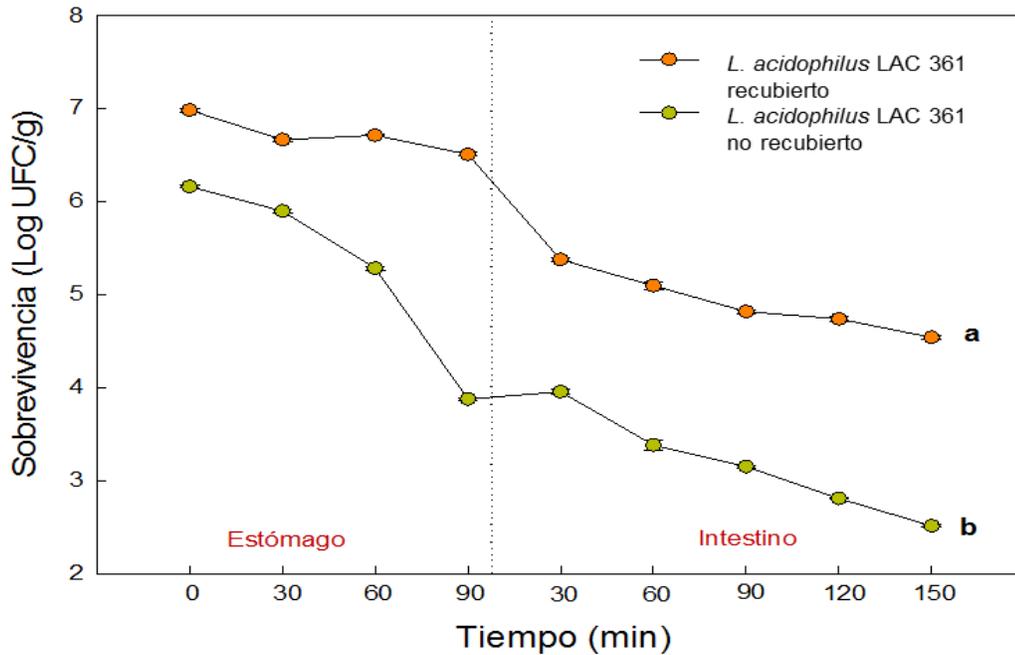


Figura 14. Efecto del recubrimiento en la sobrevivencia de *L. acidophilus* LAC-361 en condiciones gastrointestinales simuladas. Línea con diferente literal, indican diferencias ($P < 0.05$)

4.9 Efecto del Recubrimiento en la Adhesión de *L. acidophilus* a Mucinas Intestinales.

No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la interacción de los diferentes cultivos de *L. acidophilus* LAC 361 (figura 15). Tanto las bacterias recubiertas como las no recubiertas, fueron capaces de reconocer y unirse a las mucinas del colon de bovino y porcino, indicando que el recubrimiento no afecta a la capacidad de adhesión de los microorganismos.

La importancia de lo anterior radica en que el efecto benéfico de los probióticos está relacionado con la habilidad que presenten para adherirse a la mucosa presente en la pared intestinal, ya que es un pre-requisito para colonizar el tracto intestinal (Kos *et al.*, 2003). Los glicanos presentes en las mucinas que forman la mucosa intestinal, funcionan como receptores tanto para probióticos, como para bacterias patógenas, generándose de esa manera la competencia por los sitios de adhesión (Moncada *et al.*, 2003).

