



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

**FORMULACIÓN DE UN MICROENCAPSULADO
PROBIÓTICO/RESVERATROL Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO
ANTIINFLAMATORIO EN RATAS.**

Tesis para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Vázquez Maldonado Daniel

Directora de Tesis:

Dra. Patricia Aguirre Bañuelos

Codirectora de Tesis:

Dra. Zenaida Saavedra Leos



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



UASLP-Sistema de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Tesis digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

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



Formulación de un Microencapsulado Probiótico/Resveratrol y Evaluación de su Efecto Antiinflamatorio en Ratas is licensed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#).

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Farmacología y Laboratorio de Biopolímeros y Nanoestructuras de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, así como el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en el periodo comprendido entre enero del 2019 y diciembre del 2023, bajo la dirección de la Dra. Patricia Aguirre Bañuelos y la Dra. Zenaida Saavedra Leos.

El programa de Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONHACYT, registro 003382. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 791469. Número de CVU: 1037695.

Los datos del trabajo titulado Formulación de un Microencapsulado Probiótico/Resveratrol y Evaluación de su Efecto Antiinflamatorio en Ratas, se encuentran bajo el resguardo del Laboratorio de Farmacología y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Solicitud de Registro de Tesis Doctorado

San Luis Potosí SLP a 12/ 03 /2024

Comité Académico

En atención a: Dr. Serio Zarazua Guzmán

Por este conducto solicito a Usted se lleve a cabo el registro de título de tesis de Doctorado, el cual quedó definido de la siguiente manera: **Formulación de un Microencapsulado Probiótico/Resveratrol y Evaluación de su Efecto Antiinflamatorio en Ratas** que desarrollará el/la estudiante: **Daniel Vázquez Maldonado** bajo la dirección y Co-dirección de: Dra. **Patricia Aguirre Bañuelos** y Dra. **Zenaida Saavedra Leos**.

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará el manejo de animales de experimentación, estudios con seres humanos o muestras derivadas de los mismos, el manejo y/o generación de organismos genéticamente modificados y requiere de aval de Comité de Ética e investigación de la FCQ.

(Complete la opción que aplique en su caso):

Sí debido a que: _____

No

No Aplica: el estudio se realizó en la Facultad de Medicina y tiene aprobación por el comité del mismo, anexo copia.

Sin otro particular, quedo de Usted.

A T E N T A M E N T E

M. en C. Daniel Vázquez Maldonado

Dra. Patricia Aguirre Bañuelos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

**FORMULACIÓN DE UN MICROENCAPSULADO
PROBIÓTICO/RESVERATROL Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO
ANTIINFLAMATORIO EN RATAS.**

Tesis para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Vázquez Maldonado Daniel

SINODALES:

PRESIDENTE: DR. JOSÉ PÉREZ URIZAR

SECRETARIO: DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

VOCAL: DRA. MARÍA ZENAIDA SAAVEDRA LEOS

VOCAL: DRA. PATRICIA AGUIRRE BAÑUELOS

SINODAL EXTERNO: DR. JUAN RAMON ZAPATA MORALES

SINODAL SUPLENTE: DR. SERGIO ZARAZÚA GUZMAN

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dra. Patricia Aguirre Bañuelos. Directora de tesis.

Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. María Zenaida Saavedra Leos. Codirectora de tesis.

Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. José Pérez Urizar. Tutor de tesis.

Adscrito al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez. Tutor de tesis.

Adscrito al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Juan Ramón Zapata Morales. Asesor Externo.

Adscrito al Departamento de Farmacia de la Universidad de Guanajuato.

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a 12/ 03 /2024

En la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P. el día 03 del mes de diciembre del año 2024
El que suscribe Daniel Vázquez Maldonado Alumno del programa de posgrado en
Ciencias Farmacobiológicas adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la
Universidad Autónoma de San Luis Potosí manifiesta que es autor intelectual del
presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dra. Patricia Aguirre Bañuelos
y cede los derechos del trabajo titulado “Formulación de un Microencapsulado
Probiótico/Resveratrol y Evaluación de su Efecto Antiinflamatorio en Ratas a la
Universidad Autónoma de San Luis Potosí, para su difusión con fines académicos
y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto,
gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los
autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la
siguiente dirección paguirreb@uaslp.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar
el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Daniel Vázquez Maldonado

Carta Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a noviembre/ 19 /2024

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada *“Formulación de un microencapsulado probióticoresveratrol y evaluación de si efecto antiinflamatorio en ratas”* presentada por el autor **Daniel Vázquez Maldonado**. La tesis es requisito para obtener el grado de Doctorado en el Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de **10%** excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin mas por el momento, le envío un cordial saludo..

ATENTAMENTE

Dr. Sergio Zarazúa Guzmán

Coordinador Académico del Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

AGRADECIMIENTOS

A mi amada esposa **Miros** y bella hija **Reny**, quienes me acompañaron, apoyaron y alentaron a lo largo de este camino.

A mi querida hermana **Nydia**, padre **Víctor**, tía **Sonia**, tía **Bety**, tío **Gerardo** y prima **Jessy**, quienes siempre confiaron en mí y no dudaron de que este momento llegaría.

A mi directora **Dra. Patricia Aguirre Bañuelos**, por recibirme en su laboratorio, darme la oportunidad y su invaluable tiempo, apoyo y conocimiento para lograr esta etapa tan importante de mi vida profesional, le estoy eternamente agradecido.

A mi codirectora **Dra. Ma. Zenaida Saavedra Leos** por su invaluable tiempo, conocimiento y apoyo para lograr los objetivos de este proyecto, así como su disposición para contribuir en mi formación profesional, mil gracias.

A mis asesores **Dr. José Pérez Urizar**, **Dr. Fidel Martínez Gutiérrez** y **Dr. Juan Ramón Zapata Morales**, por su muy valioso conocimiento, tiempo y guía a lo largo de este proyecto.

A **M.C.A. Juan Francisco López Rodríguez** por su increíble apoyo a lo largo de la evaluación In-vivo de este trabajo.

DEDICADO A:

Mi **querida madre**, quien no alcanzó a acompañarme al cierre de esta etapa, sin embargo, donde sea que estés, “**Es para ti, se logró**”.

RESUMEN

Los probióticos, han mostrado efectos benéficos sobre diversos padecimientos como las relacionadas con la salud digestiva, basado en el equilibrio de la microbiota intestinal, fortalecimiento del sistema inmunológico y sobre todo en la regulación del proceso inflamatorio. En ese sentido, el uso de una gran variedad de cepas de probióticos es cada vez más frecuente, por lo que se han desarrollado formulaciones comerciales que faciliten su ingestión.

En este estudio se realizó una formulación de un probiótico comercial en forma de esporas de *Bacillus clausii* (sinuberase®) y un antioxidante como resveratrol, con la finalidad de optimizar el efecto antiinflamatorio.

Para ello se consideraron varios aspectos, la elección del probiótico que al ser una espora logró conservarse dentro de un sistema de microencapsulación para lograr mantener la dosis que resultó en 1×10^6 UCF resultado de estudios de viabilidad, cantidad que se encuentra entre el rango recomendado para su función.

Otro aspecto importante es la propia presentación, dado que existen opciones de formulación basadas en presentación dentro de lácteos como leche o yogurt, sin embargo, para facilitar la ingestión se propuso la forma en polvos derivados de un proceso de microencapsulamiento por secado por aspersión, que permiten posteriormente presentarlo en cápsulas comerciales con la cantidad adecuada.

Complementando la propuesta, también se consideró la adición de excipientes de tipo prebiótico como la inulina o lactosa que pudieran conservar su función como soporte nutricional de los probióticos, aunque también se consideran agentes de carga que le darán estabilidad y conservación a la formulación. La adición de resveratrol un antioxidante y antiinflamatorio, que se suma a los efectos de los acarreadores y probióticos.

La evaluación de la eficacia antioxidante del microencapsulado de probiótico o bacilo con resveratrol (BCRSV) se realizó mediante una prueba in vitro por 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), resultando en un 23.5% de actividad antioxidante, siendo este

efecto significativamente superior a los generados por los controles correspondientes a los acarreadores con resveratrol.

El efecto antiinflamatorio se evaluó mediante un biomodelo de inflamación local inducido por carragenina en el cojinete plantar de ratas y la cuantificación de marcadores inflamatorios como prostaglandinas y factor de necrosis tumoral tisular, después de una administración oral en agua de beber que contenían el microencapsulado (BCRSV), para el grupo control el vehículo con inulina (VEH) y de referencia un grupo solo con resveratrol (RSV) y otro con el probiótico (BC), observándose un efecto antinflamatorio al reducir el volumen del cojinete plantar y disminución de marcadores inflamatorios de manera estadísticamente significativa en el grupo que recibió el BCRSV en comparación con los otros grupos.

Esta propuesta sustenta que el microencapsulado de *Bacillus clausii* y resveratrol, representa una posibilidad comercial optima como formulación antinflamatoria.

Palabras clave: probióticos, resveratrol, inflamación, secado por aspersión.

ABSTRACT

Probiotics have been shown to have beneficial effects on various ailments, such as those related to digestive health, based on the balance of the gut microbiota, strengthening the immune system, and especially in the regulation of the inflammatory process. In this regard, the use of a great variety of probiotic strains is increasing, and commercial formulations have been developed to facilitate their ingestion.

In this study, a formulation of a commercial probiotic in the form of *Bacillus clausii* spores (sinuberase®) and an antioxidant, such as resveratrol, was developed to optimize its anti-inflammatory effect. Several aspects were considered for this purpose: the choice of the probiotic that, being a spore, was preserved in a microencapsulation system to maintain the dose that resulted in 1×10^6 UCF because of viability studies, an amount that is within the recommended range for its function. Another important aspect is presentation because there are formulation options based on presentation for dairy

products, such as milk or yogurt. However, to facilitate ingestion, a powder form derived from a spray-drying microencapsulation process was proposed, which allows its presentation in commercial capsules containing an adequate amount. In line with the proposal, the addition of prebiotic excipients such as inulin or lactose, which could be used to facilitate product ingestion, was also considered. The evaluation of the antioxidant efficacy of the microencapsulated probiotic or bacillus with resveratrol (BCRSV) was performed via an in vitro test using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), which resulted in 23.5% antioxidant activity, which was significantly higher than that generated by the controls corresponding to the carriers with resveratrol. The anti-inflammatory effect was evaluated by means of a biomodel of local inflammation induced by carrageenan in the rat plantar pad and the quantification of inflammatory markers, such as prostaglandins and tissue tumor necrosis factor, after oral administration in drinking water containing the microencapsulate (BCRSV) and in control group of vehicles with inulin (VEH) and reference groups that only included resveratrol (RSV) and only the probiotic (BC). We observed an anti-inflammatory effect by reducing the volume of the plantar cushion and a statistically significant decrease in inflammatory marker levels in the BCRSV group compared with the other groups. This proposal demonstrates that microencapsulation of *Bacillus clausii* and resveratrol is an optimal commercial option for anti-inflammatory formulation.

Keywords: probiotics, resveratrol, inflammation, spray drying.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Proceso inflamatorio	1
1.2 Tratamiento de la inflamación	3
1.2.1 Glucocorticoides	3
1.2.2 Analgésicos antinflamatorios no esteroidales	4
1.2.3 Resveratrol	5
1.2.4 Probióticos	6
1.3 Conservación de compuestos bioactivos	7
1.3.1 Microencapsulación	8
1.3.2 Agentes acarreadores	10
2. Antecedentes	10
3. Justificación	11
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	13
5.1 Objetivo General	13
5.2 Objetivos Específicos	13
6. Diseño Experimental	14
6.1 Primera etapa: Elaboración del microencapsulado	14
6.2 Segunda etapa: Evaluación <i>in vivo</i> del microencapsulado	15
7. Material y métodos de la Etapa 1	16
7.1 Lugar de realización	16
7.2 Materiales	16
7.3 Muestras	16
7.4 Secado por aspersión	17
7.5 Viabilidad de <i>Bacillus clausii</i>	17
7.6 Determinación de actividad antioxidante	18
7.7 Morfología del encapsulado	19
7.8 Análisis estadístico	19
8. Material y Métodos de la Etapa 2	19

8.1 Lugar de realización -----	19
8.2 Materiales -----	19
8.3 Biomodelos y condiciones -----	20
8.4 Diseño experimental -----	20
8.4.1 Cuantificación de resveratrol -----	21
8.5 Modelos de edema por carragenina -----	21
8.6 Determinación de PGE y TNF -----	22
8.7. Análisis estadístico -----	22
9. Resultados Etapa 1 -----	22
9.1 Viabilidad -----	22
9.2 Actividad antioxidante -----	23
9.3 Morfología microestructural -----	27
10. Resultados de la Etapa 2 -----	28
10.1 Cuantificación de resveratrol -----	28
10.2 Evaluación antinflamatoria <i>in vivo</i> -----	30
10.3 Determinación de marcadores de inflamación -----	32
11. Discusión General -----	35
12. Conclusiones -----	41
13. Bibliografía -----	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es una respuesta inmunológica que protege y preserva la integridad del organismo, se trata de un mecanismo para mantener la homeostasis en el cuerpo; las infecciones, daños tisulares, estrés metabólico y disfunción celular, son factores que inducen la respuesta inflamatoria (Medzhitov, 2008).

Si bien, la inflamación como proceso de defensa es indispensable, en ocasiones, su resolución no se lleva a cabo de manera adecuada, debido a factores genéticos, y otras alteraciones o perpetuación de los inductores como infecciones no resueltas, proceso de autoinmunidad e incluso la presencia de cuerpos extraños como resultado de intoxicaciones o acumulación de compuestos químicos como silicio u otros, lo cual genera un estado crónico de inflamación, mismo que se asocia a diversas condiciones de salud como daño tisular, cáncer, entre otras. (Schett y cols., 2018).

Desde el punto de vista fisiológico, la inflamación busca eliminar al agente o circunstancia que genera daño al organismo para poder reestablecer su funcionalidad, no obstante, para que este proceso de lleve a cabo son distintas las etapas que la conforman. Inicialmente, los inductores del proceso inflamatorio pueden ser exógenos y endógenos, los primeros pueden ser derivados de microorganismos como factores de virulencia o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), o aquellos no provenientes de microorganismos, como alérgenos, irritantes o sustancias tóxicas; Mientras que los inductores endógenos son derivados de células, tejidos, plasma y matrices extracelulares, que se liberan por daño, estrés, malfuncionamiento o muerte celular, los cuales en muchas ocasiones dependen de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) para inducir la respuesta inflamatoria (Medzhitov, 2008). Posteriormente, los inductores son detectados por sensores/receptores del sistema inmune, como inmunoglobulinas (ej. IgE), inflamasoma (NALP3), receptores tipo NOD, de reconocimiento de patrones (PRR) o TOLL (TLRs), que una vez que identifican a los inductores, generan la liberación de mediadores inflamatorios (Freire y cols., 2013).

En consecuencia, los mediadores de la inflamación como aminas vasoactivas, bradiquininas, IL-6, IL-1 β , prostaglandinas (PGE₂) o factor de necrosis tumoral (TNF- α), los cuales provienen de proteínas plasmáticas o son secretados por células del sistema inmune (ej. macrófagos y mastocitos), generan alteraciones en la vascularización de tejidos y órganos, fiebre, hiperalgesia y dolor, lo cual da lugar a los signos cardinales clásicos de la inflamación, que son: enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y perdida de la función (Freire y cols., 2013), aunque no necesariamente están presentes en todas las enfermedades inflamatorias (Antonelli y cols., 2023).

