



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**EFFECTO DE LA MANGIFERINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y
PRODUCCIÓN DE METABOLITOS MICROBIANOS EN BACTERIAS
LÁCTICAS**

POR:

L.N. AILIN CECILIA RAMÍREZ CASTILLO

TÉSIS PROPUESTA A LA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS DE ALIMENTOS

Vo.Bo. Jorge Alberto Sánchez Burgos

VoBo
Sonia G. Sáyago Ayerdi

Vo.Bo.
Dr. Víctor Manuel Zamora Gasga

Director:

Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos

Codirector:

Dr. Víctor Manuel Zamora Gasga

Tepic, Nayarit, México

Septiembre, 2022



Tepic, Nayarit., **10/octubre/2022**
CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
No. Oficio CMCA 2022-23.

MC LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS
JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis de la alumna **Ailin Ramírez Castillo**, con número de control **M20401337**, cuyo título es **EFECTO DE LA MANGIFERINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS MICROBIANOS EN BACTERIAS LÁCTICAS** a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

Ulises Miguel López García
(Vocal suplente)

Dr. Víctor Manuel Zamora Gasga
(Vocal)

Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi
(Secretario)

Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos
(Presidente)

Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“Sabiduría tecnológica. Pasión por Nuestro Espíritu”

DR. PORFIRIO GUTIÉRREZ MARTINEZ
PRESIDENTE DEL CONSEJO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN ALIMENTOS

c.c.p. Expediente





Instituto Tecnológico de Tepic
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Tepic, Nayarit, 28/septiembre/2022
No. Oficio: 25-576-2022

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "EFECTO DE LA MANGIFERINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS MICROBIANOS EN BACTERIAS LACTICAS" para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos de la C. L.N. AILIN CECILIA RAMÍREZ CASTILLO con numero de control **M20401337** cuenta con un nivel de **originalidad EXCELENTE** según lo definido en el Procedimiento para la Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican artículos en revistas Indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin más por el momento envío saludos cordiales

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®*

MANUEL ANGEL URIBE VÁZQUEZ
DIRECTOR



Ccp. Archivo DEPI



Detector de plagio v. 1921 - Informe de originalidad 27/09/2022 02:21:16 p.

Documento analizado: TESIS AILIN CECILIA RAMÍREZ CASTILLO.docx Licenciado para: Roberto Enriquez_License2

Preajuste de comparación: Palabra a palabra Idioma detectado: Es

Tipo de verificación: Control de internet

[tee_and_enc_string] [tee_and_enc_value]

Análisis detallado del cuerpo del documento:

Tabla de relaciones:

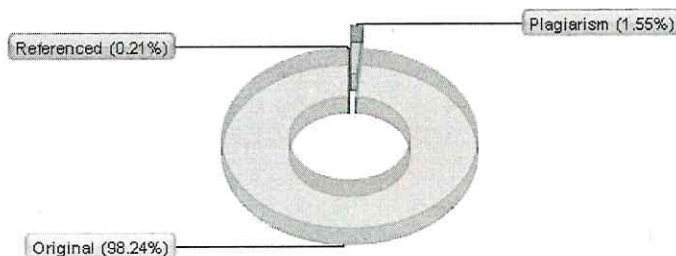


Gráfico de distribución:



Principales fuentes de plagio: 11

10%	168	1. https://iztapalapa3.tecnm.mx/departamentos/ss/FORMATOS_TUTORIAS.pdf
0.5%	8	2. https://shsfeapi1.pdc-gate2.com/get_doc.php?id=5141/MTAuMTAwNy85NzgtOTQtMDE3LTMwMDAtNg==.txt
0.4%	7	3. https://es.studenta.com/content/98051019/inflamacion

Detalles de recursos procesados: 81 - Okay / 16 - Ha fallado

Notas importantes:

Wikipedia:	Libros de Google:	Servicios de escritura fantasma:	Anti-trampa:
[no detectado]	[no detectado]	[no detectado]	[no detectado]

[uace_headline]

[uace_line1]	
[uace_line2]	
[uace_line3]	
[uace_line4]	
[uace_line5]	
[uace_line_recommendation_title]	
[uace_line_recommendation]	
[uace_abc_stats_header]	



Instituto Tecnológico de Tepic
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Tepic, Nayarit, **31/octubre/2022**

No. Oficio: 25-651-2022

Asunto: Autorización de impresión

**L.N. AILIN CECILIA RAMÍREZ CASTILLO
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
P R E S E N T E**

De acuerdo con los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México y las disposiciones en este Instituto, habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado *“EFECTO DE LA MANGIFERINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS MICROBIANOS EN BACTERIAS LACTICAS”*, la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este Instituto, concede la Autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin otro particular, quedo de Usted.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría Tecnológica Pasión de Nuestro Espíritu.

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**M.C. LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS
JEFE DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Coordinación de ñla Maestría en Ciencias en Alimentos
Archivo



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

ASUNTO: CARTA DE SESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el mes de JUNIO de 2018, el que suscribe alumno **AILIN CECILIA RAMÍREZ CASTILLO** del Programa de **EN CIENCIAS EN ALIMENTOS** con número de control M20401337, manifiesta que todos los resultados derivados de sus estudios de posgrado y realizados bajo la dirección de el/la DR(A). **JORGE ALBERTO SÁNCHEZ BURGOS** pertenece al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos y de investigación. Así mismo manifiesto que es de mi conocimiento que si de estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.



Ailin Cecilia Ramírez Castillo

NOMBRE COMPLETO DEL ESTUDIANTE

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la fortaleza, la sabiduría y la calma tras tantas adversidades, pues encontré muy bellos regalos. Confió en que su voluntad fue convertirme en un ser más humano, menos perfecto y más feliz.

Agradezco a mi familia, en especial a mi madre María Blanca Lilia Castillo por su ejemplo de superación y quien con infinito amor se ha esforzado tanto por mi educación, y a mi hermana Karla Liliana Ramírez Castillo, por aconsejarme, guiarme y sembrar en mí el sueño de seguirme preparando. A mi esposo Marco Antonio Vega Reyes por su amor, su apoyo, y su paciencia, porque siempre creyó en mí y me alentó a seguir adelante. Agradezco a mi suegra María Alicia Vega, porque fue mi soporte más grande cuando di a luz a mi bebé, agradezco su tiempo en el estacionamiento de la escuela cuidando de Elián hasta la hora de poder salir a lactarla.

Agradezco a mis asesores, en especial al Dr. Jorge por su tolerancia y por responder ante mi situación de salud, al Dr. Víctor por su paciencia, dedicación y confianza, mis demás profesores por sus tan importantes enseñanzas y a mis compañeros Diana Laura, Fabián, Cecilia, Osiris, Carlos, Citlalli y Alejandro por su tiempo y apoyo, fue un placer compartir con ustedes.

Finalmente agradezco el apoyo del CONACYT, por brindarme una beca que me ayudo a sustentar mis estudios de posgrado.

DEDICATORIAS

Comencé este sueño con mucha emoción creyendo que sería más sencillo, infortunadamente en septiembre del 2020 perdí a un ser muy especial, enfrente un duelo que jamás había vivido, pero sé que Dios puede hacer bien después de las tragedias, y en enero del 2021 me dio la dicha de concebir una hija.

Las herramientas que adquirí durante todo el trayecto tuvieron más impacto en mi profesión como mamá, por lo que dedico este proyecto a mi pequeña Elián, quien ha sido parte de inicio a fin y le ha dado un significado diferente a mi vida. Te amor infinitamente mi cielo, contigo hice maestría en maternidad y crianza.

RESUMEN

La mangiferina es un compuesto bioactivo que puede ser bio-transformado a noratiriol por bacterias del género *Lactobacillus*. Hasta el momento existen muy pocos reportes sobre bacterias específicas que puedan metabolizar mangiferina y generar metabolitos potencialmente benéficos para el huésped.

El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de la mangiferina sobre la viabilidad celular y la producción de metabolitos microbianos en bacterias lácticas del género *Lactobacillus*.

La metodología se dividió en dos etapas. En la Etapa 1 se reactivaron ambas bacterias a las condiciones ideales de crecimiento (37 °C, 24 h) utilizando agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) como medio de crecimiento y se elaboró una curva de crecimiento microbiano para la obtención de parámetros cinéticos (μ , μ_{max} , y K). Los resultados se expresaron en células/mL y unidades formadoras de colonia (UFC)/mL. Posteriormente se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de mangiferina (0.5-70 mM) sobre la viabilidad celular de ambas cepas y crecimiento incorporando mangiferina a 1 mM y medio MRS como control en tiempos de 3, 4, 5, 6, 7, 12 y 14 h mediante la cuantificación de biomasa estimada en peso seco (g/mL). En la etapa 2 se evaluó la biotransformación de mangiferina a noratiriol y se identificaron productos metabólicos de la interacción de mangiferina (0.1 mM) con *L. paracasei* y *L. pentosus* por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS).

Ambas cepas presentaron una μ y μ_{max} en cel/mL similar (0.64, 0.127 y 0.66, 0.123 h⁻¹ respectivamente); sin embargo, *L. paracasei* presentó mejor capacidad para generar colonias ($\mu=0.111$ h⁻¹) en comparación con *L. pentosus* ($\mu=0.448$ h⁻¹). En lo que respecta al ensayo de viabilidad celular no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre los microorganismos ni entre las concentraciones de mangiferina evaluadas. Los valores de viabilidad (%) se encontraron entre 97.8±31.52 hasta 170.13±118.14. Con respecto a la cuantificación de biomasa se observó que *L. paracasei* con MRS (inicio vs final) presentó valores de 3.38 a 4.81 mg/mL y *L. paracasei* con mangiferina de 2.74 a 5.03 mg/mL. Mientras que para *L. pentosus* con MRS se obtuvieron valores de 3.26 a 4.81 mg/mL y para *L. pentosus* con mangiferina valores de 3.21 a 4.72 mg/mL, sin cambios estadísticamente significativos con respecto al tiempo ($p>0.05$). La mangiferina presenta una glucosa por cada molécula, la cual fue insuficiente para ejercer un efecto estimulante en la síntesis de β -glucosidasa. En el análisis por HPLC-DAD-MS de metabolitos producto de la fermentación no se observó presencia de noratiriol, pero sí un potencial isómero de mangiferina, con comportamiento decreciente conforme al tiempo en *L. pentosus* (10.7 mg/mL a las 3 h y 9.4 mg/mL a las 14 h) lo que indica una posible biotransformación a tiempos de fermentación más prolongados. Dentro de los metabolitos bacterianos se identificó ácido láctico con diferencias significativas ($p<0.05$) en presencia de mangiferina relación asociada a la activación de otras vías metabólicas.

La adición de mangiferina al medio MRS no afecta al crecimiento de las bacterias conforme al tiempo. *L. paracasei* y *L. pentosus* no biotransformaron la mangiferina a noratiriol pero modificaron su metabolismo fermentativo en presencia de mangiferina con dependencia en el tiempo.

(Palabras clave: mangiferina, *Lactobacillus*, metabolitos microbianos)

SUMMARY

Mangiferin is a bioactive compound that can be bio-transformed to noratiriol by bacteria of the genus *Lactobacillus*. So far there are very few reports of specific bacteria that can metabolize mangiferin and generate potentially beneficial metabolites for the host.

The objective of this project was to evaluate the effect of mangiferin on cell viability and the production of microbial metabolites in lactic bacteria of the genus *Lactobacillus*.

The methodology was divided into two stages. In Stage 1, both bacteria were reactivated to ideal growth conditions (37°C, 24 h) using Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) as a growth medium and a microbial growth curve was developed to obtain kinetic parameters (μ , μ_{max} , and K). The results were expressed in cells/mL and CFU/mL. Subsequently, the effect of different mangiferin concentrations (0.5-70 mM) on the cell viability of both strains and growth was evaluated by incorporating mangiferin at 1 mM and MRS as control at times of 3, 4, 5, 6, 7, 12 and 14 h by quantifying biomass estimated in dry weight (g/mL). Stage 2 evaluated the biotransformation of mangiferin to noratiriol and identified metabolic products from the interaction of mangiferin (0.1mM) with *L. paracasei* and *L. pentosus* by mass-coupled liquid chromatography (HPLC-DAD-MS).