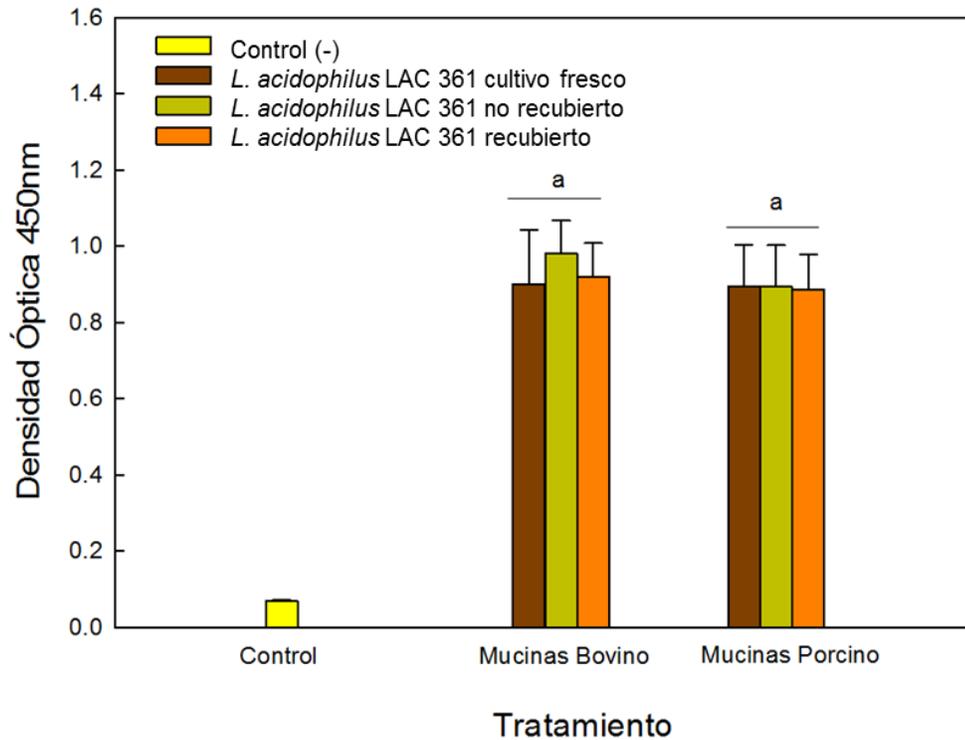


Figura 15. Efecto del recubrimiento en la adherencia de *L. acidophilus* LAC-361 a mucinas intestinales. ^a Medias con la misma literal son similares estadísticamente ($P > 0.05$)

4.10 Efecto del Recubrimiento en la Capacidad Antagónica de *L. acidophilus* Recubierto contra *C. difficile*

Las bacterias recubiertas fueron capaces de impedir el crecimiento de *C. difficile* de manera semejante a los cultivos bacterianos frescos, por lo que el recubrimiento utilizado no afectó la capacidad de estas para inhibir al patógeno (figura 16). Las placas mostraron que hubo actividad antagónica como lo indican los halos de inhibición; el análisis estadístico mostró que no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el cultivo fresco y las bacterias recubiertas, a las 48 hrs de incubación, que es el tiempo en donde se presenta la mayor producción de ácido láctico (Adamberg, 2003).

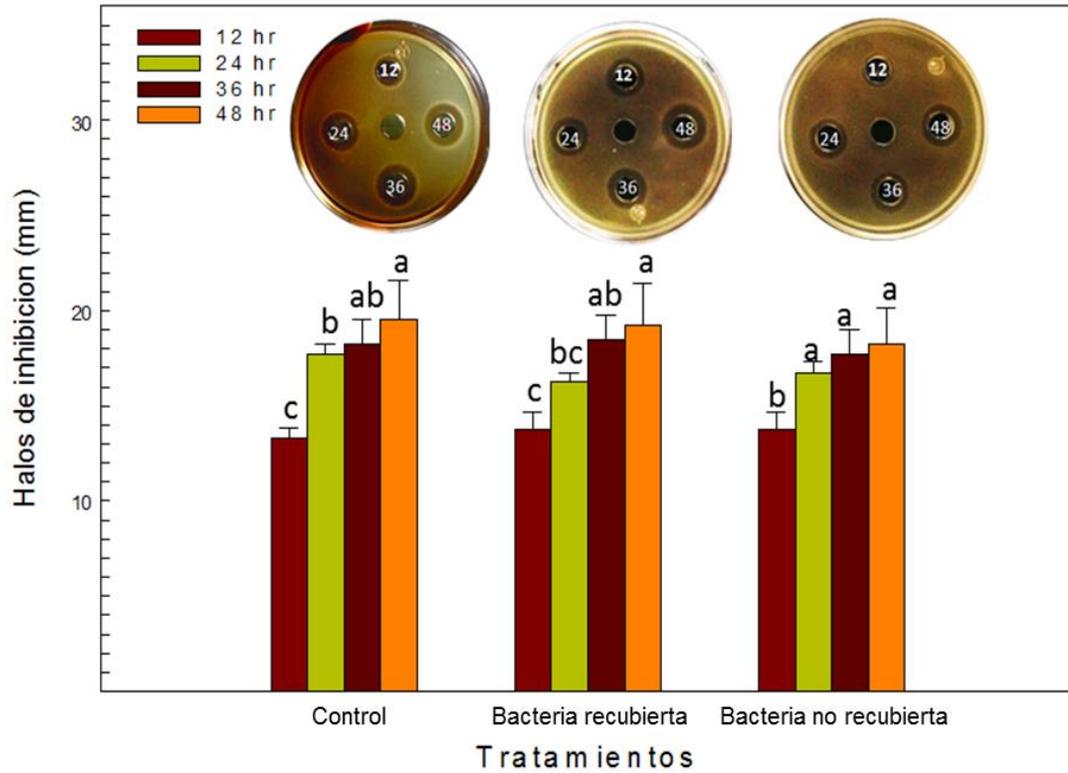


Figura 16.. Halos de inhibición de *L. acidophilus* contra *C. difficile*. Efecto del recubrimiento en la actividad antagonica contra *C. difficile*. ^{abc} Medias con diferente literal, indican diferencias respectivamente ($P < 0.05$).