Adicionalmente los mediadores de inflamación favorecen el reclutamiento de otras células como neutrófilos, granulocitos y monocitos, y por ende la liberación de más mediadores, lo cual favorece el estado proinflamatorio, mismo que será resuelto una vez controlado o eliminado el estímulo inductor, proceso que también es orquestado por mediadores como lipoxinas, resolvinas, protectinas y factores de crecimiento (Schett y cols., 2018).

Finalmente, a causa de los mediadores de la resolución del proceso inflamatorio, se induce un proceso de reparación en la zona dañada tanto por el agresor como la inflamación en sí, a través de fibroblastos y el desarrollo de nuevas células epiteliales y angiogénesis (Medzhitov, 2008).

Sin embargo, el tiempo en el que se lleva a cabo la inflamación, determina si el resultado es la restauración de la integridad del tejido u órgano, o por el contrario si condiciona el desarrollo de complicaciones por una inadecuada resolución, lo cual también estará determinado por diversos factores tanto biológicos como propios del estímulo y los mecanismos de inducción de la inflamación (Antonelli y cols., 2023).

Una vez iniciada la inflamación se esperaría que su resolución se diera en pocos días, lo cual determinaría un proceso de inflamación aguda, sin embargo, cuando esta inflamación dura entre 2 y 6 semanas, se le define como subaguda, y si persiste más allá de este periodo se cataloga como crónica (Hannoodee y cols., 2023; Pahwa y cols., 2023).

Las causas de la inflamación aguda pueden atribuirse a sustancias tóxicas, irritantes, virus, bacterias, radiación ionizante, entre otros, y su desarrollo implica las etapas de

la inflamación descritas previamente, desde la liberación de mediadores hasta la reparación (Hannoodee y cols., 2023), mientras que la inflamación subaguda es el periodo en el cual la inflamación aguda se establece como crónica.

Por otra parte, la inflamación crónica se puede deber a microorganismos que no pueden ser eliminados, alteraciones autoinmunes, estrés oxidativo, cristales de ácido úrico, homocisteína, entre otros, lo cual mantiene la infiltración de células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos, linfocitos), citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento a la par del desarrollo de fibrosis y granulomas (Pahwa y cols., 2023).

1.2 TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN

Si bien, los estados de inflamación aguda y las enfermedades inflamatorias comparten generalidades del proceso inflamatorio, las variantes de los procesos celulares, órganos y tejidos, determinan sus características; no obstante, el uso de glucocorticoides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son ampliamente usados para su tratamiento (Sinniah y cols., 2021).

1.2.1 GLUCOCORTICOIDES

Los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides se deben a diversos mecanismos, como la inhibición en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-12, interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF- α), fosfolipasas, también por regulaciones transcripcionales inhibiendo a NF κ B y por lo tanto reprimiendo genes proinflamatorios como COX-2 y como consecuencia la inhibición de liberación de prostaglandinas (PGE) (Panettieri y cols., 2019).

Los glucocorticoides también reprimen la expresión de moléculas de adhesión, y activación de mastocitos por IgE, lo cual los hace ser altamente efectivos para el tratamiento de la inflamación (Vandewalle y cols., 2018), sin embargo, los efectos adversos por su uso son amplios y condicionan de manera importante su uso tanto agudo como crónico.

Dentro de los efectos adversos que se generan por el uso de glucocorticoides se encuentran la atrofia de la corteza adrenal, por la supresión de la hormona

adrenocorticotrópica (ACTH), retraso del crecimiento en niños, por la supresión de somatotropina, hiperglucemia al inhibir la utilización de glucosa y favorecer la gluconeogénesis, hipertensión por el incremento en la producción de angiotensinógeno, obesidad y por lo tanto síndrome metabólico, edema, osteoporosis, entre otros (Sinniah y cols., 2021).

1.2.2 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)

Por otra parte, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), actúan al inhibir a las ciclooxygenasas y en consecuencia la formación de prostaglandinas, las cuales tienen efectos proinflamatorios, de hiperalgesia y vasodilatación, gran parte de estos fármacos no son selectivos y actúan sobre ambas isoformas de ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2), y ambas tienen funciones importantes para en la homeostasis, tanto COX-1 que es constitutiva y COX-2 que se expresa ante situaciones de daño celular (Sinniah y cols., 2021).

La inhibición de COXs, tiene implicaciones importantes en la homeostasis cardiovascular, debido a que está implicada en la síntesis de tromboxano (TXA₂), que interviene en la vasoconstricción, agregación plaquetaria y desarrollo de células musculares lisas, así como integridad de del tracto gastrointestinal (Diaz-González y cols., 2023).

A nivel gástrico los AINEs interactúan con la mucosa gástrica, disminuyen su hidrofobicidad, lo cual compromete su estructura y hace susceptible a agresión por el ácido gástrico, pepsina, sales biliares y bacterias al tracto gastrointestinal, esto a su vez se ve potenciado por la inhibición tanto de COX-1 y COX-2, que genera una disminución de la microcirculación a nivel gástrico y la secreción de la mucosa gástrica (Bjarnason y cols., 2018).

Ante los efectos adversos por el uso agudo y crónico de glucocorticoides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos, se ha investigado el uso de otras sustancias y compuestos bioactivos de origen natural, con propiedades antiinflamatorias y menos efectos adversos, entre los cuales compuestos bioactivos como el resveratrol e incluso

microorganismos probióticos han mostrado resultados prometedores (Knowles, 2023; Wang y cos., 2023; Nunes y cols., 2020; Milajerdi y cols., 2023).

1.2.3 RESVERATROL

El resveratrol (3, 4', 5-trans-trihidroxiestilbeno) es un compuesto polifenólico con propiedades antioxidantes que se encuentra en uvas, arándanos, cacahuates y plantas medicinales, este se produce como respuesta a estímulos estresantes en las plantas (Sovak, 2019).

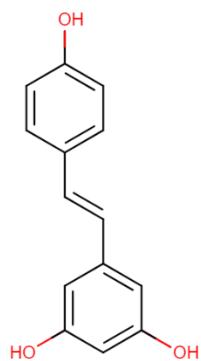


Figura 1. Estructura de Resveratrol, tomada de DrugBank

La estructura del resveratrol (Figura 1), está conformada por dos anillos fenólicos, unidos por un doble enlace estireno, este tiene un peso molecular de 228 g/mol y se puede encontrar en forma cis y trans, y es este último el que tiene mayor estabilidad (Tian y cols., 2020). Si bien, el resveratrol es un compuesto con una alta absorción, su biodisponibilidad es baja, sin embargo, sus metabolitos, como dihidroresveratrol, 3,4'-dihidroxi-trans-stilbeno o 3,4'-dihidroxibibenzyl, también pueden ser responsables de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Man y cols., 2020).

La biodisponibilidad oral de resveratrol en su forma trans es del 12 %, mientras que el 90% del resveratrol ingerido llega al colon y es metabolizado por el microbiota intestinal, posteriormente los metabolitos son mayormente sulfatados o glucuronizados a nivel hepático, llegan a nivel sistémico y pueden regresar a nivel intestinal nuevamente por las bilis o ser excretados por orina (Mengt y cols., 2021).

El resveratrol como fitoestrógeno, tiene similitud estructural con estrógenos como el dietilestilbestrol, y ha mostrado su afinidad por receptores de estrógeno, lo cual le puede otorgar las propiedades anticancerígenas, al actuar como agonista de los receptores estrogénicos, modular el crecimiento tumoral y sistemas antioxidantes (Alamolhodaei y cols., 2017). Por otra parte, las propiedades antioxidantes del resveratrol pueden ser directas o indirectas, de manera directa el resveratrol tiene la capacidad de neutralizar moléculas oxidantes como radicales hidroxil, peróxido de hidrógeno o peroxinitritos, pero se trata de un mecanismo limitado, mientras que los efectos antioxidantes del resveratrol se han atribuido mayormente, mediante la regulación de genes (Xia y cols., 2017).

La función del resveratrol como antioxidante mediante la regulación de genes depende de la unión a diversas proteínas, como SIRT-1, la cual está involucrada en la regulación de catalasas y superóxido dismutasas (SOD), lo que contribuye en la neutralización de especies reactivas de oxígeno (Xia y cols., 2017). Adicionalmente la regulación de SIRT-1 por resveratrol también impacta en la expresión de enzimas apoptóticas, de defensa a estrés, metabolismo de lípidos, adaptaciones metabólicas, y genes proinflamatorios como NF-Kb, lo que puede potenciar las propiedades antiinflamatorias. El resveratrol como molécula antiinflamatoria, ejerce su efecto también mediante mecanismos adicionales, al intervenir en la producción de moléculas proinflamatorias como IFN-γ por los linfocitos, o TNF-α e IL-12 por los macrófagos, al regular la expresión de estos genes en estas líneas celulares (Ren y cols., 2013).

1.2.4 PROBIÓTICOS

Los probióticos son microorganismos que han mostrado otorgar beneficios a la salud, cuando son administrados en cantidades adecuadas (1×10^6 – 1×10^9 UFC), estos son principalmente lactobacilos o bifidobacterias, aunque también levaduras son usadas como probióticos (Hill y cols., 2014).

Los probióticos desempeñan diversas funciones biológicas, las cuales se pueden catalogar en protectoras, metabólicas y tróficas, su mecanismo puede ser directo o

indirecto, aunque gran parte de estas funciones están involucradas en la regulación del sistema inmune (Chiu y cols., 2017).

Los probióticos contribuyen en la respuesta inmune a través de la interacción directa con células del sistema inmune como células dendríticas mediante receptores tipo TOLL (ej. TLR2 – TLR4), lo que genera tolerancia inmunogénica al favorecer la producción de citocinas antiinflamatorias y diferenciación de linfocitos Treg (Yiu y cols., 2017). Por otra parte, sus metabolitos como propionato y acetato se unen a receptores como GPR41, GPR43, expresados en monocitos y macrófagos, lo cual genera respuestas antiinflamatorias y contribuye a un estado de homeostasis inmunológica e incluso de antinocicepción durante el proceso inflamatorio (Sun y cols., 2023; Liu y cols., 2023).

Adicionalmente los ácidos grasos de cadena corta producidos pueden inhibir a histonas desacetilasas y por consecuencia la expresión de genes proinflamatorios como NF-Kb y la reducción de la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α (Rooks y cols., 2023). Específicamente los probióticos del género *Bacillus*, también han mostrado producir ácidos grasos de cadena corta y reducir la expresión de TNF- α y COX-2, lo que también los convierte en probióticos con potenciales funciones antiinflamatorias (Lee y cols., 2019).

Si bien, en muchas ocasiones los efectos que pueden otorgar los probióticos o sustancias bioactivas como el resveratrol son prometedores, no dejan de estar condicionados por la tecnología usada para su administración, ya que es importante preservar la viabilidad de los organismos vivos, así como la estabilidad de los compuestos bioactivos durante su almacenamiento y al ser administrados (Davidov-Pardo y cols., 2014; Trush y cols., 2023; De Vries y cols., 2018).

1.3 CONSERVACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Uno de los principales retos al buscar administrar sustancias bioactivas es mantener la estabilidad de las moléculas como el resveratrol o la viabilidad de los probióticos, aunque en ocasiones algunas características propias de los probióticos como la esporulación, contribuyen en la viabilidad, al ser un mecanismo propio de la bacteria

para protegerse, tal es el caso de *Bacillus clausii* (Trush y cols., 2023; De Vries y cols., 2018; Khatri y cols., 2019).

Sin embargo, para sustancias bioactivas como el resveratrol, siempre se busca mantener su estabilidad, al considerar su baja biodisponibilidad, e incluso mejorar la misma por distintas técnicas de microencapsulación (Vasisht, 2014; Nahum y cols., 2021; Tolun y cols., 2016).

Es así, que diversos métodos se han evaluado para la microencapsulación de sustancias bioactivas (Figura 2), (Gholamali y Cols., 1988), los cuales se dividen en físicos y químicos, dentro de los métodos químicos se encuentran la polimerización, coacervación, gelificación, generación de liposomas y en los métodos físicos se encuentra la liofilización, extrusión y secado por aspersión principalmente (Madene y cols., 2020).

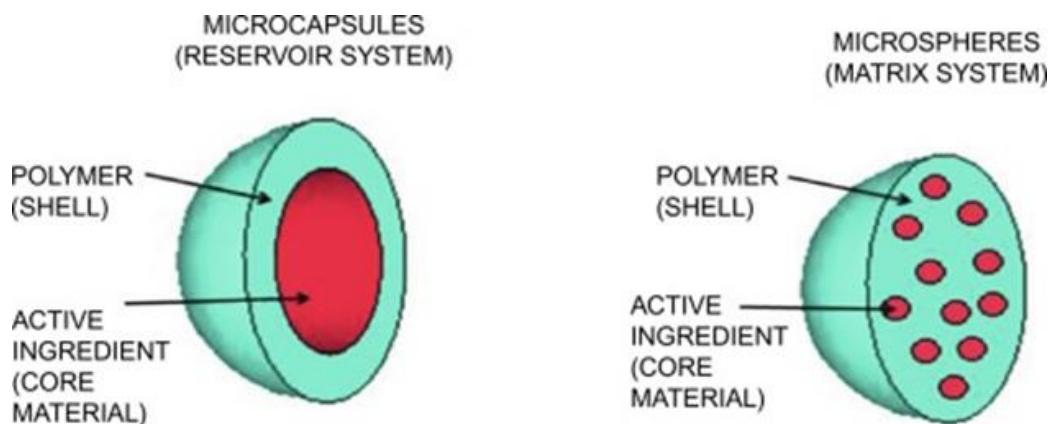


Figura 2. Microencapsulados. Tomado de Morphology control in encapsulation.

Gholamali y cols., 2023

1.3.1 MICROENCAPSULACIÓN

La microencapsulación es una técnica empleada para conservar las propiedades de ingredientes activos propensos a sufrir daños en determinadas condiciones de procesamiento o ambientales. Entre las condiciones ambientales que pueden afectar a la actividad del ingrediente se incluyen el oxígeno atmosférico, el pH, la humedad, la irradiación de luz y la exposición a altas temperaturas (Gbassi y cols., 2012).

Los ingredientes nutracéuticos y funcionales como antioxidantes, vitaminas, minerales, lípidos y probióticos han sido microencapsulados mediante diferentes metodologías, y se ha identificado una protección de polifenoles mayor al 80% cuando se usan carbohidratos o proteínas como agentes acarreadores, esto se puede atribuir a una unión de la región hidrofílica del flavonoide (grupo hidroxil), que podía unirse mediante puentes de hidrógeno con los grupos carbonil y amino de las proteínas (Ho y cols., 2017).

Existen otros parámetros a considerar al microencapsular compuestos, como el rango de difusión de los componentes que conforman a la microcápsula, el cual está determinado por el ingrediente activo y la matriz polimérica, para lo cual se necesita conocer la morfología, compatibilidad fisicoquímica y termodinámica de ambos compuestos. También al generarse la microencapsulación se pueden presentar distintas configuraciones morfológicas del sistema, lo cual estará relacionado con la distribución del ingrediente activo y la matriz polimérica y tendrá repercusiones en su estabilidad (Vasisht, 2014).

Sin embargo, los dos tipos de encapsulado más comunes son de depósito y de matriz, en el primer tipo de encapsulado una pared se genera alrededor del compuesto activo, en el encapsulado de matriz el ingrediente activo se encuentra disperso por todo el material acarreador y también de llega a localizar en la superficie (Nedovic y cols., 2011).

1.3.2 AGENTES ACARREADORES

Un agente acarreador o encapsulante tiene la finalidad de preservar y proteger distintos compuestos químicos ya sean naturales o sintéticos, así como estabilizar, separar componentes o controlar su liberación (Fuchs y col., 2006).