Both strains had a similar μ and μ_{max} in cel/mL (0.64, 0.127 and 0.66, 0.123 h⁻¹ respectively); but *L. paracasei* had a better ability to generate colonies ($\mu= 0.111$ h⁻¹) compared to *L. pentosus* ($\mu= 0.448$ h⁻¹). For the cell viability test, no statistically significant differences ($p > 0.05$) were observed between the microorganisms or between the mangiferin concentrations evaluated. Viability values (%) were found between 97.8 31.52 to 170.13 118.14. With respect to biomass quantification, *L. paracasei* with MRS (start vs end) presented values of 3.38 to 4.81 mg/mL and *L. paracasei* with mangiferin of 2.74 to 5.03 mg/mL. While for *L. pentosus* with MRS values of 3.26 to 4.81 mg/mL and for *L. Pentosus* with mangiferin were obtained values of 3.21 to 4.72 mg/mL, without statistically significant changes with respect to time ($p > 0.05$). Mangiferin has one glucose per molecule, which was insufficient to have a stimulating effect on the synthesis of β -glucosidase. The HPLC-DAD-MS analysis of metabolites from fermentation did not show the presence of noratiriol, but an isomer potential of mangiferin, with a decreasing behavior according to time in combination with *L. pentosus* (10.7 mg/mL at 3 h and 9.4 mg/mL at 14 h) indicating possible biotransformation at longer fermentation times. Within the bacterial metabolites, lactic acid was identified with significant differences ($p < 0.05$) in the presence of mangiferin associated with the activation of other metabolic pathways.

The addition of mangiferin to the MRS medium does not affect the growth of bacteria according to time. *L. paracesei* and *L. pentosus* did not biotransfromaron mangiferin to noratiriol but modified its fermentative metabolism in the presence of mangiferin with time dependence.

(Keywords: mangiferin, *Lactobacillus*, microbial metabolites)

ÍNDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	3
2.2 Metabolitos como nutraceuticos	3
2.2.1 Definición de nutraceuticos	3
2.3 Mangiferina como nutraceutico	3
2.3.1 Efectos biológicos de la mangiferina	6
2.4 Microorganismos considerados como probióticos	6
2.4.1 Generalidades de los microorganismos probióticos	6
2.4.2 <i>Lactobacillus</i> en el tracto gastrointestinal	7
2.4.2.1 <i>Lactobacillus paracasei</i>	8
2.4.2.2 <i>Lactobacillus pentosus</i>	9
2.4.3 Productos metabólicos de los <i>Lactobacillus</i>	10
2.4.3.1 Ácido láctico	10
2.5 La biotecnología de los simbióticos	10
2.5.1 Definición de simbióticos	11
2.5.2 Tipos de simbióticos	11
2.5.3 Efectos benéficos de los simbióticos en la salud	11

2.6 Proceso de inflamación y sus reguladores	12
2.6.1 Generalidades de la inflamación	13
2.6.2 Mecanismo de regulación de la inflamación	13
2.7 Metabolismo de la mangiferina por <i>Lactobacillus</i> en el proceso inflamatorio	14
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	17
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS	19
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos específicos	21
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1.1. Etapa preliminar: reactivación de los microorganismos y preparación del inóculo bacteriano	23
6.1.2. Evaluación de la viabilidad celular de <i>Lactobacillus pentosus</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	23
6.1.3. Evaluación de la bioconversión de mangiferina	23
6.1.4 Cálculo de biomasa	24
6.3 Análisis estadístico	25
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro 7.1 Parámetros cinéticos de <i>Lactobacillus paracasei</i> y <i>Lactobacillus pentosus</i>	28
Cuadro 7.2 Crecimiento (%) del <i>Lactobacillus pentosus</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i> a diferentes concentraciones de mangiferina (mM)	31
Cuadro 7.3 Concentración de mangiferina (mg/mL) tras la introducción <i>Lactobacillus pentosus</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	33
Cuadro 7.4 Concentración de probables isómeros (mg/mL) tras la introducción <i>Lactobacillus pentosus</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	34
Cuadro 7.5 Metabolitos bacterianos como productos de la interacción de mangiferina y <i>Lactobacillus</i>	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura molecular de la mangiferina	4
Figura 2.2. Rutas metabólicas propuestas de mangiferina en ratas	5
Figura 2.3. Estructura de <i>Lactobacillus</i>	8
Figura 2.4. Fase celular: marginación, adhesión y migración leucocitarias	13
Figura 2.5. Diagrama esquemático de la liberación y bioconversión de compuestos fenólicos	15
Figura 7.1 Crecimiento <i>Lactobacillus pentosus</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i> en Células/mL (a) y UFC/mL (b)	27
Figura 7.2 Crecimiento <i>L. pentosus</i> y <i>L. paracasei</i> expresado en biomasa con una concentración de mangiferina en 1 mM	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ANOVA	Análisis de la Varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BAL	Bacterias del ácido láctico
CO ²	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetil sulfóxido
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GI	Gastrointestinal
h	Horas
H ²	Hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
µL	Microlitro
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimoles
MRS	Caldo Den Manrogosa y Sharpe
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NF-kB	Factor nuclear kappa B
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
PN	<i>L. Pentosus</i>
PR	<i>L. Paracasei</i>
PNMG	<i>L. Pentosus</i> con Mangiferina
PRMG	<i>L. Paracasei</i> con Mangiferina
sd	Desviación estándar
TGI	Tracto gastrointestinal
TR	Tiempo de retención
UFC	Unidades formadoras de colonias

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de microorganismos en combinación con C-glucósidos puede ser un proceso de valor agregado que ofrece la oportunidad de explorar la funcionalidad de las cepas para mejorar su supervivencia y tasa de crecimiento. La mangiferina, es un compuesto bioactivo con evidencia científica antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena, que al hidrolizarse se convierte en noratiriol, un metabolito de mayor solubilidad y por ende mayor actividad biológica. Hasta el momento existen muy pocos reportes de bacterias con interacción directa en mangiferina. Los esfuerzos de investigación se centran en buscar fuentes nutricionales nuevas y efectivas que permitan lograr tanto una alta conversión de sustrato como una alta producción de metabolitos bacterianos, por lo que se planteó como objetivo evaluar el efecto de la mangiferina sobre la viabilidad celular y la producción de metabolitos microbianos en *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei* que a futuro pueda contribuir a la producción de extractos y productos alimenticios de alto valor agregado.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.2 Metabolitos como nutraceuticos

A partir del novedoso desarrollo de la nutrición y las ciencias de los alimentos, se introducen al mercado alimentos “medicina”, mejor conocidos como alimentos funcionales (Perez-Leonard Heidy, 2006). Los alimentos funcionales son aquellos que por sus propiedades nutricionales proporcionan un beneficio adicional a la salud, hasta inclusive reducir síntomas de enfermedad (Silveira-Rodríguez et al., 2013).

Las plantas como material vegetal brindan un beneficio a la salud debido al contenido de sustancias químicas llamadas “bioactivos” que surgen de su propio metabolismo y que son capaces de desarrollar una actividad específica en las funciones fisiológicas del organismo humano. Su promoción y utilidad es de carácter pragmático con una prevalencia de mercado notablemente alta (Helal et al., 2019).

Con un enfoque terapéutico y como estrategia emergente a la salud, especialistas en nutrición humana, ciencia y tecnología de alimentos han logrado extraer y aislar estas sustancias metabólicas procedentes de los alimentos vegetales para formular los llamados “Productos Nutraceuticos” (Luego-Fernández, 2007; Pérez-Leonard, 2006).

Los bioactivos se clasifican como nutrientes, compuestos químicos o prebióticos y su obtención deriva de fuentes diferentes, los nutraceuticos más comunes son las vitaminas, minerales, ácidos grasos, aminoácidos y extractos herbales o botánicos (Rojas-Jiménez, 2015).

2.2.1 Definición de nutraceuticos

El termino Nutraceutico según la Fundación de Medicina Innovadora de los Estados Unidos se refiere a una categoría de sustancias que parten de un alimento y que se pueden usar para proporcionar beneficios a la salud, dentro de estos beneficios se incluye la prevención, tratamiento de una enfermedad o complemento de algunos fármacos (Meléndez-Sosa et al, 2020)

De manera sencilla un nutraceutico es la combinación de un componente nutricional y otro farmacéutico (Rojas-Jiménez, 2015).

2.3 Mangiferina como nutraceutico

La mangiferina (Figura 2.1) es un polifenol (xantona C-glucósido) de color amarillo pálido resistente a hidrólisis ácida, alcalina y enzimática. Está constituida por dos moléculas de xantona ligadas a cinco moléculas de agua, estabilizada por puentes de hidrógeno intermoleculares (Canuto, 2009).

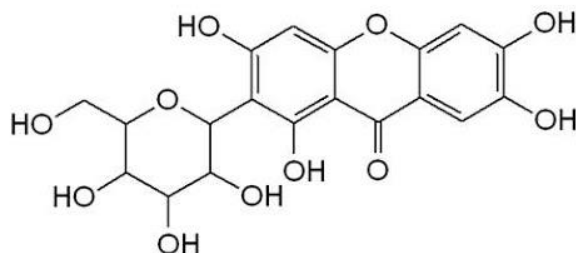


Figura 2.1 Estructura molecular de la mangiferina (Gold-Smith et al., 2016)

Se produce mediante el acoplamiento de *p*-hidroxicinamato con dos moléculas de malonato, lo que da como resultado benzofenona iriflofenona, que se oxida en la posición C-3' y posteriormente glicosilada sobre carbono C-3 que finalmente, genera una xantona por el acoplamiento oxidativo de carbonos C-4 y C-6' (Canuto, 2009).

Informes previos de investigación han determinado desglicosilación, deshidroxilación, metilación, glicosilación, glucuronidación y sulfatación como las diferentes vías de metabolismo y transformación de mangiferina, proponiéndose tentativamente hasta 33 metabolitos (Ver Figura 2.2) de esta xantona (Huynh et al., 2014; Liu et al., 2011). Sin embargo, el noratiriol es el compuesto más reconocido y con actividad biológica superior (Gold-Smith et al., 2016; Souza et al., 2020). La bioconversión del polifenol se lleva a cabo por medio de la enzima β -glucosidasa, sintetizada por bacterias del ácido láctico (BAL) y bifidobacterias, capaces de liberar compuestos hidrosolubles de las moléculas de glucosa, formando moléculas biológicamente más activas (Correa Deza et al., 2019; Delgado et al., 2019). Esta enzima juega un papel clave en la hidrólisis del enlace β -glucósido que une compuestos químicos de las células vegetales a las paredes celulares, liberándolos al entorno y aumentando la actividad fenólica (Huynh et al., 2014).

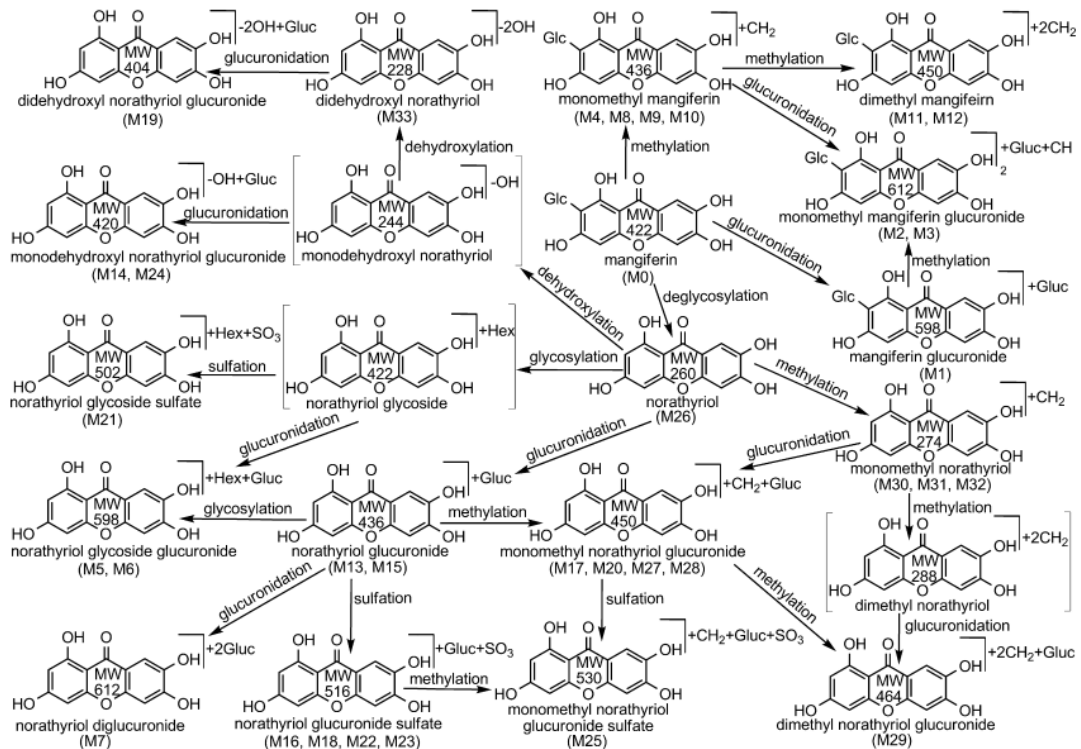


Figura 2.2 Rutas metabólicas propuestas de mangiferina en ratas (Liu et al., 2011)

La mangiferina es un compuesto bioactivo identificado en plantas, especialmente madera y corteza del árbol *Mangifera indica L* y subproductos de mango, conocida desde tiempos antiguos por su diversidad de aplicaciones en medicina tradicional y ayurvédica (Gold-Smith et al., 2016).