4.11 Recuperación Metabólica del Probiótico Recubierto Sometido a Altas y Bajas Temperaturas

El propósito de este ensayo fue conocer el efecto del recubrimiento en el restablecimiento de la capacidad metabólica de los probióticos después de someter a las bacterias a 6 temperaturas diferentes (4, 7, 17, 47, 57 y 67 °C). La recuperación metabólica se determinó mediante la generación de calor de las bacterias. Se inició con la solución inoculada a 37 °C, para después mantener cada una de las temperaturas ensayadas durante 90 min y nuevamente alcanzar los 37 °C.

No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las bacterias con recubrimiento y las no recubiertas, ni entre las diferentes temperaturas utilizadas (Figura 17). Esto sugiere que, una vez restablecido el cultivo, y a las condiciones del experimento, la bacteria se recupera de igual manera independientemente de si fue recubierta o no. Una recomendación para posteriores trabajos sería someter a las temperaturas de estrés a tiempos mayores a 90 min.

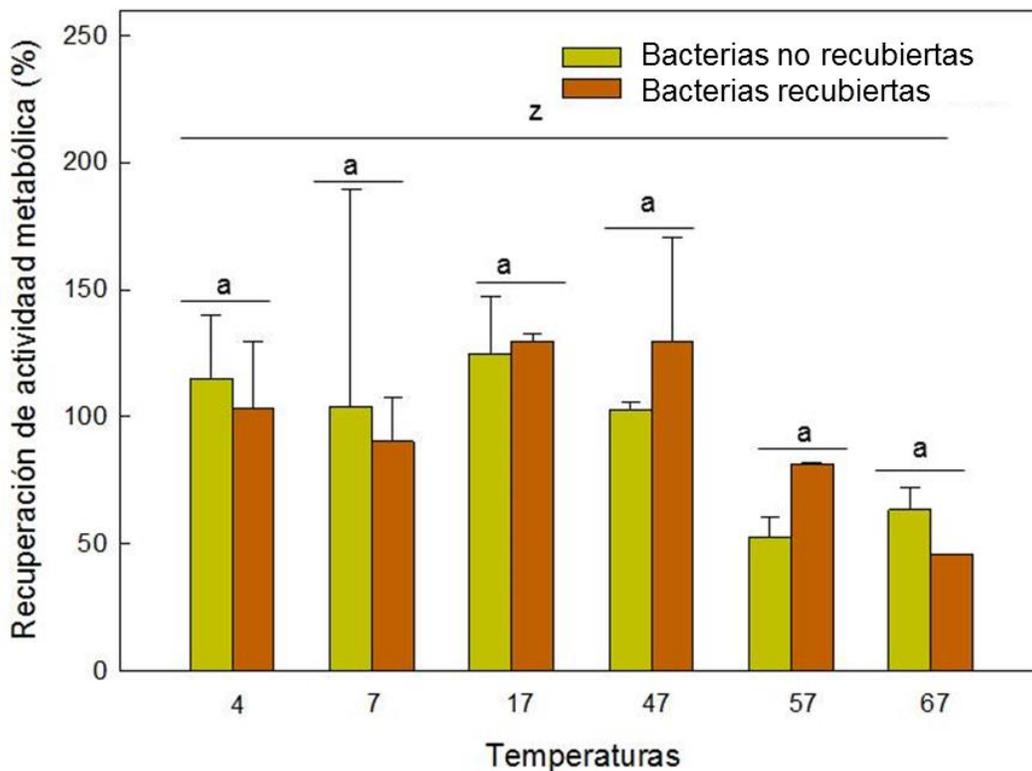


Figura 17. Respuesta de la actividad metabólica en relación a distintas temperaturas de diferente intensidad. La temperatura origen fue de 37 °C, las células se sometieron a las temperaturas señaladas por espacio de 90 min para luego leer la actividad metabólica a la temperatura origen. ^{az} Medias con la misma literal son similares estadísticamente ($P > 0.05$).

4.12 Efecto del Tratamiento en el Inicio del Crecimiento de *L. acidophilus*

Para determinar el efecto del tratamiento sobre el crecimiento de *L. acidophilus* LAC361 se hicieron 2 repeticiones con 16 observaciones de curvas de crecimiento de las bacterias liofilizadas (recubiertas y no recubiertas) y de cultivos frescos. La figura 18 muestra un ejemplo de dichas curvas. Se observó crecimiento en todos los tratamientos. Sin embargo el análisis de las curvas de crecimiento (DMfit), mostró diferencias ($P < 0.05$) en la velocidad de crecimiento de los diferentes cultivos (figura 19).