Uno de los agentes acarreadores mayormente usados es la lactosa, la cual ha sido en algunos casos modificada para mejorar sus propiedades acarreadoras como mayor superficie y tamaño de poro, lo cual demuestra la gran utilidad que se le puede dar a los carbohidratos como agentes acarreadores. Otro carbohidrato que también ha sido utilizado como agente acarreador es la inulina, la cual es un polisacárido proveniente de la achicoria, conformado por unidades de B-d-fructofuransonil unidas a un grupo terminal D-glucopiranosa, del cual, una de las ventajas son sus enlaces tipo beta, los cuales no son degradados en el tracto gastrointestinal superior y permite que los compuestos bioactivos lleguen en mayor cantidad al colon y sean absorbidos o metabolizados por la microbiota intestinal, y adicionalmente tiene el potencial de ejercer un efecto prebiótico (Tan y cols., 2018).

2. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado, múltiples estudios abalan el efecto beneficioso sobre la salud, específicamente en la protección digestiva para promover el equilibrio de la microbiota intestinal (Vera-Santander y cols., 2023), múltiples formulaciones de probióticos han sido utilizadas y diseñados para mejorar su biodisponibilidad, es así como se encuentra comercialmente presentaciones que van desde productos lácteos como el Yakult®, (*Lactobacillus casei*) y otras presentaciones en capsulas que también solo contienen una sola cepa como Floratil® (*Saccharomyces boulardii*), Culturelle® (*Lactobacillus rhamnosus*), Align® (*Saccharomyces boulardii*) y Microbitic Fit® (*Bifidobacterium lactis* BPL1), otras capsulas contienen varias cepas como BioGaia®, (*Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus protectivus*), Probrainbiotics Max® (*Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*), Lactipan®, (*Lactobacillus acidophilus*,

Lactobacillus casei, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus thermophilus*) y sobre todo capsulas que contienen *Bacillus clausii* en forma de espora como Enterogermina® y Sinuberase®, en todos los casos se consideran como suplemento nutricional.

El uso de probióticos de una sola cepa puede tener la ventaja de ser utilizados para un efecto específico como *Lactobacillus rhamnosus* que es indicado para diarrea (Guo y cols., 2019) y *Saccharomyces boulardii* para infecciones intestinales (Ragan y cols., 2022), la desventaja puede ser que, al ser solo una cepa, el efecto puede limitarse a su acción. Los probióticos con varias cepas puede ofrecer beneficios complementarios, dado que la combinación de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* pueden equilibrar la microbiota intestinal y por eso la salud intestinal, digestión e inmunidad (Kaźmierczak-Siedlecka y cols., 2020). La desventaja de combinar cepas es la posible competencia entre sí y la reducción de su efectividad y los efectos de una combinación pueden no ser estudiados como las cepas individuales. Sin embargo, para algunos problemas específicos como infecciones, síndrome de intestino irritable o diarrea, una cepa en particular puede ser la indicada, mientras que para un mejoramiento del estado de salud en general, así como para el fortalecimiento del sistema inmune, las combinaciones pueden ser mejor (Madsen y cols., 2001).

También el tipo de cepa, por ejemplo, una ventaja que ofrecen las cepas como la de *Bacillus clausii* es la forma de espora, que le permitirá mayor estabilidad (Acosta-Rodríguez-Bueno y cols., 2022).

No se han encontrado que comercialmente se combine probióticos con antioxidantes para potenciar el efecto antioxidante e incluso el efecto antinflamatorio, lo cual puede ser una estrategia benéfica para resaltar las cualidades de esta terapia alimentaria para cuidar la salud.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en las enfermedades inflamatorias, se estudian los mecanismos subyacentes donde los probióticos y compuestos bioactivos como resveratrol, pueden ejercer su efecto antinflamatorio.

Si se parte de que la inflamación es un proceso de defensa local del organismo ante un daño celular, y que gran parte de su mecanismo es inmunológico, dado que a partir de esta irritación química se inicia una cascada de liberación de mediadores químicos, principalmente prostaglandinas, así como otras citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF α), que amplifican este proceso, se producen los signos clínicos típicos como edema, dolor, enrojecimiento y pérdida de la función del órgano afectado (Medzhitov, 2023).

Como ya se mencionó, el resveratrol tiene la capacidad de reprimir la expresión de citoquinas proinflamatorias, incluidas TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como prostaglandinas, a la par de la expresión de las citocinas antiinflamatorias como IL-10, lo cual le confiere un importante efecto antiinflamatorio (Malaguarnera, 2019).

Adicionalmente, los probióticos participan en la regulación de la respuesta inmune y actualmente se han reportado efectos antiinflamatorios en modelos de inflamación inducida por carragenina en roedores (Solanki y cols., 2015), planteándose que este efecto también se basa en la capacidad inmunomoduladora de los probióticos, al encontrarse una disminución de citocinas inflamatorias sistémicas y un incremento de inmunoglobulinas a nivel general (Amdekar y cols., 2023).

Por lo tanto, al tener evidencia de que algunos probióticos pueden mejorar el tratamiento en estados inflamatorios (Bungau y cols., 2021). La estrategia de la formulación y caracterización de un microencapsulado para la administración concomitante de bacterias probióticas como *B. clausii*, a la par de resveratrol que tiene propiedades antiinflamatorias y prebióticas, en conjunto con un agente acarreador que también tiene propiedades prebióticas como es el caso de la inulina o lactosa, se podría originar una sinergia en el efecto antinflamatorio, como una alternativa al uso de analgésicos antinflamatorios no esteroidales (AINES), cuya limitación son los daños enterohepáticos producidos por un uso crónico.

4. HIPÓTESIS

Una formulación de probiótico-resveratrol encapsulado, producirá un efecto antiinflamatorio en modelos de edema inducido por cartagenina en ratas, basados en

un decremento del edema además de una disminución de la producción de prostaglandinas y TNF α .

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Formular y evaluar el efecto de la administración de un microencapsulado probiótico-resveratrol en un modelo animal de edema inducido por carragenina, sobre el edema y niveles de prostaglandinas y TNF α , a nivel local.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar un microencapsulado de *B. clausii*/resveratrol mediante secado por aspersión, con inulina (IN) o lactosa (Lc) como agentes acarreadores.
- Determinar la viabilidad de *B. clausii* en las distintas formulaciones microencapsuladas, mediante técnica de extensión en placa.
- Determinar la actividad antioxidante en las distintas formulaciones microencapsuladas, mediante la disminución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).
- Evaluar la morfología de los microencapsulados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Cuantificar los niveles de resveratrol en el microencapsulado candidato, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
- Evaluar del efecto antiinflamatorio del microencapsulado *B. clausii*/resveratrol (BaCRSV) en comparación con sus componentes individuales: *B. clausii* (BaC), resveratrol (RSV) y agente acarreador (IN o LC), en un modelo de edema inducido por carragenina en rata.
- Evaluar la concentración de prostaglandina (PGE₂) y TNF- α a nivel local (subplantar) de la rata después de la administración de BaCRSV, BaC, RSV.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 PRIMERA ETAPA: ELABORACIÓN DEL MICROENCAPSULADO

La primera etapa del estudio consistió en la formulación, elaboración del microencapsulado mediante secado por aspersión y su posterior caracterización, mediante la evaluación de viabilidad de *B. clausii*, morfología del microencapsulado por microscopía electrónica de barrido y actividad antioxidante mediante DPPH (Figura 3).

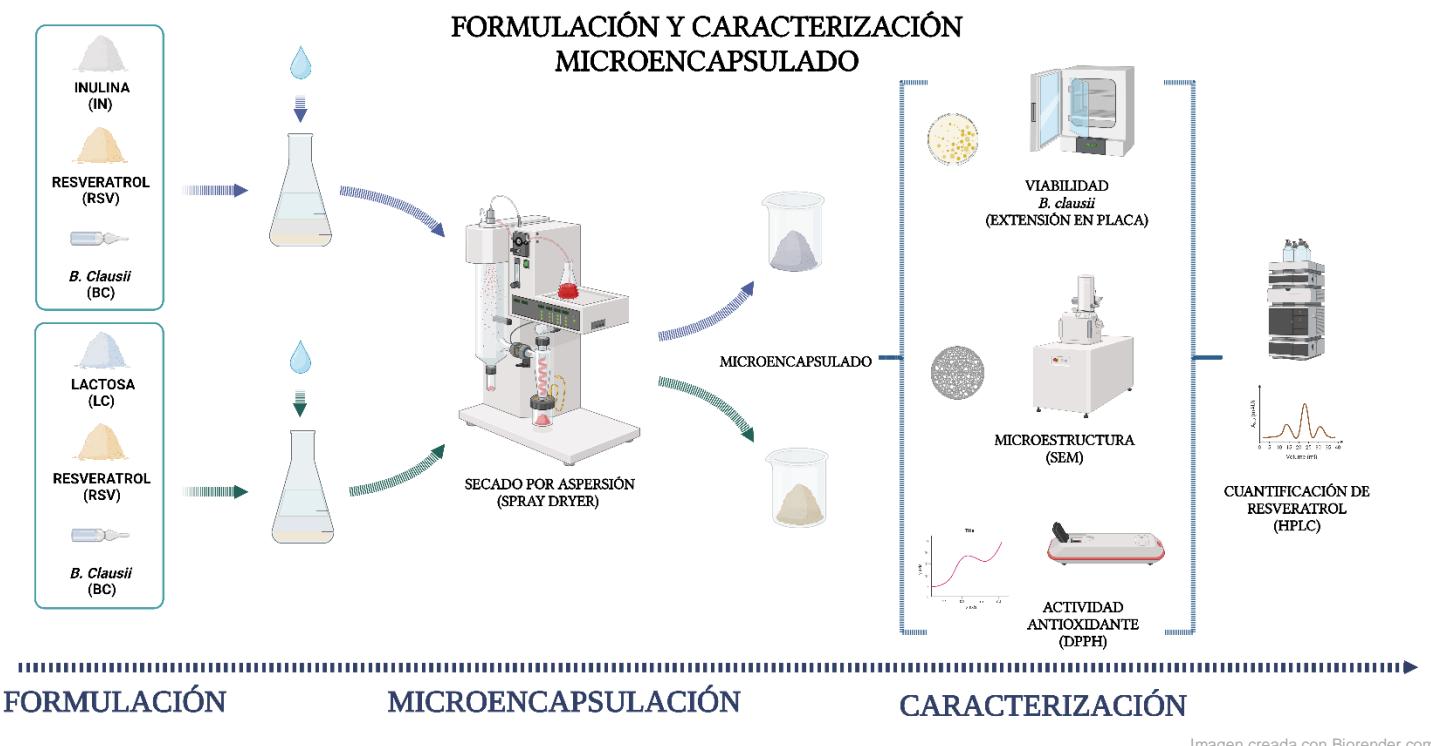


Figura 3. Diseño experimental de la primera etapa, correspondiente a la formulación y caracterización del microencapsulado.

6.2 SEGUNDA ETAPA: EVALUACIÓN IN VIVO DEL MICROENCAPSULADO

La segunda etapa del estudio consistió en la evaluación antinflamatoria del microencapsulado, en ratas Wistar macho y hembra ($n=6$), la cual consistió en la administración del microencapsulado y sus componentes de manera individual por 15 días, para posteriormente inducir la inflamación en la pata trasera derecha del modelo

animal con carragenina y determinar el grosor o edema, así como marcadores de inflamación PGE2 y TNF- α a nivel subplantar local (Figura 4).

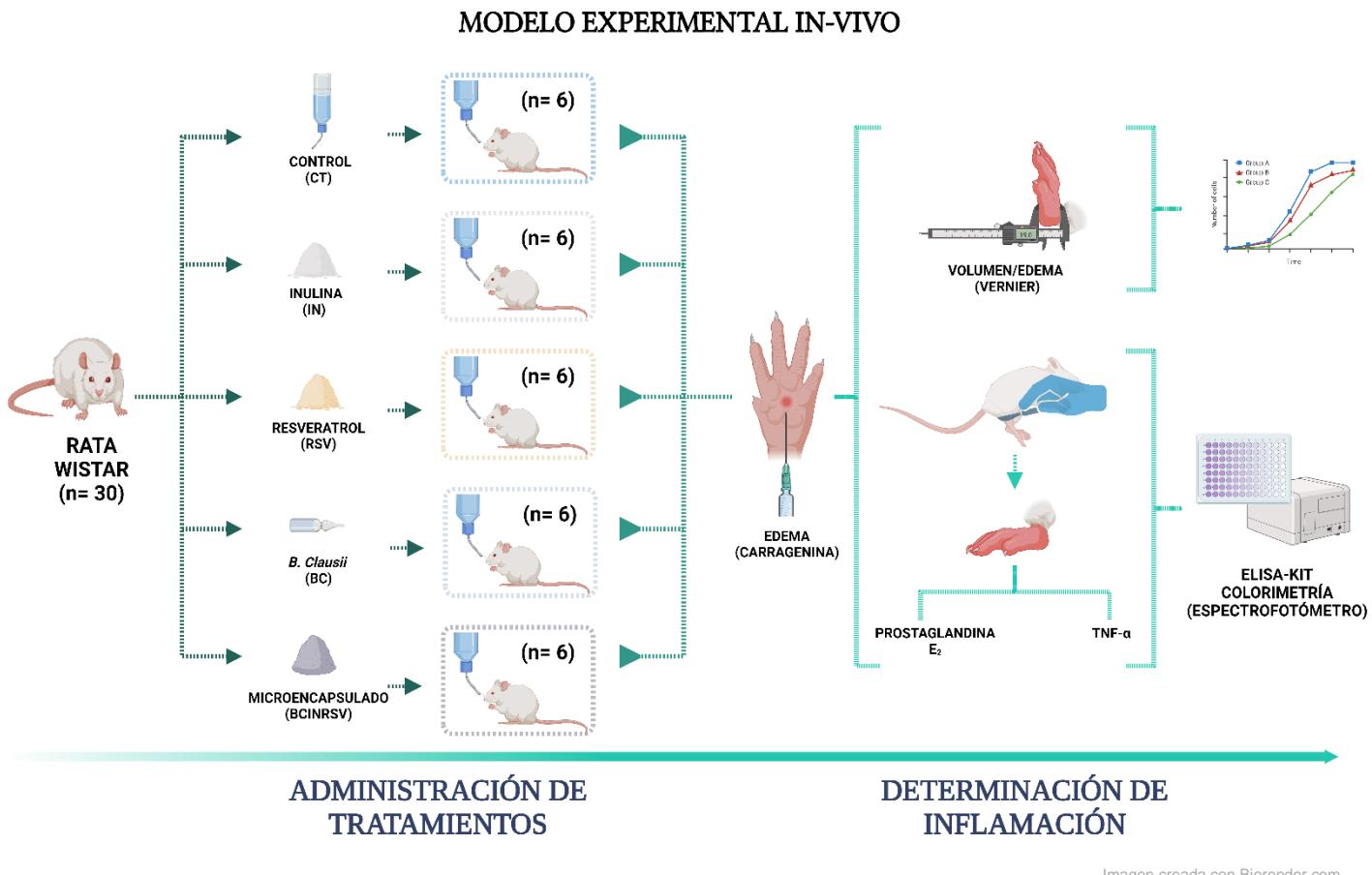


Figura 4. Diseño experimental de la segunda etapa, correspondiente a la evaluación del efecto antiinflamatorio in-vivo del microencapsulado.