Los principales países productores de mangiferina son la India, México, Cuba y China (Razura-Carmona et al., 2019), muchos de estos ya la comercializan en forma de tabletas, té, cremas y jarabes como suplemento nutricional, cosmético y fitomedicinal (Forero-L. y Pulido-D., 2016).

Las propiedades de la mangiferina son extensamente útiles a nivel biotecnológico, farmacéutico y nutricional. Actualmente se continúa innovando métodos de extracción (Gómez-Zaleta et al., 2008; Ruiz-Montañez et al., 2014), concentración y preparación de estos compuestos para en un futuro próximo formular medicamentos naturales más novedosos (Guevara García et al., 2004; Maurmann et al., 2014; Núñez Sellés et al., 2007).

2.3.1 Efectos biológicos de la mangiferina

La bioactividad de la mangiferina permite que sea coadyuvante para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas, crónicas transmisibles, trastornos gástricos, trastornos dermatológicos, infecciones y diferentes tipos de cáncer (Gold-Smith et al., 2016).

La evidencia científica respalda que la mangiferina tiene una capacidad significativa para captar radicales libres, lo que le confiere una potente acción antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* (Gold-Smith et al., 2016; Núñez Sellés et al., 2007), además de intervenir en la detención del ciclo celular reduciendo consigo la proliferación y metástasis y promoviendo la apoptosis de células malignas (Gold-Smith et al., 2016; Guevara García et al., 2004; Maurmann et al., 2014; Núñez Sellés et al., 2007). Estudios realizados por Razura-Carmona (2019) y Gold-Smith (2016) han demostrado que la mangiferina posee una estructura química de alta biodisponibilidad con efectos sinérgicos en medicamentos quimioterapéuticos. Comprobada su baja toxicidad (Razura-Carmona et al., 2019) resulta conveniente utilizar compuestos a base de mangiferina como alternativa para contrarrestar efectos biológicos patológicos.

2.4 Microorganismos considerados como probióticos

La composición de la microbiota intestinal humana varía individualmente y consta de cientos de especies de bacterias cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen a nuestro cuerpo (Każmierczak-Siedlecka et al., 2020).

En la microbiota intestinal dos géneros son de importancia para la salud humana, el *Lactobacillus* y el *Bifidobacterium* (FAO y OMS, 2006), y están conformados por distintas especies: *acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus*, *salivarius*, *animalis*, *bifidum*, *breve* y *longum*, y otros géneros como *Lactococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus* (Castañeda-Guillot, 2018).

2.4.1 Generalidades de los microorganismos probióticos

Cuando se habla del microbioma humano se hace referencia al ecosistema de microorganismos con sus genes y metabolitos que colonizan el tracto gastrointestinal (TGI), el genitourinario, la cavidad oral, el tracto respiratorio y la piel. Estos

microorganismos son aislados de individuos sanos e introducidos nuevamente al TGI para producir probióticos (Tonello, 2012).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), definen a los probióticos como microorganismos vivos que, al ingerirse en cantidades adecuadas, confieren un efecto beneficioso en el huésped. El concepto surge en contraparte del concepto antibiótico (anti vida), puesto que con los probióticos se trata a la enfermedad aumentando el número de bacterias beneficiosas (pro vida) (Tonello, 2012).

Para ser reconocidos como probióticos deben ser probados en humanos, generar seguridad, supervivencia durante el tránsito gastrointestinal, y un alcance de proliferación en el intestino y colon de al menos 10^6 - 10^8 UFC/ mL (Oliveira y González-Molero, 2016).

A la luz de los conocimientos más importantes se sabe que los probióticos fungen en la fermentación de los sustratos no digeribles de la dieta y a partir de ello producen metabolitos con diferentes efectos de protección contribuyendo al desarrollo de inmunidad, la inhibición de agentes patógenos, tóxicos y cancerígenos, efectos de nutrición al producir ácidos grasos de cadena corta y energía, mejoran la digestión y absorción de nutrientes, contribuyen en la síntesis de vitaminas B y K, y mejoran el metabolismo (Rondon et al., 2015).

Los microorganismos probióticos reciben su nombre por sus género, especie y cepa (National Institutes of Health, 2019). Los *Lactobacillus* son unas de las bacterias más valiosas y que generalmente se reconocen como seguras para uso en la industria alimentaria (Ma et al., 2021).

2.4.2 *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal

Dentro de los *Lactobacillus* más reconocidos se encuentran bacterias de metabolismo fermentativo que a partir de carbohidratos y en condiciones anaerobias o con muy baja concentración de oxígeno son capaces de producir ácido láctico sin producir toxicidad (Abriouel et al., 2017). Suelen encontrarse en materia vegetal, lácteos, alimentos fermentados y alimentos en descomposición, pero también en el intestino delgado y membranas de mucosas animales y humanas (Ilha, 2015). Se consideran seguras y

benéficas para la salud, ya que además de participar en la digestión de los alimentos y la síntesis de algunas vitaminas, ayudan a equilibrar la microbiota intestinal y desde este punto a modular el sistema inmune, inhibir bacterias patógenas, reducir la propagación de algunos tipos de cáncer, y otras enfermedades relacionadas al tracto gastrointestinal como la inflamación y el estreñimiento (Murata, 2016).

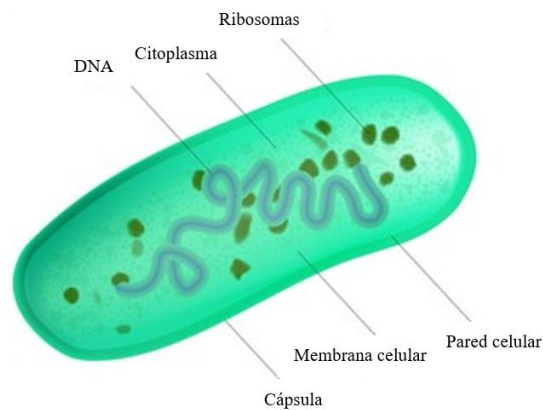


Figura 2.3. Estructura de *Lactobacillus*

Las bacterias del ácido láctico (BAL) pueden crecer en un rango de temperatura de 37 a 43°C y pH de 3.8 (Llerena et al., 2017).

Lactobacillus paracasei y *Lactobacillus pentusus* son dos géneros de bacterias heterofermentadoras facultativas que se desarrollan en matrices de origen vegetal, capaces de producir dióxido de carbono a partir de sustratos de las frutas, verduras, cereales y leguminosas (Bernal Castro et al., 2017). La glucosa de estos alimentos ejerce un efecto protector que les confiere una capacidad de supervivencia en condiciones gástricas e intestinales debido a la presencia natural de altas cantidades de prebióticos (oligosacáridos) (Montoro et al., 2016).

2.4.2.1 *Lactobacillus paracasei*

Son especies gram positivas que trabajan por comensalismo, heterofermentativas por convertir hexosas y algunas pentosas en ácido láctico, ácido acético, etanol y CO² (Ilha, 2015). Morfológicamente tienen forma de bacilo con un ancho de 2 a 4 µm y una longitud de 0.8 a 1 µm.

Algunas son incapaces de producir cromoproteínas y enzimas catalasas, pero pueden ser aerotolerantes y producir peroxidasas o pseudocatalasas (Silva, 2011). Su temperatura óptima de incubación es de 37°C a un tiempo mínimo de 48 h. Poseen una supervivencia de pH ácido de 1.5 hasta 6.8 y tolerancia biliar del 20% por dos horas de exposición gastrointestinal (Ljungh et al., 2002).

Poseen la capacidad de producir bacteriocinas que evitan la propagación de patógenos (Heredia-Castro et al., 2017) y participan en la transcripción del factor NF- κ B de los macrófagos haciéndose participes en la respuesta inmune y control de la proliferación celular siendo este lactobacilo un excelente probiótico en la salud gastrointestinal (Cerbo y Palmieri, 2013).

2.4.2.2 *Lactobacillus pentosus*

Especie heterofermentadora en forma de bastoncillo (Tajabadi et al., 2013), que se pueden incubar a temperaturas de 30 a 37°C con velocidad de crecimiento de 1 a 6 días con al menos 7 a 9 log¹⁰ UFC/ mL, con una posibilidad de mantenimiento de 4 a 10°C, pueden sobrevivir a un pH de 1.5, a 8. 4% de sal biliar y 6.5% de NaCl (Abriouel et al., 2017; Montoro et al., 2016). Poseen genes para la degradación de compuestos fenólicos y genes que codifican enzimas hidrolasas, esterases y carboxilasas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos con la capacidad de fermentar lactosa, glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa (Carrasco et al., 2018).

Sus proteínas codifican ligandos los cuales les brindan la capacidad de unión a la mucosa intestinal, producción de sustancias antimicrobianas y degradación de sustancias antinutritivas. *Lactobacillus pentosus* CF2-10N, CF1-6 y AP2-16N son las más cepas probióticas más prometedoras (Abriouel et al., 2017; Montoro et al., 2016)

Recientemente estos dos *Lactobacillus* han sido combinadas como un probiótico recibiendo gran atención por su actividad antioxidante, antitumoral y antiulcerosa. Estos *Lactobacillus* son capaces de producir inmunoestimulación, inmunomodulación, reducir colesterol y sintetizar vitaminas permaneciendo vivos y multiplicándose en el intestino sin generar ningún efecto secundario (Abd-El Ghany et al., 2015; Abd-EL Ghany et al., 2014; Vázquez-López, V.M., Gómez-Cruz, L.A., López-Zúñiga, E.J., García-Parra, E. y Vela-Gutiérrez, 2019). En el campo clínico son indicados como tratamiento para

diferentes afecciones intestinales (Castañeda-Guillot, 2018). Estudios aleatorizados y controlados de Oliveira y González Molero (2016) y Díaz Ferrer et al. (2012) han comprobado la funcionalidad terapéutica complementaria de estos probióticos en diferentes tipos de diarrea, trastornos e infecciones intestinales.

2.4.3 Productos metabólicos de los *Lactobacillus*

La ruta del metabolismo del carbono incluye complejos enzimáticos que son de gran importancia para la utilización de carbohidratos. La familia de enzimas activas codificadas por los *Lactobacillus* juega un papel crucial en su descomposición y para la producción de nuevos componentes que puedan ser absorbidos por el epitelio intestinal (Bhattacharya et al., 2015).

La hidrólisis anaeróbica de los carbohidratos por bacterias se conoce convencionalmente como fermentación siendo los principales productos finales los AGCC, ácido láctico, acético, propiónico y butírico, los gases de H₂, y CO₂, amoníaco, aminas, fenoles y energía, que las bacterias utilizan para el crecimiento y el mantenimiento de la función celular.

2.4.3.1 Ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico (BAL), fermentan azúcares de hexosa, como la glucosa. Este proceso inicia por fosforilación a expensas de ATP para formar glucosa-6-fosfato y finalmente ácido pirúvico. La conversión de glucosa a ácido pirúvico en la fermentación homoláctica transcurre por la vía glicolítica y posteriormente el ácido pirúvico en presencia del enzima lactatodeshidrogenasa, actúa como aceptor de electrones en la reoxidación de NADH, convirtiéndose en ácido láctico (Almeida et al., 2011; Hernández, 2003; Jawad et al., 2013).

