Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos

Efecto antagónico *in vivo* de la bebida simbiótica de *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose "pitahaya roja" frente *a Listeria monocytogenes*

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR

Brenda Elizabeth BERMUDEZ BARRIENTOS

ASESORES

Mg. Nelson BAUTISTA CRUZ

Mg. Robert Dante ALMONACID ROMAN (Coasesor)

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Bermudez B. Efecto antagónico *in vivo* de la bebida simbiótica de *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose "pitahaya roja" frente a *Listeria monocytogenes* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Brenda Elizabeth Bermudez Barrientos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73115117
URL de ORCID	No aplica
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Nelson Bautista Cruz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10260086
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0932-2332
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Robert Dante Almonacid Roman
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40493000
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4865-3820
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07760326
Miembro del jurado 1	

Nombres y apellidos	Gloria Marina Marín Vallejos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09690135
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Adrian Arturo Intiquilla Quispe
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	71428803
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.4.2. Seguridad alimentaria B.2.4.3. Alimentos funcionales y nutracéuticos
Grupo de investigación	Innovación, desarrollo y evaluación de productos funcionales (IDEPF)
Agencia de financiamiento	Per˙. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. RR N.º 05753-R-21 con código de proyecto PCONFIGI: A21040501
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Microbiología País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Calle: Jr. Puno N°1002- Lima Latitud sur: -12.05572 Longitud oeste : -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022-2024
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Alimentos y bebidas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Efecto antagónico *in vivo* de la bebida simbiótica de *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose "pitahaya roja" frente a *Listeria monocytogenes*

Que presenta la Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos:

BRENDA ELIZABETH BERMUDEZ BARRIENTOS

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado Evaluador, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

18 (DIECIOCHO) APROBADO CON MENCIÓN HONROSA

en conformidad con el Art. 34.° del Reglamento para la obtención Título Profesional de Licenciado (a) en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 04 de diciembre de 2024.

Dr. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Presidente

Mg. Gloria Marina Marín Vallejos
Miembro

Mg. Adrian Arturo Intiquilla Quispe
Miembro

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. DECANA DE AMÉRICA.
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, NELSON BAUTISTA CRUZ, identificado con DNI N°10260086 en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N°000023-2023-D-FFB/UNMSM de la tesis cuyo título es: **Efecto antagónico *in vivo* de la bebida simbiótica de *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose "pitahaya roja" frente a *Listeria monocytogenes***, presentada por la bachiller Brenda Elizabeth Bermudez Barrientos**,** para optar el título profesional de Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 7 % de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, para la obtención del título profesional de Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Jardín Botánico, 27 de noviembre de 2024

UNMSM
Firmado digitalmente por BAUTISTA CRUZ Nelson FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 27.11.2024 14:29:01 -05:00

Firma del asesor
DNI: **10260086**
Nelson Bautista Cruz

DEDICATORIA

A la memoria de mis abuelos, Exaltación Bermudez y Emilia Carbajal, siendo mi mayor fuente de inspiración durante toda esta odisea.

A mis padres Luis Bermudez y Maura Barrientos, quienes, con paciencia, mucho esfuerzo y gran amor han permanecido a mi lado; por ser mi más grande soporte y motivación, gracias a todo su amor me han ayudado a cumplir hoy una meta más en este camino profesional y en la vida.

A mi hermana Milagros Bermudez por su apoyo incondicional, por ser mi confidente y más grande compañía, mi gran soporte para nunca rendirme y seguir siendo su inspiración.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Mg. Nelson Bautista Cruz por la oportunidad, la gran paciencia y el apoyo durante la elaboración de este trabajo de investigación con el fin de inculcar siempre la motivación por la ciencia y el bienestar social.

Al Mg. Robert Almonacid por su apoyo y guía durante la ejecución de esta investigación.

A mi familia, quiénes fueron participes de todo mi desarrollo profesional y estuvieron brindándome su apoyo, junto a sus grandes consejos de aliento y perseverancia para nunca desistir en este camino.

A mis grandes mejores amigas y colegas, Lic. Patricia Tatiana Rudas Bautista y Lic. Mayori Judit Correa Olivos, por su apoyo con el desarrollo y ejecución de este gran proyecto.

A las personas especiales y cercanas, por su apoyo y motivación durante mi paso por la carrera de Ciencia y tecnología de los alimentos.

A los docentes pertenecientes al Departamento Académico de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada por su apoyo y guía dentro de las aulas y sus laboratorios.

A mi gran Alma mater la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su formación y el apoyo con el financiamiento de este trabajo de tesis.

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – RR N.º 05753-R-21 con código de proyecto PCONFIGI: A21040501

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN 14

1.2. Formulación del problema **15**

1.3 Objetivos **15**

1.3.1 Objetivo general 15

1.3.2 Objetivos específicos 15

1.4 Importancia y alcance de la investigación **15**

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA 17

2.1 Antecedentes del estudio 17

2.2 Bases teóricas 19

2.2.1 Listeriosis 19

2.2.2 *Listeria monocytogenes* 19

2.2.3 Mecanismos de patogenicidad de *Listeria monocytogenes.* 20

2.2.4. Antibióticos como solución a las infecciones bacterianas 21

2.2.5 Resistencia bacteriana 21

2.2.6 Mecanismos de resistencia bacteriana 21

2.2.7 Simbióticos 23

2.2.8 Bacteriocinas 24

2.2.9 Estudios *in vivo* 24

2.3 Glosario de términos 26

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES 27

3.1 Hipótesis 27

3.2 Variables 27

3.3 Operacionalización de variables 28

IV. MATERIALES Y MÉTODOS 29

4.1.Consideraciones éticas 29

4.2.Área de estudio 29

4.3.Diseño de investigación 29

4.4 Población y muestra 29

4.4.1 Población de estudio 29

4.4.2 Muestra 30

4.5 Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información 30
4.5.1 Obtención de la bebida simbiótica. 30
4.5.2 Caracterización organoléptica, fisicoquímica y microbiológica de la bebida simbiótica de pulpa de pitahaya roja 30
4.5.3 Adquisición y activación de la cepa patógena 31
4.5.4 Adquisición de animales 31
4.5.5 Preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644TM 31
4.5.6 Evaluación del efecto antagónico *in vivo* de la bebida simbiótica fr*Listeria monocytogenes* 32
4.5.7 Determinación del contenido de bacterias ácido-lácticas, *Listeria monocytogenes y* enterobacterias en heces de los ratones 33
4.5.8 Evaluación de la salud física de los ratones 34
4.6 Análisis estadístico 35
V. RESULTADOS 36
5.1 Caracterización organoléptica, fisicoquímica y microbiológica de la bebida simbiótica de pulpa de pitahaya roja 36
5.2 Determinación del contenido de bacterias ácido-lácticas, Listeria monocytogenes y enterobacterias en heces de los ratones 37
5.2.1 Recuento de bacterias ácido lácticas en heces de los ratones 37
5.2.2 Recuento de *Listeria monocytogenes* en heces de los ratones 40
5.2.3. Recuento de Enterobacterias provenientes de la microbiota nativa en heces de ratones *Mus musculus* en el paso de los días 42
5.3 Evaluación de salud física de los ratones 45
5.3.1 Pesos de los ratones durante el estudio 45
5.3.2 Bienestar general de los ratones 47
5.4 Aspecto físico de las heces de los ratones 49
VI. DISCUSIÓN 52
VII. CONCLUSIONES 57
VIII. RECOMENDACIONES 59
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60
X. ANEXOS (*) 68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización organoléptica de la bebida simbiótica de pulpa de "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose. **.....36**

Tabla 2: Características fisicoquímicas de la bebida simbiótica.**.....36**

Tabla 3. Recuento de probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™ en la bebida simbiótica.**.....36**

Tabla 4. Valores del recuento de bacterias acido lácticas (Log UFC/g) en heces de ratones de los 7 grupos experimentales en el paso de los días. **.....38**

Tabla 5. Recuento de *Listeria monocytogenes* (Log UFC/g) en heces de ratones de los grupos experimentales frente al grupo control en el transcurso de los días.**.....41**

Tabla 6. Recuento de enterobacterias (Log UFC/g) de la microbiota nativa en heces de ratones durante el periodo de experimentación. **.....43**

Tabla 7. Evaluación del bienestar general de los ratones con las dosis de la bebida simbiótica durante los días experimentales.**.....48**

Tabla 8. Evaluación del aspecto físico de heces recolectada en los grupos experimentales con tratamientos de la bebida simbiótica **.....50**

Tabla 9: Resumen del diseño experimental de la investigación **.....68**

Tabla 10. Variación de pesos de ratones de los grupos experimentales en el paso de los días.**.69**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: ciclo de vida de *Listeria monocytogenes* dentro de una célula **.....20**

Figura 2: Mecanismos de resistencia bacteriana **. 22**

Figura 3. Gráfico lineal comparativo del recuento de bacterias acido lácticas (BAL) (Log UFC/g) en heces de ratones en los grupos profilácticos (GP1 y GP2) versus los grupos controles. **.....39**

Figura 4. Gráfico lineal comparativo del recuento de bacterias acido lácticas (BAL) (Log UFC/g) en heces de ratones en los grupos tratamientos (GT1 y GT2) versus los grupos controles. **.....40**

Figura 5. Gráfico lineal comparativo sobre el recuento de enterobacterias (Log UFC/g) de la microbiota nativa en heces de ratones en los grupos profilácticos versus los grupos controles. **44**

Figura 6. Gráfico lineal comparativo del recuento de enterobacterias (Log UFC/g) de la microbiota nativa en heces de ratones en los grupos tratamientos versus los grupos controles. **45**

Figura 7: Comparación de pesos entre los grupos profilácticos y grupos controles en el transcurso de la experimentación**. 46**

Figura 8. Comparación de pesos entre los grupos tratamientos y grupos controles en el transcurso de la experimentación**. 47**

Figura 9. Evaluación de características fisicoquímicas como pH, acidez titulable y sólidos solubles para la bebida simbiótica con pulpa de *Hylocereus monocanthus* (Hort.Ex Lem.) Brintton & Rose "pitahaya roja" **.....70**

Figura 10. Recuento de probióticos de la bebida simbiótica previa a la dosificación a los animales**. 70**

Figura 11. Distribución en jaulas, marcado de los ratones para su identificación (*Mus musculus*) y control de temperatura del ambiente seleccionado. **.....70**

Figura 12. Administración de cepa patógena, recolección de muestras fecales e inducción a la excreta, administración de la bebida simbiótica a los ratones *Mus musculus***. 71**

Figura 13. Recuentos bacterianos en diferentes diluciones, de *Listeria monocytogenes*, Enterobacterias y probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™) **.....71**

Figura 14. Puntuación del bienestar general (salud) y caracterización de las heces de los ratones **.....72**

Figura 15. Resumen ANOVA para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo profiláctico 1 (GP1)**.....72**

Figura 16. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo profiláctico 1 (GP1) **72**

Figura 17. Resumen ANOVA para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo control patógeno (GCP) **72**

Figura 18. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo control patógeno (GCP) **73**

Figura 19. Resumen ANOVA para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo terapéutico 1 (GT1) **73**

Figura 20. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo terapéutico 1 (GT1) **73**

Figura 21. Resumen ANOVA para el recuento de Enterobacterias del grupo profiláctico 1 (GP1) **73**

Figura 22. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de Enterobacterias del grupo profiláctico 1 (GP1) **74**

Figura 23. Resumen ANOVA para el recuento de Enterobacterias del grupo control patógeno (GCP) **74**

Figura 24. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de Enterobacterias del grupo control patógeno (GCP) **74**

Figura 25. Resumen ANOVA para el recuento de Enterobacterias del grupo tratamiento 1 (GT1) **74**

Figura 26. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de Enterobacterias del grupo tratamiento 1 (GT1) **75**

Figura 27. Resumen ANOVA del recuento de probióticos para el grupo profiláctico 1 (GP1) **75**

Figura 28. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) del recuento de probióticos para el grupo profiláctico 1 (GP1) **75**

Figura 29. Resumen ANOVA del recuento de probióticos para el grupo control patógeno (GCP) **75**

Figura 30. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) del grupo control patógeno (GCP) **76**

Figura 31. Resumen ANOVA del recuento de probióticos para el grupo tratamiento 1 (GT1) **76**

Figura 32. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) del recuento de probióticos para el grupo terapéutico 1 (GT1). **76**

ABREVIATURAS

GCP: grupo control patógeno

GCSP: grupos control sin patógeno

GB: grupo control bebida

GP1: grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica suministrada

GP2: grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica suministrada

GT1: grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica suministrada

GT2: grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica suministrada

BAL: bacterias ácido-lácticas

ETA: enfermedades transmitidas por alimentos

FGID: trastornos gastrointestinales funcionales

AMH: análisis microbiológicos de heces

TGF: cólico infantil y/o estreñimiento funcional

BHI: caldo de infusión cerebro-corazón

ETEC*: Escherichia coli* enterotoxigénica

PRO: probióticos

PRE: prebióticos

SYN: simbióticos

INS: Instituto Nacional de Salud

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto antagónico *in vivo* de la bebida simbiótica a base de pulpa de "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose frente a *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™. A la bebida simbiótica se realizó la caracterización organoléptica, fisicoquímica y de viabilidad de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™. Para las evaluaciones *in vivo* se utilizaron 28 ratones macho del género *Mus musculus*, los cuales fueron agrupados en un grupo control sin patógeno (GCSP), un grupo control con patógeno (GCP), dos grupos profilácticos (GP1 y GP2), dos grupos tratamientos (GT1 y GT2) y un grupo control con bebida (GB). Tanto *L. monocytogenes* y la bebida simbiótica fueron administradas por vía oral; la bebida simbiótica fue administrada en dosis de 0,5 y 1% v/p peso de los ratones en los grupos profilácticos, terapéuticos y grupo control bebida. La evaluación del efecto antagónico se realizó mediante los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL), *L. monocytogenes* y enterobacterias en las heces de los animales, asimismo, mediante la evaluación del aspecto físico de las heces, el bienestar y el peso de los animales. El recuento de probióticos en la bebida simbiótica fue de 9,57±0,09 Log UFC/mL para *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y 9,52±0,11 Log UFC/mL para *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™. Los grupos GP1, GT1 y GB mostraron los mayores valores de BAL (11,37±0,15 Log UFC/g, 11,00±0,13 Log UFC/g y 11,42±0,23 Log UFC/g, respectivamente) y el menor valor fue para GCP (6,44±0,45 Log UFC/g). En el recuento de *Listeria monocytogenes*, los grupos GP1 y GT1 (4,56±0,74 Log UFC/g y 3,94±0,30 Log UFC/g respectivamente) presentaron mayores valores y el menor valor fue en GCP (2,98±0,28 Log UFC/g) en las heces. Hubo una disminución en el recuento de enterobacterias en los grupos GP1, GT1 y GB con valores de 3,61±0,21 Log UFC/g, 4,88±0,12 Log UFC/g y 5,54±0,46 Log UFC/g respectivamente; sin embargo, no hubo diferencias significativas en GCSP ($p<0,05$). Respecto al bienestar general, los grupos con las dosis de bebida simbiótica mostraron menores síntomas, con rango inferior a 3 de la escala nominal cualitativa de 4 puntos; por otro lado, los grupos GP1 y GB mostraron un incremento de peso. La bebida simbiótica presenta un potencial efecto antagónico contra *Listeria monocytogenes* en el modelo *in vivo* (*Mus musculus*) bajo el mecanismo de exclusión competitiva inhibiendo la adhesión celular del patógeno.