7. MATERIAL Y MÉTODOS DE LA ETAPA 1

7.1 LUGAR DE REALIZACIÓN

La elaboración del microencapsulado mediante secado por aspersión, ensayos de viabilidad y cuantificación de resveratrol, se realizaron en el Laboratorio de Farmacología correspondiente a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad

Autónoma de San Luis Potosí. La determinación de la actividad antioxidante y morfología del microencapsulado se realizó en el Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMAV), en Monterrey, Nuevo León.

7.2 MATERIALES

Los materiales utilizados fueron, Inulina (99.9%), y α -Lactosa monohidrato, (99%, α L-H₂O) adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (Toluca, Edo de México, México). La cepa bacteriana de *Bacillus* (*Bacillus clausii*) esporas en solución (Sinuberase) se adquirió de Sanofi-Aventis de México, S.A. de C.V. (Coyoacán, CDMX, México), el resveratrol (99%) se adquirió de Química Farmacéutica Esteroidal S.A. de C.V., (Tláhuac, CDMX, México), el medio de cultivo agar de soya tripticaseina de Becton Dickinson S.A. de C.V. (Cuautitlán Izcalli, Edo. de México).

7.3 MUESTRAS

Para las muestras elaboradas mediante secado por aspersión se realizaron seis formulaciones distintas, las cuales contenían 20g del agente acarreador [inulina (IN) o lactosa (L)], 10 g de resveratrol (RSV) y 5 ml de solución de esporas de *B. clausii* (Bac) con una concentración de 4×10^{12} UFC, toda la materia seca se pesó en báscula analítica y posteriormente se aforaba a 100 mL con agua destilada (Tabla 1).

Las muestras se elaboraron con las concentraciones mencionadas anteriormente y se identificaron acorde a sus componentes, BaCRSV, INRSV, BaCIN, BacLRSV LRSV y BaCL.

7.4 SECADO POR ASPERSIÓN

El secado por aspersión se realizó en un Mini Spray Dryer B290 (BÜCHI, Labortechnik AG, Flawil, Suiza) con las siguientes condiciones, temperatura de alimentación de 40 °C, flujo de alimentación de 7 cm³/min, flujo de aire caliente de 28 m³/h, aspiración del 70% y presión de 1,5 bar, inlet 210°C y outlet 70°C.

FORMULACIONES (INULINA)				
Muestra	Agente acarreador	Antioxidante	Probiótico	Diluyente
BacINRSV	Inulina (20%)	Resveratrol (10%)	<i>B. Clausii</i> (5%-4x10 ¹²)	Agua (65%)
INRSV	Inulina (20%)	Resveratrol (10%)		Agua (70%)
BacIN	Inulina (20%)		<i>B. Clausii</i> (5%-4x10 ¹²)	Agua (75%)

FORMULACIONES (LACTOSA)				
Muestra	Agente acarreador	Antioxidante	Probiótico	Diluyente
BacLRSV	Lactosa (20%)	Resveratrol (10%)	<i>B. Clausii</i> (5%-4x10 ¹²)	Agua (65%)
LRSV	Lactosa (20%)	Resveratrol (10%)		Agua (70%)
BacL	Lactosa (20%)		<i>B. Clausii</i> (5%-4x10 ¹²)	Agua (75%)

Tabla 1. Componentes de las seis formulaciones elaboradas para ser microencapsuladas mediante secado por aspersión.

7.5 VIABILIDAD *Bacillus Clausii*

La viabilidad de *Bacillus clausii* de los distintos microencapsulados se determinó mediante la técnica de extensión en placa, con agar de soya tripticaseina (Beckton Dickinson, Alemania), al realizar diluciones seriadas 1x10⁻¹ a 1x10⁻⁷ de los micronecapsulados BaCL, BaCLRSV, BacIN y BaCINRSV y su posterior siembra en placa.

Las placas se incubaron en condiciones aeróbicas durante 48 h a 37°C, en incubadora incubadora Novatech (Jalisco, México), como control se utilizó la solución stock de *Bacillus clausii* (Sinuberase, Sanofi-Aventis de México, S.A. de C.V.), y una placa únicamente con el agua utilizada para las diluciones.

Para la determinación del número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g), se seleccionaron las concentraciones que presentaban entre 30 y 300 UFC, y se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{CFU}{g} = \left[\frac{N^{\circ} \text{ plate colonies} \times \text{dilution factor}}{mL \text{ sample seeded}} \right]$$

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se reportaron como media de los valores calculados.

7.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la actividad antioxidante se realizó acorde a la metodología descrita por Hao (Hao y cosl., 2020), donde el microencapsulado se diluyó en una solución con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) como radical libre. Se añadieron 1.7 mL de solución de etanol DPPH* (0.1 mmol/L) a 1.7 mL de muestra microencapsulada diluida en etanol. Las concentraciones iniciales de polvo de las soluciones fueron de 2,5, 5 y 15 µg/mL. La solución mezclada (3,4 mL) se vertió en una celda de cuarzo de 10 mm de espesor y la capacidad antioxidante se evaluó como la disminución de la concentración inicial de DPPH* tras 30 min de preparación. La variación de la intensidad de absorbancia del DPPH* se midió a una longitud de onda de 537 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Evolution 220 (Mettler Toledo, Powai Mumbai, India). La actividad de barrido (%DPPH*) se calculó según la ecuación:

$$\text{Scavenging activity (\% DPPH *)} = \frac{A_0 - A_{30}}{A_0} * 100$$

donde A_0 es la absorbancia inicial del DPPH*, y A_{30} es la absorbancia del DPPH* después de 30 min de añadir el microencapsulado.

7.7 MORFOLOGÍA DEL ENCAPSULADO

La determinación de la morfología de los microencapsulados se realizó mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM), empleando un microscopio electrónico de barrido SU3500 (Hitachi, Japón) operado a 15 kV en condiciones de bajo vacío de 60 Pa, y con un detector de retrodispersión (BSE), para observar la morfología de las partículas. Todas las muestras fueron colocadas en una película de carbono de doble cara y se observaron sin ningún tratamiento adicional.

7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para establecer un nivel de significación de 0,05, y se utilizó la prueba post hoc de la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey para determinar la diferencia entre medias. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

8. MATERIAL Y METODOS PARA LA ETAPA 2

8.1 LUGAR DE REALIZACIÓN

El ensayo experimental en modelo animal se realizó en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, certificado por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) con clave AUT-B-C-0323-092.

8.2 MATERIALES

Los materiales utilizados para el ensayo in-vivo fueron, Inulina (99.9%), adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (Toluca, Edo de México, México), resveratrol (99%) de Química Farmacéutica Esteroidal S.A. de C.V., (Tláhuac, CDMX, México), *Bacillus clausii* en solución (Sinuberase) de Sanofi-Aventis de México, S.A. de C.V. (Coyoacán, CDMX, México), microencapsulado BaCINRSV y alimento para roedor Harlan Tekland

8.3 BIOMODELOS Y CONDICIONES

El modelo animal utilizado en el experimento fueron ratas Wistar macho (n=15) y hembra (n=15), provenientes del centro de Biociencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, las cuales se recibieron con un peso de 64.7 ± 7.4 g los machos y 58.3 ± 5.5 g las hembras, posteriormente se les dejó crecer y adaptarse en condiciones de luz y oscuridad a una temperatura ambiente controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante dos semanas, en grupos de cinco ratas separadas por sexo, hasta alcanzar un peso de 220g aproximadamente.

8.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los grupos experimentales fueron conformados por tres ratas Wistar macho y tres hembras (n=6), las cuales fueron asignadas de manera aleatoria a los siguientes grupos, control (n=6), vehículo (n=6), *B. clausii* (n=6), resveratrol (n=6) y microencapsulado BaCINSRV (n=6), con las dosis establecidas en la Tabla 2.

Grupo	Tratamiento	Cantidad	Dosis
Control	Agua	Ad libitum	N/A
IN	Inulina	0.5 g	0.5 g /día
BaC	<i>B. clausii</i>	87 µl	1.6 x 10 ⁸ UFC/día
RSV	Resveratrol	62 µg	62 µg /día
BaCINRSV	Microencapsulado	0.5 g	<i>B. clausii</i> (1.6 x 10 ⁸ UFC) /día Resveratrol (62 µg)/día

Tabla 2. Dosis administradas de inulina, resveratrol, *B. clausii* o microencapsulado a los distintos grupos experimentales por día.

Todas las ratas se mantuvieron en cajas individuales para tener control sobre las dosis ingeridas y se administraron los distintos tratamientos en los bebederos, en cantidades para 7 días, el tiempo de administración fue de 14 días y en el último día se indujo el edema por carragenina, para posteriormente realizar eutanasia a las ratas por sobredosis de pentobarbital.

8.4.1 CUANTIFICACIÓN DE RESVERATROL

Con el objetivo de caracterizar al microencapsulado, una vez realizados y pertinentes los resultados de viabilidad, actividad antioxidante y morfología microestructural se seleccionó para la evaluación antiinflamatoria en el modelo animal la formulación con *Bacillus clausii*, resveratrol e inulina (BaCINRSV), para lo cual analizo la cantidad de

resveratrol mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con la finalidad de igualar las concentraciones que se han utilizado en la evaluación en el modelo *in vivo*. El equipo CLAR consto de un equipo modular de marca Waters, conformado por una bomba binaria modelo 1525, un detector de absorbancia de doble longitud de onda modelo 2487 y acoplado a un autoinyector modelo 717 plus (Waters Assoc. Milford MA, EUA). Los datos se analizaron con el software Empower Pro (versión 4.0).

8.5 MODELOS DE EDEMA POR CARRAGENINA

La determinación del nivel de edema se realizó en la pata trasera derecha de las ratas con vernier digital, donde se inyecto a nivel subplantar 0.1 ml de carragenina al 1 % diluida en solución salina al 0.9%.

Posteriormente se monitoreo el volumen de la pata al tiempo 0, 1, 2, 4 y 6 horas, para estimar el porcentaje de inflamación como aumento en el volumen de la pata, al tener como base el volumen de la pata inmediatamente después de la inyección de carragenina a las 0 horas.

Una vez terminada la evaluación del volumen, las ratas se sometieron a eutanasia mediante sobredosis de pentobarbital (5 mg/mL) y se procedió a cortar la pata trasera derecha donde se indujo el edema, así como la pata izquierda como control, posteriormente fueron homogeneizadas en solución de fosfatos y almacenadas alrededor de -20°C hasta la determinación de los marcadores de inflamación (PGE₂ Y TNF- α).

8.6 DETERMINACION DE PROSTAGLANDINAS (PGE₂) Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF α)

La determinación de prostaglandina (PGE₂) y del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), se realizó del homogeneizado tisular de la pata derecha de las ratas, mediante técnica de ELISA, acorde al protocolo establecido por la marca.

8.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

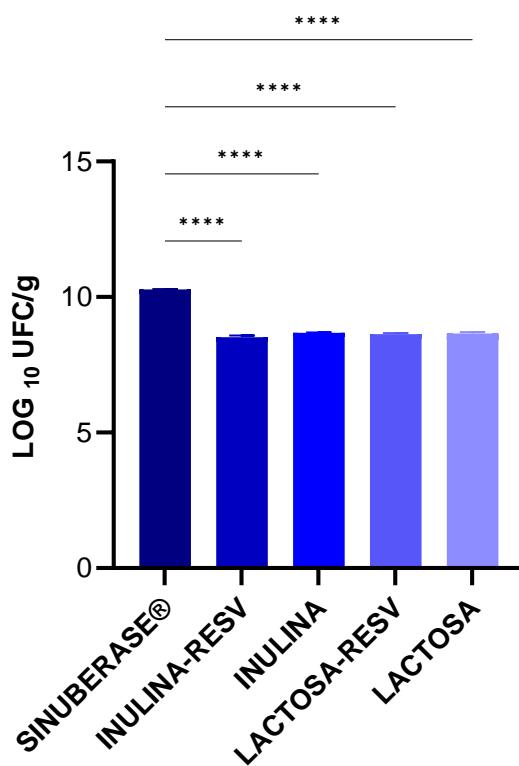
El análisis estadístico se realizó para comparar los diferentes tratamientos en una prueba de ANOVA una vía, mediante Tukey de comparación con grupo control y una p menor a 0.05.

9. RESULTADOS DE ELABORACIÓN DEL MICROENCAPSULADO

9.1 VIABILIDAD

Los resultados de viabilidad de las muestras mostraron una disminución significativa en comparación con el control (*Bacillus clausii*) 10.28 ± 0.03 Log10 UFC/g, ($p<0.05$). No obstante, entre las muestras de *B. clausii* con los distintos agentes acarreadores como inulina ($BacIN = 8.68 \pm 0.01$ Log10 UFC/g) y lactosa ($BacL = 8.66 \pm 0.07$ Log10 UFC/g) no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$), lo cual muestra que ambos componentes tienen el mismo efecto termoprotector sobre las esporas de *Bacillus clausii* en el proceso de secado por aspersión (Gráfica 1), lo cual puede atribuirse a las interacciones que se crean entre los grupos hidroxilo de lactosa e inulina con las proteínas de la espora de *Bacillus clausii*, las cuales pueden impedir la desnaturalización de las proteínas y por lo tanto conservar su integridad (Tantratian y cols., 2020). Por otra parte, *Bacillus clausii* al encontrarse en un estado esporulado, tiene una mayor resistencia a altas temperaturas, como las utilizadas durante el secado por aspersión (Hayrapetyan y cols., 2016).

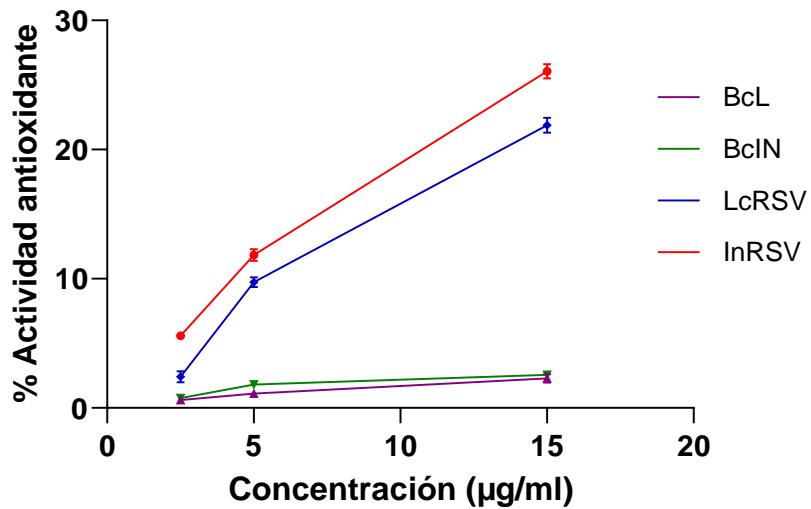
La presencia de resveratrol en los microencapsulados de este estudio no mostró diferencias significativas sobre la viabilidad de *Bacillus clausii* (Gráfica 1), $BacINRSV$ (8.52 ± 0.10 Log10 UFC/g) y $BacLRSV$ (8.62 ± 0.06 Log10 UFC/g), no obstante, al compararlas con los microencapsulados sin resveratrol ($BacIN$ y $BacLRSV$) se observa una disminución en la viabilidad.



Gráfica 1. Diferencia de viabilidad de *B. clausii* (control) con los microencapsulados que contienen inulina y lactosa, con y sin resveratrol (BacIN, BacINRSV, BacL y BacLRSV). **** Diferencia significativa de la muestra control analizada mediante ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey. $P < 0.000$.

9.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En la actividad antioxidante de los microencapsulados se observó que las muestras con *Bacillus clausii* y el agente acarreador (BacIN y BacL) tuvieron los parámetros más bajos en comparación con las muestras con resveratrol y el agente acarreador (InRSV y LcRSV) (Gráfica 2).