2.5 La biotecnología de los simbióticos

La simbiosis tiene un papel extensamente crucial con las principales innovaciones evolutivas, su estudio se ha convertido en una disciplina científica que biotecnológicamente manifiesta un potencial de amplio espectro y experimentación que puede implementarse en cualquier ámbito que se desee (Tikhonovich et al., 2016).

2.5.1 Definición de simbióticos

Según la Revista de Nutrición y Endocrinología los simbióticos son mezclas de microorganismos vivos y sustratos, definición integrada a preparaciones farmacéuticas y alimentarias que en forma combinada contienen probióticos y prebióticos, y son elaborados para modular la microbiota intestinal e impactar de forma positiva en la salud (Gotteland, 2010; Olveira y González-Molero, 2016).

2.5.2 Tipos de simbióticos

Los componentes de los simbióticos poseen al menos una propiedad significativa.

Existe simbiosis por mutualismo cuando ambas partes obtienen beneficio de la relación, por comensalismo, donde solo uno de los implicados obtiene beneficio, y parasitismo cuando uno de los simbioses se beneficia a expensas del otro (Tikhonovich et al., 2016).

Los principales simbióticos empleados en estudios clínicos incluyen mezclas de *Lactobacillus* y fibras de plantas bioactivas (Rodríguez-Martínez et al., 2018), algunos ejemplos de estos son:

- *Lactobacillus* y fruto-olisacáridos
- *Lactobacillus* y bifidobacterias
- *Lactobacillus* y betaglucanos

2.5.3 Efectos benéficos de los simbióticos en la salud

Los simbióticos poseen propiedades curativas. Su incorporación a los alimentos ha resultado una alternativa novedosa y saludable con resultados realmente satisfactorios (Rodríguez-Martínez et al., 2018).

Numerosos estudios han demostrado que el consumo de simbióticos contribuye en la modulación del sistema inmunitario, ayuda a reducir el pH, promueve el crecimiento de bifidobacterias a nivel gastrointestinal e inhiben la proliferación de microorganismos potencialmente patógenos, favoreciendo la estabilización del entorno intestinal (Hdez. et al., 2015).

Los mecanismos de acción integran células de la microbiota, células epiteliales, dendríticas e inmunológicas (Rosas, 2011) por lo que su implicancia terapéutica juega

un papel relevante en la fisiopatología de enfermedades crónicas, infecciosas, transmisibles e inflamatorias (Hu et al., 2021; Mamic et al., 2021).

2.6 Proceso de inflamación y sus reguladores

El proceso de inflamación comprende a una serie de reacciones que ante un estímulo de agresión intentan recuperar la homeostasis del organismo (González-Costa y Padrón-González, 2019; Robledo-Vega, 2008).

En relación a este proceso se encuentran vinculados el sistema nervioso, cardiovascular, endocrino, hemolinfopoyético y el sistema inmune (González-Costa y Padrón-González, 2019).

Ocurre exclusivamente en los tejidos conectivos vascularizados donde se presentan tres acontecimientos: eliminación de la causa inicial de la lesión celular, eliminación del tejido dañado y generación de tejido nuevo.

Según la cronicidad de evolución el proceso inflamatorio puede ser agudo o crónico. En caso de un proceso inflamatorio agudo de respuesta temprana e inmediata, acontece en una fase vascular, que comienza con un incremento del flujo sanguíneo seguido por vasodilatación, se genera calor y eritema, hay un aumento de la permeabilidad vascular y escape de fluido rico en proteínas (exudado), la presión osmótica intersticial y la presión capilar aumentan, produciendo tumefacción, dolor y anomalías de la función, se presenta estasis del flujo sanguíneo, coagulación y diseminación de partículas extrañas o microorganismos infectantes. Posteriormente comienza la fase celular (Figura 2.4), el tejido tisular se contrae y genera espacios para que los glóbulos blancos (leucocitos) en este caso neutrófilos que se encuentran en marginación, migren por rodamiento hasta adherirse al sitio de lesión mediante quimiotaxis (Grossman y Mattson-Porth, 2014).

El proceso inflamatorio crónico prolongado, también consta de dos fases, pero en contraste con el anterior, envuelve células inmunes diferentes: macrófagos y linfocitos, e implica la proliferación de fibroblastos en lugar de exudados (Grossman y Mattson-Porth, 2014). En este mecanismo se incluye la eliminación de microorganismos resistentes, células anómalas o tejido muerto y reparación mediante la secreción de citoquinas, e interacciones con los linfocitos T (Vinay et al., 2013).

El riesgo de cicatrización y deformidad suele ser mayor en este proceso (Grossman y Mattson-Porth, 2014).

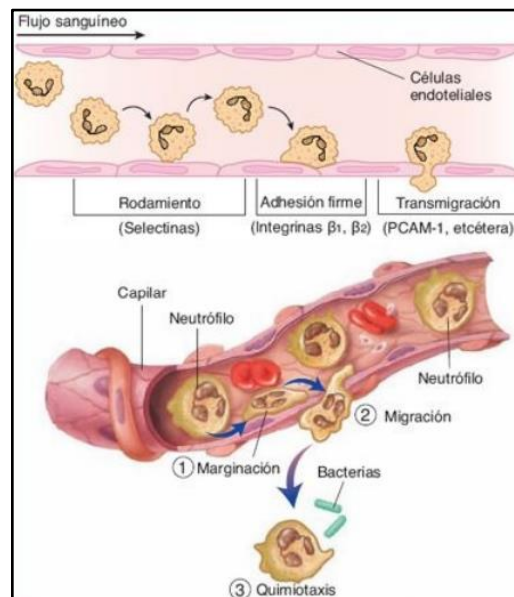


Figura 2.4. Fase celular: marginación, adhesión y migración leucocitarias (Grossman y Mattson-Porth, 2014)

2.6.1 Generalidades de la inflamación

Con base en lo anterior se puede describir a la inflamación como una respuesta multisistémica defensiva y reparadora, caracterizada por manifestaciones clínicas como eritema (rubor), calor, dolor, tumor (tumefacción) e inmovilidad (García-Barreno, 2010). Los agentes causales que pueden desarrollar un proceso inflamatorio pueden ser exógenos comúnmente agentes físicos, químicos, biológicos o mecánicos, y endógenos derivados celulares, tisulares, plasmáticos o de la matriz extracelular (Grossman y Mattson-Porth, 2014; Robledo-Vega, 2008).

La inflamación es clasificada según el área de daño, la severidad y su duración. Regularmente, las condiciones inflamatorias se nombran agregando el sufijo «itis» al órgano o sistema afectado (Grossman y Mattson-Porth, 2014).

2.6.2 Mecanismo de regulación de la inflamación

La respuesta inflamatoria comprende mecanismos de regulación altamente controlados. De forma esquemática y general, cada mediador pasa por un proceso de activación, descomposición, inactivación enzimática, eliminación y finalmente inhibición.

Los mediadores mayormente caracterizados en el proceso de inflamación son la histamina, serotonina, prostaglandina, leucotrienos, factor de actividad plaquetaria, metabolitos del oxígeno, óxido nítrico, citocinas y quimiocinas (Cervantes et al., 2014; García-Barreno, 2010; González-Costa y Padrón-González, 2019). Su actividad consta en ir equilibrando el proceso hasta su finalización evitando con ello una respuesta exagerada o perjudicial (Cervantes et al., 2014).

2.7 Metabolismo de la mangiferina por *Lactobacillus* en el proceso inflamatorio

Se ha demostrado que la mangiferina posee mecanismos de acción antiinflamatoria y analgésica mostrando un potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias relacionado con la adhesión celular y el tráfico de leucocitos (Benites-Vílchez et al., 2010). Generalmente la mangiferina es absorbida por el cuerpo en su forma aglicona. El noratiriol es un metabolito resultante de la C-desglicosilación de mangiferina con mayor solubilidad en agua y por ende mayor actividad biológica. La hidrólisis de conversión de glucósido a aglicona se lleva a cabo por la actividad de la β -glucosidasa, enzima citosólica de las bacterias que permite una absorción más efectiva dejando una estructura menos compleja y con menor peso molecular (Correa Deza et al., 2019; Delgado et al., 2019; Huynh et al., 2014). Recientemente se han utilizado procesos de fermentación bacteriana para la liberación y conversión de compuestos fenólicos, mecanismo que se ilustra en la Figura 2.5 (Huynh et al., 2014).

Hasta el momento existen dos aislados bacterianos del intestino humano, el *Bacteroides* sp. MANG (Sanugul et al., 2005) y la cepa CG19-1 de *Lachnospiraceae* (Braune y Blaut, 2011), y un aislado de intestino de ratón, la bacteria *KM 7-1* del género *bacillus* (Uswatun Hasanah, 2021). En este sentido, se puede demostrar que las bacterias utilizadas como probióticos son capaces de realizar la desglicosilación generando además un efecto simbiótico al funcionar la mangiferina como matriz y medio de crecimiento proporcionando como alimento glucosa (Kim et al., 2017) para la producción de fermentados que puedan actuar a través de la inhibición de la inflamación

de las células inmunitarias y proteger al huésped de patobiontes y patógenos entéricos (Zagato et al., 2014).

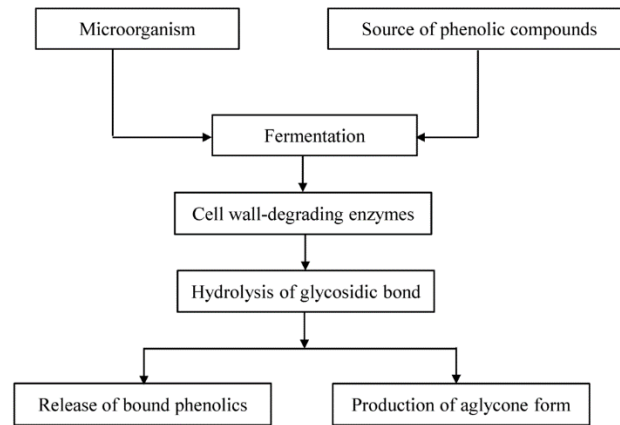


Figura 2.5. Diagrama esquemático de la liberación y bioconversión de compuestos fenólicos (Huynh et al., 2014)

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de microorganismos en combinación con C-glucósidos puede ser un proceso de valor agregado que ofrece la oportunidad de explorar la funcionalidad de las cepas para mejorar su supervivencia, tasa de crecimiento e interacción con otros sustratos. Los esfuerzos de investigación se centran en buscar una fuente nutricional nueva y efectiva que permitan lograr tanto una alta conversión de sustrato como una alta producción de metabolitos bacterianos.

A la luz de los conocimientos más importantes se sabe que los *Lactobacillus* fungen en la fermentación de los sustratos y a partir de ello producen metabolitos con diferentes efectos de protección, mostrando capacidad de codificar enzimas que modifican carbohidratos para la producción de nuevos componentes.

La mangiferina ha sido extensamente estudiada por sus propiedades terapéuticas, químicamente es un compuesto bioactivo constituido por una xantona y una molécula de glucosa, que al desglicosilarse se convierte en noratiriol, compuesto con actividad biológica superior.

En este estudio se pretende evaluar el efecto de la mangiferina sobre la viabilidad celular y la producción de metabolitos microbianos en bacterias lácticas del género *Lactobacillus*.

.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

La adición de mangiferina en medio MRS favorece el crecimiento de *L. pentosus* y *L. paracasei* durante el tiempo, lo que permite la biotransformación de mangiferina a noratiriol y la producción de metabolitos microbianos en un sistema de fermentación anaerobio.

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la mangiferina sobre la viabilidad celular y la producción de metabolitos microbianos en bacterias lácticas del género *Lactobacillus*

5.2 Objetivos específicos

Evaluar los parámetros cinéticos en *L. paracasei* y *L. pentosus* en un sistema anaerobio durante 12 horas de fermentación

Determinar la influencia de la concentración de mangiferina y el tiempo de fermentación sobre el crecimiento de *L. paracasei* y *L. pentosus*

Identificar noratiriol y metabolitos bacterianos en mezclas de extractos de fermentación de *L. paracasei* y *L. pentosus* con mangiferina a 1 mM

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ETAPA 1: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE MANGIFERINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS *Lactobacillus*

6.1.1. Etapa preliminar: reactivación de los microorganismos y preparación del inóculo bacteriano

Para la reactivación de los microorganismos de interés se tomaron 5 µL del stock en criopreservación de cada microorganismo y se colocaron en tubos con 5 mL de caldo MRS. Posteriormente en condiciones de anaerobiosis los tubos se incubaron a 37 °C durante un lapso de 48 h. Se tomó una alícuota (50 µL) de cada tubo y se sembraron en placa con agar MRS, incubándose durante 24 h en las mismas condiciones que la incubación en tubos; esto con la finalidad de obtener placas con el microorganismo reactivado posterior a una etapa de criopreservación. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se mantuvieron en anaerobiosis a temperatura ambiente para su posterior uso.