Palabras clave: efecto antagónico, *in vivo*, probióticos, *Listeria monocytogenes*, *Hylocereus monacanthus,* bebida simbiótica.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the in vivo antagonistic effect of the symbiotic drink based on "red pitahaya" pulp *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose against *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™. The organoleptic, physicochemical and viability characterization of the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ and *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™ was carried out on the synbiotic drink. For *in vivo* evaluations, 28 male mice of the genus *Mus musculus* were used, which were grouped into a control group without pathogen (GCSP), a control group with pathogen (GCP), two prophylactic groups (GP1 and GP2), two treatment groups. (GT1 and GT2) and a control group with drink (GB). Both *L. monocytogenes* and the synbiotic drink were administered orally; The synbiotic drink was administered in doses of 0.5 and 1% v/w weight of the mice in the prophylactic, therapeutic and control drink groups. The evaluation of the antagonistic effect was carried out by means of the counts of lactic acid bacteria (LAB), *L. monocytogenes* and enterobacteria in the feces of the animals, also by evaluating the physical appearance of the feces, the well-being and weight of the animals. animals. The probiotic count in the synbiotic drink was 9.57±0.09 Log UFC/mL for *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ and 9.52±0.11 Log UFC /mL for *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™. The GP1, GT1 and GB groups showed the highest BAL values (11.37±0.15 Log UFC/g, 11.00±0.13 Log UFC/g and 11.42±0.23 Log UFC/g, respectively) and the lowest value was for GCP (6.44±0.45 Log UFC/g). In the *Listeria monocytogenes* count, groups GP1 and GT1 (4.56±0.74 Log UFC/g and 3.94±0.30 Log UFC/g respectively) presented higher values and the lowest value was in GCP (2, 98±0.28 Log UFC/g) in feces. There was a decrease in the Enterobacteriaceae count in the GP1, GT1 and GB groups with values of 3.61±0.21 Log UFC/g, 4.88±0.12 Log UFC/g and 5.54±0.46 Log UFC/g respectively; however, there were no significant differences in GCSP ($p<0.05$). Regarding general well-being, the groups with the doses of synbiotic drink showed fewer symptoms, with a rank lower than 3 on the 4-point qualitative nominal scale; On the other hand, groups GP1 and GB showed an increase in weight. The synbiotic drink presents a potential antagonistic effect against *Listeria monocytogenes* in the *in vivo* model (*Mus musculus*) under the competitive exclusion mechanism, inhibiting cell adhesion of the pathogen.

Keywords: antagonistic effect, *in vivo*, probiotics, *Listeria monocytogenes*, *Hylocereus monacanthus*, symbiotic drink.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son un problema de salud pública en crecimiento (OMS)[1]. Las ETAs en su mayoría son causadas por microorganismos patógenos como *Salmonella spppp., Escherichia coli, Clostridium spp., Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* y *Vibrio cholerae*, considerados como agentes clásicos y *Listeria monocytogenes, Campylobacter sp., y Yersinia sp.* como bacterias emergentes[2]. La OMS estima que cada año en el mundo se desencadenan 600 millones de ETAs debido a la ingestión de alimentos y de agua contaminados, mientras que 420 000 fallecen por esta misma causa; 125 000 defunciones constituyen en niños menores de 5 años[3]. En el Perú, en el 2019 se reportaron un promedio de 47 brotes anuales, 6 098 personas afectadas, 1311 hospitalizados y 29 defunciones en todo el país. El departamento más afectado fue Lima con 22,2 % de los casos[1]. Por otro lado, la listerioris es una enfermedad causada por la bacteria *Listeria monocytogenes*; es una ETA de las más graves, se sabe que 0,1 a 10 casos anuales por un millón de personas padece de esta enfermedad[4]. El 70% de casos afecta a los inmunocomprometidos, neonatos, gestantes, pacientes oncológicos, entre otros[5] .Usualmente en el tratamiento de las ETAs se recomiendan los antibióticos, sin embargo, estos pueden causar una disbiosis en el microbioma de las mucosas y tener efectos adversos importantes, asimismo, en la actualidad la lista de los antibióticos eficaces es cada vez menor por la resistencia que desarrollan los patógenos[67]. Frente a esta situación, existe la necesidad de reducir el uso de antibióticos; una nueva alternativa son el uso de las bacterias del ácido láctico (BAL), en las que se evalúan las capacidades antagónicas, también denominada antibiosis[8] , estos ayudan a la disminución de la proliferación de patógenos transmitidos por alimentos[9]. Los probióticos son incorporados en matrices que contienen compuestos prebióticos, como es el caso de la pulpa de pitahaya roja que contiene naturalmente estos prebióticos dentro de su composición[10]. Existen estudios con probióticos y simbióticos *in vitro*, sin embargo, es necesario realizar los estudios *in vivo*, debido a que estos exploran el potencial de los probióticos y simbióticos de estos al ser utilizados en una gran diversidad de modelos biológicos de diversa complejidad[11], con el fin importante de identificar los niveles seguros de eficacia y toxicidad de alguna dosis con probióticos, o la interacción real y directa de estos con el organismo[11] . En tal sentido, el objetivo del presente trabajo fue realizar el estudio del efecto antagónico de la bebida simbiótica con pulpa de pitahaya roja "*Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose" frente a *Listeria monocytogenes* en ratones, con el fin de sentar las bases para futuras investigaciones a escalas mayores.

1.2. Formulación del problema

¿La bebida simbiótica de *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose "pitahaya roja" tendrá efecto antagónico frente a *Listeria monocytogenes* en un modelo animal?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antagónico *in vivo* de la bebida simbiótica de *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose "pitahaya roja" frente a *Listeria monocytogenes.*

1.3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida simbiótica.
- Determinar el contenido de bacterias ácido-lácticas, *Listeria monocytogenes y* enterobacterias en heces de los ratones.
- Monitorear la salud física de los ratones mediante la observación de su bienestar general, el análisis de las características físicas de las heces y el control del peso.

1.4 Importancia y alcance de la investigación

En los últimos años, es ampliamente reconocido que las ETAs se originan por la ingestión de los alimentos y bebidas contaminados con microorganismos patógenos, impactando a la población[12]. En Perú, hasta el 2019 se notificaron 22 brotes de ETAs en 12 departamentos a nivel nacional, lo que subraya la necesidad de generar conciencia sobre este problema de salud pública. Entre los años 2005-2015 en Perú, se identificaron 29 casos de listeriosis (causada por *Listeria monocytogenes*) en pacientes oncológicos[5], y en 2017 se registraron 4 casos en pacientes gestantes, recomendándose entonces evitar el consumo alimentos no pasteurizados[13]. El tratamiento consiste en el uso de antibióticos, aunque estos medicamentos pueden eliminar a los patógenos, también provocan un desbalance significativo en la microbiota intestinal[14], la cual desempeña funciones cruciales como la síntesis de vitaminas, la digestión de carbohidratos complejos, la contribución a la inmunidad innata y adaptativa, la señalización celular[15]. Se conoce que la reducción drástica de las poblaciones dominantes de microbiota favorece la proliferación de patógenos oportunistas, aumentando el riesgo de enfermedades inflamatorias crónicas[8]. Por otro lado, las bacterias han desarrollado resistencia a los antibióticos[6,7]. El uso de simbióticos se presenta como una excelente alternativa, ya que proporciona múltiples beneficios

a los huéspedes, como la estabilización de la microbiota intestinal alterada, la exclusión competitiva de patógenos y la modulación de las respuestas inmunitarias[16]. En este contexto, esta investigación busca encontrar una nueva solución para combatir las ETAs sin efectos adversos en los consumidores. La bebida servirá para prevenir infecciones intestinales, asimismo para mejorar, restituir y tratar los efectos perjudiciales del patógeno y reducir el uso de antibióticos. Desde el punto de vista social, esta investigación cubre un vacío científico, debido que actualmente no existen estudios de los efectos de los simbióticos frente a los patógenos alimentarios, así como los estudios en modelos *in vivo*. Además, este estudio será una valiosa fuente de información para futuras investigaciones en otros modelos animales, en diferentes matrices vegetales, en escalas mayores como estudios en humanos o con diferentes patógenos trasmitidos por alimentos; contribuyendo significativamente a la sociedad.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Antecedentes del estudio

Astó et al.[17], investigaron el potencial *in sílico, in vitro* e *in vivo* de *Bifidobacterium longum subsp. lomgum* KABP042 y *Pediococcus pentosaceus* KABP041 como probióticos frente a patógenos en bebés. Se utilizaron 36 bebés con síntomas de estreñimiento funcional y/o cólicos infantiles, con edades de 1 a 10 meses. El tratamiento fue por 15 días con una fórmula con contenido de *B. longum* KABP042 y *P. pentosaceus* KABP041(1:1) en aceite de girasol, con dosis de 2×10^{9} UFC/mL de bacterias totales en la primera comida del día. El tratamiento disminuyó la puntuación de gravedad total de trastornos gastrointestinales funcionales, lo cual fue de 3,65 ± 1,48 al inicio y 1,69 ± 1,70 según el análisis ITT al final del tratamiento.

Chen et al.[18], evaluaron los efectos de *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0344. Las pruebas se llevaron a cabo en 40 ratones BALB/c preñadas, divididos aleatoriamente en cuatro grupos: grupo control (GC), grupo control modelo (MC), ambos inyectados con 0,25 mL de buffer fosfato salino vía intragástrica; al grupo de control positivo (PC) se le suministró por vía intravenosa 5 mg/Kg de dexametasona, al grupo terapéutico (GT) se le suministró una dosis de 5×10^{9} UFC/mL de suspensión de *L. plantarum* KLDS 1,0344 por sonda. Tras 24 horas, los ratones fueron sacrificados, para recolectar los tejidos mamarios. Según los resultados demostraron que el tratamiento con *L. plantarum* puede prevenir y proteger contra la mastitis mediante la regulación las vías de activación de la señal NF-kB.

Rodríguez et al.[19], evaluaron el potencial simbiótico de *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 7210 y *Lactobacillus rhamnosus* HN001 con y sin galacto-oligosacáridos, frente a la infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) en lechones post destete. Se utilizaron 96 lechones divididos en cinco grupos de tratamiento: control positivo (CT+), control negativo (CT-), grupo probióticos con dosis de $>3 \times 10^{10}$ UFC/kg de peso corporal (PRO), grupo prebióticos al 5% (PRE), y simbióticos (SYN). Una semana después, se inoculó a los lechones con ETEC con 6 mL (6×10^{9} UFC) por vía oral. En los días 4 y 8 se sacrificaron un lechón por grupo para los análisis de contenido colónico de ETEC y microbiológicos en heces. El grupo simbiótico (SYN) mostró una reducción en el deterioro colónico causado por *E. coli*.

Buddhasiri et al.[20], investigaron los efectos antisalmonella y antiinflamatorios de *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 en ratones. Utilizaron 28 ratones hembra C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, divididos en cuatro grupos: profiláctico (GP), terapéutico (GT), simbiótico (SYN) y grupo control (GC). Los ratones del grupo (GP) recibieron 10^{9} UFC de *L. reuteri* diariamente por 7 días, el grupo (GT) durante 4 días y el grupo (SYM) durante 11 días. Tras los tratamientos, se

indujo a colitis, administrando 10^9 UFC de *Salmonella* por vía oral, un día antes se les dio 100 µL de solución de sulfato de estreptomicina. Los ratones fueron sacrificados al cuarto día de infección para recolección de tejidos. El grupo (SYM) mostró una reducción significativa de *Salmonella* en los tejidos intestinales. Se concluyó que el tratamiento simbiótico es más eficaz contra *Salmonella* debido a la resistencia a la colonización directa e indirecta por parte de *L. reuteri*.

Riaz et al.[21], investigaron la actividad antilistérica de *Lactobacillus brevis MF*179529 en un modelo animal. Formaron cuatro grupos: un grupo control negativo (GC-) grupo expuesto a *L. monocytogenes* con 200 µl de dosis (GP), grupo alimentado con *L. brevis* a 10^9 UFC/mL por vía intragástrica (GT) y un grupo que recibió *L. brevis* durante 3 días antes de la infección con *L. monocytogenes (*GPT*).* Los tratamientos se monitorearon durante 7 días. Los resultados mostraron que el grupo (GPT) presentó signos menores de infección, una reducción en la dispersión y propagación del patógeno en órganos como el hígado, baso e intestino, debido a que al terminó de la experimentación mostraron valores disminuidos de 4,15 Log UFC/mL en hígado y bazo , mientras que en el intestino obtuvo 4,8 Log UFC/mL , mostrando así una reducción del patógeno. En el grupo (GT), aumentaron las bacterias acido lácticas, disminuyendo así a los anaerobios y coliformes. Según los resultados obtenidos, sugieren que *L. brevis* podría ser utilizado como un medio profiláctico efectivo contra la infección por *L. monocytogenes.*

Golić et al.[22] analizaron el efecto antimicrobiano de cultivos probióticos que contenían cepas como *Lactobacillus helveticus* BGRA43, *Lactobacillus fermentum* BGHI14 y *Streptococcus thermophilus* BGVLJ1-44 contra *Clostridium difficile* y *C. perfringens* mediante análisis *in vitro* e *in vivo*. Destacaremos el análisis *in vivo*, se seleccionaron 10 cabras Saanen hembras, infectadas con *C. perfringens* (10^2 -10^3 UFC/g) y se les administró 50 mL del cultivo probiótico mixto (*L. helveticus; L. fermentum y S. thermophilus)* durante 10 días. Se tomaron muestras fecales antes y después del tratamiento. Los resultados mostraron una reducción del número de *C. perfringens* en las muestras de heces, llevándolo por debajo de los niveles de detección, y una mejora en la salud general de las cabras. Concluyeron que el uso de estos cultivos probióticos es potencialmente útil para prevenir infecciones por *C. perfringens* y *C. difficile.*

Ribeiro et al.[23] evaluaron los posibles efectos anti-candida de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 en *Candida albicans* ATCC 18804 mediante modelos *in vitro* e *in vivo*. Se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* en estadio larvario final. Primero se determinó la concentración del inóculo subletal (10^6 UFC/mg). Para evaluar las acciones probióticas, las larvas fueron inoculadas con *L. rhamnosus* o tratados con el sobrenadante de este mediante inyección directa,

y luego se infectaron con *C. albicans*, creando dos grupos de tratamiento y uno control. Los resultados mostraron que solo el 80% de las larvas del grupo tratado con sobrenadante de *L. rhamnosus* + *C. albicans* alcanzaron la supervivencia, mientras que solo el 10% de las larvas tratadas con *L. rhamnosus* + *C. albicans* sobrevivieron, en comparación con el control. Esto demuestra el efecto protector de *L. rhamnosus* frente al patógeno evaluado.

Según los antecedentes, los estudios sobre el efecto antagónico de los probióticos frente a diferentes patógenos, tanto *in vitro* como *in vivo*, han obtenido resultados prometedores. La mayoría de estos estudios se han realizado con probióticos. Sin embargo, los estudios con simbióticos recién están tomando relevancia, por lo cual resalta la importancia de investigar el efecto antagónico *in vivo* de la bebida simbiótica con pulpa de pitahaya roja contra *Listeria monocytogenes*.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Listeriosis

La listeriosis es una infección bacteriana causada por la bacteria conocida como *Listeria monocytogenes*. El principal medio de contaminación es a través de los alimentos, debido a que se encuentra ampliamente diseminada por la naturaleza, estas bacterias se pueden encontrar en el suelo, agua, especies vegetales y en la microbiota intestinal de muchos mamíferos consumidos como alimento para los seres humanos[24]. En la actualidad se considera a esta enfermedad como una de las ETAs más graves, se tiene de 0,1 de 10 casos anuales por millón de personas, valor que depende del país y región; pese a que las cifras son pequeñas, no dejan de ser el foco de preocupación debido a su alta tasa de mortalidad significativa del 20% al 30% [25] en todo el mundo en pacientes inmunocomprometidos, neonatos, gestantes, entre otros[5,4]; debido a que se encuentran entre las muertes más frecuentes por *Listeriosis* invasiva, ocupando la segunda posición, después de la salmonelosis[26] .También colocándose como la quinta zoonosis más frecuentemente observada en Europa después de *Campylobacter, Salmonella, Yersinia y Escherichia coli* enterotoxigénica[27].