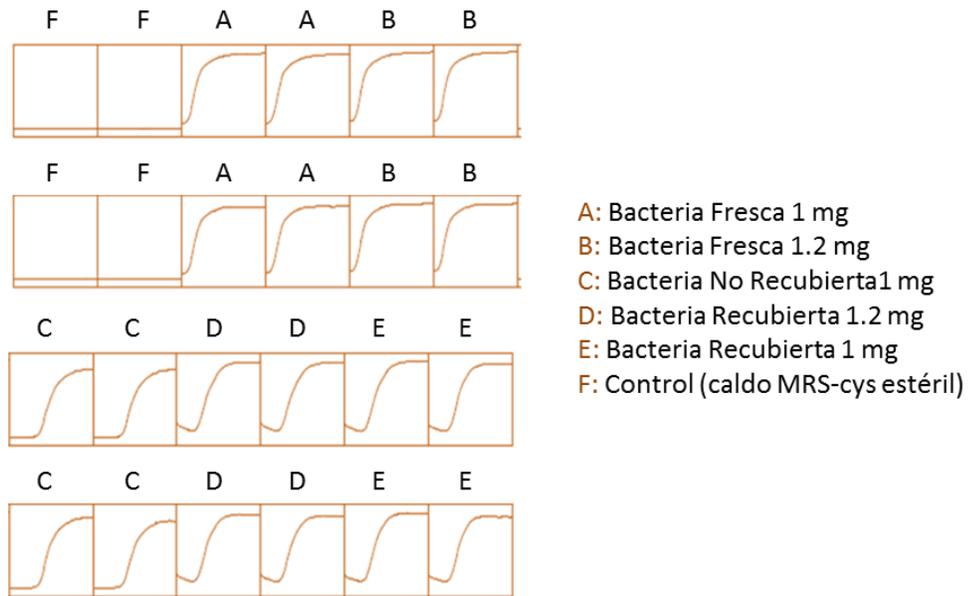


Figura 18. Curvas de crecimientos de *L. acidophilus* LAC-361 en cultivos frescos y obtenidos de bacterias liofilizadas (recubiertas y no recubiertas)

De acuerdo al análisis del programa DMFit, se observó una fase de retardo (lag) de 1165 min en el probiótico libre liofilizado, mientras que la fase lag para las bacterias recubiertas y los cultivos frescos fue de 715 y 50 min, respectivamente. Dado que el cultivo fresco no fue sometido al estrés de la liofilización, era previsible que pudiera reactivarse más rápidamente (Naidi *et al.*, 1999). Sin embargo, cabe resaltar que el recubrimiento ejerció un efecto protector sobre las bacterias, ya que el tiempo de retardo antes de alcanzar el crecimiento exponencial fue 38 % menor con respecto al requerido por las bacterias no recubiertas. Este experimento puede resultar complementario al de calorimetría, en el que primero se restableció el cultivo, para iniciar el ensayo con la misma cantidad de bacteria. Como ya se indicó, no hubo diferencia significativa en la recuperación metabólica. Sin embargo, la bacteria no recubierta tarda más en crecer, lo cual puede disminuir la efectividad del probiótico durante su consumo.

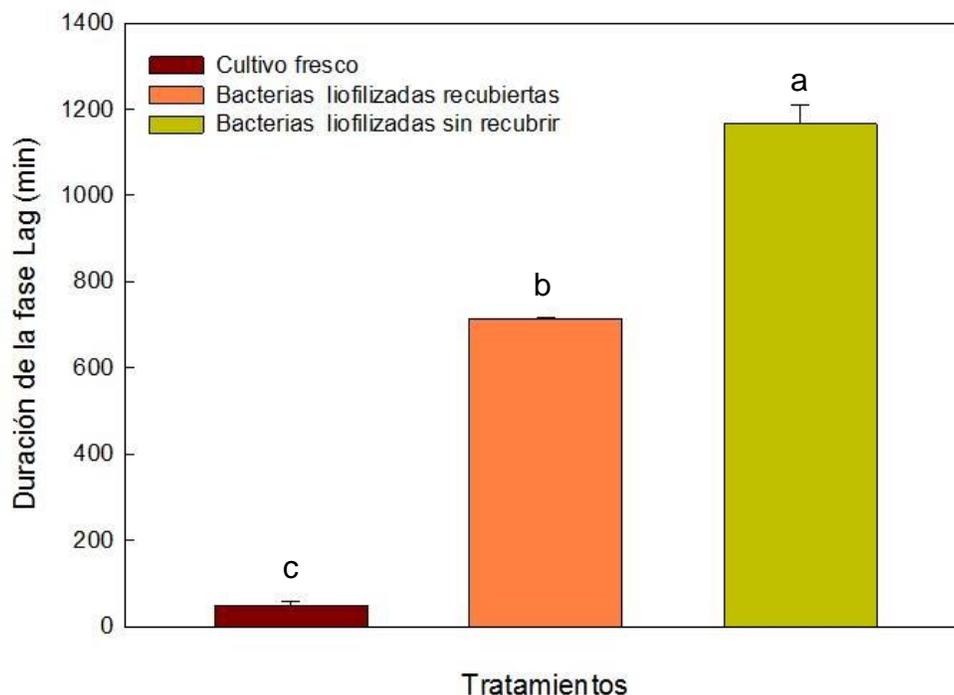


Figura 19. Efecto del Tratamiento en el Inicio del Crecimiento de *L. acidophilus*.