6.1.2. Evaluación de la viabilidad celular de *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei*

Para conocer la velocidad de crecimiento de los microorganismos de interés, fue necesario realizar curvas de crecimiento, para así obtener los diferentes parámetros cinéticos que permitieron establecer el tiempo de la fase logarítmica.

Para la viabilidad celular, se inocularon tubos con caldo MRS utilizando el respectivo microorganismo (*Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei*), dejándose en incubación anaeróbica a las condiciones ideales de crecimiento, hasta que alcanzaron la densidad celular necesaria para la preparación de los diferentes tratamientos. Alcanzada la densidad celular, se realizó un ajuste de concentración de 2×10^6 Células/mL, para posteriormente ser colocados en celdas de microplaca con las diferentes concentraciones de mangiferina disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) y con una concentración de 0.5 mg/mL de sales de tetrazolio. El volumen final de cada pocillo fue de 250 µL y se dejó en incubación durante 4 horas a las mismas condiciones de anaerobiosis, posterior a este tiempo se tomaron lecturas a 570 nm. Los resultados se expresaron como % de viabilidad.

6.1.3. Evaluación de la bioconversión de mangiferina

A partir de la concentración estándar de mangiferina (1 mM), se incubaron 2×10^6 Células/mL de cada microorganismo y se evaluó el tiempo del microorganismo en bioconvertir la mangiferina, para ello se tomaron alícuotas a los tiempos 3, 4, 5, 6, 7, 12 y 14 horas respectivamente. La alícuota, fue centrifugada y el sobrenadante filtrado fue colocado en microplacas para medir la concentración de mangiferina y la concentración de noratiriol a 370 y 310 nm respectivamente. Para la cuantificación de la concentración de mangiferina y noratiriol, se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de mangiferina. Los resultados fueron expresados como mg de mangiferina/mL.

6.1.4 Cálculo de biomasa

Se evaluó el crecimiento de los *L. pentosus* y *L. paracasei* incorporando mangiferina a 0.1 mM y medio comercial MRS como control mediante la cuantificación de biomasa estimada en peso seco (g/mL) utilizando 10 mL de cada tratamiento por cepa distribuidos en microtubos en tiempos de 3, 4, 5, 6, 7, 12 y 14 horas. Los tubos se centrifugaron a 6000 rpm con una temperatura de 25°C durante 10 minutos y tras retirar el sobrenadante, se colocaron en un cestillo metálico y se secaron en estufa a 105°C hasta alcanzar su peso constante.

6.2 ETAPA 2: ANÁLISIS POR HPLC-DAD-MS DE LOS METABOLITOS DE LA BIOCONVERSIÓN

La identificación de metabolitos generados durante la bioconversión se realizó utilizando un sistema HPLC-DAD-MS de acuerdo con la metodología propuesta por Blancas-Benítez et al., (2018) con algunas modificaciones. Se utilizó un sistema HPLC Agilent serie 1260 (Agilent Technologies, EE.UU.) equipado con un detector de arreglo de diodos UV-Vis (DAD) Agilent G4212-60008 y acoplado con un LC/MS de cuadrupolo simple Agilent 6120 equipado con una ionización por electroaspersión. Se utilizó la interfaz en modo de ionización negativa (N₂ como flujo de gas de secado, 13.0 L/min; presión del nebulizador, 40 psi; temperatura de secado de gas de 350 °C; voltaje capilar, 3500 V). Los sobrenadantes de fermentación y el estándar de mangiferina se filtraron a través de un filtro de membrana de nylon de 0.45 µm (Merck Millipore Ltd., Irlanda) y se inyectaron automáticamente 10 µL en una columna Poroshell 120 EC-C18 (4.6 mm x 150 mm, partícula tamaño 2.7 µm). El gradiente de elución se llevó a cabo usando agua con ácido fórmico al 0.1% como

disolvente A y acetonitrilo como disolvente B. El análisis de datos se realizó utilizando el software OpenLab CDS, ChemStation Edition. La identificación de noratriol y metabolitos de fermentación se basó en el tiempo de retención (TR) en DAD y en la señal espectrométrica de masas (escaneo el rango de 100-1000 m/z) directamente en comparación con el TR del estándar analítico y de autores que han reportado para las muestras estudiadas. Según la literatura, se buscó la presencia de compuestos como mangiferina, noratriol y ácidos orgánicos en diferentes concentraciones dependiendo del tiempo de bioconversión.

6.3 Análisis estadístico

Se determinó la importancia estadística de las diferencias entre las muestras utilizando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de FISHER LSD y un análisis de varianza de dos vías para estudiar la relación entre el crecimiento microbiano con mangiferina conforme al tiempo, utilizando el software de análisis de datos STATISTICA (StatSoft, Inc. version 12). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (SD), con un valor significativo en términos de la prueba de Fisher, $p < 0.05$.

CAPÍTULO 7. RESULTADOS

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 ETAPA 1: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE MANGIFERINA SOBRE LA VIABILIDA CELULAR DE LOS *Lactobacillus*

7.1.1. Etapa preliminar: revitalización de los microorganismos y preparación del inóculo bacteriano

El *Lactobacillus paracasei* tanto como el *Lactobacillus pentosus* presentaron una tendencia de crecimiento expresado como Células/mL, sin diferencias estadísticas con respecto al tiempo ($p>0.05$) iniciando la fase exponencial a las 2 h y finalizando a las 6 h (Figura 1a).

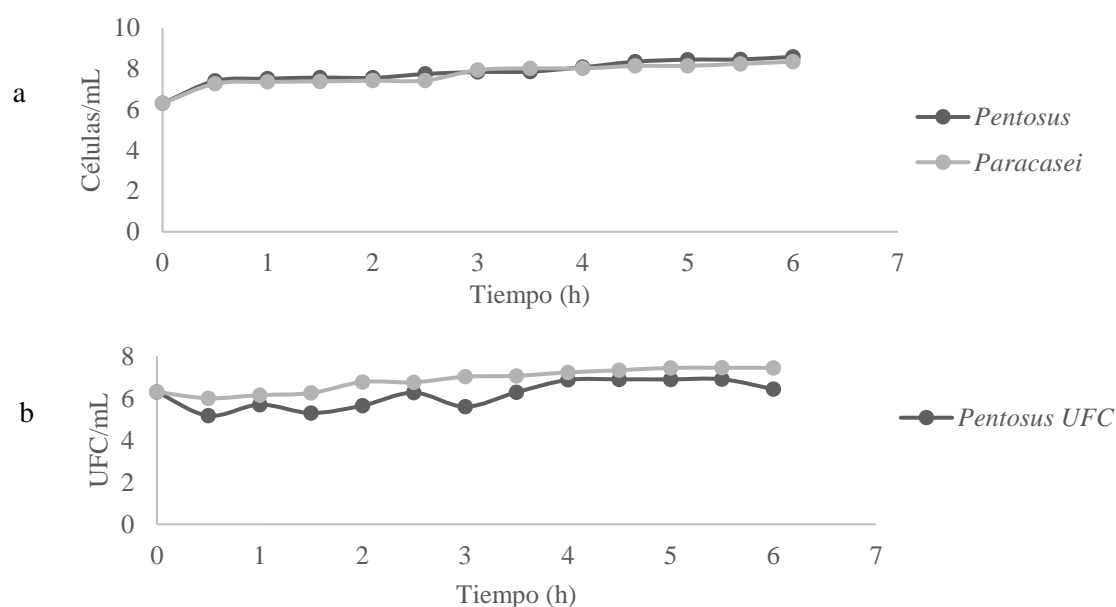


Figura 7.1 Crecimiento *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei* en Células/mL (a) y UFC/mL (b).

En lo que respecta al crecimiento expresado en UFC/mL se puede observar que el *Lactobacillus paracasei* presentó una tasa de crecimiento superior al *Lactobacillus pentosus* (Figura 1b). En este sentido, Palud et al., (2020) realizaron un estudio con *L. paracasei* identificando un perfil de genes relacionados con el transporte de moléculas, la estructura y función de la pared celular implicados en respuesta a la deshidratación los cuales contribuyen a estabilizar a la bacteria en respuesta a fluctuaciones hídricas.

Los resultados presentados en la Cuadro 7.1 muestran que el *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus pentosus* presentan una velocidad específica de crecimiento de 0.064 y 0.066 h⁻¹ en Células/mL respectivamente, valor cercano al reportado por Velasquez-Tellez et al., (2015) quienes alcanzaron una velocidad específica de crecimiento de 0.061 h⁻¹ con *Lactobacillus casei* ATCC 393 en suero clarificado.

Cuadro 7.1 Parámetros cinéticos de *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus pentosus*

	<i>Paracasei</i>		<i>Pentosus</i>	
	Células/mL	UFC/mL	Células/mL	UFC/mL
	0.064x + 7.8618	0.111x + 6.8915	0.066x + 8.1184	0.448x + 5.2955
Ecuación	R ² = 0.957	R ² = 0.979	R ² = 0.988	R ² = 0.894
μ	0.064 h ⁻¹	0.111 h ⁻¹	0.066 h ⁻¹	0.448 h ⁻¹
μ Max	0.127 h ⁻¹	0.145 h ⁻¹	0.123 h ⁻¹	0.189 h ⁻¹
K	0.008 g/mL	0.016 g/mL	0.008 g/mL	0.085g/mL

El crecimiento máximo de los *Lactobacillus paracasei* como *Lactobacillus pentosus* se encontró en rangos de 0.127 y 0.123 Células/mL h⁻¹, respectivamente. La velocidad máxima de crecimiento para los *Lactobacillus* utilizando glucosa como fuente de carbono reportada James et al., (2017) y Pak et al., (2013) fue de 0.25 a 0.30 h⁻¹, lo que significa que los *Lactobacillus* utilizados en este trabajo requieren mayor tiempo para alcanzar la fase de crecimiento exponencial.

Ambos *Lactobacillus* pertenecientes al mismo género y con las mismas características propias de crecimiento, tales como el tiempo y temperatura de incubación, tipo de respiración y pH fueron inoculados en fase logarítmica metabólicamente activos utilizando un medio con los mismos nutrientes, razón que podría explicar por qué siguieron una misma tendencia de velocidad.

En lo que respecta a la velocidad máxima en UFC/mL, el *L. paracasei* tuvo mejor capacidad de adaptación y duplicación en respuesta al nuevo medio con un tiempo de 0.145 UFC/mL h⁻¹, contrario a *L. pentosus* con 0.189 UFC/mL h⁻¹ lo que le otorga una ventaja competitiva para utilizar el sustrato.

La constante de saturación Células/mL de ambas bacterias coincidieron con un resultado de 0.08 g/mL, lo que puede asociarse a sus mismas características de nutrición y actividad metabólica. Sin embargo, fue en UFC/mL donde se observó una variación significativa puesto que el *L. paracasei* presentó una constante de saturación menor (0.16 g/mL) en comparación con el *L. pentosus* (0.85 g/mL) lo que podría estar relacionado a que este último posee mayor dificultad para adaptarse al cambio de medio y por ende mayor gasto energético, demanda y exigencia de nutrientes.

Dentro del análisis estadístico se obtuvo un valor de R cuadrado que indica un buen ajuste del modelo (0.95 para Células/mL *L. paracasei*, 0.97 para UFC/mL *L. paracasei*, 0.98 Células/mL *L. pentosus* y 0.89 UFC/mL *L. pentosus*).