2.2.2 *Listeria monocytogenes*

Microorganismo que pertenece a la familia *Listeriaceae*, del género *Listeria*, es un bacilo gram positivo, facultativo, anaerobio[28], catalasa positiva y betahemolítico[29] . Es pequeño de 0,5 µm × 1-2 µm de tamaño, posee una alta resistencia a los cambios de temperatura, soporta rangos de 4-37°C [24] , pH bajo y alto, alta concentración de sal, luz ultravioleta, presencia de biocidas y metales

pesados[30]. Sus principales factores de virulencia se deben a la movilidad intracelular por la polimerización de actina y la capacidad de replicarse a temperaturas de refrigeración, con lo cual causa dificultad a las industrias alimentarias debido al control de los diversos procesos en cadena y parámetros establecidos para evitar la contaminación por esta bacteria[29].

2.2.3 Mecanismos de patogenicidad de *Listeria monocytogenes.*

Cuando *Listeria monocytogenes* ingresa al huésped, generalmente por vía oral, este patógeno se adhieren principalmente a las células epiteliales gastrointestinales a través de la proteína cadherina del huésped, utilizando las proteínas de la pared celular conocidas como internalinas Ay B, las cuales le confieren un alto poder invasivo[25,30]. Una vez dentro de la célula (Figura 1), el patógeno se aloja en la vacuola de fagocitosis y la lisa por acción de la proteína citotóxica denominada listeriolisina (O: LLO). Tras la lisis de la vacuola, la bacteria se multiplica rápidamente en el citoplasma, interrumpiendo los procesos celulares normales y desplazándose por la célula mediante la polimerización de actina en unos de los polos de la célula del huésped. Al empujar la membrana de la célula huésped, forma filopodios que son ingeridos por las células adyacentes, facilitando así su entrada a otras células y repitiendo el ciclo para asegurar su permanencia en el huésped principal[24,29].

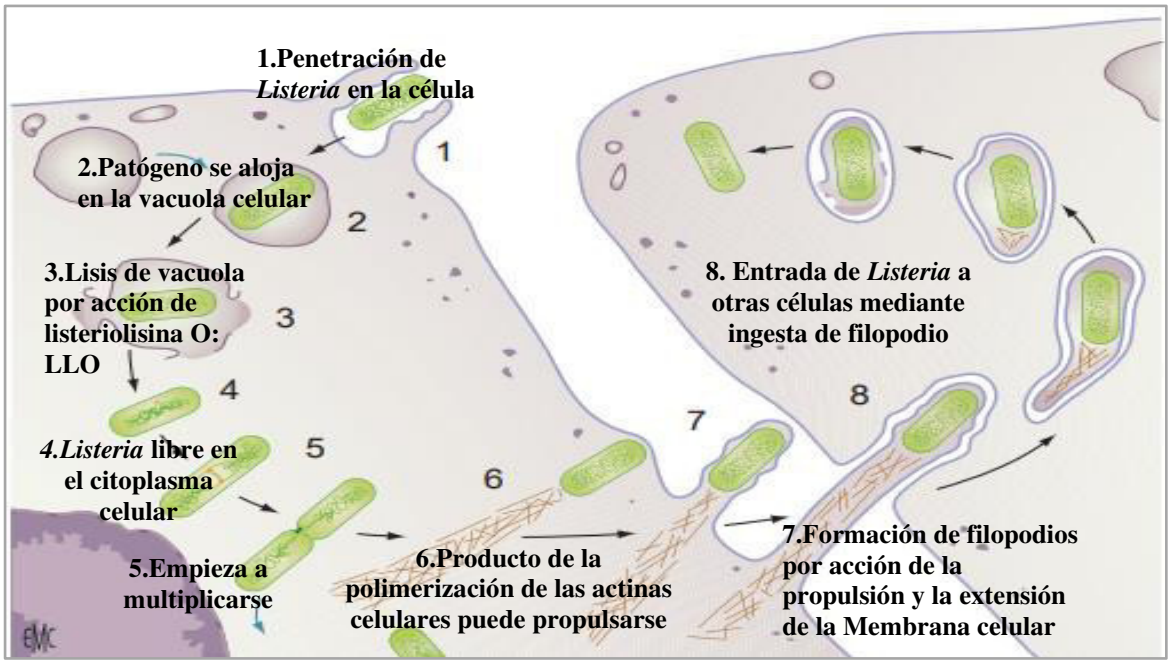


Figura 1*:* ciclo de vida de *Listeria monocytogenes* dentro de una célula [24].

2.2.4. Antibióticos como solución a las infecciones bacterianas

A los largo de los años, los antibióticos han sido ampliamente utilizados en diversos entornos con el fin de inhibir o eliminar el crecimiento de bacterias que generan daños a la salud púbica. Las principales características de un agente antimicrobiano radican en los mecanismos mediante los cuales en las que ejercen su acción. Estos agentes actúan directamente en la síntesis de paredes y membranas bacterianas, la síntesis de proteínas como las de ARN y ADN, también intervienen en el metabolismo del ácido fólico, induciendo así la muerte o inhibición de las células bacterianas[31].

2.2.5 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es una de las problemáticas más preocupantes para la salud publica global, esto debido a que estas infecciones bacterianas no pueden ser contrarrestadas con el tratamiento de antibióticos convencionales[32]. Los principales inconvenientes de la resistencia bacteria, incluyen la generación mayores costos médicos, el incremento y prolongación de las estancias hospitalarias, y el aumento de la mortalidad[33]. Otro aspecto crítico es que lo portadores de genes de resistencia son capaces de compartirlos, creando nuevas bacterias resistentes por mecanismos de conjugación genética[34]. Esto amenaza la capacidad de tratar infecciones comunes y provoca un desequilibrio en la microbiota natural del sistema digestivo[35].

2.2.6 Mecanismos de resistencia bacteriana

La vía natural del mecanismo de acción de los antibióticos es la unión de estas específicamente con sus objetivos con alta afinidad, imposibilitando así la actividad normal del objetivo. Para ello se conoce que las bacterias disponen de 2 tipos de resistencia bacteriana: la intrínseca (natural) y la adquirida por mutaciones genéticas mediante la transferencia horizontal de genes de resistencia[31]. Los mecanismos de resistencia más comunes **(Figura 2)** incluyen cuando ciertas bacterias dificultan la entrada de los antibióticos, otras que los descomponen a través de enzimas, algunas que los eliminan utilizando bombas en sus membranas celulares, o bien, modifican los sitios diana para alterar los objetivos del antibiótico [34].

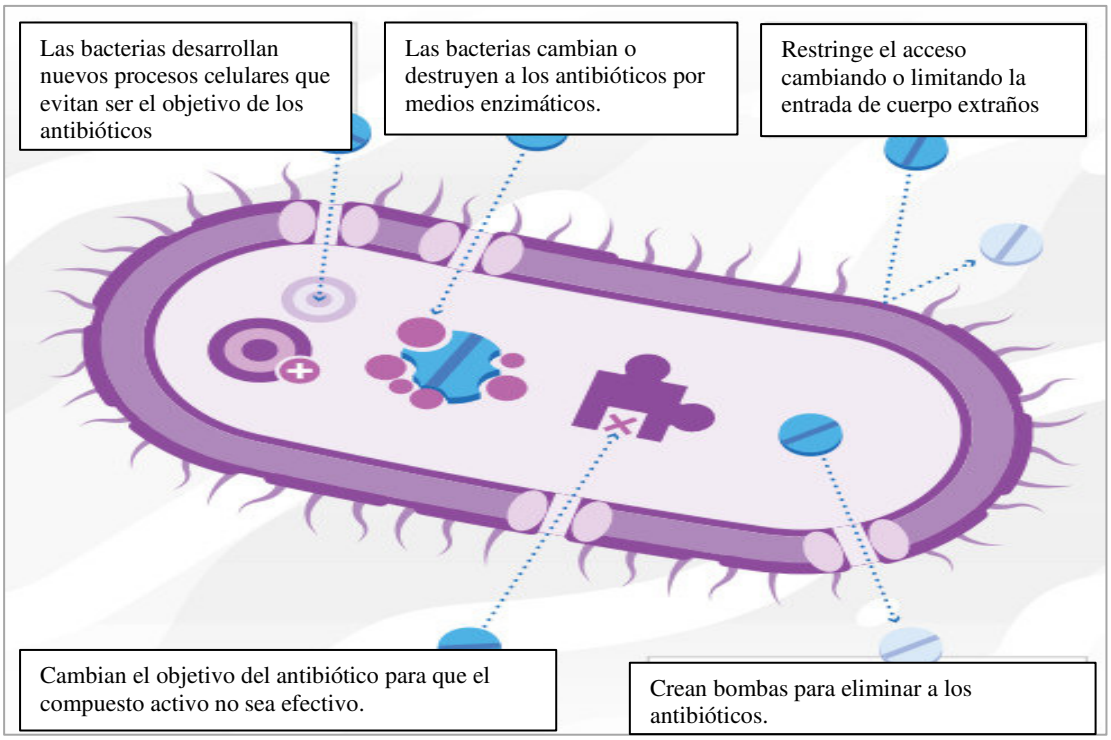


Figura 2: Mecanismo de resistencia bacteriana [34].

2.2.6.1 Resistencia bacteriana intrínseca

Se da en especies bacterianas que tienen la particular capacidad de resistir la acción de los antibióticos debido a las características estructurales o funcionales innatas[36], estas se pueden dar por la permeabilidad reducida o de la expresión de porinas[36] y el aumento del flujo de salida, mediante bombas de expulsión[37]

2.2.6.2. Resistencia bacteriana adquirida

Se considera que la resistencia adquirida ocurre cuando las bacterias desarrollan la capacidad de resistir un agente antimicrobiano específico al que previamente eran sensibles. Esta resistencia se obtiene a través de mutaciones genéticas[38] que son inducidas por la exposición repetida al agente[39].

2.2.6.3 Resistencia bacteriana adaptativa por mutaciones genéticas y por transferencia de ADN

Estos mecanismos se dan por modificación de la posición de los sitios diana (objetivos de alta afinidad), también por la protección del sitio diana por adición de un grupo químico en el lugar diana que no altera la secuencia proteica y la producción de enzimas que desintegran o destruyen a los antibióticos. (Por ejemplo, la inactivación del efecto antibiótico por hidrólisis o por transferencia de un grupo químico)[3640]Por otro lado, algunas bacterias tienen la capacidad de

intercambiar genes a través de la transferencia horizontal, un proceso que consta de tres etapas principales: la transformación, transducción y la conjugación[38].

2.2.6.4 Resistencia de *Listeria monocytogenes* a diferentes antibióticos

En el estudio realizado por Patryk Wiśniewski[41] observó que *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos en Polonia, mostraron resistencia intermedia y resistencia completa a la clindamicina, meropenem, trimetoprima/sulfametoxazol, penicilina G, ciprofloxacino y gentamicina. Pero mostraron sensibilidad a los antibióticos como la ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, rifampicina, tetraciclina y vancomicina[41].

2.2.7 Simbióticos

El término "simbiótico" se utiliza para referirse a productos que contienen una combinación de probióticos y prebióticos. En esta mezcla, los prebióticos tienen un efecto beneficioso de manera selectiva y sinérgica con relación a los probióticos, fomentando así una interacción positiva entre ambos componentes, con el objetivo de favorecer la salud y el equilibrio de la microbiota intestinal[42]. Actualmente, se crearon productos simbióticos con el propósito de abordar los desafíos relacionados a la supervivencia de los probióticos en el tracto gastrointestinal. Además, se busca lograr una implantación más eficiente en el colón. Este enfoque tiene como objetivo de contribuir en la mantención de la homeostasis intestinal, lo que, a su vez favorece la salud del organismo[43].

2.2.7.1 Bebida simbiótica de pulpa de pitahaya roja

Frente a la difusión actual de alimentos simbióticos, se tiene el estudio realizado por Rudas P. (2023)[44] en la que utiliza una matriz vegetal como fuente de simbióticos. En el estudio se elaboró una bebida a base de pulpa de pitahaya roja *"Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose" la cual tiene como inóculos a las cepas probióticas, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™. La bebida obtuvo valores de 11,63 ± 0,04 para *Lactobacillus rhamnosus* y 11,39 ± 0,13 *Lactobacillus acidophilus* respectivamente como fuentes de probióticos[44]. La selección de estos probióticos se basó en las propiedades destacables que poseen las cepas elegidas; *Lactobacillus rhamnosus* tiene una buena capacidad de resistencia para sobrevivir a los pH ácidos del sistema digestivo, aptitud por la cual le permite llegar en concentraciones significativas al intestino; una segunda propiedad destacables es gran capacidad para la adhesión a las mucosas intestinales y la producción de biopelículas que la protegen, lo

ayudaba en obtener una colonización efectiva en el tracto gastrointestinal[45] . Por otro lado, se tiene a *Lactobacillus acidophilus* el cual es un productor ácido láctico y reductor del pH del entorno que lo rodea, otra propiedad de gran importancia es el de secretar sustancias como las bacteriocinas, por último, se le conoce también por ser un promotor del crecimiento de otras BAL debido a su capacidad de metabolizar carbohidratos complejos[45].

Como medio prebiótico en la bebida del estudio se tiene a los fructooligosacáridos propios de la composición de la matriz vegetal, considerado como componentes prebióticos[36]. La importancia de la investigación se basa en ser una nueva alternativa de producto no lácteo consumido para el beneficio y equilibrio del microbiota intestinal.

2.2.8 Bacteriocinas

Las bacteriocinas constituyen un conjunto un conjunto de péptidos antimicrobianos altamente efectivos, los cuales son generados por ciertos microorganismos, incluidas las bacterias del ácido láctico (BAL)[46.] Estos péptidos se producen a nivel ribosomal y han sido empleados durante mucho tiempo en la industria alimentaria[47].

Las BAL, en particular, son reconocidas por sintetizar diversas bacteriocinas con características que las vuelven apropiadas para combatir patógenos; entre estas características se destacan su amplio espectro de actividad antimicrobiana, su resistencia al pH y al calor, así como su naturaleza no tóxica. Estas propiedades hacen que las bacteriocinas sean herramientas valiosas en la inactivación de patógenos, contribuyendo así también a la seguridad alimentaria[48]

2.2.9 Estudios *in vivo*

Los estudios *in vivo* se distinguen principalmente por emplear animales, son una práctica controvertida pero crucial, ya que estos modelos animales son homólogos fisiológicos de los humanos. Esto permite el desarrollo de tratamientos para diversas patologías que afectan a poblaciones en todo el mundo[49]. Actualmente, los estudios *in vivo* son herramientas fundamentales para la detección de enfermedades y el descubrimiento de nuevos fármacos o alternativas terapéuticas. Estos incluyen innovaciones como el uso de los simbióticos, los cuales están comenzando a aplicarse en ensayos clínicos con humanos, abriendo nuevas posibilidades en las investigaciones y el desarrollo de tratamientos[50].

2.2.9.1 Importancia del uso de ratones en estudios *in vivo*

Los ratones de laboratorio *(Mus musculus)* son esenciales en la investigación científica por sus similitudes fisiológicas, patológicas y genéticas con los humanos[51]. Son ampliamente utilizados

en el ámbito de la medicina comparada, ya que permiten aplicar conocimientos obtenidos de una especie para entender procesos similares en otros , convirtiéndolos en modelos valiosos para las investigaciones biomédicas[52]. Su notable capacidad para adaptarse a entornos experimentales controlados los hace ideales para este tipo de estudios. Además, juegan un papel clave en la investigación de las interacciones entre huésped y los patógenos, lo que contribuye al desarrollo de nuevas terapias y tratamientos[53]. Finalmente, el uso de este modelo animal presenta importantes ventajas económicas, ya que por su tamaño reducido y sus características anatómicas permiten que requieran poco espacio y recursos para su mantenimiento[52].