^{abc} Medias con diferente literal, indican diferencias ($P < 0.05$).

CAPITULO V

RESUMEN DE HALLAZGOS Y CONCLUSIONES

5.1 Resumen de Hallazgos

- ✓ Los sobrenadantes del cultivo de *L. acidophilus* presentaron efecto antagónico contra *C. difficile* únicamente cuando no fueron neutralizados, sugiriendo que el pH bajo fue lo que inhibió al patógeno.
- ✓ La carga final de las bacterias, después de 5 recubrimientos fue de +18.9.
- ✓ Morfológicamente se observaron bacterias individualizadas formando agrupaciones, en el caso de las bacterias recubiertas se observan partes continuas y crepúsculos que pudieran ser agregados de los electrolitos.
- ✓ Las cuentas en el probiótico recubierto después de liofilizar fueron mayores (5.73 Log UFC/g) respecto a las del probiótico libre liofilizado (4 Log UFC/g).
- ✓ La sobrevivencia de las bacterias recubiertas después de 90 días de almacenamiento fue mayor (71.6 %) que la de las bacterias no recubiertas (50.5%).
- ✓ Al simular las condiciones gastrointestinales *in vitro* se observó una menor disminución de la viabilidad en las bacterias recubiertas (2.44 Log UFC/g) que la de las bacterias no recubiertas (3.64 Log UFC/g).

- ✓ El recubrimiento de *L. acidophilus* LAC-361 con Lf y PBM no afectó su capacidad de adhesión a las mucinas del colon, ni la actividad antagónica contra *C. difficile*.
- ✓ El recubrimiento no fue un factor determinante para el restablecimiento de la actividad metabólica.
- ✓ El tiempo de retardo en el crecimiento de las bacterias recubiertas fue 38 % menor al de las bacterias no recubiertas.

5.2 Conclusión

El recubrimiento por autoensamblado molecular con 5 capas de la combinación lactoferrina y pectinas de bajo metoxilo mejoró la sobrevivencia de *L. acidophilus* LAC-361 sin afectar su actividad antagónica contra *C. difficile* y no tuvo impacto en la adhesión del probiótico a las mucinas intestinales.

REFERENCIAS

- Abo-Ali, F., Ashour, Z., Shahin, R., Zaki, W., Ragab, S., and Attia, M. 2013. Role of intestinal microflora *Lactobacillus acidophilus* in phagocytic function of leukocytes in type 2 diabetic patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 14(1): 95-101.
- Adamberg, K., Kask, S., Laht, T.-M., and Paalme, T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology* 85(1): 171-183.
- Adlerova, L., Bartoskova, A., and Faldyna, M. 2008. Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina* 59(9): 457-468.
- Allen, S., B, O., Martinez, E., Gregorio, G., and Dans, L. 2004. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Systematic Reviews* 2: 30-48.
- Anal, A. and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 18(5): 240-251.
- Annan, N., Borza, A., and Hansen, L. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International* 41(2): 184-193.
- Antunes, L., Han, J., Ferreira, R., Lolic, P., Borchers, C., and Finlay, B. 2011. Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(4): 1494-1503.
- Arribas, B., Rodríguez, M., Camuesco, D., Zarzuelo, A., and Gálvez, J. 2008. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharmaceutica* 49(1): 5-30.
- Aureli, P., Fiore, A., Scalfaro, C., Casale, M., and Franciosa, G. 2010. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 137(2): 265-273.

- Bâati, L., Roux, G., Dahhou, B., and Uribelarrea, J. 2004. Unstructured modelling growth of *Lactobacillus acidophilus* as a function of the temperature. *Mathematics and Computers in Simulation* 65(1): 137-145.
- Badger, V., Ledebor, N., Graham, M., and Edmiston, C. 2012. *Clostridium difficile* Epidemiology, Pathogenesis, Management, and Prevention of a Recalcitrant Healthcare-Associated Pathogen. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 36(6): 645-662.
- Badui, D. 2006. Química de los alimentos. *Editorial Alhambra Mexicana*, SA(4).
- Barbut, F., Richard, A., Hamadi, K., Chomette, V., Burghoffer, B., and Petit, J. 2000. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile* associated diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 38(6): 2386-2388.
- Bartlett, J. 2002. Antibiotic-associated diarrhea. *New England Journal of Medicine* 346(5): 334-339.
- Bartlett, J. and Gerding, D. 2008. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases* 46(1): 12-18.
- Bauer, M., Kuijper, E., and Van Dissel, J. 2009. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clinical Microbiology and Infection* 15(12): 1067-1079.
- Beaugerie, L. and Petit, J. 2004. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 18(2): 337-352.
- Beausoleil, M., Fortier, N., GuÉnette, S., L'ecuyer, A., Savoie, M., Franco, M., Lachaine, J., and Weiss, K. 2007. Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CI1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Journal of Gastroenterology* 21(11): 732-736.
- Black, F., Einarsson, K., Lidbeck, A., Orrhage, K., and Nord, C. 1991. Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 23(2): 247-254.