7.1.2. Evaluación de la viabilidad celular de *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei*

Los resultados reportados en el Cuadro 7.2 representan el crecimiento de las bacterias lácticas (%) al incorporar diferentes concentraciones de mangiferina (70-0-5 mM) mostrándose sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) y determinando que la mangiferina no posee la capacidad de incrementar, pero tampoco disminuir el crecimiento del *Lactobacillus pentosus* (127.07 con 35 mM y 141.57 % con 17 mM) y *Lactobacillus paracasei* (97.8 con 70 mM y 170.13% con 35 mM). Uswatun-Hasanah, (2021) comparó el crecimiento de tres especies taxonómicamente similares, el *Bacilo sp.* KM7-1, *B. hisashii* N-11 y *B. thermoamylovorans* en condiciones aeróbicas y anaeróbicas a 37 y 50 °C utilizando como sustrato mangiferina a 1 mM obteniendo en *Bacilo sp.* KM7-1 valores de crecimiento más significativos con la temperatura más alta y en condición aeróbica. Bajo este contexto, se puede hipotetizar que la glucosa de la mangiferina únicamente funciona como fuente de mantenimiento para los *Lactobacillus* utilizados en este trabajo, característica que puede relacionarse a su tipo de respiración celular y la menor eficiencia

de producción de moléculas de ATP para su crecimiento pero que suele utilizarse para la producción de metabolitos de fermentación (Ferrera-Rodríguez et al., 2021).

Se necesita más investigación para dilucidar el potencial efecto de interacción y estimulación en el crecimiento de los *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei*.

Cuadro 7.2 Crecimiento (%) del *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei* a diferentes concentraciones de mangiferina (mM).¹

Concentración de mangiferina (mM)	Crecimiento (%)	
	<i>L. pentosus</i>	<i>L. paracasei</i>
70	136.38 ± 17.02 a A	97.8 ± 31.52 a A
35	127.07 ± 47.74 a A	170.13 ± 118.14 a A
17	141.57 ± 55.63 a A	167.17 ± 111.88 a A
8	131.78 ± 39.88 a A	126.67 ± 54.63 a A
4	134.42 ± 34.08 a A	118.72 ± 45.51 a A
2	130.87 ± 23.94 a A	124.39 ± 60.06 a A
1	140.79 ± 45.95 a A	159.28 ± 113.05 a A
0.5	137.21 ± 47.73 a A	124.86 ± 46.84 a A
0	108.05 ± 24.28 a A	80.54 ± 20.12 a A

¹ Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en las concentraciones de mangiferina por tipo de microorganismo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre el tipo de microorganismo por concentración de mangiferina.

7.1.3 Cálculo de biomasa

Se evaluó la concentración de biomasa de los *L. pentosus* y *L. paracasei* con la adición de mangiferina a 1 mM en un periodo de 14 horas. La Figura 2 a y b presentan la media de los valores de biomasa expresados en mg/mL sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) con respecto al tiempo. Aunque no se presentaron cambios significativos, se observó una tendencia de crecimiento de 3.38 a 4.81 mg/mL para *L. paracasei* con medio MRS y de 2.74 a 5.03 mg/mL para *L. paracasei* con mangiferina considerando las 3 y 14 horas de fermentación. Mientras que para *L. pentosus* con medio MRS fue de 3.26 a 4.81 mg/mL y 3.21 a 4.72 mg/mL para *L. pentosus* con mangiferina. Con estos resultados se

determinó que la concentración de mangiferina 1 mM como fuente alternativa de carbono no afecta al crecimiento de las bacterias con respecto al tiempo evaluado ya que permite que los microorganismos se mantengan viables sin exhibir un efecto inhibitorio y con una buena tendencia de adaptabilidad, que desde un punto de vista industrial en el que el objetivo de la fermentación es únicamente la producción de metabolitos sin incremento de la masa celular la mezcla de mangiferina con *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei* podría considerarse viable (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000).

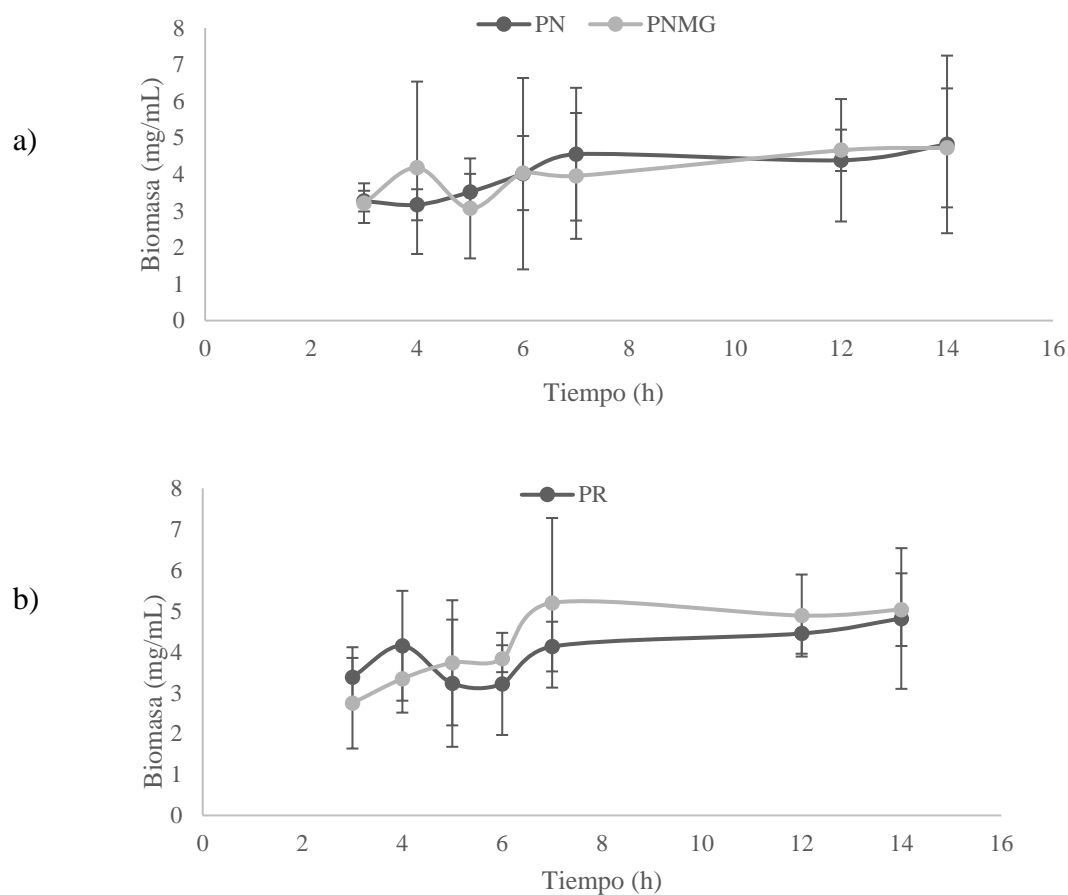


Figura 7.2 Crecimiento *L. pentosus* (a) y *L. paracasei* (b) expresado en biomasa con una concentración de mangiferina en 1 mM. *L. paracasei* (PR), *L. paracasei* con mangiferina (PRMG), *L. pentosus* (PN), *L. pentosus* con mangiferina (PNMG)

Los compuestos polifenólicos pueden activar o inhibir el metabolismo de un microorganismo dependiendo de sus estructuras y concentraciones (Collombel et al., 2018). Niño-Herrera, et al., (2020) evaluaron el efecto del ácido gálico y resveratrol sobre el crecimiento de microorganismos probióticos *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* y la mezcla de cepas *Lactobacillus delbrueckii* / *Streptococcus thermophilus*, con el fin de conocer su comportamiento de crecimiento, encontrando un porcentaje de inhibición de 2.79 % con la máxima concentración probada de ácido gálico (0.01 mM) y determinando que, este polifenol no genera inhibición, pero tampoco una estimulación del crecimiento como se probó en este trabajo con la mangiferina, sin embargo, la concentraciones más altas de resveratrol probadas (0.008 mM) obtuvieron un porcentaje de inhibición de hasta 77% demostrando un efecto antimicrobiano contraproducente cuando se trata de microorganismos probióticos.

Por otro lado, es importante tomar en cuenta que el caldo MRS es un sustrato altamente nutritivo para los *Lactobacillus* que, si se compara con la mangiferina está última no posee en su estructura ninguna otra fuente de crecimiento como el nitrógeno, factor nutricional deseable que debe estar presente para la duplicación de bacterias lácticas (Carabajal-Torrez et al., 2021; González-B. et al., 2008). Las cepas de *Lactobacillus* poseen un requerimiento nutricional complejo (Pescuma et al., 2008), lo cual podría significar que estas bacterias poseen mayores exigencias nutricionales que no se alcanzan a cubrir con las concentraciones de mangiferina utilizadas. Ayala-Monter et al., (2018) realizaron un estudio en el que compararon el crecimiento *in vitro* del *L. salivarius* sustituyendo como fuente de energía la glucosa del medio MRS por inulina observando un crecimiento favorecedor relacionado a la estructura mixta de estos polímeros. Considerando que la mangiferina únicamente cuenta con una glucosa por cada molécula, se podría determinar que las concentraciones utilizadas son insuficientes para ejercer un efecto estimulante en el crecimiento de los *L. paracasei* y *L. pentosus*.

7.2 ETAPA 2: ANÁLISIS POR HPLC-DAD-MS DE LOS METABOLITOS DE LA BIOCONVERSIÓN

La concentración final de mangiferina con *Lactobacillus paracasei* no mostró diferencias significativas conforme al tiempo ($p > 0.05$), sin embargo, la concentración de mangiferina

con *Lactobacillus pentosus* tuvo un aumento significativo ($p < 0.05$) de las 3 a las 14 horas (Ver Cuadro 7.3) figurando interacción metabólica que podría comprobarse en futuras investigaciones con tiempos de fermentación más prolongados. Actualmente se han realizado análisis de los genomas disponibles del *L. pentosus* evidenciando genes involucrados en el metabolismo de compuestos fenólicos, metabolismo del carbono, transporte y enzimas activas de carbohidratos relacionados a su capacidad de supervivencia (Ye et al., 2020) y se ha determinado que la enzima 6-P- β glucosidasa es codificada por el gen LPENT_00991, el cual únicamente ha sido detectado en un 53% de las cepas estudiadas, siendo inexistente para el 47% restante, lo que podría suponer que el *Lactobacillus pentosus* utilizado en este trabajo no transcribe este gen.

Cuadro 7.3 Concentración de mangiferina (mg/mL) tras la introducción *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei*¹

Tratamientos	Mangiferina (mg/mL)	
	3 horas	14 horas
<i>L. paracasei</i> con MRS	ND	ND
<i>L. pentosus</i> con MRS	ND	ND
<i>L. paracasei</i> MRS y mangiferina	22.57 \pm 3.14 a A	25.04 \pm 1.56 a A
<i>L. pentosus</i> MRS y mangiferina	20.40 \pm 0.30 a A	23.6 \pm 3.48 a B

¹ Letras minúsculas diferentes por columna indican diferencias en un tiempo por tratamiento

Letras mayúsculas diferentes por fila indican diferencias en un tratamiento por tiempos

No se observó presencia de noratiriol; sin embargo, se dilucidaron tentativamente dos metabolitos de la mangiferina (Cuadro 7.4) sobre la base de sus características de tiempos de retención (13.8 y 15.2). Diversos estudios han demostrado que el metabolismo de la mangiferina implica varias vías de biotransformación y suele variar conforme al tiempo y en relación a la especie (Liu et al., 2011; Sanugul et al., 2005; Souza et al., 2020). Liu et al., (2011) realizaron una investigación sistemática *in vivo* e *in vitro* de los metabolitos de la mangiferina detectando un total de treinta y tres metabolitos sobre la base de las características de sus iones precursores, iones de productos y tiempos de retención cromatográfica, sugiriendo que las bacterias intestinales están involucradas en la formación de metabolitos desglicosilados, deshidroxilados, metilados, glicosilados, glucuronizados y

sulfatados. Al hacerse un análisis comparativo de los metabolitos reportados por Liu et al. se puede dilucidar que los compuestos identificados en este trabajo corresponden a posibles isómeros resultados de actividad metabólica por parte de los *Lactobacillus*.