2.2.9.2 Evaluación del bienestar general de ratones *Mus musculus.*

Una forma eficaz de obtener una gran cantidad de información sobre la salud y el bienestar de los animales es a través de la observación y vigilancia constante por parte del investigador. Además, los monitores físicos también contribuyen a evaluar detalladamente el comportamiento animal [54]. La metodología comúnmente empleada incluye el uso de hojas de puntuación, las cuales permiten registrar el comportamiento utilizando puntuaciones basadas en criterios visuales y prácticos predefinidos por el investigador en conjunto con el objetivo del estudio a realizar. Estas evaluaciones suelen asignar puntos que van desde 4 (animal que muestras signos de sufrimiento) hasta 0 (animal en buen estado de salud, sin dificultades) [53]. Los principales criterios para evaluar el bienestar general de los animales incluyen:

- **Apariencia general,** que se evalúa a través de indicadores de comportamiento, como movimientos lentos, cojera, presencia de heridas, o expresiones faciales que indiquen dolor o angustia[54].
- **Recolección de muestras fecales,** utilizadas para realizar de verificación del correcto metabolismo del animales, para pruebas de recuentos bacterianos, análisis de parásitos y pruebas PCR[54].
- **Cambios en el peso corporal,** donde los animales son pesados y sus variaciones se registran, ya que una pérdida de peso significativa (20% a 30%) es un indicador clave de salud general y metabólica. Actualmente, una pérdida de peso en ese rango se considera un criterio humanitario para optar por la eutanasia y evitar el sufrimiento del animal, según lo establecido por las autoridades regulatorias a nivel mundial[53,55].

2.3 Glosario de términos

- **Zoonosis:** son enfermedades infecciosas transmisibles naturalmente desde animales vertebrados al ser humano[56].
- **Homeostasis:** se hace referencia a la tendencia o condición de equilibrio fisiológico autorregulado, cuyo propósito es preservar la funcionalidad apropiada de una forma de vida[57].
- **Fructooligosacáridos:** estos son se componen de oligosacáridos enlazados con glicósidos beta 2,1 fructosil-fructosa; son de origen vegetal. Son conocidos también, como prebiótico debido a la capacidad de fortalecer selectivamente al microbiota intestinal[58].
- **Factores de virulencia:** se conocen como las capacidades de los patógenos al invadir organismos vivos y causar daños, dado que son habilidades que les permiten modular las respuestas inmunitarias a su favor y dificultar así en tratamiento dirigido contra ellos[59].
- **Filopodios:** son extensiones, comúnmente llamadas protuberancias celulares ya que estas tienen forma de dedos; estas estructuras están conformadas por filamentos de actina y cumplen funciones celulares esenciales en los procesos de desarrollo y migración celular [60,61]
- **Biocidas:** son compuestos químicos, los cuales regulan el crecimiento microbiano, a diferencia de los antibióticos, estos no seleccionan objetivos específicos, sino que tienen la capacidad de eliminar bacterias, esporas, hongos y virus[62].
- **Fagocitosis:** es una actividad innata de los organismos pluricelulares, donde los fagocitos desempeñan un papel especializado para facilitar este proceso de manera altamente eficiente. Este fenómeno abarca la ingestión y eliminación de partículas, sustancias o microorganismos extraños presentes en el organismo[63].

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1 Hipótesis

- La bebida simbiótica de *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose "pitahaya roja" tiene efecto antagónico *in vivo* frente a *Listeria monocytogenes*.

3.2 Variables

- **Independiente:**

  Dosis de la bebida simbiótica a base de pulpa de pitahaya roja "*Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose" en muestra animal.

- **Dependiente:**

  Efecto antagónico frente a *Listeria monocytogenes*.

3.3 Operacionalización de variables

VARIBLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
Independiente: Dosis alternadas de la bebida simbiótica en muestra animal	Cuantitativa	Las bebidas simbióticas son productos en los que el componente prebiótico favorece selectivamente al compuesto probiótico y brinda más efectos beneficios para la salud humana[64].	Administración de la bebida simbiótica en dosis de 0,5%–1% en relación al peso de los ratones *Mus musculus*	pH	pH: 3.6-4	-
				Grados Brix	°Brix: 14	g azúcares/ 100 mL
				%Acidez	0,20-0,30	g de ácido láctico/100mL
				Contenido de probióticos	Viabilidad de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* a través del recuento en placas, mayor a 10^8 Log UFC/mL	Log UFC/mL
Dependiente: Efecto antagónico frente a *Listeria monocytogenes*	Cuantitativa	Capacidad de una sustancia de inhibir el crecimiento de bacterias por diferentes mecanismos[8].	Capacidad inhibitoria *in vivo* de la bebida simbiótica frente a *Listeria monocytogenes*	Recuento de las bacterias en las heces de los animales	Cantidad de *Listeria monocytogenes* en heces de los ratones	Log UFC/g
					Cantidad de Enterobacterias en heces de los ratones	Log UFC/g
					Cantidad de bacterias probióticas en heces de los ratones	Log UFC/g
				Evaluación salud física de los animales.	Bienestar general Peso Características de las heces	g y puntuación cualitativa de (0-4 puntos)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Consideraciones éticas

En el estudio no se extrajeron órganos ni se sacrificaron a los animales, solo se trabajó con los recuentos del patógeno *Listeria monocytogenes* y las bacterias ácido lácticas exclusivamente en las heces de los animales. La investigación tomó como referencia la guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio según el INS y el MINSA[65]; así como las Directrices Internacionales para la investigación biomédica que implique el uso de animales (PHS)[66]. Bajo esta premisa, este proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la facultad de Farmacia y bioquímica; el estudio se encuentra certificado con el registro **Nro. 0014-CE-UDI-FFB-2024.**

4.2. Área de estudio

El estudio se realizó en los laboratorios del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicado en Jr. Puno N°1002 - Lima - Perú con coordenadas de Latitud sur: -12.0556133, Longitud oeste: -77.0235747

4.3. Diseño de investigación

Es un diseño experimental, debido a que los datos obtenidos se dieron por la variación de las dosis alternadas de la bebida simbiótica (0,5-1% de bebida) a las muestras animales (variables independientes). Prospectivo, dado que el estudio recolectó datos necesarios a lo largo del desarrollo experimental. Transversal, porque los datos fueron obtenidos en un determinado tiempo. En el siguiente esquema se establecen las 5 etapas de la investigación sobre la Evaluación del efecto antagónico de la bebida simbiótica de *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose "pitahaya roja" en un modelo animal frente a *Listeria monocytogenes.* **(Ver Anexo 1)**

4.4 Población y muestra

4.4.1 Población de estudio

Segundo lote de 30 botellas de bebida simbiótica con pulpa de "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose.

4.4.2 Muestra

Cinco botellas del segundo lote de bebida simbiótica con pulpa de "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose dosificadas en 0,5 y 1% v/p a los ratones.

4.5 Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información

4.5.1 Obtención de la bebida simbiótica.

La bebida simbiótica con pulpa de pitahaya roja, es categorizada como bebida fermentada, debido al proceso de inoculación con las cepas de la experimentación, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™. Se proporcionaron 5 botellas de 350 mL de bebida simbiótica por parte del Grupo de Investigación "Innovación, desarrollo y evaluación de los productos funcionales" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM. Actualmente, la bebida se encuentra en proceso de patente y por lo cual no se describe el proceso de elaboración.

4.5.2 Caracterización organoléptica, fisicoquímica y microbiológica de la bebida simbiótica de pulpa de pitahaya roja

4.5.2.1 Organoléptica

Debido a que bebida simbiótica con pulpa de pitahaya roja fue proporcionada, se realizó un análisis sensorial descriptivo simple[67]por parte del investigador, evaluando los atributos sensoriales como el color, olor, sabor y aspecto general por triplicado; con el fin de realizar un control de calidad del producto brindado[67].

4.5.2.2 Fisicoquímica

Se evaluaron los siguientes ensayos por triplicado:

- **pH:** Se determinó mediante el método potenciométrico. Haciendo uso de un potenciómetro calibrado previamente con tampones de pH 4, 7 y 10 [68].
- **Grados Brix:** Se realizó mediante el método refractrométrico, se filtró la bebida con papel filtro, luego se añadió una gota del filtrado en el refractómetro previamente calibrado con agua destilada[68].
- **% Acidez:** Se utilizó el método volumétrico. Se colocó 5 mL de la bebida simbiótica en un Erlenmeyer, se agregó 50 mL de agua destilada, se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta pH 8,2. El porcentaje de acidez se expresó como mL ácido láctico/100 mL de la bebida simbiótica[68].

4.5.2.3 Recuento de bacterias ácido lácticas en la bebida simbiótica

La numeración de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™ se realizó mediante el recuentro en placas en agar MRS, se realizó al término de la fermentación, cuando se adquirió la muestra . Se tomaron 10 mL de la bebida simbiótica y se mezclaron en un frasco con 90 mL de suero fisiológico estéril para obtener la primera dilución 10^{-1}, posteriormente se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a 10^{-9}. Se tomó 1 mL de las 4 últimas diluciones y se transfirieron a placas Petri, vertiéndose 24 mL de agar MRS a 45 °C, se homogenizó con movimiento circulares en sentido horario y antihorario. Tras dejar solidificar el agar, fueron incubados a 37ºC por unas 48 horas en condiciones anaeróbicas usando una jarra de anaerobiosis[69] . El ensayo se realizó por triplicado. Para contar las colonias de *Lactobacillus rhamnosus,* se tomaron las placas con colonias blancas, grandes y de bordes regulares que contengan de 30 a 300 colonias. En cambio, para *Lactobacillus acidophilus,* se tomaron aquellas placas con colonias cremas, pequeñas de bordes irregulares que contengan de 30 a 300 colonias, los resultados se expresaron en UFC/mL[69].

4.5.3 Adquisición y activación de la cepa patógena

La cepa liofilizada *de Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™ fue adquirida en GenLab; para su activación se utilizó el caldo de infusión cerebro corazón (BHI) a 37ºC durante 18-24 horas. Al término de este periodo se sembró en agar tripticasa soya (TSA) y se incubó a 37°C por 48 horas[21].

4.5.4 Adquisición de animales

Una semana previa al inicio de los ensayos experimentales se adquirieron ratones albinos sanos (*Mus musculus*) cepa BALC/c , de 3 a 4 semanas de edad en el Instituto nacional de salud (INS), ubicados en: Av. Defensores del Morro 2268 (Ex Huaylas) - Chorrillos, Lima. Como medio de validación, a los animales se les realizó el control de *Listeria monocytogenes* en las heces para garantizar su ausencia.

4.5.5 Preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644TM

Para el inóculo de *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644TM se cultivó en el agar cerebro corazón (BHI), se incubó a 37°C por un tiempo de 24-48 horas[70] , posteriormente, se preparó la suspensión celular del patógeno en suero fisiológico a una concentración de

10^5 UFC/mL[70]. A los grupos experimentales infectados con *Listeria monocytogenes*, se administró una dosis de 500 µL de una suspensión del patógeno por vía oral.

4.5.6 Evaluación del efecto antagónico *in vivo* de la bebida simbiótica frente a *Listeria monocytogenes*

En el estudio se utilizaron un total de 28 ratones macho del género *Mus musculus*, con edades de 3 a 4 semanas, y pesos de entre 25-35 g. Los ratones fueron mantenidos en un ambiente con temperatura controlada a 28 ± 2 °C con fotoperíodos de 12 horas ciclos de luz/oscuridad, además fueron alojados en jaulas de tamaño estándar, mientras que la dieta basal y el agua dulce se proporcionaron *ad libitum*[21].

4.5.6.1 Diseño experimental

La experimentación tuvo una duración de 17 días en la cual los animales fueron sometidos a diversas dietas después de un periodo de adaptación de 7 días[19].

Los ratones fueron divididos en 7 grupos:

- Grupo control patógeno (GCP): dosis de *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™.
- Grupos control sin patógeno (GCSP); sin dosis de *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™.
- Grupo control bebida (GB): con dosis de bebida simbiótica al 1% v/p del ratón.
- Grupo profiláctico 1 (GP1): con dosis de bebida simbiótica suministrada con 1%v/p del ratón + 500 µLde *L. monocytogenes*
- Grupo profiláctico 2 (GP2): con dosis de bebida simbiótica suministrada con 0,5% v/p del ratón + 500 µL de *L. monocytogenes*
- Grupo tratamiento 1 (GT1): con dosis de bebida simbiótica suministrada con 1% v/p del ratón + 500 µL de *L. monocytogenes*
- Grupo tratamiento 2 (GT2): con dosis de bebida simbiótica suministrada con 0,5% v/p del ratón + 500 µL de *L. monocytogenes*

Al grupo control con patógeno (GCP) se le administró la dosis de 500 µL de *L. monocytogenes* por vía oral en el día 4 de la experimentación, al grupo control sin patógeno (GCSP) no se le administró ninguna dosis desde el primer día de la experimentación (día 0); al grupo control bebida (GB) sólo se le administró la bebida simbiótica en una dosis del 1% v/p del ratón desde el inicio de la experimentación; a los grupos profilácticos (GP1 y GP2), se les suministró las 2 dosis (1% y 0,5%

respectivamente) de la bebida simbiótica con 4 días antes de la infección con *Listeria monocytogenes* (día 0). Para los grupos tratamientos (GT1 y GT2), tras haber transcurrido las 24 horas de haber sido infectados con el patógeno (día 5), se les administró diariamente la bebida simbiótica en dosis de 1% y 0,5% v/p del ratón respectivamente. El grupo control sin patógeno (GCSP) fue alimentado solo con suero fisiológico estéril y alimento balanceado[20]. Para validar la carga microbiológica inicial de los animales experimentales, a cada grupo de ratones se les realizó el control *Listeria monocytogenes* en las heces.

4.5.6.2 Recolección y acondicionamiento de muestras de heces de los ratones

Las muestras de heces se recogieron asépticamente después de la defecación espontánea o mediante estimulación diaria[19], para los posteriores ensayos como recuento de patógenos y probióticos.

4.5.7 Determinación del contenido de bacterias ácido-lácticas, *Listeria monocytogenes y* enterobacterias en heces de los ratones

4.5.7.1 Recuento combinado de bacterias ácido lácticas en heces de los ratones

Se realizó el primer recuento, en el día 1 de la semana de adaptación de los ratones, considerado como día 0. Posteriormente se realizaban los recuentos cada 2 días, hasta el término de la experimentación (día 17). Se tomaron muestras 0,5 g de heces y se homogenizaron en 4,5 mL de solución salina estéril con un homogeneizador durante 90 segundos. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-10} en solución salina estéril[22] . El recuento de la bacteria ácido lácticas se realizó en placas con agar MRS. Se tomó 1 mL de las 3 últimas diluciones (10^{-8} a 10^{-10}) se colocó en las placas y se mezcló con 24 mL de agar MRS a 45 °C, se vertió en una placa, posteriormente se homogenizó con movimiento circulares en sentido horario y antihorario, por último, se incubaron a 37ºC por 48 horas en condiciones anaerobias[69]. Para el recuento de UFC se tomaron aquellas placas que contengan de 30 a 300 colonias[69].

4.5.7.2 Recuento de *Listeria monocytogenes* en heces de los ratones

Se realizó un recuento inicial considerado como día 0, en el día 1 de la semana de adaptación de los ratones. Posteriormente se realizó los recuentos al día 5, tras haber cumplido las 24 horas de la administración del patógeno (día 4); los recuentos posteriores se realizaron cada 2 días. Se tomaban muestras de 0,5 g de heces y se homogenizaron en

4,5 mL de solución salina estéril con un homogeneizador durante 90 segundos. Se realizarán diluciones seriadas hasta 10^{-10} en solución salina estéril[22]. Para el recuento de *Listeria monocytogenes* se utilizó el agar Oxford, para ello se colocó 100 µL de las 4 últimas diluciones (10^{-7} a 10^{-10}) de la muestra fecal, se realizó por extensión por toda la superficie del medio y se incubó a 37°C durante 24 a 48 horas[71].