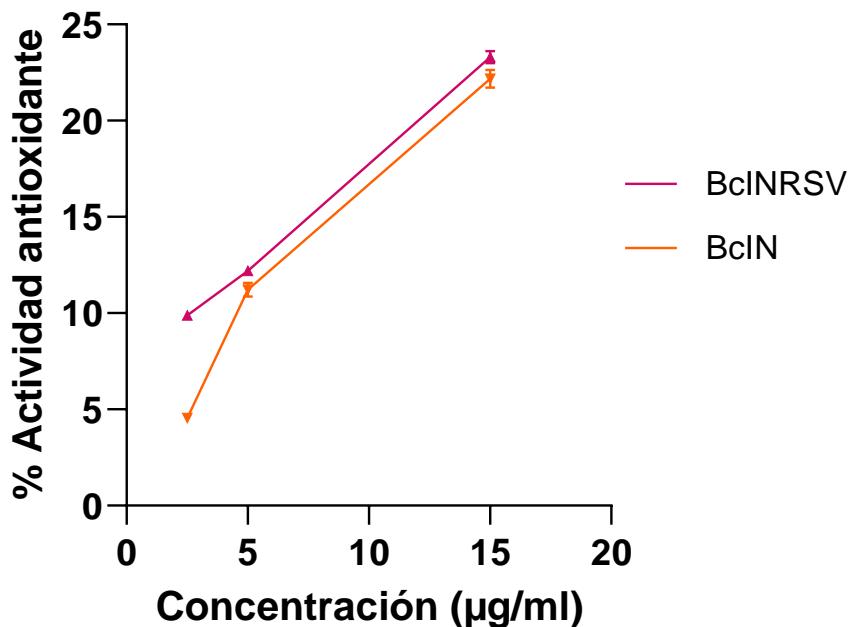


Gráfica 2. Efecto antioxidante de los agentes acarreadores inulina y lactosa, únicamente con resveratrol (InRSV y LcRSV) o *B. clausii* (BacL y BacRSV).

Por otra parte, también se pudo observar el efecto antioxidante del resveratrol en presencia de inulina y lactosa como parte del microencapsulado (InRSV y LcRSV) (Gráfica 2), donde el microencapsulado INRSV mostró mayor actividad antioxidante en comparación con LRSV, hallazgo que se puede atribuir a una mayor eficacia de encapsulación de la inulina sobre compuestos bioactivos (Silva y cols., 2016), tal como Ha et al. demostraron, al evaluar al nanoencapsular resveratrol con proteína de suero e inulina mediante gelificación iónica y mostrar que una concentración de inulina del 1 a 3% mejora la eficiencia de encapsulación de 79 a 83% (Ha y cols., 2016). No obstante, la lactosa también ha mostrado estabilizar y proteger compuestos bioactivos como resveratrol, al mantener su actividad antioxidante (Velasco y cols., 2004), sin

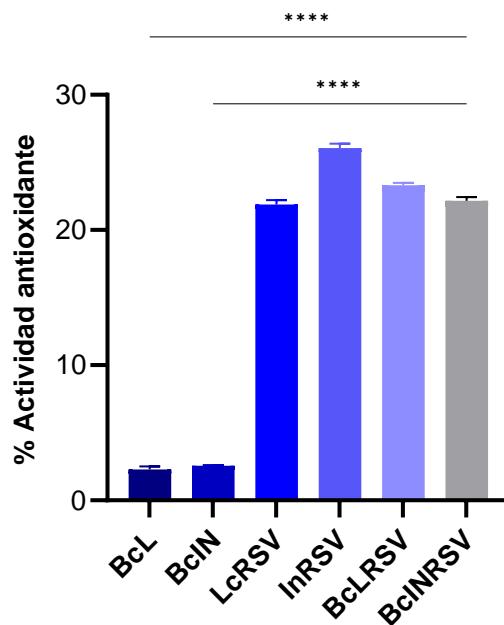
embargo, el microencapsulado con inulina InRSV mostró ser un mejor material encapsulante al tener una mayor actividad antioxidante en este estudio.

Respecto a la actividad antioxidante de los microencapsulados con los tres componentes (BacINRSV y BacLRSV), el microencapsulado con lactosa (BacLRSV) mostró actividad antioxidante ligeramente mayor en comparación con la inulina (BacLRSV) (Gráfica 3), que podría atribuirse a un efecto sinérgico entre los componentes (Sonam y cols., 2020), aunado a esto *B. clausii* también puede actuar como agente fermentador y producir compuestos péptidos fenólicos con capacidad antioxidante (Rochín-Medina y cols., 2018; Rochin-Medina y cols., 2020), incluso compuestos antioxidantes como carotenoides y riboflavina (Kotowicz y cols., 2019), por lo tanto los resultados observados pueden relacionarse con un sinergismo de los componentes del microencapsulado (Riesenman y cols., 2020; Nicholson y cols., 2020), frente a radicales libres como DPPH* utilizado en este estudio.



Gráfica 3. Actividad antioxidante (InRSV y LcRSV) y *B. clausii* (BacL y BacRSV).

Finalmente, la actividad antioxidante con la concentración máxima de microencapsulado (15 $\mu\text{g/mL}$) se observó en la muestra con inulina y resveratrol (InRSV), contrario a las muestras BacL y BacIN que tuvieron la menor actividad, mientras que todas las muestras con resveratrol (InRSV, LcRSV, BacINRSV y BacLRSV) no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) (Gráfica 4), sin embargo, la disminución de la actividad antioxidante de BacINRSV en comparación con LcRSV se puede atribuir a la capacidad de adsorción de las esporas de *B. clausii* que tienen la capacidad de retener compuestos solubles en las paredes (Isticato y cols., 2019; Shi y cols., 2014), así mismo se ha observado una correlación entre la actividad antioxidante de polímeros y el grado de reticulación, al modificarse las redes poliméricas de los microencapsulados, que podría retener al resveratrol dentro de la partícula y reducir su disponibilidad para interactuar con el entorno (Spizzirri y cols., 2020).



Gráfica 4. Comparación del efecto antioxidante de los las microencapsulados s acarreadores inulina y lactosa, únicamente con resveratrol (InRSV y LcRSV) o *B. clausii* (BacL y BacRSV). **** Diferencia significativa de la muestra control analizada mediante ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey. $P < 0.0001$

9.3 MORFOLOGIA MICROESTRUCTURAL

La morfología microestructural de los microencapsulados BacIN y BacL mostró partículas esféricas con dimensiones de 2 a 25 μm , adicionalmente los microencapsulados con resveratrol (InRSV y LcRSV) presentaron estructuras en forma de varilla de 40 a 60 μm y 10 μm de diámetro, partículas que se identificaron como ricas en resveratrol (70), mientras que las muestras con los tres componentes (BacINRSV y BacLRSV) mostraron algunas estructuras irregulares, las cuales se pueden atribuir a la viscosidad de las soluciones previo al secado por aspersión (Imagen 1).

Microestructura microencapsulados

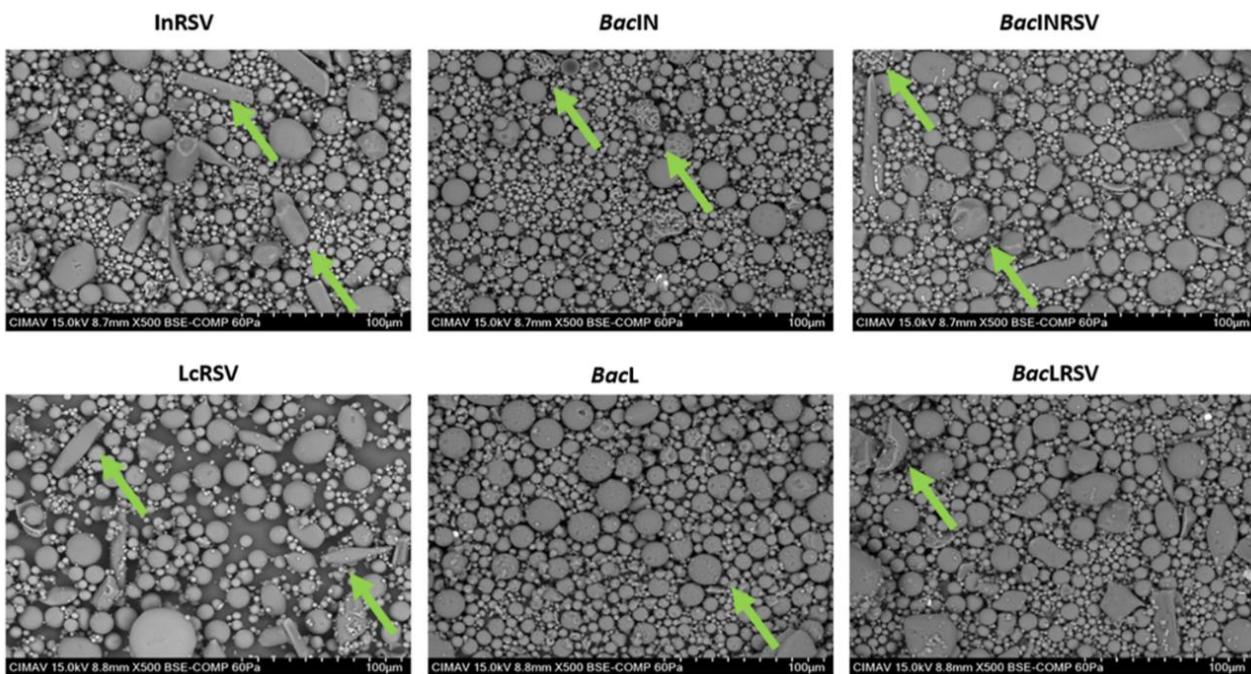


Imagen 1. Morfología microestructural de los seis microencapsulados con los distintos componentes.

InRSV: BacIN, BacINRSV, LcRSV, BacL y BacLRSV

10. RESULTADOS DE LA ETAPA 2

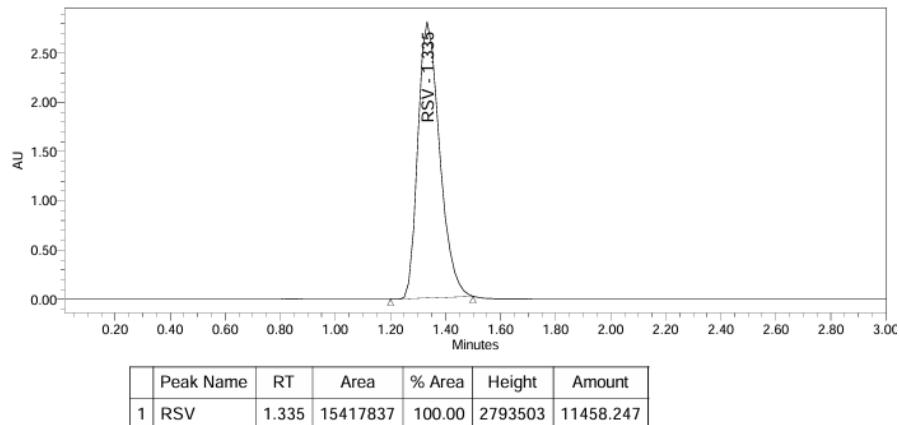
10.1 CUANTIFICACIÓN DE RESVERATROL

Para la cuantificación de la cantidad de resveratrol del microencapsulado (BaCINRSV), se realizó en primer lugar la extracción etanólica del resveratrol desde 1 g de microencapsulado en 20 mL de una mezcla de acetonitrilo-etanol, esta suspensión se colocó en sonicación y agitación constante, hasta que en 2 horas se dejó precipitar la materia insoluble y se filtró en papel Whatman # 1, posteriormente se separó el sobrenadante y se volvió a pasar a través de acrodiscos membrana de polietilentrifluoroetileno (PTFE) de 25 mm y poro de 0.45 μm , marca PALL®, para posteriormente inyectar 10 μL al equipo cromatográfico, cuyas características se detallan en el apartado 7.4.1. Las condiciones cromatográficas se establecieron de la siguiente manera: se seleccionó una columna Zorbax eclipse plus C18, 4.6 x 75 mm y 3.5 micron, Agilen technologies®, una fase móvil de acetonitrilo: agua desionizada (30:70 V/V), a flujo de 1 ml/min y se leyó a una longitud de onda de 360 nm y a temperatura ambiente (25°C). La curva de calibración se realizó utilizando reactivos resveratrol grado reactivo (>99,0%, Química Farmacéutica Esteroidal, México), estableciendo las siguientes concentraciones: 1, 10, 25, 50, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$, que corresponden a 0.1, 1, 2.5, 5.0, 10.0 y 100.0 μg (Imagen 2A). La cromatografía correspondiente al análisis de la muestra, arroja una cantidad de 11458.247g, que corresponde a 2.29 mg/g de resveratrol por peso neto del microencapsulado (Imagen 2B). Para ese peso de 2.29 mg/g (124 mg) representa una perdida del 74% del resveratrol posterior al secado por aspersión.

En este estudio se observó una eficiencia de recuperación de 8 g por ciclo, donde la cantidad inicial fue de 30 g de materia seca (20 g acarreador y 10 g resveratrol), por lo tanto, el rendimiento calculado fue del 26%, tanto las pérdidas de masa, así como las de resveratrol se pueden atribuir a las condiciones del secado, como la temperatura

entrada, flujo de aire e incluso la Tg de los agentes acarreadores (León-Martínez y cols., 2010; Tontul y cols., 2017).

2A



Processing Method: RSV1	Project Name: transRESVERATROL
Processing Method ID: 5371	System: LC_UV
Calibration ID: 5388	Channel: 2487Channel 1

2B

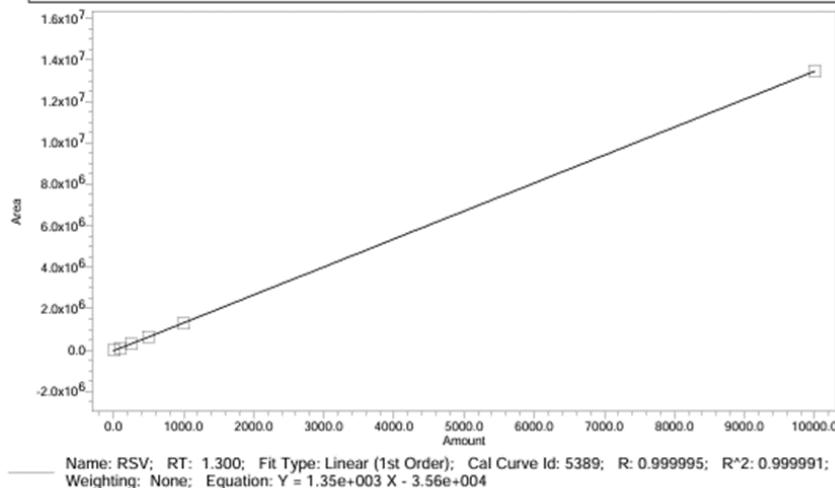


Imagen 2. 2A Muestra correspondiente a la muestra de Resveratrol del microencapsulado BacINRSV.