- Bourgault, A., Lamothe, F., Loo, V., and Poirier, L. 2006. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Quebec, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3473-3475.
- Bouza, E., Burillo, A., and Muñoz, P. 2006. Tratamiento antimicrobiano de la diarrea asociada con *Clostridium difficile*. *Medical Clinics of North America* 90: 1141-1163.
- Bruno, F. and Shah, N. 2003. Viability of Two Freeze - dried Strains of Bifidobacterium and of Commercial Preparations at Various Temperatures During Prolonged Storage. *Journal of Food Science* 68(7): 2336-2339.
- Camacho-Ortiz, A., Galindo-Fraga, A., Rancel-Cordero, A., Macías, A., Lamothe-Molina, P., Ponce de León-Garduño, A., and Sifuentes-Osornio, J. 2009. Factores asociados con el desarrollo de la enfermedad por *Clostridium difficile* en un hospital de tercer nivel en México: estudio de casos y controles *Revista de Investigación Clínica* 61(5): 371-377.
- Cannon, M., Terneus, K., Hall, Q., Tan, L., Wang, Y., Wegenhart, B., Chen, L., Lamport, D., Chen, Y., and Kieliszewski, M. 2008. Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(6): 2226-2231.
- Carroll, K. and Bartlett, J. 2011. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annual Review of Microbiology* 65: 501-521.
- Carvalho, A., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F., and Gibbs, P. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 14(10): 835-847.
- Cohen, S.H., Gerding, D.N., Johnson, S., Kelly, C.P., Loo, V.G., L Clifford McDonald, M., Pepin, J., and Wilcox, M.H. 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology* 31(5): 431-455.

- Crittenden, R. 2009. Incorporating probiotics into foods. *Handbook of Probiotics and Prebiotics, 2nd edn Wiley, Hoboken, NJ: 58-75.*
- Cheng, A. and Swaminathan, R. Layer By Layer (LbL) Self-Assembly Strategy And Its Applications. *Nanotechnology Engineering, University of Waterloo: 1-5.*
- De Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M., and Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal 20(4): 292-302.*
- Decher, G., MacLennan, J., Soehling, U., and Reibel, J. 1992. Creation and structural comparison of ultrathin film assemblies: transferred freely suspended films and Langmuir-Blodgett films of liquid crystals. *Thin Solid Films 210(504-507).*
- Déjugnat, C. and Sukhorukov, G. 2004. pH-responsive properties of hollow polyelectrolyte microcapsules templated on various cores. *Langmuir 20(17): 7265-7269.*
- Enoch, D., Butler, M., Pai, S., Aliyu, S., and Karas, J. 2011. Clostridium difficile in children: Colonisation and disease. *Journal of Infection 63(2): 105-113.*
- Ephraim, E., Schultz, R., and Safdar, N. 2013. *Lactobacillus rhamnosus GG* Protects Cells from *Clostridium difficile* Toxins. *British Microbiology Research Journal 3(2): 165-175.*
- EuiOhy, S., SeungMinLee, Y., KiLee, Y., SunRyoungChoi, JinChoi, M., KyungKim, J., Young, R., Kim, S., Park, T., Kim, S., JieunOh, Suh, J., Yoon, J., Koo, J., Kim, H., and Noh, J. 2013. *Clostridium difficile* associated diarrhea in dialysis patients Kidney. *Research Clinical Practice 32: 27-31.*
- FAO/WHO. 2002. Joint Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotic in Food. In. April 30 - May 1, Canada, London, Ontario.
- Fowler, A. and Toner, M. 2006 Cryo- Injury and Biopreservation. *Annals of the New York Academy of Sciences 1066(1): 119-135.*

- Freeman, J., Bauer, M., Baines, S., Corver, J., Fawley, W., Goorhuis, B., Kuijper, E., and Wilcox, M. 2010. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 23(3): 529-549.
- Gänzle, M. 2004. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(3): 326-332.
- García-Montoya, I., Cendón, T., Arévalo-Gallegos, S., and Rascón-Cruz, Q. 2012 Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1820(3): 226-236.
- Gibson, G., Probert, H., Van Loo, J., Rastall, R., and Roberfroid, M. 1994. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 17(2): 259-275.
- Gifford, A. and Kirkland, K. 2006. Risk factors for *Clostridium difficile*-associated diarrhea on an adult hematology-oncology ward. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 25(12): 751-755.
- Grattepanche, F., Miescher-Schwenninger, S., Meile, L., and Lacroix, C. 2008. Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *Dairy Science and Technology* 88(4-5): 421-444.
- Guarner, F. 2007. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria* 22: 14-19.
- Hickson, M. 2011. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 4(3): 185-197.
- Hugues-Ayala, M. 2013. Microencapsulamiento de *Lactobacillus rhamnosus* GG en una matriz de alginato de calcio recubierta por proteínas de suero lácteo. Hermosillo, Sonora: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, Ciancia de los Alimentos.
- Hurdle, J., Heathcott, A., Yang, L., Yan, B., and Lee, R. 2011. Reutericyclin and related analogues kill stationary phase *Clostridium difficile* at achievable colonic concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(8): 1773-1776.