4.5.7.3 Recuento de enterobacterias en heces de los ratones

Adicionalmente se realizó el recuento de enterobacterias propias del microbiota intestinal del animal. Se realizó el primer recuento, en el día 1 de la semana de adaptación de los ratones, considerado como día 0; los recuentos posteriores se realizaron cada 2 días**.** Se utilizó agar MacConkey, se tomó 100 µL de las 3 últimas diluciones (10^{-8} a 10^{-10}), y se colocó en placas Petri, se adicionó el agar licuado a 45°C, posteriormente se homogenizó con movimientos circulares en sentido horario y antihorario. Las placas, fueron incubados a 37ºC por 48 horas en condiciones aerobias. Las placas con 30 a 300 colonias fueron consideras para el recuento[72].

4.5.8 Evaluación de la salud física de los ratones

4.5.8.1 Evaluación física de heces de los ratones

La evaluación física de las muestras fecales se realizó diariamente para determinar cambios posteriores a la inoculación con los patógenos. La escala que se utilizó constó de 4 puntos en las que se describió el aspecto físico de las heces, los cuales fueron: 1 sólidas y terrosas, 2 suave con forma definida y abundante, 3 muy blando, poca definición de forma y color claro, 4 acuoso, con textura semilíquida o con presencia de sangre[19].

4.5.8.2 Evaluación de bienestar general de los ratones

Los ratones fueron observados diariamente durante el trascurso de la experimentación y se anotaron todos los signos o síntomas clínicos de infección que puedan padecer durante el paso de los días. Se verificó el movimiento del animal, estado del pelaje, la deshidratación y la actividad al alimentarse, estos síntomas fueron puntuados y calificado de 0 a 4. Las puntuaciones representaron los siguientes atributos físicos como: 0 el animal se muestra activo en alerta y no muestra signos de malestar; 1 comienzo de pelaje activo, erizado y con indicios de embalonamiento abdominal; 2 pelaje ondulado, erizado con el abdomen pronunciado y circunflejo, 3 inicios del pelaje activo y con volantes y muestra

signos de aletargamiento, 4 el animal se muestra con la espalda circunfleja, ojos cerrados y hundidos y con heridas cutáneas visibles[21].

4.5.8.3 Evaluación de peso en los ratones

Los ratones fueron pesados el día 0 y se registraron los pesos corporales iniciales. Al finalizar la semana de acondicionamiento, los animales fueron pesados dos veces por semana antes de la inoculación; después de la infección con *Listeria monocytogenes*, todos los ratones se pesaron y evaluaron dos veces por semana, hasta el término de la experimentación[73].

4.6 Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre los tratamientos fueron analizadas mediante la prueba ANOVA, seguida de una comparación entre las medias utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan con un porcentaje de confianza de 95% ($p<0,05$), usando el software *Statgraphics Centurion* XVIII.

V. RESULTADOS

5.1 Caracterización organoléptica, fisicoquímica y microbiológica de la bebida simbiótica de pulpa de pitahaya roja

La Tabla 1 muestra los detalles en cuanto a los atributos sensoriales evaluados, la presencia de un sabor dulce, color rojo violeta, olor característico al fruto y textura ligeramente viscosa.

Tabla 1. Caracterización organoléptica de la bebida simbiótica de pulpa de "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose.

Atributos	Bebida simbiótica
Sabor	Dulce
Color	Rojo violeta
Olor	Característico al fruto
Aspecto General	Suave con ligera viscosidad

Realizado por triplicado (n=3)

La Tabla 2 muestra que, la bebida simbiótica tiene un pH ácido (3,76 ± 0,02), una acidez titulable de 0,85 ± 0,036 % expresado en ácido láctico y un valor de sólidos solubles con de 13,9 ± 0,1 °Brix.

Tabla 2: Características fisicoquímicas de la bebida simbiótica.

Características	Valores
pH	3,76 ± 0,02
Acidez titulable (% ácido láctico)	0,85 ± 0,036
Sólidos solubles (°Brix)	13,9 ± 0,1

Resultados expresados como media ± desviación estándar (n=3)

La Tabla 3 evidencia que, la bebida simbiótica presentó una concentración de 9,57±0,11 Log UFC/mL para *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y 9,52±0,09 Log UFC/mL para *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™.

Tabla 3. Recuento de probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™ en la bebida simbiótica.

Probióticos	Resultados (Log UFC/mL)
Lactobacillus rhamnosus ATCC® 53103™	9,57±0,11
Lactobacillus acidophilus ATCC® 4356™	9,52±0,09

Resultados expresados como media ± desviación estándar (n=3)

5.2 Determinación del contenido de bacterias ácido-lácticas, *Listeria monocytogenes* y enterobacterias en heces de los ratones

5.2.1 Recuento de bacterias ácido lácticas en heces de los ratones

La Tabla 4 muestra el recuento de BAL en heces de ratones durante el periodo experimental; el grupo control bebida (GB) mostró un aumento de la cantidad de BAL entre los días 11 y 17, con valores de 11,24±0,46 Log UFC/g, y 11,42±0,23 Log UFC/g, respectivamente. Por otro lado, el grupo control patógeno (GCP) tuvo una disminución desde el día 5 hasta el día 17, alcanzando un valor mínimo de concentración de BAL de 6,44±0,45 Log UFC/g. En lo que respecta a los grupos profilácticos (GP1 y GP2) y grupos tratamientos (GT1 y GT2), se observaron diferencias significativas bajo las pruebas estadísticas de Duncan ($p<0,05$), con excepción del grupo tratamiento 2 (GP2) con dosis de 0,5% de bebida simbiótica; los 3 grupos restantes presentaron variación significativa desde los días 3 y 5, respondiendo al enfrentamiento con el patógeno *Listeria monocytogenes*. El grupo profiláctico 1 (GP1 + 1% de bebida simbiótica) destacó frente a todos los grupos, debido a que alcanzó un valor de 11,47±0,30 Log UFC/g de BAL en toda la tabla, solo encontrándose por debajo del grupo control bebida (GB) en el día 17 de la experimentación.

Tabla 4. Valores del recuento de bacterias acido lácticas (Log UFC/g) en heces de ratones de los 7 grupos experimentales en el paso de los días.

Días	Grupo control sin patógeno (GCSP)	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	Grupo profiláctico + 0,5 % de bebida simbiótica (GP2)	Grupo control patógeno (GCP)	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	Grupo control bebida (GB)
0	9,13±1,15^{a}	9,15±1,06^{d}	9,13±1,08^{b}	9,15±1,07^{a}	9,13±1,12^{c}	9,11±1, 11^{a}	9,15±1,12^{d}
1	9,42±0,60^{a}	9,70±0,69^{cd}	9,86±0,25^{ab}	9,23±0,57^{a}	9,36±0,55^{c}	9,22±0,83^{a}	9,69±0,58^{cd}
3	9,65±0,11^{a}	10,42±0,25^{abc}	9,97±0,16^{ab}	9,16±0,52^{a}	9,45±0,62^{bc}	9,32±0,60^{a}	9,93±0,25^{bcd}
5	9,76±0,09^{a}	9,94±0,24^{bcd}	9,30±0,20^{ab}	8,92±0,61^{ab}	9,32±0,62^{c}	9,07±0,12^{a}	10,96±0,25^{abc}
7	9,88±0,18^{a}	10,15±0,09^{bcd}	9,18±0,09^{ab}	7,73±0,87^{abc}	9,29±0,20^{c}	9,25±0,96^{a}	10,83±0,75^{abc}
9	9,91±0,09^{a}	10,23±0,33^{bcd}	9,84±0,30^{ab}	7,61±0,53^{abc}	9,8±0,11^{abc}	9,63±0,15^{a}	11,08±0,30^{abc}
11	9,97±0,25^{a}	10,98±0,14^{ab}	9,37±0,66^{ab}	7,17±1,16^{bc}	9,64±0,04^{bc}	9,66±0,36^{a}	11,24±0,46^{ab}
13	9,96±0,16^{a}	10,72±0,23^{abc}	9,99±0,13^{ab}	7,23±0,93^{bc}	10,36±0,37^{abc}	9,95±0,49^{a}	11,18±0,54^{ab}
15	9,89±0,31^{a}	11,01±0,20^{ab}	9,85±0,21^{ab}	7,28±0,54^{bc}	10,70±0,28^{ab}	10,38±0,57^{a}	11,25±0,60^{ab}
17	9,95±0,21^{a}	11,37±0,15^{a}	10,23±0,08^{a}	6,44±0,45^{c}	11,00±0,13^{a}	10,52±0,46^{a}	11,42±0,23^{a}

Los superíndices (a, b, c y d) en las columnas muestran las diferencias significativas entre los valores del recuento de BAL según a la prueba estadística Duncan ($p < 0,05$)

La Figura 3, muestra que el grupo control bebida (GB) experimenta un aumento constante en la cantidad de BAL a partir del día 9 en adelante, alcanzando un máximo de 11,42±0,15 Log UFC/g en el último día. En contraste, el grupo control patógeno (GCP) experimentó un crecimiento gradual sin cambios significativos y una tendencia a la disminución desde el día 3, llegando a un mínimo de 6,44±0,45 Log UFC/g de BAL en el día 17, siendo este el valor más bajo de toda la tabla. En cuanto a los grupos profilácticos (GP1 y GP2), se observaron variaciones en las concentraciones de BAL, debido a que el grupo (GP1) con dosis de 1% de bebida simbiótica, mostró mejores resultados frente a los del grupo (GP2); GP1 tuvo valores de 11,01±0,20 Log UFC/g y 11,37±0,15 Log UFC/g en los días 15 y 17 respectivamente.

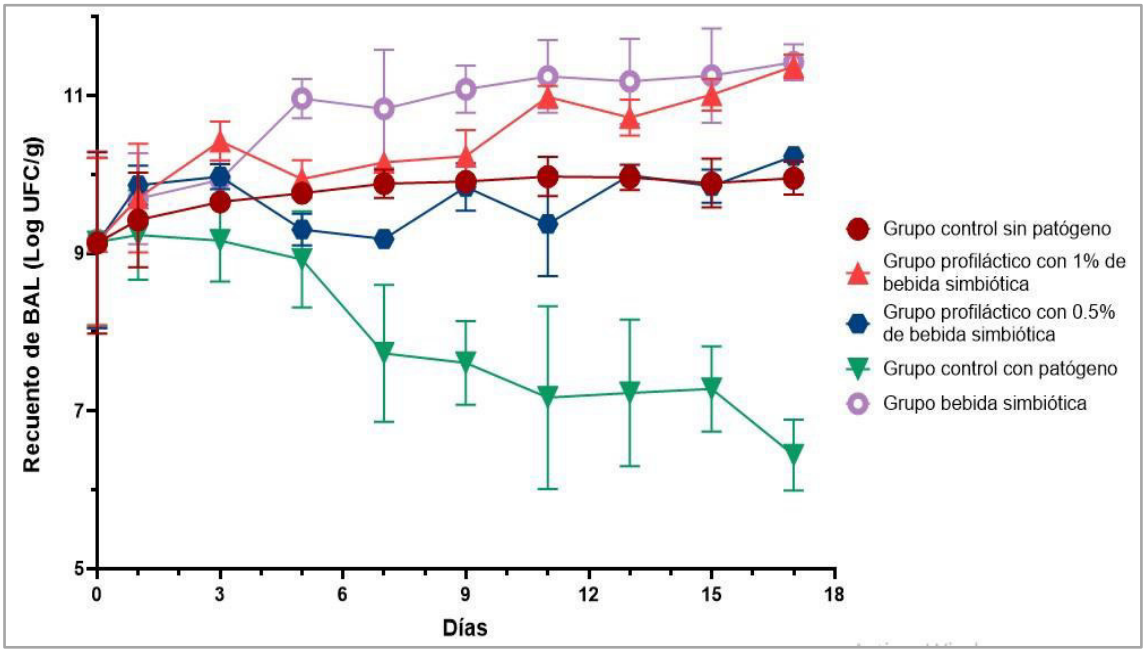


Figura 3. Gráfico lineal comparativo del recuento de bacterias acido lácticas (BAL) (Log UFC/g) en heces de ratones en los grupos profilácticos (GP1 y GP2) versus los grupos controles.

En la Figura 4 se observa que, existen diferencias en el recuento de bacterias acido lácticas entre los grupos tratamiento (GT1 y GT2) y los grupos control, debido que a partir del día 5 (a 24 horas de la infección) todos los grupos mostraron variaciones en su crecimiento. El grupo control patógeno (GCP) muestra una tendencia decreciente de BAL hasta el final de la experimentación. Por otro lado, el grupo tratamiento (GT1) con 1% de bebida simbiótica, a partir del día 11 en adelante experimentó un aumento en la concentración de BAL, alcanzando un valor de 11,00±0,13 Log UFC/g en el día 17. En

cambio, el grupo tratamiento (GT2) con 0,5% de bebida simbiótica mostró tener un crecimiento más tardío y gradual, observándose cambios recién a partir del día 13. Para determinar las diferencias estadísticas significativas entre los valores de cada grupo, se utilizaron las pruebas de Duncan ($p < 0,05$).

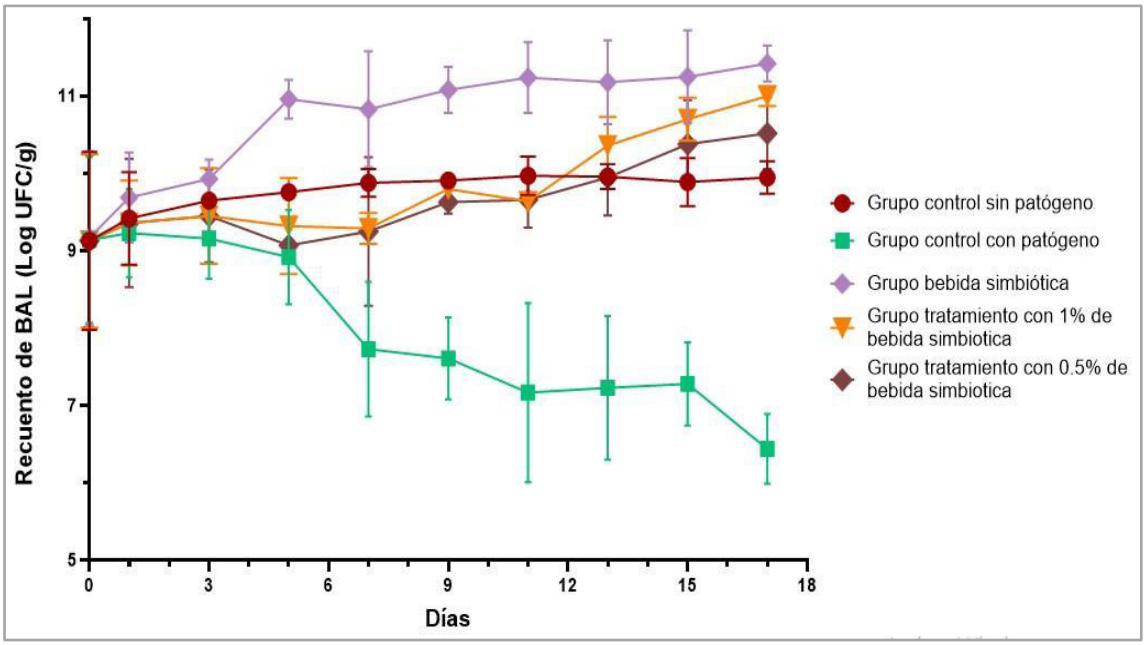


Figura 4. Gráfico lineal comparativo del recuento de bacterias acido lácticas (BAL) (Log UFC/g) en heces de ratones en los grupos tratamientos (GT1 y GT2) versus los grupos controles.