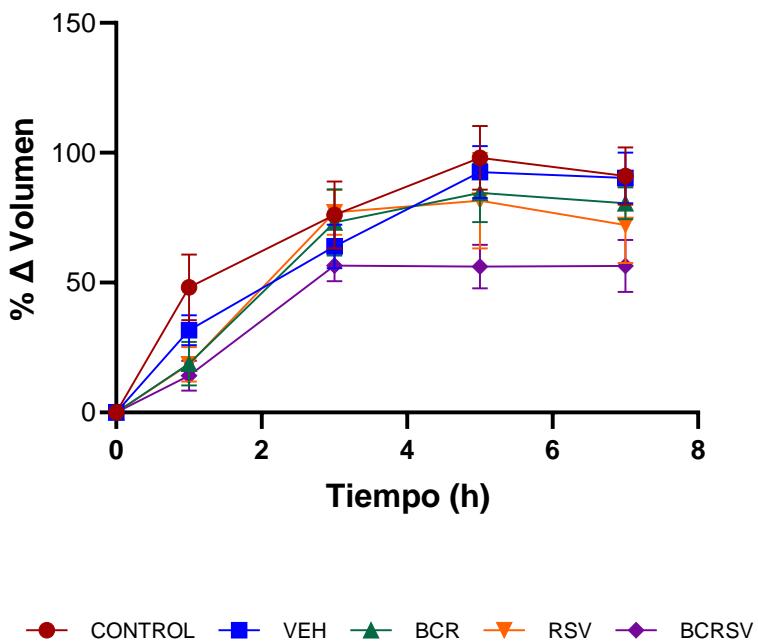
2B. Curva de calibración para cuantificación de resveratrol en CLAR.

10. EVALUACIÓN ANTIINFLAMATORIA *IN-VIVO*

La evaluación del efecto antinflamatorio de los microencapsulados, en modelos *in vivo*, se realizó metodológicamente como ya se mencionó en la sección 7.5 mediante el modelo de inducción de inflamación por carragenina, este modelo ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de proceso inflamatorios subcrónicos, donde un estímulo inicia el proceso inflamatorio *in situ* de la pata de la rata y se puede valorar un efecto de disminución del volumen ante la administración de productos a evaluar.

Esta prueba se caracteriza por presentar 3 fases, la fase temprana de 0 a 2 horas ocurre la liberación de mediadores celulares como histamina y serotonina que inducen permeabilidad vascular permitiendo la acumulación de líquido y activación de células inflamatorias en el área afectada. La fase intermedia de 2 a 4 horas, que continua con la liberación o generación de otros mediadores como bradicinina, que también incrementa la permeabilidad vascular y activa terminales nerviosas periféricas para producir hiperalgesia o dolor. La fase tardía se presenta de 4 a 6 horas, donde la inflamación es sostenida por la liberación de prostaglandinas y otros mediadores derivados del ácido araquidónico, en esta fase se concentran células inflamatorias como neutrófilos en el área de inyección de la carragenina, lo que contribuye al edema y el dolor persistente. Este aumento del edema puede persistir hasta 12 horas (Fehrebacher y cols., 2012).

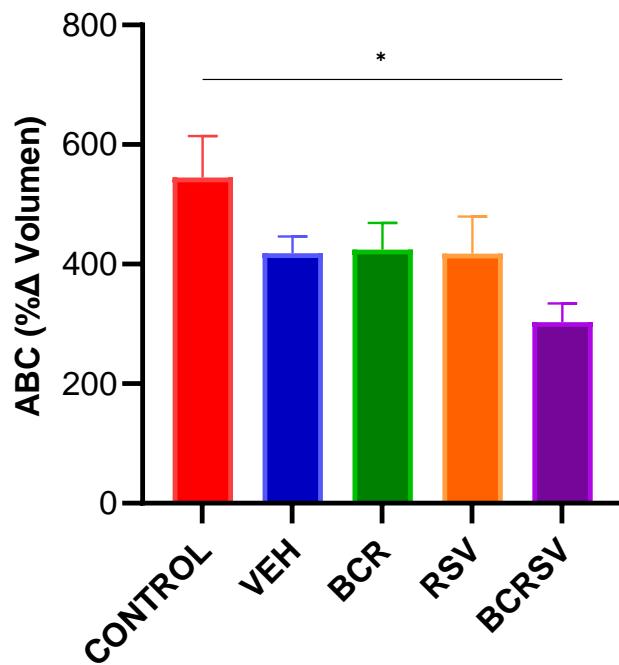
En la Gráfica 5, se muestran los cursos temporales de los grupos experimentales que recibieron de manera oral, BaC (grupo con *Bacillus clausii*), RSV grupo que recibe únicamente resveratrol y un grupo que recibe el microencapsulado BaCSV, comparados con los grupos control (que solo se sometieron al inductor de infamación) y el grupo de vehículo, que recibe únicamente los componentes base del microencapsulado como la inulina. Se observa un incremento del volumen de la pata de la rata después de la administración local de carragenina y un grupo que no presenta un incremento de la misma magnitud. Aunque también se observa una tendencia a disminuir el incremento de volumen en la primera hora, estimando que la absorción del microencapsulado se presenta de manera rápida.



Grafica 5. Cursos temporales del porcentaje del incremento de volumen.

Los datos representan media \pm e.e

Una manera de visualizar la magnitud del efecto general durante todo el periodo de evaluación es el cálculo del área bajo la curva, de tal manera que con ello podemos visualizar e incluso estimar si existe diferencia entre estos tratamientos, como se observa en la Grafica 6. Se observa que todos los grupos tienden a disminuir el porcentaje de volumen, aunque solo existe una disminución importante con el grupo que recibió un tratamiento oral del microencapsulado BCRRSV, que contiene a *Bacillus clausii* y resveratrol, lo cual fue estadísticamente significativo, cuando se compara con el grupo control.



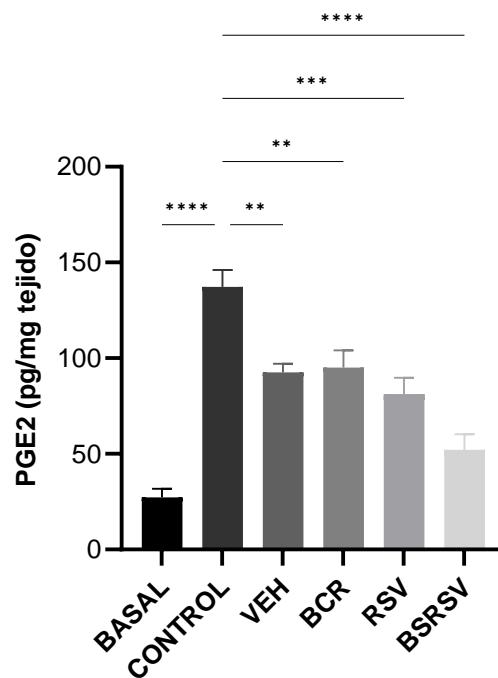
Gráfica 6. Área abajo la curva del efecto inflamatorio. Los datos representan media ± e.e. Diferencia significativa de la muestra control analizada mediante ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey. * p < 0.0169.

10.3 DETERMINACIÓN DE MARCADORES INFLAMATORIOS

Para complementar los resultados observados como los cambios de volumen inducidos por carragenina, estos resultados se complementan con la determinación de marcadores inflamatorios. Como primera opción se eligió la cuantificación de prostaglandinas, dado que son mediadores que se van a sintetizar al inicio del proceso inflamatorio significando un pivote para la generación de otros mediadores como cininas, interleucinas y factores de crecimiento y dado su aporte al proceso en los principales signos clínicos como vasodilatación, permeabilidad capilar, sensibilización periférica neuronal, regulación inmunitaria y fiebre constituye un mediador fundamental

en el proceso inflamatorio, por lo que suele ser una referencia tisular en muchos estudios histológicos (Freire y cols., 2024).

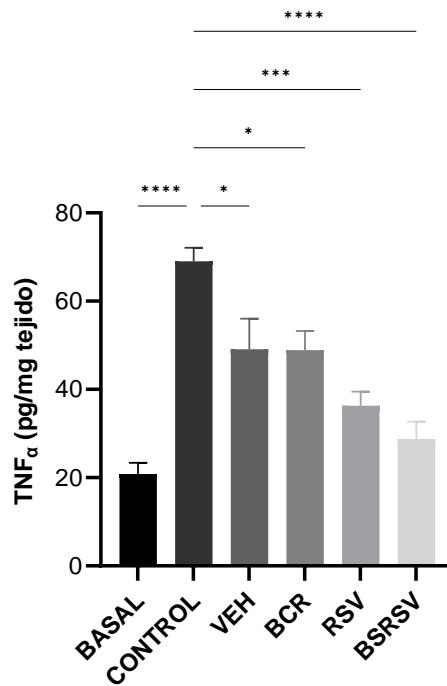
En los resultados que se derivan de los tejidos del cotonete plantar de la rata expuesta al estímulo inflamatorio, expresado en la Grafica 7, se observa que los diferentes tratamientos vehículo (Inulina), bacilo (BC), resveratrol (RSV) y la combinación del bacilo con resveratrol (BCRSV) disminuyeron de manera significativa la cantidad de prostaglandinas tisulares, lo que concuerda con el proceso inflamatorio observado en la Grafica 6.



Gráfica 7. Cuantificación de PGE₂ tisular. Los datos representan media ± e.e. Diferencia significativa de la muestra control analizada mediante ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey.

** p <0.0077, *** p <0.0003, **** p< 0.0001.

Como segunda opción se determinaron las concentraciones tisulares del factor de necrosis tumoral (TNF α), este mediador es una citocina proinflamatoria que se produce desde células inmunológicas como macrófagos, linfocitos T y asesinas naturales (NK), estas se sintetizan desde estímulos infecciosas por activación de lipopolisacáridos y su función en la inflamación es también igual que las PGE₂, desde estados iniciales o inflamación aguda, activando células endoteliales promoviendo la migración leucocitaria, además de que induce la producción de otras citocinas proinflamatorias, quimiocinas y proteínas de fase aguda como la proteína c, que es un marcador de inflamación no específica. Por ello la cuantificación de TNF α tisular también puede ser un marcador más específico de inflamación localizada.



Gráfica 8. Cuantificación de TNF α tisular. Los datos representan media \pm e.e. Diferencia significativa de la muestra control analizada mediante ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey.

* p < 0.0341, ** p < 0.0321, *** p < 0.0002, **** p < 0.0001.

Como se observa en la Grafica 8, la determinación de las concentraciones tisulares de TNF α aumenta significativamente ante un estímulo inflamatorio comprobando el biomodelo de inducción de inflamación por carragenina, sin embargo, después de los tratamientos con vehículo (inulina), Bacilo (BCR), resveratrol (RSV) y la combinación del bacilo con resveratrol (BSRSV), se observa una disminución significativa de este medidor. Sin embargo, solo se puede observar una correlación del efecto antiinflamatorio del grupo que recibió el tratamiento de la combinación del bacilo con resveratrol (BSRSV), observado en la Grafica 6.

11. DISCUSIÓN GENERAL

La elaboración del microencapsulado de *Bacillus clausii* - resveratrol se realizó mediante secado por aspersión, elegido por la versatilidad, ya que permite el proceso de elementos o productos como sustancias químicas, productos farmacéuticos o alimentos, entre otros (Yan y cols., 2022). Además de que esta metodología muestra ventajas importantes en el proceso como rapidez y eficiencia de la producción. En este estudio se observó una eficiencia de recuperación de 26 % tanto de acarreador y de resveratrol, estos valores son comúnmente encontrado en otros procesos, aunque el ideal es una recuperación del 100%, este valor dista mucho en los procesos de equilibrio de masa, en donde otros factores están en juego como la temperatura y flujos (Iqbal y cols., 2021). Aun así, se podría proponer optimizar el procedimiento para alcanzar un 50% de rendimiento.

La elección del agente acarreador se estableció con inulina o lactosa, que son sustancias comúnmente utilizadas, algunas con desventajas, sobre todo si es aplicado a alimentos, la lactosa puede no ser la mejor elección para personas con intolerancia a la lactosa, restándole valor al producto, por lo que aunque se trabajó con

microencapsulados tanto con lactosa como inulina, se elige al final este último, dado la ventaja de ser un polisacárido con propiedades prebióticas e incluso mostrar propiedades anti inflamatorias es un producto benéfico para la salud (Qin y cols., 2023).

Al tratarse de probióticos, la determinación de la viabilidad de las distintas formulaciones de los microencapsulados es una prueba, que indica si las cepas han resistido el proceso, en particular esta prueba se realiza en extensión de paca, que implica la extensión de muestras sobre una placa de siembra, para observar el crecimiento de microrganismos viables en la muestra. Estos resultados concuerdan con otros autores, quienes han analizado la encapsulación de probióticos mediante secado por aspersión con distintos agentes acarreadores, con la finalidad de protegerlos durante el proceso, tal es el caso de Araujo Uribe, quien encontró un aumento de la viabilidad de esporas de *Bacillus polymyxa* en comparación con *Lactobacillus delbruekii* al utilizar un 35% de maltodextrina como acarreador y un porcentaje de aspiración de 60% (De Araujo-Uribe y cols., 2020), así mismo Utami observó que el uso de maltodextrina incrementó la viabilidad de *Bacillus NP5* al someterlo a secado por aspersión con una temperatura de entrada de 120°C y salida de 70°C (Utami y cols., 2020).

Adicionalmente, Romano también evaluó el efecto protector de la inulina sobre *Lactiplantiacillus plantarum* CIDCA 83114 durante el secado por aspersión, con temperaturas de entrada de 160°C y salida de 65° C y encontró una mayor estabilidad conforme la actividad de agua (aw) aumentaba y la temperatura de almacenamiento se aproximaba a la de transición vítrea (Tg) (Yoha y cols., 2020), adicionalmente se ha mostrado que la encapsulación con emulsiones de inulina, pectina, almidón y salvado de arroz, genera redes estables entre inulina y pectina lo cual preserva la encapsulación del probiótico hasta por 90 días (Maleki y cols., 2020).

También se ha encontrado que los fructooligosacáridos (FOS) pueden mejorar la eficacia de encapsulación y conservar el 96% la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* al microencapsular mediante secado por aspersión (Yoha y cols., 2020), así mismo, otros factores que se ha visto pueden condicionar la eficiencia de encapsulación al

usar inulina, proteína de suero y nanocelulosa, son el mantenimiento de la presión osmótica en el entorno intracelular de bacterias y la interacción de proteínas con polisacáridos (Maleki y cols., 2020).

Otras investigaciones han usado lactosa como agente acarreador, no obstante, a causa de la población que presenta intolerancia a la lactosa, ésta representa ciertas limitaciones para su uso (Deng y cols., 2015; Silanikove y cols., 2015; Tang y cols., 2013), sin embargo, autores como Tantratian y Pradeamchai han evaluado la eficacia de diversos carbohidratos como matrices protectoras de *Lactiplantibacillus plantarum* en secado por aspersión y mostraron que carbohidratos con una Tg mayor a 100°C mejoran la viabilidad celular, tal como la lactosa que tiene una Tg de 119.3°C, la cual adicionalmente tiene la capacidad de estabilizar las proteínas de las membranas celulares del probiótico *Lactiplantibacillus plantarum* (Tantratian y cols., 2020), mientras que la inulina puede tener una Tg de 175° C (Mensink y cols., 2015).

El efecto del resveratrol puede ser atribuido al efecto antimicrobiano que el resveratrol puede tener sobre algunas bacterias como *Bacillus Cereus* (Mora-Pale y cols., 2015), observaciones que concuerdan con autores como Ma et al. quienes atribuyen el efecto antibacteriano de resveratrol contra patógenos al inhibir el transporte de electrones, lo cual genera una disminución de la división celular (Ma y cols., 2020). No obstante, los resultados reportados en este trabajo muestran que la concentración de *Bacillus clausii* en las distintas formulaciones (BacIN, BacL, BacINRSV, BacLRSV) posterior al secado por aspersión, presentan las concentraciones necesarias para ejercer un efecto probiótico, la cual debe ser mayor de 1×10^6 UFC/g (De Melo-Pererira y cols., 2018).