- Jiménez, M. 2010. Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación oral: Universidad de Granada, España, Facultad de Farmacia.
- Kailasapathy, K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology* 39(10): 1221-1227.
- Kaur, S., Vaishnavi, C., Prasad, K., Ray, P., and Kochhar, R. 2011. Effect of *Lactobacillus acidophilus* & epidermal growth factor on experimentally induced *Clostridium difficile* infection. *The Indian Journal of Medical Research* 133(4): 434.
- Kietzmann, D., Béduneau, A., Pellequer, Y., and Lamprecht, A. 2009. pH-sensitive microparticles prepared by an oil/water emulsification method using n-butanol. *International Journal of Pharmaceutics* 375(1): 61-66.
- Kim, W., Ohashi, M., Tanaka, T., Kumura, H., Kim, G., Kwon, I., and Shimazaki, K. 2004. Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biometals* 17(3): 279-283.
- King, A. 1995 Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. . *American Chemical Society*: 26-41.
- Klarin, B., Wullt, M., Palmquist, I., Molin, G., Larsson, A., and Jeppsson, B. 2008 *Lactobacillus plantarum* 299v reduces colonisation of *Clostridium difficile* in critically ill patients treated with antibiotics. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 52(8): 1096-1102.
- Kłodzińska, E., Szumski, M., Hryniewicz, K., Dziubakiewicz, E., Jackowski, M., and Buszewski, B. 2009. Differentiation of *Staphylococcus aureus* strains by CE, zeta potential and coagulase gene polymorphism. *Electrophoresis* 30(17): 3086-3091.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., and Matošić, S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94(6): 981-987.

- Leffler, D. and Lamont, J. 2009. Treatment of *Clostridium difficile* Associated Disease. *Gastroenterology* 136(6): 1899-1912.
- Libby, D.B. and Bearman, G. 2009. Bacteremia due to *Clostridium difficile*”review of the literature *International Journal of Infectious Diseases* 13(5): 305-309.
- Lönnermark, E., Friman, V., Lappas, G., Sandberg, T., Berggren, A., and Adlerberth, I. 2010. Intake of *Lactobacillus plantarum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology* 44(2): 106-112.
- Makarewicz, V. 2008. *Clostridium difficile* asociated disease in the HIV-Infected patient. *Journal of the Association of Nurses in AIDS Care* 19(5): 338-341.
- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhliid, R., and Ananta, E. 2012. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of Biotechnology* 162(4): 356-365.
- McFarland, L. 1999. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. *Digestive Diseases* 16(5): 292-307.
- . 2005. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? *Journal of Medical Microbiology* 54(2): 101-111.
- . 2009. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* 15(6): 274-280.
- Mendoza-Madriral, A. 2009. Determinación de la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum*, inmovilizado, tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas, simuladas *in vitro*, Tesis Maestría Instituto Politécnico Nacional.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A., Khosrokhavar, R., and da Cruz, A. 2011 Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology* 61(3): 411-424.
- Moncada, D., Kammanadiminti, S., and Chadee, K. 2003 Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in Parasitology* 19(7): 305-311.

- Morales, P., Brignardello, J., and Gotteland, M. 2010. The association of intestinal microbiota with obesity. *Revista Médica de Chile* 138(8): 1020.
- Moreira, V. and López, A. 2006. Diarrea por antibióticos. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 96(4): 21-29.
- Morgan, C., Herman, N., White, P., and Vesey, G. 2006. Preservation of micro - organisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods* 66(2): 183-193.
- Mortazavian, A., Ehsani, M., Mousavi, S., Rezaei, K., Sohrabvandi, S., and Reinheimer, J. 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro - organisms in yogurt. *International Journal of Dairy Technology* 60(2): 123-127.
- Naaber, P., Smidt, I., Štšepetova, J., Brilene, T., Annuk, H., and Mikelsaar, M. 2004. Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal Lactobacillus species. *Journal of Medical Microbiology* 53(6): 551-554.
- Naidu, A., Bidlack, W., and Clemens, R. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39(1): 13-126.
- Parkes, G.C., Sanderson, J.D., and Whelan, K. 2009. The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *The Lancet Infectious Diseases* 9(4): 237-244.
- Perdana, J., Fox, M., Schutyser, M., and Boom, R. 2012. Enzyme inactivation kinetics: Coupled effects of temperature and moisture content. *Food Chemistry* 133(1): 116-123.
- Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M.A., Tortoló-Cabañas, K., and Gastón-Peña, C. 2013. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 47(1): 14-25.
- Plummer, S., Weaver, M.A., Harris, J.C., Dee, P., and Hunter, J. 2010. *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *International Microbiology* 7(1): 59-62.