5.2.2 Recuento de *Listeria monocytogenes* en heces de los ratones

La Tabla 5 presenta ausencia de *Listeria monocytogenes* en el recuento del día 0, el cual se utilizó para demostrar que los animales de experimentación estuvieron libres del patógeno. Los grupos exentos de inoculación con el patógeno no fueron incluidos dentro de la tabla. Se observa que casi todos los grupos muestran diferencias significativas según las pruebas estadísticas de Duncan ($p<0,05$), con excepción del grupo control patógeno (GCP), cuyos valores no difieren entre sí. Los grupos tratamientos (GT1 y GT2) y profilácticos (GP1 y GP2) presentan valores variables, los 4 grupos mostraron mayores recuentos en el día 17. Los grupos que recibieron la bebida simbiótica en la dosificación de 1% de bebida simbiótica , mostraron valores más altos del recuento del patógeno; este fue el caso con los grupos GP1 y GT1, los cuales obtuvieron valores de 4,56±0,74 Log UFC/g y 3,94±0,30 Log UFC/g, respectivamente, valores que mayores a en comparación con los valores de los grupos a los que se les dosifico 0,5% de bebida simbiótica.

Tabla 5. Recuento de *Listeria monocytogenes* (Log UFC/g) en heces de ratones de los grupos experimentales frente al grupo control en el transcurso de los días.

Días	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	Grupo profiláctico + 0,5 % de bebida simbiótica (GP2)	Grupo control patógeno (GCP)	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)
0	$0,00\pm0,00^{d}$	$0,00\pm0,00^{d}$	$0,00\pm0,00^{b}$	$0,00\pm0,00^{d}$	$0,00\pm0,00^{d}$
5	$2,69\pm0,02^{c}$	$2,75\pm0,11^{b}$	$2,96\pm0,34^{a}$	$2,66\pm0,21^{b}$	$3,00\pm0,01^{ab}$
7	$3,31\pm0,23b^{c}$	$3,19\pm0,19^{ab}$	$2,34\pm0,26^{a}$	$3,24\pm0,21^{ab}$	$3,26\pm0,21^{ab}$
9	$4,03\pm0,32^{ab}$	$3,61\pm0,01^{a}$	$3,02\pm0,38^{a}$	$3,34\pm0,47^{ab}$	$3,74\pm0,08^{a}$
11	$2,81\pm0,33^{c}$	$1,87\pm0,55^{c}$	$2,38\pm0,17^{a}$	$1,31\pm0,83^{c}$	$1,80\pm0,83^{c}$
13	$3,46\pm0,08^{bc}$	$2,74\pm0,28^{b}$	$2,87\pm0,04^{a}$	$3,30\pm0,40^{ab}$	$2,57\pm0,26^{b}$
15	$3,04\pm0,08^{c}$	$2,65\pm0,40^{bc}$	$2,70\pm0,44^{a}$	$3,37\pm0,12^{ab}$	$3,27\pm0,08^{ab}$
17	$4,56\pm0,74^{a}$	$3,71\pm0,64^{a}$	$2,98\pm0,28^{a}$	$3,94\pm0,30^{a}$	$3,15\pm0,04^{ab}$

Los superíndices (a, b, c y d) en las columnas muestran las diferencias significativas entre los valores del recuento de *L. monocytogenes* según a la prueba estadística Duncan ($p < 0,05$)

NOTA: Le evaluación en días pasa del día 0 al día 5, debido a que es en el día 4 en el cual es suministrado el patógeno y se realizó un recuento a las 24 h de infección (día 5).

5.2.3. Recuento de enterobacterias provenientes de la microbiota nativa en heces de ratones *Mus musculus* en el paso de los días.

La tabla 6 evidencia los datos del recuento de enterobacterias en las heces de los ratones, las cuales muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en casi todos los grupos según lo indicado por las pruebas estadísticas de Duncan, con excepción de los valores del grupo control. Estas variaciones dependían de la concentración de la bebida simbiótica suministrada. Los más destacados fueron, el grupo profiláctico 1 (GP1) como el grupo tratamiento 1 (GT1), ambos con dosis de 1% de bebida simbiótica, estos grupos mostraron una tendencia a la disminución, con valores que descienden a partir del día 7 en adelante.

Tabla 6. Recuento de enterobacterias (Log UFC/g) de la microbiota nativa en heces de ratones durante el periodo de experimentación.

Días	Grupo control sin patógeno (GCSP)	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	Grupo profiláctico + 0,5 % de bebida simbiótica (GP2)	Grupo control patógeno (GCP)	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	Grupo control bebida (GB)
0	8,95±1,00^{a}	9,25±0,66^{a}	9,23±0,64^{a}	8,98±1,05^{a}	9,24±0,64^{a}	9,26±0,67^{a}	9,25±0,66^{a}
1	7,90±0,42^{a}	8,34±0,49^{a}	8,24±0,26^{ab}	8,68±0,04^{ab}	8,67±0,76^{ab}	8,52±0,04^{b}	8,77±0,06^{ab}
3	8,12±0,18^{a}	8,92±0,02^{a}	8,57±0,05^{ab}	8,81±0,35^{a}	8,62±0,13^{ab}	8,76±0,05^{ab}	8,69±0,03^{ab}
5	7,97±0,53^{a}	8,80±0,13^{a}	8,32±0,06^{ab}	8,55±0,23^{ab}	8,63±0,19^{ab}	8,87±0,06^{ab}	8,49±0,15^{ab}
7	8,20±0,54^{a}	7,08±0,18^{b}	8,60±0,27^{ab}	8,84±0,37^{a}	8,95±0,12^{ab}	8,95±0,08^{ab}	8,66±0,51^{ab}
9	8,03±0,55^{a}	6,66±0,25^{b}	7,72±0,65^{bc}	8,12±0,15^{ab}	8,10±0,12^{b}	8,28±0,28^{bc}	8,72±0,65^{ab}
11	7,94±0,10^{a}	6,15±1,10^{bc}	7,45±0,93^{bcd}	8,08±0,48^{ab}	6,26±0,31^{c}	7,72±0,28^{cd}	8,25±0,55^{ab}
13	8,09±0,14^{a}	5,21±0,99^{cd}	6,68±0,90^{cd}	7,67±0,26^{b}	5,79±0,24^{c}	7,43±0.08^{d}	7,77±0,45^{bc}
15	8,02±0,16^{a}	4,53±0,34^{de}	6,16±0,40^{d}	7,76±0,12^{b}	5,47±0,01^{cd}	6,00±0,30^{e}	7,04±0,03^{c}
17	8,01±0,37^{a}	3,61±0,21^{e}	6,15±0,86^{d}	6,30±0,13^{c}	4,88±0,12$_{d}$	5,54±0,46^{e}	5,43±0,10^{d}

Los superíndices (a, b, c, d y e) en las columnas muestran las diferencias significativas entre los valores del recuento de Enterobacterias (UFC/g) según a la prueba estadística Duncan ($p < 0,05$)

En la Figura 5, se evidencia la comparación de los grupos profilácticos (GP1 y GP2), los cuales recibieron diferentes dosis de bebida simbiótica (1% y 0,5%). Las líneas de tendencia muestran que el grupo profiláctico 1 (GP1) con mayor dosificación de bebida simbiótica tuvo una mayor capacidad de reducción de enterobacterias. Este grupo comenzó su disminución desde el día 7 con un valor de 7,08±0,18 Log UFC/g, alcanzando el valor más bajo de 3,61±0,21 Log UFC/g en el día 17. Un comportamiento similar se observó en el grupo (GP2) con 0,5% de bebida simbiótica, pasando de 8,60±0,27 Log UFC/g a 6,15±0,86 Log UFC/g en el día 17. En cambio, el grupo bebida (GB) presentó cambios desde el día 11 con un valores de 8,25±0,55 Log UFC/g a 5,43±0,10 Log UFC/g en el último día. Por último,el grupo control patógeno (GCP) también mostro una leve tendencia a la disminución.

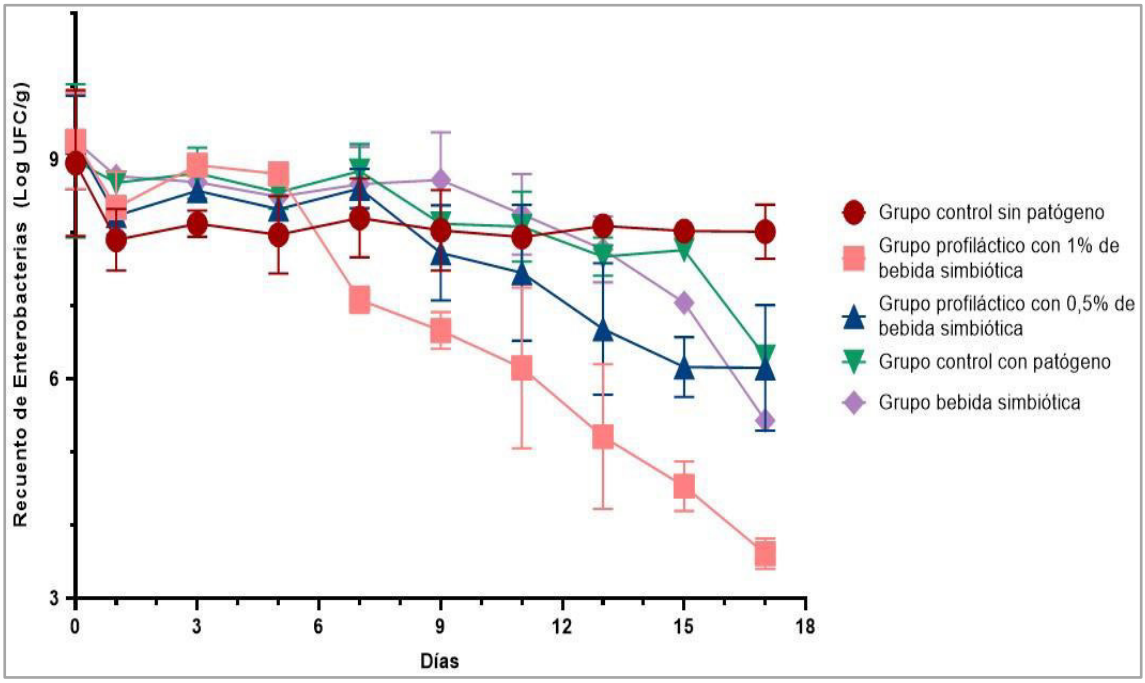


Figura 5. Gráfico lineal comparativo sobre el recuento de enterobacterias (log UFC/g) de la microbiota nativa en heces de ratones en los grupos profilácticos versus los grupos controles.

La Figura 6 muestra la comparación de los recuentos de enterobacterias en heces de ratones entre los grupos tratamientos (GT1 y GT2) y los grupos controles; desde el inicio se muestran valores oscilantes. La gráfica revela una tendencia decreciente en tres grupos principalmente, desde el día 9: los grupos tratamientos (GT1 y GT2) y el grupo control bebida (GB). Entre estos tres grupos, el grupo tratamiento (GT1) con 1% de bebida simbiótica, mostró una reducción mayor en el crecimiento de Enterobacterias desde el día 9, pasando de un valor de 8,10±0,12 Log UFC/g a 4,88±0,12 Log UFC/g en el último día

de experimentación; mientras que en segundo lugar se encuentra el grupo GT2, el cual también disminuyó sus valores de recuentos, pasando de 8,28±0,28 Log UFC/g a 5,54±0,46 Log UFC/g en el día 17, pero estos valores no superaban la reducción observada por el grupo GT1.

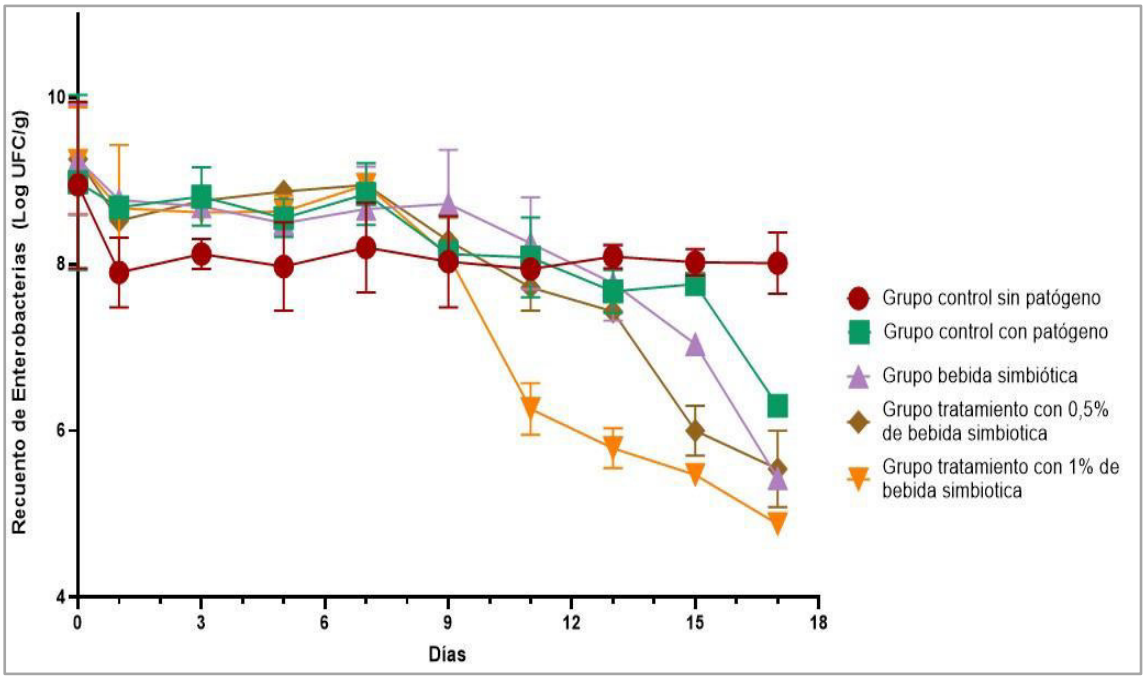


Figura 6. Gráfico lineal comparativo del Recuento de enterobacterias (Log UFC/g) de la microbiota nativa en heces de ratones en los grupos tratamientos versus los grupos controles.

5.3 Evaluación de salud física de los ratones

5.3.1 Pesos de los ratones durante el estudio

La Figura 7 muestra la comparación entre el comportamiento de pesos de los grupos control y los grupos profilácticos (GP1 y GP2) con diferentes dosis de la bebida simbiótica (1 % y 0,5%). A partir del día 3, el grupo control patógeno (GCP) mostró una disminución en sus valores, caso contrario pasó con los datos del grupo control bebida (GB), este exhibió un aumento constante desde el día 3, pero al igual que el grupo control sin patógenos (GCSP), ambos no mostraron diferencias significativas entre sus datos. En cambio, el grupo profiláctico con 1% de bebida simbiótica (GP1) mostró un comportamiento oscilante entre sus valores no significativos desde el día 1 hasta el día 6, ya que a partir de este día se visualizó un ligero incremento, obteniendo 32,21±1,27 g en el día 17, siendo este el segundo valor más alto en toda la tabla al término del último día de experimentación, solo

encontrándose por debajo del valor registrado por el grupo bebida (GB) con un valor de 32,29±0,85 g.