Para la actividad antioxidante en las distintas formulaciones microencapsuladas, mediante la disminución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), se observó que los acarreadores tanto la inulina como lactosa no se caracterizan por tener propiedades antioxidantes, algunos estudios han indagado sobre su potencial antioxidante, tal es el caso de Pasqualetti quien observó que la inulina secada por aspersión tuvo una capacidad antioxidante de 0.8 nmolTE/mg en muestras de células de colon, sin embargo la actividad antioxidante se podría atribuir a la reactividad de las células de

colon con las especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia de inulina y no directamente a la actividad del polisacárido (Pasqualetti y cols., 2020); estos resultados que concuerdan con Shang que demostró que la inulina por si sola tiene una actividad antioxidante mínima, pero una vez administrada en un modelo animal la actividad antioxidante aumenta significativamente (Shang y cols., 2018).

La actividad antioxidante de la lactosa también se le ha atribuido a su capacidad de formar productos de en la reacción de Maillard con proteínas (Velasco y cols., 2004), por consiguiente, al ser la lactosa un carbohidrato reductor, tiene la capacidad de interactuar con la espora de *Bacillus clausii* y generar productos de Maillard durante el secado por aspersión, lo cual concuerda con los resultados observados en este estudio, donde ambos microencapsulados, tanto BacIN como BacL, mostraron una mínima actividad antioxidante.

Por otra parte, la evaluación de la morfología de los microencapsulados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), tal como Estevinho lo identificaron al preparar microencapsulados con quitosano que tiene una alta viscosidad (Estevinho y cols., 2020). Así mismo, la temperatura de salida puede ser otro factor para el desarrollo de estructuras irregulares, donde entre mayor sea la temperatura de salida se presentan estructuras más lisas, como lo observó Littringer et al. al evaluar el efecto de la temperatura de salida en el secado por aspersión de sistemas de manitol en la morfología de las partículas y encontró que una temperatura de 102°C genera estructuras lisas en comparación con 67°C donde obtuvo estructuras rugosas (Littringer y cols., 2010), adicionalmente el tipo de agente acarreador también desempeña un papel importante en la morfología, como Tobin et al. lo demostró al evaluar el efecto de la inulina sobre las propiedades estructurales de partículas de proteína de suero y lactosa, e identificó que conforme aumentaba la proporción de inulina las estructuras quebradizas disminuían (Tobin y cols., 2010), resultados que concuerdan con la presencia de estructuras quebradizas en las muestras con lactosa (BacL y Bac LRSV).

Finalmente, todos los microencapsulados de este trabajo presentaron estructuras mayormente lisas, con una temperatura de salida de 70°C, si bien en las micrografías SEM no muestran evidencia clara sobre la presencia de *Bacillus clausii* dentro o fuera de los microencapsulados, los resultados de viabilidad demostraron la conservación de las esporas de la bacterias posterior al proceso de secado, lo cual indica que las bacterias están siendo encapsuladas de manera efectiva, mientras que aquellas fuera del material pudieron ser degradadas y por lo tanto no observables en las micrografías, sin embargo más estudios son necesarios para validar ésta hipótesis.

Es importante señalar también que el método que se utilizó para cuantificar los niveles de resveratrol en el microencapsulado, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), permitió determinar la cantidad que se mantiene sin cambios después del proceso de secado por aspersión. Se determinó la pérdida del 70% de la cantidad de resveratrol, después del proceso de secado por aspersión, resultados similares a los encontrados por Leyva Porras et al., donde encontró una disminución del 90% de resveratrol posterior al secado por aspersión con maltodextrina (Leyva-Porras y cols., 2019).

En general existen una gran cantidad de estudios que se han centrado en el estudio de probióticos en biomodelos de enfermedades gastrointestinales como de colitis, colitis ulcerativa, diarrea, etc. (Peran y cols., 2007; Ladda y cols., 2023; Xie y cols., 2022; Pan y cols., 2022) que precisamente están enfocados en el uso de probióticos como ayuda a la terapia. Pero existen limitados estudios en donde se evaluaron el efecto de probióticos en modelos de inflamación local inducidos por carragenina como el caso de *Lactobacillus fermentum* MCC 2759, *Lactobacillus fermentum* MCC 2760 and *Lactobacillus delbrueckii* MCC 2775, encontrando un porcentaje de inhibición de 15, 14 y 14.8% respectivamente (Archer y cols., 2015). Por otra parte, Amdekar en un estudio en el mismo modelo de inflamación y utilizando la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* encontró un porcentaje de inhibición de 66% y una disminución de citocinas proinflamatorias en suero como interleucinas 6, 1 β , 17, 4 y 10 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Amdekar y cols., 2016).

También existen pocos estudios que impliquen evaluación biológica de las formulaciones de probióticos microencapsulados. En ese sentido se tiene referencia de un primer estudio donde se analiza el efecto de una combinación de *Lactobacillus sporogenes* y *Bifidobacteria bifidum* en solución y microencapsulada, encontrando un porcentaje de inhibición de edema de 37% y 43% respectivamente, en este estudio se observa que un proceso de microencapsulación podría mejorar la formulación para eficientar su efecto biológico (Solanski y cols., 2015). En otro estudio más reciente, se evalúan cepas como *Lactobacillus mucosae* AN1 y *Lactobacillus fermentum* SNR1 en un modelo de inflamación inducida por carragenina y adyuvante de Freund, encontrándose que la administración por vía oral junto con el alimento a ratas, tanto en soluciones o en forma microencapsulada exhiben un porcentaje de inhibición en el grosor de la pata del $85 \pm 13\%$ y del $77 \pm 25\%$, respectivamente, asociado con una regulación negativa de los genes de citocinas proinflamatorias en los tejidos de la pata de rata (Ayyanna y cols., 2018). Estos estudios refuerzan nuestro resultado, puesto que también encuentran efecto antiinflamatorio en cepas de probióticos, en este estudio se encontró que para la cepa de *Bacillus clausii* microencapsulado, mostró un porcentaje de disminución de un 30% y un porcentaje mayor de reducción de 50%, del bacilo junto con resveratrol, cuyo aumento del efecto antiinflamatorio se explica por los efectos aditivos.

La disminución de prostaglandinas y factor de necrosis tumoral tisulares, explica el efecto antiinflamatorio local observado en los grupos experimentales que recibieron el probiótico y la combinación con resveratrol, y esta disminución concuerda con la disminución tisular de estos mediadores en otros estudio como el de Ayyanna y cols. (2018).

12. CONCLUSIONES

En este estudio se diseñó y elaboró un microencapsulado de *Bacillus clausii* y resveratrol (BcRSV), mediante la técnica de secado por aspersión. La optimización de

este proceso se estableció en factores como concentración de *Bacillus clausii*, (10.0 Log10 UFC/g) y resveratrol (10g), el acarreador (20 g de inulina) y de las temperaturas de alimentación: 40 °C, flujo de alimentación de 7 cm³/min, flujo de aire caliente de 28 m³/h, aspiración del 70% y presión de 1,5 bar. Las temperaturas de entrada y salida se fijaron en 210 y 70 °C, respectivamente. Se recuperó un 26% de los compuestos activos iniciales, mostrando una aceptable recuperación.

El microencapsulado BcRSV mediante microscopía electrónica de barrido, presentó una morfología de partículas forma irregular, que resultaron de las correspondientes a las partículas esféricas del rango de 2-25 µm) de resveratrol, pero el acarreador de inulina promueve la presentación de varilla con una longitud de 40-60 µm y 10 µm de diámetro.

Dado que, en el proceso de secado por aspersión, los compuestos activos se someten a temperaturas altas, se realizó la prueba de viabilidad, realizado mediante siembra de diluciones de *Bacillus clausii* (sinuberase ®), como referencia, para obtener las unidades formadoras de colonias del microencapsulado de *Bacillus clausii* y la combinación con resveratrol 8,52 ± 0,10 y 8,62 ± 0,06 Log10 UFC/g, respectivamente. Lo cual comprueba que nuestro probiótico mantiene buena viabilidad en la formulación del microencapsulado BcRSV.

La naturaleza antioxidante del microencapsulado se realizó mediante la prueba de disminución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), lo cual mostró que esta propiedad es principalmente inherente al resveratrol, y se conserva cuando se combina con *Bacillus clausi* al solo disminuir de 27 a 24% actividad de eliminación de radicales. Conservando esta propiedad.

Por último, la evaluación *in vivo* del microencapsulado BcRSV presentó un efecto antiinflamatorio de aproximadamente un 50%, el cual es un resultado de una administración subcrónica de 15 días en ratas wistar, por lo que resultó ser mayor a otras eficacias reportadas para otros probióticos que estriban entre un hasta un 20%, además de sobresalir el efecto que suma el resveratrol en el microencapsulado. Los

niveles tisulares de PGE₂ y TNF- α concuerdan con el efecto antinflamatorio, pues sus niveles se redujeron aproximadamente un 37 y 45 respectivamente.

En cuanto a las perspectivas de este trabajo el estudio de los parámetros farmacocinéticos del microencapsulado, específicamente del resveratrol, así como la evaluación del establecimiento de *Bacillus clausii* a través del análisis de la microbiota intestinal, podría contribuir a atribuir los hallazgos de una manera más certera al microencapsulado, esto derivado de otras variables como los cambios de la microbiota intestinal por la presencia de *Bacillus clausii* o el agente encapsulante con propiedades prebióticas como la inulina, pueden estar influyendo en los resultados observados.

13. BIBLIOGRAFIA

Acosta-Rodríguez-Bueno, C. P., Abreu, Y., Abreu, A. T., Guarner, F., Guno, M. J. V., Pehlivanoglu, E., & Perez, M. (2022). *Bacillus clausii* for gastrointestinal disorders: A narrative literature review. *Advances in Therapy*, 39(11), 4854-4874. <https://doi.org/10.1007/s12325-022-02285-0>

Alamolhodaei, N. S., Tsatsakis, A. M., Ramezani, M., Hayes, A. W., & Karimi, G. (2017). Resveratrol as MDR reversion molecule in breast cancer: An overview. *Food and Chemical Toxicology*, 103, 223-232. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.024>

Archer, A. C., Muthukumar, S. P., & Halami, P. M. (2015). Anti-inflammatory potential of probiotic *Lactobacillus* spp. on carrageenan induced paw edema in Wistar rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.044>

Amdekar, S., & Singh, V. (2016). Studies on anti-inflammatory and analgesic properties of *Lactobacillus rhamnosus* in experimental animal models. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 13(2), 145-150. <https://doi.org/10.1515/jcim-2015-0087>

Amdekar, S., Singh, V., Kumar, A., Sharma, P., & Singh, R. (2014). *Lactobacillus acidophilus* protected organs in experimental arthritis by regulating the pro-inflammatory cytokines. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(4), 471-478. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0396-y>

Ayyanna, R., Ankaiah, D., & Arul, V. (2018). Anti-inflammatory and antioxidant properties of probiotic bacterium *Lactobacillus mucosae* AN1 and *Lactobacillus fermentum* SNR1 in Wistar albino rats. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3063. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03063>

Bjarnason, I., Scarpignato, C., Holmgren, E., Olszewski, M., Rainsford, K. D., & Lanas, A. (2018). Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology*, 154(3), 500-514. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.049>

Bungau, S. G., Behl, T., Singh, A., Sehgal, A., Singh, S., Chigurupati, S., Vijayabalan, S., Das, S., & Palanimuthu, V. R. (2021). Targeting probiotics in rheumatoid arthritis. *Nutrients*, 13(10), 3376. <https://doi.org/10.3390/nu13103376>

Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M. E., Schaeverbeke, T., Delhaes, L., & Pradeu, T. (2017). Protective microbiota: From localized to long-reaching co-immunity. *Frontiers in Immunology*, 8, 1678. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01678>

Davidov-Pardo, G., & McClements, D. J. (2014). Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability, and bioavailability issues. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 88-103.

De Vries, K., Strydom, M., & Steenkamp, V. (2018). Bioavailability of resveratrol: Possibilities for enhancement. *Journal of Herbal Medicine*, 11, 71-77.

Díaz-González, F., & Sánchez-Madrid, F. (2015). NSAIDs: learning new tricks from old drugs. European Journal of Immunology, 45(3), 679-686. <https://doi.org/10.1002/eji.201445222>

De Araujo-Uribe, N., Ruiz-Villadiego, O. S., Montoya-Campuzano, O. I., & Ramírez-Gutiérrez, L. A. (2018). Viability of probiotic bacteria *Bacillus Polymyxa*, *Bacillus Megaterium* and *Lactobacillus Delbruekii* subsp. *bulgaricus* microencapsulated under the spray-drying technique. DYNA, 85(204), 272-276. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n204.61644>

de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. Biotechnology Advances, 36(8), 2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>

Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N., & Fox, M. (2015). Lactose intolerance in adults: Biological mechanism and dietary management. Nutrients, 7(9), 8020-8035. <https://doi.org/10.3390/nu7095380>

Knowles, R. G. (2014). Development of anti-inflammatory drugs – the research and development process. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 114(1), 7-12. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12130>

Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. Trends in Food Science & Technology, 31(2), 138–155. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224413000733>

Freire, M. O., & Van Dyke, T. E. (2013). Natural resolution of inflammation. *Periodontology 2000*, 63(1), 149–164. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23931059/>

Fehrenbacher, J. C., Vasko, M. R., & Duarte, D. B. (2012). Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. *Current Protocols in Pharmacology*, 5(Unit5.4). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0504s56>

Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149–163.

Gholamali Farzi, Masomeh Barati, & Maedeh Gheysipour. (2023). Morphology control in encapsulation. In F. Sefat, G. Farzi, & M. Mozafari (Eds.), *Principles of biomaterials encapsulation: Volume one* (pp. 67-90). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-32-385947-9.00004-X>

Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: A review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(12), 2019–2040. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-020-01474-7>

Guo, Q., Goldenberg, J. Z., Humphrey, C., El Dib, R., & Johnston, B. C. (2019). Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4(CD004827). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004827.pub5>

Gupta, N., Jangid, A. K., Pooja, D., & Kulhari, H. (2019). Inulin: A novel and stretchy polysaccharide tool for biomedical and nutritional applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 852–863.

Hao, J., Zhu, H., Zhang, Z., Yang, S., & Li, H. (2015). Identification of anthocyanins in black rice (*Oryza sativa L.*) by UPLC/Q-TOF-MS and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Journal of Cereal Science*, 64, 92–99. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521015000685>

Ha, H. K., Jeon, N. E., Kim, J. W., Han, K. S., Yun, S. S., Lee, M. R., et al. (2016). Physicochemical characterization and potential prebiotic effect of whey protein isolate/inulin nano complex. *Korean Journal of Food Science of Animal Resources*, 36(2), 267–274. <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=CSSPBQ&py=2016&vnc=v36n2&sp=267>

Hannoodee, S., & Nasuruddin, D. N. (2023). Acute inflammatory response. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://doi.org/10.1038/2064979>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24912386/>

Ho, T. M., Truong, T., & Bhandari, B. (2017). Spray-drying and non-equilibrium states/glass transition. In *Non-equilibrium states and glass transitions in foods: Processing effects and product-specific implications* (pp. 111–136). Elsevier Inc.