- Poortinga, A.T., Bos, R., Norde, W., and Busscher, H.J. 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports* 47(1): 1-32.
- Priya, A.J., Vijayalakshmi, S., and Raichur, A.M. 2011. Enhanced survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layers through layer-by-layer approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(21): 11838-11845.
- Redelings, M.D., Sorvillo, F., and Mascola, L. 2007. Increase in *Clostridium difficile* - related mortality rates, United States, 1999 - 2004. *Emerging Infectious Diseases* 13(9): 1417.
- Reginald, H.W. 1991. The chemistry and Technology of Pectin. *New York, University of Nebraska.*
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57(6): 929-967.
- Rivera-Espinoza, Y. and Gallardo-Navarro, Y. 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 27(1): 1-11.
- Rodríguez-Pardo, D., Mirelis, B., and Navarro, F. 2013. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 31(4): 254-263.
- Rupnik, M., Wilcox, M.H., and Gerding, D.N. 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 7(7): 526-536.
- Sagis, L.M., de Ruyter, R.I., Miranda, F.J.R., de Ruyter, J., SchroËn, K., van Aelst, A.C., Kieft, H., Boom, R., and van der Linden, E. 2008. Polymer microcapsules with a fiber-reinforced nanocomposite shell. *Langmuir* 24(5): 1608-1612.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., and Black, R.E. 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *The Lancet Infectious Diseases* 6(6): 374-382.

- Schär-Zammaretti, P., Dillmann, M.-L., D'Amico, N., Affolter, M., and Ubbink, J. 2005. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12): 8165-8173.
- Schooster, A., Kokotovic, B., Permin, A., Pedersen, P., Bello, F.D., and Guardabassi, L. 2013. *In vitro* inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. *Anaerobe* 20: 36-41.
- Serrano, M.E.D. 2007. Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* 38(3): 30-38.
- Shanahan, F. and Kiely, B. 2007. The gut microbiota and disease - an inner repository for drug discovery. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 4(3): 195-200.
- Sherman, M.P., Miller, M.M., Sherman, J., and Niklas, V. 2014. Lactoferrin and necrotizing enterocolitis. *Current Opinion in Pediatrics* 26(2): 146-150.
- Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., and Thaker, V. 2011. Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1(2): S287-S290.
- Souzo, H. 1992. Freeze-drying of microorganisms. Encyclopedia of Microbiology. In. Academic Press, New York.
- Stevens, V., Dumyati, G., Fine, L.S., Fisher, S.G., and van Wijngaarden, E. 2011. Cumulative antibiotic exposures over time and the risk of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases* 53(1): 42-48.
- Sunenshine, R.H. and McDonald, L.C. 2006. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 73(2): 187-197.
- Surawicz, C.M. 2003. Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17(5): 775-783.
- Thomas, C., Stevenson, M., and Riley, T.V. 2003. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(6): 1339-1350.

- Tobey, N.A., Hosseini, S.S., Caymaz-Bor, C., Wyatt, H.R., Orlando, G.S., and Orlando, R.C. 2001. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *The American Journal of Gastroenterology* 96(11): 3062-3070.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., and Hayasawa, H. 2002. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology* 80(1): 109-112.
- van der Wal, A., Norde, W., Zehnder, A.J., and Lyklema, J. 1997. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 9(1): 81-100.
- Vasiljevic, T. and Shah, N.P. 2008. Probiotics - from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18(7): 714-728.
- Vesterlund, S., Salminen, K., and Salminen, S. 2012. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology* 157(2): 319-321.
- Vidhyalakshmi, R., Bhakayaraj, R., and Subhasree, R. 2009. Encapsulation "The future of probiotics" - A review. *Advances in Biological Research* 3(3-4): 96-103.
- Voth, D.E. and Ballard, J.D. 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews* 18(2): 247-263.
- Waikar, Y. 2013. Review of probiotics in children. *Pediatric Infectious Disease* 5(1): 9-12.
- Wang, C., Ye, S., Sun, Q., He, C., Ye, W., Liu, X., and Tong, Z. 2008. Microcapsules for controlled release fabricated via layer-by-layer self-assembly of polyelectrolytes. *Journal of Experimental Nanoscience* 3(2): 133-145.
- Weinbreck, F., Bodnár, I., and Marco, M. 2010. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology* 136(3): 364-367.

- Weiss, K., Bergeron, L., Bernatchez, H., Goyette, M., Savoie, M., and Thirion, D. 2007. *Clostridium difficile* associated diarrhoea rates and global antibiotic consumption in five Quebec institutions from 2001 to 2004. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30(4): 309-314.
- Wilcox, M., Fawley, W., Settle, C., and Davidson, A. 1998. Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection - relapse or reinfection? *Journal of Hospital Infection* 38(2): 93-100.
- Wullt, M., Hagslätt, M.-I.J., and Odenholt, I. 2003. *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 35(6-7): 365-367.