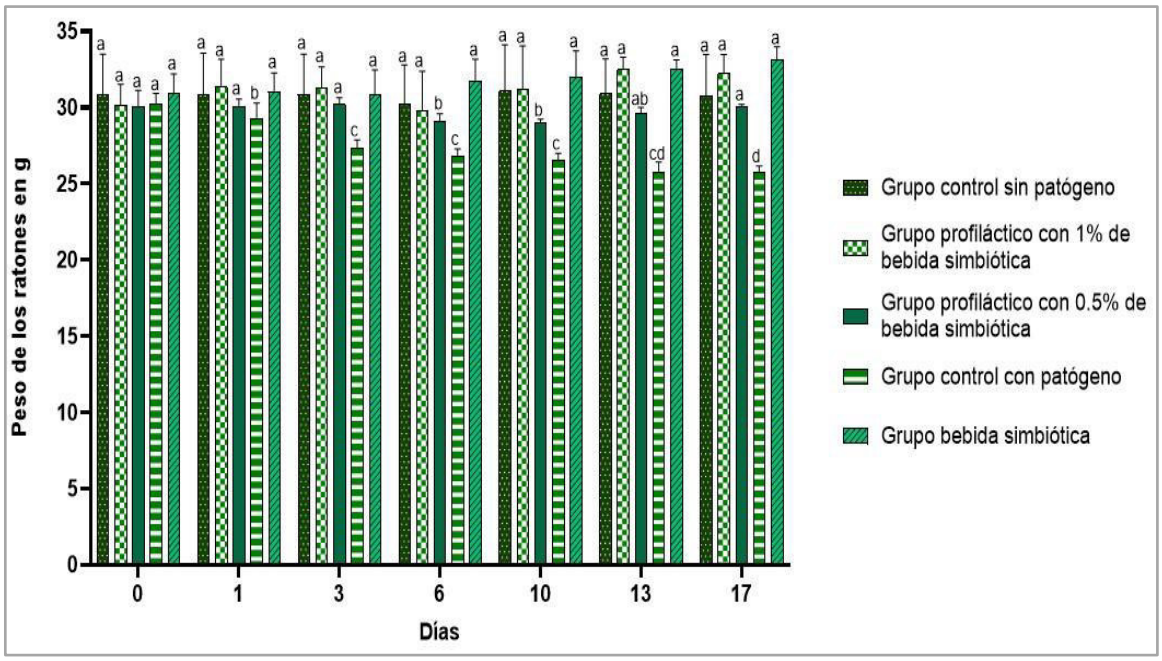


Figura 7: Comparación de pesos entre los grupos profilácticos y grupos controles en el transcurso de la experimentación.

La Figura 8 muestra las variaciones de peso de los ratones a lo largo del tiempo en los grupos tratamientos (GT1 y GT2) en comparación con los grupos controles. En contraste, los grupos tratamiento (GT1 y GT2) mostraron fluctuaciones en sus valores, siendo el grupo (GT1) con dosis de 0,5% de bebida simbiótica que mostró fluctuaciones desde el día 6 ya que los pesos iban desde 29,58±1,42 g a 29,05±0,85 en el último día, mostrando una disminución en el paso de los días. Por otro lado, el grupo (GT1) con dosis de 1% de bebida simbiótica, experimentó un ligero incremento en los días 13 y 17, alcanzando valores de 30,00±0,31 g y 30,34±0,38 g respectivamente, siendo estos ligeramente superiores a los registrados en el primer día. Para mayor detalle ver **Anexo 2.**

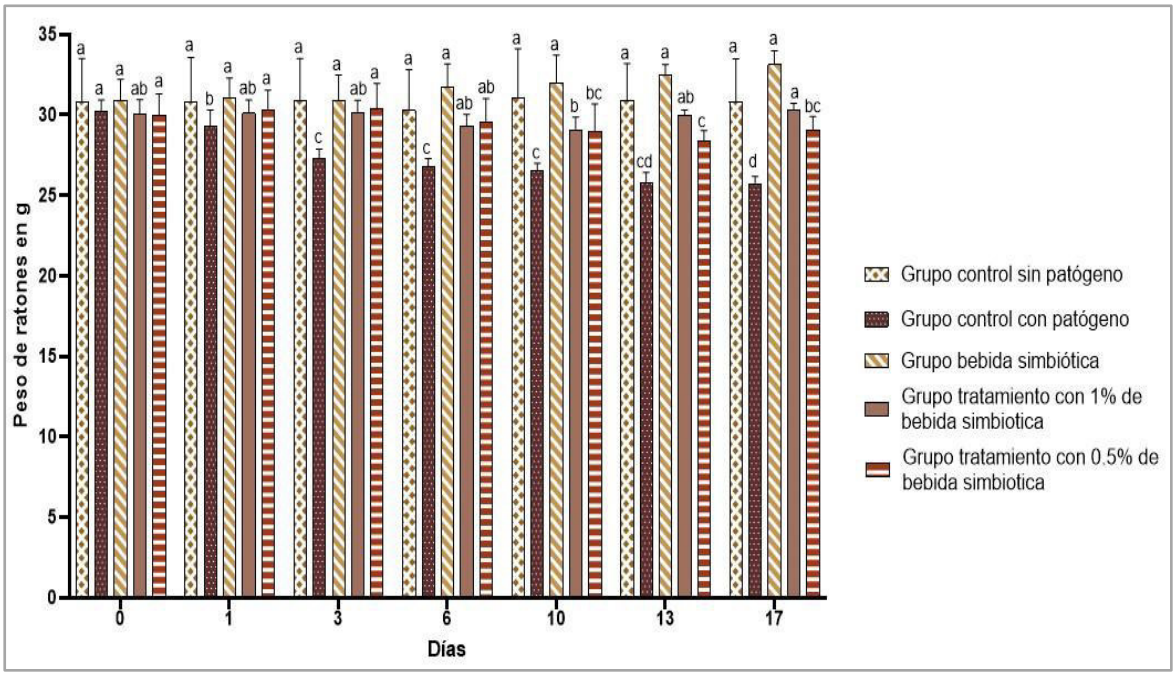


Figura 8. Comparación de pesos entre los grupos tratamientos y grupos controles en el transcurso de la experimentación.

5.3.2 Bienestar general de los ratones

La Tabla 7, muestra la evaluación de bienestar general de los ratones antes de la infección inicial con el patógeno *Listeria monocytogenes* (Día 0), los cambios no fueron muy evidentes en las primeras 24 horas (Día 1). Sin embargo, se observó que un ratón de grupo control patógeno (GC) y uno del grupo tratamiento 2 con dosis de 0,5% de bebida simbiótica (GT2), presentaron un pelaje ligeramente erizado. Debido a este hallazgo, se decidió realizar verificaciones cada 2 días. Tras el transcurso de la experimentación, el grupo control patógenos (GC) mostró un deterioro progresivo en los síntomas, con más del 50% de los ratones fueron clasificados con la puntuación 3, presentando signos evidentes de letargo, pelaje erizado y distensión notable del abdomen. En contraste, el grupo control bebida (GB) se mantuvo consistentemente con puntaje de 0, mostrándose más enérgicos al resto de grupos y sin malestar. Los grupos más resaltantes fueron los grupos profiláctico 1 (GP1) y tratamiento (GT1) ambos con dosis de 1% de bebida simbiótica, debido a que no alcanzaron una puntuación de 3 a lo largo de la experimentación. En la tabla no se tomó en cuenta al grupo control sin patógeno (GCSP), ya que no fueron sometidos a ningún tratamiento.

Tabla 7. Evaluación del bienestar general de los ratones con las dosis de la bebida simbiótica durante los días experimentales.

Días	Grupos	Puntuación de salud general				
		0	**1**	**2**	**3**	**4**
0	Grupo control patógeno (GCP)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
1	Grupo control patógeno (GCP)	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0.5% de bebida simbiótica (GT2)	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3	Grupo control patógeno (GCP)	2/4	1/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	3/4	0/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	0/4	3/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
6	Grupo control patógeno (GCP)	0/4	2/4	1/4	1/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	1/4	3/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	1/4	3/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4
9	Grupo control patógeno (GCP)	0/4	2/4	1/4	1/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	1/4	1/4	1/4	1/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	0/4	3/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	2/4	0/4	2/4	0/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Días	Grupos	Puntuación de salud general				
		0	1	2	3	4
11	Grupo control patógeno (GCP)	0/4	1/4	1/4	2/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	1/4	2/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	0/4	1/4	2/4	1/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	0/4	2/4	2/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	0/4	1/4	2/4	1/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
13	Grupo control patógeno (GCP)	0/4	0/4	1/4	3/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	0/4	2/4	2/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	0/4	2/4	2/4	0/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Los números utilizados como puntaje describen: (0) el animal se muestra activo, alerta y no muestra signos de malestar;(1) comienzo de pelaje activo, erizado y con indicios de embalonamiento abdominal; (2) pelaje ondulado, erizado con el abdomen pronunciado y circunflejo; (3) inicios del pelaje activo y con volantes, muestra signos de aletargamiento; (4) el animal se muestra con la espalda circunfleja, ojos cerrados y hundidos, con heridas cutáneas visibles.

Nota: en cada grupo experimental había 4 ratones, por lo tanto, la tabla nos el número de ratones se encuentran con los diferentes síntomas descritos por la escala utilizada (4 puntos).

5.4 Aspecto físico de las heces de los ratones

La Tabla 8,presenta los resultados de la evaluación del aspecto físico de las heces de los ratones durante la experimentación. Cabe resaltar que no se tomó en cuenta al grupo control sin patógeno (GCSP), debido a que no se les brindó ningún tratamiento. Se aplicó el mismo criterio de evaluación como la realizada en el monitoreo de bienestar general. En el día 6, se observó un miembro del grupo control patógeno (GC) alcanzo una puntuación de 4, debido a la aparición de heces muy acuosa y de textura casi líquida. Desde ese día, los miembros del grupo no volvieron a mostrar una puntuación de 1 en los días posteriores. En contraste, el grupo control bebida (GB) mantuvo a sus miembros dentro de los puntajes 1 y 2, indicando la presencia de heces sólidas, terrosas o suaves con forma definida. Para los grupos que recibieron diferentes dosis de la bebida simbiótica, los grupos profilácticos (GP1 y GP2) como los de tratamientos (GT1 y GT2), tuvieron fluctuaciones dentro de los puntajes, debido a que muchos de los miembros llegaron a obtener una puntuación de 3, mostrando heces blandas, con poca definición de forma y de colores claros, pero mostrando mejorías en los días finales.

Tabla 8. Evaluación del aspecto físico de heces recolectada en los grupos experimentales con tratamientos de la bebida simbiótica

Días	Grupos	Aspecto físico de heces recolectadas			
		1	2	3	4
0	Grupo control patógeno (GCP)	4/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	4/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0.5% de bebida simbiótica (GP2)	4/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	4/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0.5% de bebida simbiótica (GT2)	4/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	4/4	0/4	0/4	0/4
1	Grupo control patógeno (GCP)	3/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	4/4	0/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0.5% de bebida simbiótica (GP2)	3/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	4/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0.5% de bebida simbiótica (GT2)	3/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	1/4	3/4	0/4	0/4
3	Grupo control patógeno (GCP)	2/4	1/4	1/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	3/4	1/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0.5% de bebida simbiótica (GP2)	2/4	2/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	1/4	2/4	1/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0.5% de bebida simbiótica (GT2)	0/4	3/4	1/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	2/4	2/4	0/4	0/4
6	Grupo control patógeno (GCP)	0/4	2/4	1/4	1/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	2/4	2/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0.5% de bebida simbiótica (GP2)	0/4	3/4	1/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	0/4	3/4	1/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0.5% de bebida simbiótica (GT2)	0/4	2/4	2/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	1/4	3/4	0/4	0/4
9	Grupo control patógeno (GCP)	0/4	2/4	2/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	0/4	3/4	1/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	1/4	2/4	1/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	0/4	2/4	2/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	0/4	1/4	3/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	0/4	4/4	0/4	0/4

Días	Grupos	Aspecto físico de heces recolectadas			
		1	2	3	4
11	Grupo control patógeno (GCP)	0/4	3/4	1/4	0/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	1/4	2/4	1/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	1/4	1/4	2/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	1/4	2/4	1/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	1/4	1/4	2/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	2/4	2/4	0/4	0/4
13	Grupo control patógeno (GCP)	0/4	1/4	0/4	3/4
	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	1/4	3/4	0/4	0/4
	Grupo profiláctico + 0,5% de bebida simbiótica (GP2)	1/4	2/4	1/4	0/4
	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	1/4	3/4	0/4	0/4
	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	0/4	2/4	2/4	0/4
	Grupo control bebida (GB)	0/4	4/4	0/4	0/4

Los números utilizados como puntaje describen las siguientes características para las heces de los ratones evaluados: (1) sólidas y terrosas, (2) suave con forma definida y abundante, (3) blando, poca definición de forma y color claro, (4) acuoso, con textura semilíquida o con presencia de sangre.

VI. DISCUSIÓN

La bebida simbiótica formulada con pulpa de pitahaya roja, inoculada e incubada con las cepas *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™, presentó características fisicoquímicas tuvo un pH de 3,76 ± 0,02; contenido de acidez titulable de 0,85 ± 0,036 % de ácido láctico y 13,9 ± 0,1 de °Brix . El pH fue menor a lo reportado por Da Cunha et al.[74] (5,56±0,04 de pH) y la acidez titulable fue mayor a 0,12±0,01 % ácido láctico. En otro estudio más reciente, realizado por Maftei et al.[75] en la que formularon una bebida simbiótica con jarabe de espino amarillo (SBS) y leche de soja, las cuales tuvieron diferentes concentraciones de inulina (1 y 3 % p/v), se obtuvieron valores de 3,87 de pH, 0,65 g ácido láctico /100 mL para la muestra de SBS con 1% p/v de inulina; en el caso de la muestra de SBS con 3% de inulina, se tuvieron los valores de 3,88 de pH , 0,74 g ácido láctico /100 mL en la acidez titulable, todos estos valores fueron obtenidos tras 6 horas de fermentación a 37°C. Las variaciones en los parámetros fisicoquímicos, como el pH, la acidez titulable y sólidos solubles, pueden atribuirse a factores como la composición de la matriz alimentaria, las cepas probióticas utilizadas, el tiempo de fermentación y las temperaturas utilizadas. La disminución de pH está muy ligada a la acumulación de ácidos orgánicos generados durante la fermentación, el uso de las especies de *Lactobacillus*, son conocidos por su capacidad de hidrolizar extracelularmente a los fructooligosacáridos[76], este grupo de microorganismos tienden a tener una alta actividad enzimática y con ello el consumo de azucares, incrementando la formación de ácido láctico, lo que a su vez incrementa la acidez titulable y el medio se vuelve más ácido[77]. Este estudio utilizó una matriz vegetal, la "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose, fruto que posee oligosacáridos dentro de su composición nutricional y las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™ [78], con tiempos de fermentación y temperaturas diferentes a las planteadas por otros autores. El tiempo de fermentación disminuyó la concentración de sólidos solubles de 14°Brix a 13,9°Brix. En tanto se hablan de los parámetros de acidez titulable y pH se tienen similitudes con los del autor Maftei et al.[75].

En el estudio comparativo de Deziderio et al.[79], en la que tuvo 9 matrices simbióticas diferentes, obtuvo valores de recuento de cepas probióticas como *Lactobacillus acidophillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus thermophilus* un poco mayores a 6 Log UFC/mL. En cambio, el autor Bianchi et al.[80] obtuvo un valor de recuento de *Lactobacillus casei* de 9,39±0,09 Log UFC/ mL en la fórmula de bebida simbiótica seleccionada, bebida

que estuvo formulada con extracto de quinua y soja en porcentajes de 70 % y 30% respectivamente; en la misma línea Da Cunha et al.[74] con su bebida simbiótica formulada con nuez de Brasil, reportó 9,46 ± 0,16 Log UFC/mL de *Lactobacillus casei* en el día 0 tras 12 horas de fermentación. En cuanto a los resultados de bebida simbiótica con pulpa de pitahaya roja, se obtuvo los valores de los recuentos de 9,57±0,09 Log UFC/mL de las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y 9,52±0,11 Log UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™, son valores que se encuentran por arriba de los obtenidos por los otros autores Bianchi et al.[80] , Da Cunha et al.[74] y Deziderio et al.[79]. La variación en valores de probióticos puede deberse a que los otros estudios emplearon diferentes especies y cepa probióticas, ya que cada una presenta distintas sensibilidades frente a factores como la acidez del sustrato, el oxígeno disuelto, los productos metabólicos, las temperaturas y el tipo de matriz utilizadas[81]. Sin embargo, se conoce que el número de células viables para los probióticos en los productos bajo esta denominación debe ser de al menos 10^6 UFC/mL, mientras que, para fines de salud y funcionalidad, las dosis mínimas recomendadas por día son de 10^8 –10^9 UFC/mL[82], demostrando así que, los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites para considerar a la bebida simbiótica con pulpa de pitahaya roja, como funcional.