Hayrapetyan, H., Abee, T., & Nierop Groot, M. (2016). Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control*, 60, 493-499. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515301626>

Iqbal, R., Liaqat, A., Jahangir Chughtai, M. F., Tanweer, S., Tehseen, S., Ahsan, S., Nadeem, M., Mehmood, T., Ur Rehman, S. J., Saeed, K., Sameed, N., Aziz, S., Tahir,

A. B., & Khaliq, A. (2021). Microencapsulation: A pragmatic approach towards delivery of probiotics in gut. *Journal of Microencapsulation*, 38(6), 437-458. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1949062>

Isticato, R., Ricca, E., & Baccigalupi, L. (2019). Spore adsorption as a nonrecombinant display system for enzymes and antigens. *Journal of Visualized Experiments*, 145, e59102. <https://www.jove.com/video/59102/spore-adsorption-as-nonrecombinant-display-system-for-enzymes>

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>

Khatri, I., Sharma, G., & Subramanian, S. (2019). Composite genome sequence of *Bacillus clausii*, a probiotic commercially available as Enterogermina®, and insights into its probiotic properties. *BMC Microbiology*, 19(1).

Kotowicz, N., Bhardwaj, R. K., Ferreira, W. T., Hong, H. A., Olander, A., Ramirez, J., et al. (2019). Safety and probiotic evaluation of two *Bacillus* strains producing antioxidant compounds. *Beneficial Microbes*, 10(7), 759–771. <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2019.0040>

Lee, N. K., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: Characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1297–1305. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31695928/>

León-Martínez, F. M., Méndez-Lagunas, L. L., & Rodríguez-Ramírez, J. (2010). Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and

characterization. Carbohydrate Polymers, 81(4), 864–870.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710002419>

Leyva-Porras, C., Saavedra-Leos, M. Z., Cervantes-González, E., Aguirre-Bañuelos, P., Silva-Cázarez, M. B., & Álvarez-Salas, C. (2019). Spray drying of blueberry juice-maltodextrin mixtures: Evaluation of processing conditions on content of resveratrol. *Antioxidants*, 8(10). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31581462/>

Liu, X. F., Shao, J. H., Liao, Y. T., Wang, L. N., Jia, Y., Dong, P. J., et al. (2023). Regulation of short-chain fatty acids in the immune system. *Frontiers in Immunology*, 14, 1186892.

Rooks, M. G., & Garrett, W. S. (2016). Gut microbiota, metabolites, and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 341–352.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27231050/>

Littringer, E. M., Mescher, A., Schröttner, H., Walzel, P., Urbanetz, N. A., & Ii, I. (2010). Tailoring particle morphology of spray dried mannitol carrier particles by variation of the outlet temperature. In *Ilas* (pp. 1–5).

Ladda, B., Jantararussamee, C., Pradidarcheep, W., Kasorn, A., Matsathit, U., & Taweechotipatr, M. (2023). Anti-inflammatory and gut microbiota modulating effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Nutrients*, 15(6), 1388. <https://doi.org/10.3390/nu15061388>

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18650913/>

Milajerdi, A., Mousavi, S. M., Sadeghi, A., Salari-Moghaddam, A., Parohan, M., Larijani, B., et al. (2020). The effect of probiotics on inflammatory biomarkers: A meta-analysis

of randomized clinical trials. European Journal of Nutrition, 59(2), 633-649. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01931-8>

Malaguarnera, L. (2019). Influence of resveratrol on the immune response. Nutrients, 11(5), 946. <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/5/946/htm>

Mensink, M. A., Frijlink, H. W., Van Der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. Carbohydrate Polymers, 130, 405-419.

Mora-Pale, M., Bhan, N., Masuko, S., James, P., Wood, J., McCallum, S., et al. (2015). Antimicrobial mechanism of resveratrol-trans-dihydrodimer produced from peroxidase-catalyzed oxidation of resveratrol. Biotechnology and Bioengineering, 112(12), 2417-2428. <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.25686>

Ma, D. S. L., Tan, L. T. H., Chan, K. G., Yap, W. H., Pusparajah, P., Chuah, L. H., et al. (2018). Resveratrol—Potential antibacterial agent against foodborne pathogens. Frontiers in Pharmacology, 9(102). <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00102/full>

Man, A. W. C., Li, H., & Xia, N. (2020). Resveratrol and the interaction between gut microbiota and arterial remodelling. Nutrients, 12(1), 119. <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/1/119/htm>

Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L., & He, J. (2021). Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. Molecules, 26(1), 229. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/1/229/htm>

Maleki, O., Khaledabad, M. A., Amiri, S., Asl, A. K., & Makouie, S. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in whey protein isolate-

crystalline nanocellulose-inulin composite enhanced gastrointestinal survivability. LWT, 126, 109224. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643820302127>

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - A review. International Journal of Food Science & Technology, 41(1), 1-21. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>

Madsen, K. L. (2001). The use of probiotics in gastrointestinal disease. Canadian Journal of Gastroenterology, 15(12), 817-822. <https://doi.org/10.1155/2001/690741>

Nunes, C. dos R., Arantes, M. B., de Faria Pereira, S. M., da Cruz, L. L., de Souza Passos, M., de Moraes, L. P., et al. (2020). Plants as sources of anti-inflammatory agents. Molecules, 25(16), 3726. <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/16/3726/htm>

Nahum, V., & Domb, A. J. (2021). Recent developments in solid lipid microparticles for food ingredients delivery. Foods, 10(2), 400. <https://doi.org/10.3390/foods10020400>

Nicholson, W. L., Fajardo-Cavazos, P., Rebeil, R., Slieman, T. A., Riesenman, P. J., Law, J. F., et al. (2002). Bacterial endospores and their significance in stress resistance. Antonie van Leeuwenhoek, 81(1-4), 27-32. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020561122764>

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science, 1, 1806-1815.

Fuchs, M., Turchioli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., et al. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. Journal of Food Engineering, 75(1), 27-35.

Pan, J., Gong, G., Wang, Q., Shang, J., He, Y., Catania, C., Birnbaum, D., Li, Y., Jia, Z., Zhang, Y., Joshi, N. S., & Guo, J. (2022). A single-cell nanocoating of probiotics for enhanced amelioration of antibiotic-associated diarrhea. *Nature Communications*, 13(1), 2117. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29672-z>

Pahwa, R., Goyal, A., & Jialal, I. (2023). Chronic inflammation. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-32-385947-9.00004-X>

Panettieri, R. A., Schaafsma, D., Amrani, Y., Koziol-White, C., Ostrom, R., & Tliba, O. (2019). Non-genomic effects of glucocorticoids: An updated view. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(1), 38–49. <http://www.cell.com/article/S0165614718302086/fulltext>

Pereira Souza, A. C., Deyse Gurak, P., & Damasceno Ferreira Marczak, L. (2017). Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 186–194.

Pasqualetti, V., Altomare, A., Guarino, M. P. L., Locato, V., Cocca, S., Cimini, S., et al. (2014). Antioxidant activity of inulin and its role in the prevention of human colonic muscle cell impairment induced by lipopolysaccharide mucosal exposure. Blachier F. (Ed.). *PLoS ONE*, 9(5), e98031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098031>

Peran, L., Sierra, S., Comalada, M., Lara-Villoslada, F., Bailón, E., Nieto, A., Concha, A., Olivares, M., Zarzuelo, A., Xaus, J., & Gálvez, J. (2007). A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *British Journal of Nutrition*, 97(1), 96-103. <https://doi.org/10.1017/S0007114507257770>

Qin, Y. Q., Wang, L. Y., Yang, X. Y., Xu, Y. J., Fan, G., Fan, Y. G., Ren, J. N., An, Q., & Li, X. (2023). Inulin: Properties and health benefits. *Food & Function*, 14(7), 2948-2968. <https://doi.org/10.1039/d2fo01096h>

Ragan, M. V., Wala, S. J., Goodman, S. D., Bailey, M. T., & Besner, G. E. (2022). Next-generation probiotic therapy to protect the intestines from injury. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 863949. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.863949>

Ren, Z., Wang, L., Cui, J., Huoc, Z., Xue, J., & Cui, H. (2013). Resveratrol inhibits NF- κ B signaling through suppression of p65 and I κ B kinase activities. *Pharmazie*, 68(8), 689-694.

Rochín-Medina, J. J., Ramírez-Medina, H. K., Rangel-Peraza, J. G., Pineda-Hidalgo, K. V., & Iribé-Arellano, P. (2018). Use of whey as a culture medium for *Bacillus clausii* for the production of protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity. *Food Science and Technology International*, 24(1), 35-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28816527>

Rudzki, L., Stone, T. W., Maes, M., Misiak, B., Samochowiec, J., & Szulc, A. (2021). Gut microbiota-derived vitamins – Underrated powers of a multipotent ally in psychiatric health and disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 107, 110240.

Riesenman, P. J., & Nicholson, W. L. (2000). Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 620-626. <https://aem.asm.org/content/66/2/620>

Sonam, K. S., & Guleria, S. (2017). Synergistic antioxidant activity of natural products. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 2(16), 1-6.

http://www.remedypublications.com/pharmacology-and-pharmaceutics/articles/pdfs_folder/app-v2-id1086.pdf

Rochín-Medina, J. J., Ramírez, K., Rangel-Peraza, J. G., & Bustos-Terrones, Y. A. (2018). Increase of content and bioactivity of total phenolic compounds from spent coffee grounds through solid state fermentation by *Bacillus clausii*. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 915-923. <http://link.springer.com/10.1007/s13197-017-2998-5>

Schett, G., & Neurath, M. F. (2018). Resolution of chronic inflammatory disease: Universal and tissue-specific concepts. *Nature Communications*, 9(1). Available from: /pmc/articles/PMC6093916/

Serhan, C. N., Chiang, N., & Dalli, J. (2015). The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in Immunology*, 27(3), 200-215. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25857211/>

Sinniah, A., Yazid, S., Flower, R. J., Sousa, L. P., Riccardi, C., & Sugimoto, M. (2021). From NSAIDs to glucocorticoids and beyond. *Cells*, 10(12), 3524. <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/12/3524/htm>

Sovak, M. (2001). Grape extract, resveratrol, and its analogs: A review. *Journal of Medicinal Food*, 4(2), 93-105. <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/109662001300341752>

Solanki, H. K., Shah, D. A., Maheriy, P. M., & Patel, C. A. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1277-1282.

Sun, L., & Ye, R. D. (2012). Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(3), 342. Available from: [/pmc/articles/PMC4085652/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4085652/)

Silanikove, N., Leitner, G., & Merin, U. (2015). The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: Global perspectives in evolutional and historical backgrounds. *Nutrients*, 7(9), 7312-7331. <http://www.mdpi.com/2072-6643/7/9/5340>

Tan, S., Ebrahimi, A., Liu, X., & Langrish, T. (2018). Role of templating agents in the spray drying and post-crystallization of lactose for the production of highly porous powders. *Drying Technology*, 36(15), 1882-1891

hang, H. M., Zhou, H. Z., Yang, J. Y., Li, R., Song, H., & Wu, H. X. (2018). In vitro and in vivo antioxidant activities of inulin. *PLoS ONE*, 13(2), e0192273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192273>

Silva, E. K., Zabot, G. L., Bargas, M. A., & Meireles, M. A. A. (2016). Microencapsulation of lipophilic bioactive compounds using prebiotic carbohydrates: Effect of the degree of inulin polymerization. *Carbohydrate Polymers*, 152, 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.072>

Shi, L., Li, Z., Tachikawa, H., Gao, X. D., & Nakanishi, H. (2014). Use of yeast spores for microencapsulation of enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15), 4502–4510. <https://doi.org/10.1128/AEM.00153-14>

Spizzirri, U. G., Altomari, I., Puoci, F., Parisi, O. I., lemma, F., & Picci, N. (2011). Innovative antioxidant thermo-responsive hydrogels by radical grafting of catechin on inulin chain. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.020>

Solanki, H. K., Shah, D. A., Maheriy, P. M., & Patel, C. A. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats. International Journal of Biological Macromolecules, 72, 1277-1282. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.059>

Tian, B., & Liu, J. (2020). Resveratrol: A review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. Journal of the Science of Food and Agriculture, 100(4), 1392–1404. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10152>

Tontul, I., & Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. Trends in Food Science & Technology, 63, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.009>

Trush, E. A., Poluektova, E. A., Beniashvilli, A. G., Shifrin, O. S., Poluektov, Y. M., & Ivashkin, V. T. (2020). The evolution of human probiotics: Challenges and prospects. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 12(4), 1291–1299. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09628-4>

Tantratian, S., & Pradeamchai, M. (2020). Select a protective agent for encapsulation of Lactobacillus plantarum. LWT, 123, 109075. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.109075>

Tolun, A., Altintas, Z., & Artik, N. (2016). Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. Journal of Biotechnology, 239, 23–33.

Tang, C. H., & Li, X. R. (2013). Microencapsulation properties of soy protein isolate: Influence of preheating and/or blending with lactose. Journal of Food Engineering, 117(3), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.034>

Tobin, J. T., Fitzsimons, S. M., Kelly, A. L., Kelly, P. M., Auty, M. A. E., & Fenelon, M. A. (2010). Microparticulation of mixtures of whey protein and inulin. International Journal of Dairy Technology, 63(1), 32–40. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00550.x>

Utami, D. A. S., W, ., & Suprayudi, M. A. (2015). Quality of dried *Bacillus* NP5 and its effect on growth performance of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Pakistan Journal of Biological Sciences, 18(2), 88–93.

Vandewalle, J., Luypaert, A., De Bosscher, K., & Libert, C. (2018). Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. Trends in Endocrinology and Metabolism, 29(1), 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.010>

Velasco, J., Dobarganes, M. C., & Márquez-Ruiz, G. (2004). Antioxidant activity of phenolic compounds in sunflower oil-in-water emulsions containing sodium caseinate and lactose. European Journal of Lipid Science and Technology, 106(5), 325–333

Vasisht, N. (2014). Factors and mechanisms in microencapsulation. In Microencapsulation in the Food Industry (pp. 15-24). Elsevier.

Vera-Santander, V. E., Hernández-Figueroa, R. H., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2023). Health benefits of consuming foods with bacterial probiotics, postbiotics, and their metabolites: A review. Molecules, 28(3), 1230. <https://doi.org/10.3390/molecules28031230>

Wang, Y. H., & Zeng, K. W. (2023). Traditional Chinese medicine natural products as a crucial source of anti-inflammatory drugs: Recent trends and advancements. Disponible en: <https://www.tmrjournals.com/tmr>

Wang, G., Hu, Z., Song, X., Cui, Q., Fu, Q., Jia, R., Zou, Y., Li, L., & Yin, Z. (2017). Analgesic and anti-inflammatory activities of resveratrol through classic models in mice and rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 5197567. <https://doi.org/10.1155/2017/5197567>

Xie, Q., Li, H., Ma, R., Ren, M., Li, Y., Li, J., Chen, H., Chen, Z., Gong, D., & Wang, J. (2022). Effect of Coptis chinensis franch and Magnolia officinalis on intestinal flora and intestinal barrier in a TNBS-induced ulcerative colitis rats model. *Phytomedicine*, 97, 153927. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.153927>

Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U., & Li, H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1633-1646. <https://doi.org/10.1111/bph.13492>

Yiu, J. H. C., Dorweiler, B., & Woo, C. W. (2017). Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: From immunity to metabolism. *Journal of Molecular Medicine*, 95(1), 13-20. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1474-4>

Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Effect of encapsulation methods on the physicochemical properties and the stability of *Lactobacillus plantarum* (NCIM 2083) in synbiotic powders and in-vitro digestion conditions. *Journal of Food Engineering*, 283, 110033. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110033>

Yan, C., Kim, S. R., Ruiz, D. R., & Farmer, J. R. (2022). Microencapsulation for food applications: A review. *ACS Applied Bio Materials*, 5(12), 5497-5512. <https://doi.org/10.1021/acsabm.>