Cuadro 7.4 Concentración de probables isómeros (mg/mL) tras la introducción *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei* ¹

Tratamientos	Tiempo de fermentación	
	3 horas	14 horas
Isómero de mangiferina (mg/mL, RT=13.8 min)		
<i>L. paracasei</i> y MRS	ND	ND
<i>L. pentosus</i> y MRS	ND	ND
<i>L. paracasei</i> , MRS y mangiferina	10.5 ± 1.63 a A	10.10 ± 0.343.35 a A
<i>L. pentosus</i> , MRS y mangiferina	10.7 ± 1.94 a A	9.42 ± 0.15 a A
Isómero de mangiferina (mg/mL, RT= 15.2 min)		
<i>L. paracasei</i> y MRS	ND	ND
<i>L. pentosus</i> y MRS	ND	ND
<i>L. paracasei</i> , MRS y mangiferina	9.77 ± 0.32 a A	9.97 ± 0.10 a A
<i>L. pentosus</i> , MRS y mangiferina	9.64 ± 0.17 a A	9.84 ± 0.22 a A

¹ Letras minúsculas diferentes por columna indican diferencias en un tiempo por tratamiento

Letras mayúsculas diferentes por fila indican diferencias en un tratamiento por tiempos

Las bacterias lácticas utilizan glucosa como fuente de carbono a través de diferentes rutas metabólicas para su crecimiento y producen mezclas de ácidos volátiles y no volátiles (Sanugul et al., 2005). En este estudio se logró identificar ácido láctico como metabolito bacteriano de la fermentación de azúcares por *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei* (Cuadro 7.5) observándose una disminución significativa en presencia de mangiferina ($p > 0.05$).

Cuadro 7.5 Metabolitos bacterianos como productos de la interacción de mangiferina y *Lactobacillus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)¹

a)

Ácido láctico (área) TR: 4.9		
Tratamientos	3 horas	14 horas
<i>L. paracasei</i> y MRS	294 ± 68.4 a A	239.8 ± 178.04 a A
<i>L. pentosus</i> y MRS	333 ± 24.1 a A	267 ± 21.7 a A
<i>L. paracasei</i> , MRS y mangiferina	61.1 ± 98.8 b A	44.96 ± 128.2 b A
<i>L. pentosus</i> , MRS y mangiferina	59.46 ± 29.8 b A	44.86 ± 19.64 b A

¹Letras minúsculas diferentes por columna indican diferencias en un tiempo por tratamiento

Letras mayúsculas diferentes por fila indican diferencias en un tratamiento por tiempos

b)

Ácido orgánico (área) TR:3.7		
Tratamientos	3 horas	14 horas
<i>L. paracasei</i> y MRS	506.3 ± 121.1 a A	584.85 ± 535.63 a A
<i>L. pentosus</i> y MRS	598.35 ± 96.1 a A	518.45 ± 95.38 a A
<i>L. paracasei</i> , MRS y mangiferina	220.96 ± 257.5 a A	180.4 ± 265.3 a A
<i>L. pentosus</i> , MRS y mangiferina	220.8 ± 132.8 a A	176.1 ± 87.8 a A

¹Letras minúsculas diferentes por columna indican diferencias en un tiempo por tratamiento

Letras mayúsculas diferentes por fila indican diferencias en un tratamiento por tiempos

c)

Ácido orgánico TR:3.4		
Tratamientos	3 horas	14 horas
<i>L. paracasei</i> y MRS	244.55 ± 123.8 c A	115.05 ± 99.06 a A
<i>L. pentosus</i> y MRS	361.95 ± 11.8 b A	123.9 ± 11.26 a B
<i>L. paracasei</i> , MRS y mangiferina	55.23 ± 306.95 a A	25.2 ± 77.3 a A
<i>L. pentosus</i> , MRS y mangiferina	55.26 ± 9.2 a A	24.96 ± 9.01 a A

¹Letras minúsculas diferentes por columna indican diferencias en un tiempo por tratamiento

Letras mayúsculas diferentes por fila indican diferencias en un tratamiento por tiempos

En la fermentación y producción de ácido láctico existen varios factores que intervienen en el rendimiento, tales como el microorganismo, fuente de carbono y nitrógeno, modo de fermentación, pH y temperatura. El tipo de sustrato o fuente de carbono puede disminuir la producción de ácido láctico debido a la pureza del azúcar ya que, entre más complejo se encuentre más se demoran las bacterias en fermentar (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000). En el Cuadro 7.5 a, la mangiferina parece estar ejerciendo un efecto de desaceleración de la producción de ácido láctico. Al no observarse un balance entre lo consumido (glucosa del medio) y liberado (ácidos orgánicos) podría relacionarse a que las bacterias están utilizando los monómeros de glucosa del medio para su adaptación y potencial interacción con la mangiferina en tiempos de fermentación más prolongados a los utilizados en este trabajo.

Además de ácido láctico, las bacterias producen subproductos, incluyendo ácido acético, ácido fórmico, dióxido de carbono y etanol (Sanugul et al., 2005), en el Cuadro 7.5 b y c se muestran dos ácidos orgánicos (no identificados) que al igual que el ácido láctico disminuyeron de manera estadísticamente significativa tras la introducción de mangiferina ($p > 0.05$), con un tiempo de retención de 3.7 y 3.4 respectivamente.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La introducción de mangiferina no afecta el crecimiento de *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei* conforme al tiempo ya que permite que estos se mantengan viables siguiendo una tendencia de crecimiento normal, pero, ejerce un efecto de ralentización en la producción de ácidos orgánicos demostrando señales de metabolismo en fermentaciones más largas. Los *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus pentosus* no fueron capaces de biotransformar mangiferina a noratiriol en el tiempo y condiciones utilizadas, no obstante, *L. pentosus* presenta señales de bioconversión mediante otras vías metabólicas.

Es necesario complementar estos estudios con otras técnicas que contribuyan a optimizar los parámetros de fermentación y obtener mejores resultados.

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

- Abd-EL Ghany, K., Ekbal-Abd, E., Hamouda, R. A., Mahrous, H., & H. Ahmed, Fattah Allah Hamza, H. A. (2014). Evaluation of Antioxidant and Antitumor Activities of Lactobacillus acidophilus Bacteria Isolated from Egyptian Infants. *International Journal of Pharmacology*, 10(5), 282–288. <https://doi.org/10.3923/ijp.2014.282.288>
- Abd-El Ghany, K., Hamouda, R., Abd-Elhafez, E., Mahrous, H., Salem-Bekhit, M., & Hamza, H. A. (2015). A potential role of Lactobacillus acidophilus LA1 and its exopolysaccharides on cancer cells in male albino mice. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(5), 977–983. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1050455>
- Abriouel, H., Pérez-Montoro, B., Casimiro-Soriguer, C. S., Pérez-Pulido, A. J., Knapp, C. W., Caballero-Gómez, N., Castillo-Gutiérrez, S., Estudillo-Martínez, M. D., Gálvez, A., & Benomar, N. (2017). Insight into potential probiotic markers predicted in Lactobacillus pentosus MP-10 genome sequence. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00891>
- Almeida, A., Nafarrate, E., Alvarado, A., Cervantes, A., & Luevanos-Oropeza R Balagurusamy, N. (2011). Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*. https://www.researchgate.net/publication/313567904_Expresion_genetica_en_la_digestion_anaerobia_Un_paso_adelante_en_la_comprension_de_las_interacciones_troficas_de_esta_biotecnologia
- Ayala-Monter, M. A., Hernández-Sánchez, D., Pinto-Ruiz, R., González-Muñoz, S. S., Bárcena-Gama, J. R., Hernández-Mendo, O., & Torres-Salado, N. (2018). Efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento in vitro de Lactobacillus salivarius y Enterococcus faecium. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(2), 346. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4488>
- Benites-Vílchez, J., López-Vivar, J., Kusch-Fuschlocher, F., Gajardo-Solari, S., Jorquera-Arancibia, G., Salazar-Rodríguez, G., & Rojas-Arredondo, M. (2010). Actividad

antioxidante, antibacteriana y analgésica de extractos de *Mangifera indica* L. *Revistas Bolivianas*, 18, 10–19.

http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1813-53632010000200002&lng=es&nrm=iso

Bernal-Castro, C. A., Díaz-Moreno, C., & Gutiérrez-Cortés., C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Revista Chilena de Nutrición*, 44(4), 383–392. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182017000400383>

Bhattacharya, T., Ghosh, T. S., & Mande, S. S. (2015). Global Profiling of Carbohydrate Active Enzymes in Human Gut Microbiome. *PLOS ONE*, 10(11), e0142038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142038>

Blancas-Benitez, F. J., Pérez-Jiménez, J., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2018). In vitro evaluation of the kinetics of the release of phenolic compounds from guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Journal of Functional Foods Journal*, 43(2), 139–145.

Braune, A., & Blaut, M. (2011). Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by a newly isolated human intestinal bacterium. *Environmental Microbiology*, 13(2), 482–494. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02352.x>

Canuto, K. M. (2009). Propiedades Químicas e Farmacológicas de Mangiferina: Um Composto Bioativo de Manga (*Mangifera indica* L.). *Embrapa Semi-Árido Petrolina-PE*, 10–11.

Carabajal-Torrez, J. A., Llebeili, Y., Rodríguez de Olmos, A., & Gerez, C. L. (2021). Lactic starter cultures to improve the oat bioactive compounds. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(4), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.12.002>

Carrasco, J. A., Lucena-Padrós, H., Brenes, M., & Ruiz-Barba, J. L. (2018). Expression of genes involved in metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus pentosus* and its relevance for table-olive fermentations. *Food Microbiology*, 76, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.020>

- Castañeda-Guillot, C. (2018). Probióticos, puesta al día. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(2), 286–298. <http://scielo.sld.cu/pdf/ped/v90n2/ped09218.pdf>
- Cerbo, A. Di, & Pelmieri, B. (2013). Lactobacillus Paracaseisubsp. Paracasei F19; a farmacogenomic and clinical update. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 1842–1850.
- Cervantes, R., Cervantes, A., & Presno, J. (2014). Mecanismos de señalización involucrados en la resolución de la inflamación. *Gaceta Medica de Mexico*, 150(5), 440–449.
- Collombel, I., Campos, F., & Hogg, T. (2018). Changes in the Composition of the Lactic Acid Bacteria Behavior and the Diversity of Oenococcus oeni Isolated from Red Wines Supplemented with Selected Grape Phenolic Compounds. *Fermentation*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010001>
- Correa-Deza, M. A., Rodríguez de Olmos, A., & Garro, M. (2019). Solid state fermentation to obtain vegetable products bio-enriched with isoflavone aglycones using lactic cultures. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(3), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.006>
- Delgado, S., Guadamuro, L., Flórez, A. B., Vázquez, L., & Mayo, B. (2019). Fermentation of commercial soy beverages with lactobacilli and bifidobacteria strains featuring high β -glucosidase activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.018>
- FAO, & OMS. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudios FAO Alimentación y Nutrición*, 85, 52. <file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIOTICOS OPS 2006.pdf>
- Ferrera-Rodríguez, O., Ortiz-Castro, R., Hanako-Rosas, S., & Greta-G., A. (2021). *Como respiran las bacterias*. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/component/content/article/17-ciencia-hoy/700-como-respiran-las-bacterias>
- Forero-L., F., & Pulido-D., A. P. (2016). Extracción, purificación y cuantificación de mangiferina en la corteza de algunos cultivares de mango (MANGIFERA INDICA L).

- Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 292–300.
<https://doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.4652>
- García-Barreno, P. (2010). La inflamación. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat. (Esp)*, 102, 207–220. <https://doi.org/10.1484/m.tema-eb.4.00396>
- Gold-Smith, F., Fernandez, A., & Bishop, K. (2016). Mangiferin and cancer: Mechanisms of action. *Nutrients*, 8(7), 16–20. <https://doi.org/10.3390/nu8070396>
- Gómez-Zaleta, B., González-De La Rosa, C. H., Pérez-Hernández, G., Beltrán, H. I., Aparicio, F., Rojas-Hernández, A., & Rojo-Domínguez, A. (2008). Molecular speciation effect on docking and drug design. A computational study for mangiferin, a carbohydrate-polyphenol bioconjugate as a test case. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 52(1), 78–87.
- González Costa, M., & González Padrón, A. A. (2007). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera De Ciencias Medicas*, 6(5), 1–15. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1729-519X2008000300003&script=sci_arttext
- González-B., A., Domínguez-Espinosa, R., & Alcocer, B. R. (2008). Aloe vera COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6, 152–157.
- González-Costa, M., & Padrón-González, A. A. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(1), 30–44.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000100030&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Gotteland, M. (2010). Alimentos Simbióticos. *Salud*, 14–15.
- Grossman, S., & Mattson-Porth, C. (2014). Respuesta inflamatoria. In *Porth Fisiopatología* (9th ed.). Wolters Kluwer Health España, S.A.,.
- Guevara-García, M., González-Laime, S., Alvarez-León, A., Riaño-Montalvo, A., Garrido-Garrido, G., & Nuñez-Selles, A. (2004). Uso etnomédico de la corteza de *Mangifera*

- indica L. en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(1), 0–0.
- Hdez, A. H., Rodríguez, C. C., Zamorano, M. M., & Herrera, C. Q. (2015). Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatría Integral*, 19(5), 337–354.
- Helal, N. A., Eassa, H. A., Amer, A. M., Eltokhy, M. A., Edafiogho, I., & Nounou, M. I. (2019). Nutraceuticals' Novel Formulations: The Good, the Bad, the Unknown and Patents Involved. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 13(2), 105–156. <https://doi.org/10.2174/1872211313666190503112040>
- Heredia-Castro, P., Hernández-Mendoza, A., González-Cordova, A., & Vallejo-Cordova, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Redalyc*, 42, 340–346.
- Hernández, A. (2003). *Microbiología industrial*.
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 87–107. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6)
- Hu, J., Zhang, L., Lin, W., Tang, W., Chan, F. K. L., & Ng, S. C. (2021). Probiotics, prebiotics and dietary approaches during COVID-19 pandemic. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.009>
- Huynh, N., Van Camp, J., Smaghe, G., & Raes, K. (2014). Improved Release and Metabolism of Flavonoids by Steered Fermentation Processes: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 19369–19388. <https://doi.org/10.3390/ijms151119369>
- Ilha, C. E. (2015). *Lactobacillus paracasei* FNU - isolado de fermento de uva: avaliação de características probióticas, resistência a microencapsulação por "spray drying e quantificação em iogurte por pcr em tempo real. 1–115. <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/158876/337263.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- James, M., Velastegui, E., & Cruz, M. . (2017). Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina

- como fuente de carbono. *Bionatura*, 2(1). <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.01.4>
- Jawad, A. H., Alkarkhi, A. F. M., Jason, O. C., Easa, A. M., & Nik Norulaini, N. A. (2013). Production of the lactic acid from mango peel waste – Factorial experiment. *Journal of King Saud University - Science*, 25(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2012.04.001>
- Kaźmierczak-Siedlecka, K., Ruszkowski, J., Fic, M., Folwarski, M., & Makarewicz, W. (2020). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745: A Non-bacterial Microorganism Used as Probiotic Agent in Supporting Treatment of Selected Diseases. *Current Microbiology*, 77(9), 1987–1996. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02053-9>
- Kim, H., Craig, C., Venancio, V., Barnes, R., Talcott, S., & Mertens-Talcott, S. (2017). Efectos anti-inflamatorios de los polifenoles de mango en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutr. Food Res*, 197–207.
- Liu, H., Wang, K., Tang, Y., Sun, Z., Jian, L., Li, Z., Wu, B., & Huang, C. (2011). Structure elucidation of in vivo and in vitro metabolites of mangiferin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(5), 1075–1082. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.012>
- Ljungh, Å., Lan, J., & Yanagisawa, N. (2002). Isolation, selection and characteristics of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14(3 SUPPL. 3), 4–6. <https://doi.org/10.1080/089106002760003279>
- Llerena, C., Chele, J., Saona, R., Díaz, R., & Hernández, A. (2017). *con otras bacterias lácticas en leche descremada fermentada de cabra Viability of Lactobacillus paracasei in co-culture with other bacteria in skim milk lactic fermented goat*. 3(1), 77–83.
- Luego-Fernández, E. (2007). Alimentos funcionales y nutraceuticos. *Sociedad Española de Cardiología*. <https://secardiologia.es/images/publicaciones/libros/2007-sec-monografia-nutraceuticos.pdf>
- Ma, J., Xu, C., Yu, H., Feng, Z., Yu, W., Gu, L., Liu, Z., Chen, L., Jiang, Z., & Hou, J. (2021). Electro-encapsulation of probiotics in gum Arabic-pullulan blend nanofibres

- using electrospinning technology. *Food Hydrocolloids*, 111, 106381.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106381>
- Mamic, P., Chaikijurajai, T., & Tang, W. H. W. (2021). Gut microbiome - A potential mediator of pathogenesis in heart failure and its comorbidities: State-of-the-art review. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 152, 105–117.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.12.001>
- Maurmann, N., De Farias, C. B., Schwartzmann, G., Roesler, R., Delgado-Hernández, R., & Pardo-Andreu, G. L. (2014). Mangifera indica L. extract (vimang) improves the aversive memory in spinocerebellar ataxia type 2 transgenic mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 2(3), 63–72.
- Meléndez-Sosa, M. F., García-Barrales, A. M., & Ventura-García, N. A. (2020). Perspectives and Impact on Health From Functional Food and Nutraceutical Consumption in Mexico. *Revista RD*, 6(1), 114–136.
- Montoro, B. P., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Castillo Gutiérrez, S., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2016). Fermented Aloreña Table Olives as a Source of Potential Probiotic Lactobacillus pentosus Strains. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01583>
- Murata, M. (2016). Синтез молочной кислоты клетками Lactobacillus paracasei, иммобилизованными в кальций-альгинатном геле. *Успехи В Химии И Химической Технологии*, 30(9 (178)), 0–40.
- National Institutes of Health. (2019). *Probióticos*. Hoja Informativa Para Consumidores.
<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-DatosEnEspanol/>
- Núñez-Sellés, A. J., García, M. G., León, A. Á., & Pardo-Andreu, G. L. (2007). Experiencias de la terapia antioxidante con Vimang en la atención primaria de salud en Cuba. *Revista Cubana de Salud Publica*, 33(3). <https://doi.org/10.1590/s0864-34662007000300017>
- Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinología y Nutrición*, 63(9), 482–494.

<https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>

Pak, D., Muthaiyan, A., Story, R. S., O'Bryan, C. A., Lee, S.-O., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2013). Fermentative Capacity of Three Strains of *Lactobacillus* Using Different Sources of Carbohydrates: In Vitro Evaluation of Synbiotic Effects, Resistance and Tolerance to Bile and Gastric Juices. *Journal of Food Research*, 2(1), 158.

<https://doi.org/10.5539/jfr.v2n1p158>

Palud, A., Salem, K., Cavin, J.-F., Beney, L., & Licandro, H. (2020). Identification and transcriptional profile of *Lactobacillus paracasei* genes involved in the response to desiccation and rehydration. *Food Microbiology*, 85, 103301.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103301>

Pérez-Leonard, H. (2006). Nutracéuticos: componente emergente para beneficio de la salud. *Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, XL, 20–28. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120665003>

Perez-Leonard Heidy. (2006). Disponible en:

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120665003>. *Icidca*, XL(3).

Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F., & Font de Valdez, G. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, 25(3), 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.01.007>

Razura-Carmona, F. F., Pérez-Larios, A., González-Silva, N., Herrera-Martínez, M., Medina-Torres, L., Sáyago-Ayerdi, S. G., & Sánchez-Burgos, J. A. (2019). Mangiferin-loaded polymeric nanoparticles: Optical characterization, effect of antitopoisomerase I, and cytotoxicity. *Cancers*, 11(12), 1–17.

<https://doi.org/10.3390/cancers11121965>

Robledo-Vega, G. (2008). Inflamación. *Facultad de Medicina UNAM*, 51, 220–222.

<https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un085k.pdf>

Rodríguez-Martínez, O., Rodríguez-Martínez, J., Rosendo-Perez, R., Hernández-Sánchez, O., Nieto-Tabares, M., Nuñez, M., & Santos-Caballar, B. (2018). Influencia de un prebiótico cubano en la calidad de una leche fermentada simbiótica durante su

- conservación. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 28, 22–26.
- Rojas-Jiménez, S. (2015). Consumo de nutraceuticos, una alternativa en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. *Biosalud*, 14(2), 91–103.
<https://doi.org/10.17151/biosa.2015.14.2.9>
- Rondon, L., Añez, M., Salvatierra, A., Meneses, R., & Heredia, M. (2015). *Probióticos: Generalidades*. 78(1), 123–128.
- Rosas, M. R. (2011). Inmunonutrición. Probióticos, prebióticos y simbióticos. *Offarm*, 30, 54–59.
- Ruiz-Montañez, G., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., Velázquez-de la Cruz, G., Ramírez de León, J. A., & Navarro-Ocaña, A. (2014). Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*, 159, 267–272.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.009>
- Sanugul, K., Akao, T., Li, Y., Kakiuchi, N., Nakamura, N., & Hattori, M. (2005). Isolation of a Human Intestinal Bacterium That Transforms Mangiferin to Norathyriol and Inducibility of the Enzyme That Cleaves a C-Glucosyl Bond. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(9), 1672–1678. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1672>
- Silva, L. de J. M. da. (2011). *Universidade dos Açores Departamento de Ciências Agrárias Isolamento e Caracterização Bioquímica das Bactérias do Ácido Láctico do Queijo São Jorge DOP*. 117.
- Silveira-Rodríguez, M. B., Megías-Monereo, S., & Molina-Baena, B. (2013). Alimentos Funcionales y Nutrición. *Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD*, 3(11), 317–331. https://doi.org/10.15517/rc_ucr-hsjd.v3i11.13126
- Souza, J. R. R., Trevisan, M. T. S., Feitosa, J. P. A., Ricardo, N. M. P. S., Hull, W. E., Erben, G., Würtele, G., Breuer, A., Frei, E., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2020). Transformation of Mangiferin to Norathyriol by Human Fecal Matrix in Anaerobic Conditions: Comprehensive NMR of the Xanthone Metabolites, Antioxidant Capacity, and Comparative Cytotoxicity Against Cancer Cell Lines. *Natural Product*

Communications, 15(3), 1934578X2091028.

<https://doi.org/10.1177/1934578X20910286>

- Sujey Abigail, Niño Herrera; Iliana, Anna; Chávez González, Mónica Lizeth; Martínez Hernández, José Luis; Aguilar González, Noe Cristóbal; Rodríguez Herrera, Raúl ; Flores García, Melissa; Govea Salas, M. (2020). Efecto del ácido gálico y resveratrol sobre el crecimiento de microorganismos probióticos y bacterias patógenas. *Revista Científica, Tecnológica y Humanista*.
<http://www.cienciacierta.uadec.mx/articulos/CC63/102EfectoAcidoGalico.pdf>
- Tajabadi, N., Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R., & Manap, M. Y. A. (2013). Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 717–722. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300008>
- Tikhonovich, I. A., Andronov, E. E., & Provorov, N. A. (2016). Microevolutionary Processes in Plant-Microbe Symbiosis. In *Genetics, Evolution and Radiation* (pp. 441–454). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48838-7_36
- Tonello, A. (2012). Consumo de alimentos prebióticos y probióticos y resultados intrínsecos de su consumo en mujeres de 30 a 40 años que asisten a un gimnasio de la ciudad del Rosario. *Universidad Abierta Interamericana*, 301, 0–51.
- Uswatun Hasanah. (2021). Microbial conversion of C-glycoside mangiferin into its aglycone norathyriol: Distribution, isolation, and characterization of active bacteria. *Environmental and Life Science*.
- Vázquez-López, V. M., Gómez-Cruz, L. ., López-Zúñiga, E. J., García-Parra, E., & Vela-Gutiérrez, G. (2019). Optimización del proceso de elaboración y viabilidad de bacterias probióticas en un queso untable tipo ricotta. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*, 6(36), 1–12.
- Velasquez-Tellez, John Alexander, Giraldo-Giraldo, German, Padilla-Sanabria, Leonardo, & Giraldo-Castaño, Y. M. (2015). CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei* ssp *casei* ATCC 393 EN SUERO CLARIFICADO. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y*

Agroindustrial, 13, 19–27.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612015000100003&lng=en&tlng=es

Vinay, V., Abul, A., Aster, J., & Robbins, S. (2013). Inflammation and Repair. In *Robbins Basic Pathology* (9th ed., pp. 29–74). Elsevier/Saunders.

Ye, K., Li, P., & Gu, Q. (2020). Complete genome sequence analysis of a strain *Lactobacillus pentosus* ZFM94 and its probiotic characteristics. *Genomics*, 112(5), 3142–3149. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.05.015>

Zagato, E., Mileti, E., Massimiliano, L., Fasano, F., Budelli, A., Penna, G., & Rescigno, M. (2014). *Lactobacillus paracasei* CBA L74 Metabolic Products and Fermented Milk for Infant Formula Have Anti-Inflammatory Activity on Dendritic Cells In Vitro and Protective Effects against Colitis and an Enteric Pathogen In Vivo. *PLoS ONE*, 9(2), e87615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087615>