En cuanto al recuento de BAL en heces de ratones de los 7 grupos experimentales, los resultados más resaltantes en los que se presentaron cambios desde el día 0 al 17, fueron en los grupos profiláctico 1(GP1), grupo tratamiento 1(GT1) y grupo control bebida (GB), todos con 1% de dosis de bebida simbiótica, ya que estos exhibieron valores de BAL de 9,15±1,06 Log UFC/g, 9,13±1,12 Log UFC/g y 9,15±1,12 Log UFC/g en el día 0, y pasaron a tomar valores de 11,37±0,15 Log UFC/g, 11,00±0,13 Log UFC/g y 11,42±0,23 Log UFC/g respectivamente en el día 17. En el estudio de Hong et al.[83], el recuento de BAL en muestras murinas la cuales fueron divididos en 5 grupos, mostraron diferencias tras 14 días de la suplementación, los grupos T5(*L. plamtarum* + pululano + nanopartículas de ftalil pululano PPN), T4 (LP+PPN) y T3 (LP+P) demostraron un incremento en el recuento de BAL, en comparación al del grupo control, los valores reportados fueron, 5,18±0,31 Log UFC/mL, 5,20±0,40 Log UFC/mL, 5,95±0,25 Log UFC/mL y 3,73±0,38 Log UFC/mL respectivamente. Por otro lado, los resultados por parte de Riaz et al.[21] demostró tener un incremento de valores en los grupos que habían recibido dosis con *L. brevis* como tratamiento y de forma profiláctica, respectivamente. En cambio, el grupo que solo tuvo la dosificación con el patógeno *L. monocytogenes* demostró una reducción de las BAL, la experimentación tuvo 7 días de pruebas. Por otro lado, Pino et al.[84], demostró el incremento

de *L. rhamnosus* TOM 22,8 por vía oral y vaginal, con valores de 3,85±0,22 Log UFC/mL y 2,95±0,25 Log UFC/mL en los días 0, a poseer valores de 6,95±0,19 Log UFC/mL y 5,80±0,17 Log UFC/mL en el día 10 del tratamiento con el probiótico. Es por ello que los resultados obtenidos por el uso de la bebida simbiótica, son similares a los de los autores Riaz et al. [21] , Hong et al.[83] y Pino et al.[84] , ya que en todos los grupos experimentales a los que se les brindaba dosis de probióticos o simbióticos, mostraron tener un incremento mayor del recuento de BAL.

Frente al recuento del patógeno *Listeria monocytogenes* en las heces de los ratones cuando se les administró la bebida simbiótica con pulpa de pitahaya roja, cuyos valores obtenidos fueron por parte de los grupos profiláctico 1 y grupo tratamiento 1 (GP1 y GT1) obteniendo 4,56±0,74 Log UFC/g y 3,94±0,30 Log UFC/g respectivamente en el último día de la experimentación, frente al resultado del grupo control patógeno (GCP) que fue menor con un valor de 2,98±028 Log UFC/g. En estudios similares como el de Pino et al. [84] que utilizó a la cepa probiótica *L. rhamnosus* TOM 22.8 en mujeres con disbiosis vaginal, las cuales obtuvo resultados alentadores en cuanto la disminución de *Candida albicans* a los que se les dio tratamiento con el probiótico por vías oral y vaginal, obteniendo así los valores de 3,40±0,21 Log UFC/mL y 4,81±0,20 Log UFC/mL respectivamente en el día 0, para el día 10 los valores fueron de 0,27±0,31 Log UFC/mL y 1,28±0,01 Log UFC/mL. El estudio realizado por Riaz et al.[21] el cual tuvo una duración de 10 días; para el recuento de *L. monocytogenes* , mostró valores de 4,45 Log UFC/g en hígado y bazo, en el intestino del animal obtuvo 5,3 Log UFC/g, cifras mostradas por el grupo profiláctico en el primer día de infección; al terminó de la experimentación mostró valores de 4,15 Log UFC/mL en hígado y bazo , mientras que en el intestino obtuvo 4,8 Log UFC/mL , mostrando así una reducción del patógeno; muy por el contrario el grupo con el patógeno con *L.monocytogenes,* mostró un tendencia al aumento pasando de 4,9 Log UFC/mL a 5,1 Log UFC/mL en hígado, 4,4 Log UFC/mL a 4,6 Log UFC/mL en bazo y de 6,7 Log UFC/mL a Log 7,3 UFC/mL en intestino. Así mismo, Buddhasiri et al. [20] para el tratamiento de *Salmonella* con *L. reuteri* KUB-AC5 en ratones hembra, el resultado más destacable entre los 4 grupos experimentales, fue el grupo profiláctico + terapéutico, disminuyendo en gran medida a *Salmonella* en el bazo, los grupos terapéutico y profilácticos también mostraron una disminución del patógeno.

Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Pino et al. [84] , Riaz et al.[21] y Buddhasiri et al.[20], debido a que las cepas de *Lactobacillus* presentan diferentes propiedades. Algunas cepas inhiben a los patógenos mediante la secreción de bacteriocinas,

mientras que otras reducen su adhesión, lo que crea una competencia en la colonización del epitelio intestinal[85]. En un estudio reciente de Poimenidou et al.[86] , se observó una disminución en la adhesión de *L.monocytogenes* EGDe en células Caco-2. Por su parte, Gueimonde et al.[87] investigó la inhibición de adhesión de cepas como *Lactobacillus rhamnosus* LA2 (TMC 0503) y *Lactobacillus acidophilus* TMC 0356 frente a varios patógenos, incluyendo *L.monocytogenes* ATCC 15313, encontrando que ambas cepas inhibían la adhesión del patógeno. Las cepas de *Lactobacillus* en general, también ayudan a prevenir las infecciones bajo esta premisa, al tratarse de una infección en etapas tempranas; a este mecanismo también se le conoce como exclusión competitiva[88]. Por lo tanto, los resultados planteados por esta investigación, tras la administración de la bebida simbiótica con pulpa de pitahaya roja en los grupos experimentales profilácticos (GP1 y GP2) y tratamientos (GT1 y GT2), sugieren que la exclusión competitiva podría haber impedido la colonización de *L.monocytogenes* en el tracto gastrointestinal, provocando su eliminación a través de las heces de los ratones.

En cuanto a los recuentos de enterobacterias del microbioma natural, se tuvo una disminución mayor en los grupos profiláctico (GP1), grupo tratamiento (GT1) y grupo control bebida (GB), todos con 1% de dosis de bebida simbiótica, con datos de 9,25±0,66 Log UFC/g, 9,24±0,64 Log UFC/g y 9,26±0,67 de Log UFC/g para enterobacterias en el día 0, datos que cambiaron a 3,61±0,21 Log UFC/g, 4,88±0,12 Log UFC/g y 5,54±0,46 Log UFC/g en el último día 17 de experimentación. Estudios similares como el de Pino et al.[84] mostró una disminución de *E. coli* con tratamientos por vía oral (VO) y vaginal (VV) con *L. rhamnosus* TOM 22.8, los resultados obtenidos fueron de 3,30±0,28 Log UFC/mL a 1,70±0,14 Log UFC/mL de *E. coli* por VO y <1 Log UFC/mL por vía vaginal. Caso similar pasó con Rodríguez et al.[19] las cuales evaluó la inhibición de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) con la mezcla de probióticos *Bifidobacterium* y *L. rhamnosus*, se registraron valores menores de Coliformes y *E. coli* en los grupos probióticos, prebióticos y simbióticos, al término de los 8 días experimentales, registraron valores de 5,22 Log UFC/mL; 6,83 Log UFC/mL y 6,62 de Log UFC/mL respectivamente, cuando sus recuentos iniciales fueron del mayores a 9 Log UFC/mL Por ello, según los resultados obtenidos se muestra la misma tendencia a la disminución de enteropatógenos frente al uso de probióticos y simbióticos con los autores Pino et al.[84] y Sorrento et al.[19]. Frente a los resultados obtenidos en cuanto a la reducción del recuento de patógenos, se deben a las propiedades de los probióticos, debido a que dentro de los mecanismos conocidos para la inhibición patogénica; se encuentra la competencia microbiana, y la capacidad de los

probióticos para producir bacteriocinas y de esta manera poder inhibir el crecimiento y la supervivencia de los patógenos[89]. Son estas las propiedades las que ayudaron con la disminución de las enterobacterias.

En relación con las variaciones de peso en los grupos experimentales, se observó que tanto los grupos profilácticos (GP1 y GP2) con dosis del 1 y 0,5% de bebida simbiótica, los grupos tratamientos (GT1 y GT2) y grupo control bebida (GB) no presentaron diferencias significativas entre los pesos iniciales y finales, con excepción del grupo control patógeno (GCP), que experimentó una disminución de 30,25±0,68 g a 25,86±0,43 g. De manera similar, Riaz et al.[21] mostró que los grupos control y probiótico, mantuvieron sus pesos, mientras que el grupo patógeno presentó una disminución de 34 g a 28 g en los ratones experimentales. Un patrón comparable fue observado por Rodríguez et al.[19] en lechones, donde los grupos que mostraron una tendencia al aumento, estos fueron PRO, PRE y SYM con pesos iniciales que iban de 5,09 Kg; 5,02 Kg y 5,05 Kg a pesos finales de 6,89 Kg; 7,25 Kg y 6,58 Kg, respectivamente. Por lo tanto, los resultados obtenidos son consistentes con los informados por Rodríguez et al.[19] y Riaz et al.[21]

En tanto a la salud general de los grupos experimentales que recibieron dosis de bebida simbiótica con pulpa de la "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose, mostró mejoría en los grupos profiláctico 1 y terapéutico 1 (GP1 y GT1) con dosis de 1% de bebida simbiótica, en comparación con los grupos profiláctico 2 y tratamiento 2 (GP2 y GT2), ambos con dosis de 0,5% de bebida simbiótica. Al observar el aspecto físico de las heces, los grupos profiláctico 1 y terapéutico 1 (GP1 y GT1), principalmente se encontraron dentro de la escala 1-2, indicando heces duras ocasionalmente húmedas y ligeras, mientras que los demás grupos mostraron heces más suaves e incluso líquidas. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos, como el de Riaz et al.[21] , donde los grupos probiótico y profiláctico demostraron una mejor salud general frente a los otros demás grupos. Además, Rodríguez et al.[19] también encontró que los grupos que recibieron dosis de probióticos como los grupos PRO, PRE y SYM reflejaban mejor salud, y en cuanto a la evolución física de heces se encontraron dentro de la escala 1-2 (1,85; 1,95 y 2,07) respectivamente.

VII. CONCLUSIONES

- La bebida simbiótica con pulpa de "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose presentó un sabor dulce, olor característico al fruto, color rojo violeta y un aspecto suave con una ligera viscosidad, asimismo, presentó 3,76±0,02 de pH; 0,85±0,036 % de acidez titulable y 13,9±0,1 de °Brix. En el recuento de los probióticos presentó 9,57±0,11 Log UFC/mL de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ y 9,52±0,09 Log UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™.
- En la evaluación del efecto antagónico mediante el recuento de las bacterias en las heces de los ratones, el recuento de BAL en los grupos de ratones que recibieron la bebida la tendencia aumentaron hasta el día 17, alcanzando el mayor recuento (11,42±0,23 Log UFC/g) en el grupo control de bebida (GB); en el grupo control de patógeno la tendencia fue el descenso, llegando a 6,44±0,45 Log UFC/g al final del ensayo. En el recuento de *Listeria monocytogenes*, en los grupos con bebida simbiótica al 1% tanto en los grupos profiláctico 1 (GP1) y grupo tratamiento 1 (GT1) mostraron los mayores valores (4,56±0,74 Log UFC/g y 3,94±0,30 Log UFC/g respectivamente) al final del ensayo; en el grupo con patógeno tuvo el menor recuento (2,98±0,28 Log UFC/g). En el recuento de enterobacterias, los grupos profiláctico (GP1), grupo tratamiento (GT1) y grupo control bebida (GB) presentaron los menores valores (3,61±0,21 Log UFC/g, 4,88±0,12 Log UFC/g y 5,43±0,10 Log UFC/g, respectivamente) con respecto al grupo control sin patógeno ni bebida (8,01±0,37 g).
- En la evaluación del efecto antagónico mediante la evaluación al bienestar general de los animales, los grupos con dosis de bebida simbiótica al 1% como, los grupos profiláctico 1 (GP1), terapéutico 1 (GT1) y grupo control bebida (GB), mostraron un comportamiento más activo y saludable en comparación con los demás grupos. Respecto a las características físicas de las heces, los grupos profiláctico 2 (GP2), terapéutico 2 (GT2) y grupo control patógeno (GCP) presentaron heces más blandas y, en muchas ocasiones liquidas (se encontraron en rangos de 2 a 3 en la escala cualitativa). Para la evaluación de pesos de los ratones, los grupos que presentaron variaciones con el cambio de pesos fueron los grupos profiláctico 2 (GP2), terapéutico 2 (GT2) y grupo control patógeno, mostrando valores menores (30,08±0,14 g, 29,05±0,85 g y 25,86±0,43 g, respectivamente).

- Los resultados obtenidos sugieren que la bebida simbiótica elaborada con pulpa de "pitahaya roja" (*Hylocereus monacanthus*) posee un potencial efecto antagónico contra *Listeria monocytogenes* en el modelo *in vivo* (*Mus musculus*). Los grupos experimentales tratados con un 1% de la bebida mostraron los mayores recuentos de *Listeria monocytogenes* en las heces debido a la inhibición de la adhesión en el tracto gastrointestinal, mediante el mecanismo de exclusión competitiva. Por otro lado, los ratones de estos grupos no mostraron tener síntomas severos durante la evaluación del bienestar general. Además, se observó una reducción en las enterobacterias nativas de la microbiota intestinal, lo que sugiere un impacto positivo sobre la modulación del ecosistema microbiano del hospedador. Estos hallazgos respaldan el potencial de la bebida simbiótica como una estrategia preventiva y de tratamiento contra infecciones gastrointestinales.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios del efecto antagónico de la bebida simbiótica de "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose frente a otros enteropatógenos como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, Shigella sp., etc.
- Realizar estudios *in vivo* con diferentes combinaciones de probióticos con "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose como fuente de prebiótico natural, frente a *Listeria monocytogenes* u otros enteropatógenos alimentarios de interés social.
- Se recomienda realizar ensayos de permeabilidad intestinal, para evaluar y ahondar en los efectos de la bebida simbiótica de "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose frente a la integridad de la barrera intestinal.
- Realizar estudios comparativos *in vivo* del efecto antagónico de la bebida simbiótica de "pitahaya roja" *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose frente a antibióticos contra patógenos alimentarios.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico del Perú [Internet]. 2019 [citado 28 de mayo de 2024];28:27. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2019/15.pdf

2. López M. Estimación de la incidencia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Colombia en la década (1996-2006) [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana - Colombia; 2008 [citado 28 de mayo de 2024]. Disponible en: https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8477/tesis134.pdf?sequence=1&isAllowed=y

3. Organización Mundial de la Salud. Inocuidad de los alimentos [Internet]. 2020 [citado 28 de mayo de 2024]. p. 3. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety

4. Organización Mundial de la Salud. Listeriosis [Internet]. 2018 [citado 4 de junio de 2024]. p. 1. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis

5. Cuéllar E, Chiappe A, Velarde J, Holguín A, Portillo D, Vicente W. Bacteriemia por *Listeria* en pacientes de un instituto oncológico peruano, 2005-2015. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2021;38(1):108–12. DOI: 10.17843/rpmesp.2021.381.5488

6. Nathan C. Antibiotics at the crossroads. Nature. 431(7011):899–902. DOI:10.1038/431899a

7. Modi R, Collins J, Relman A. Antibiotics and the gut microbiota. J Clin Invest.1 de octubre de 2014; 124(10):4212. DOI: 10.1172/JCI72333

8. Madureira R, Pintado E, Gomes M, Malcata X. Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: Decreasing the risk of microbial contamination. J Food Prot. 2011; 74(7):1194–9. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-217

9. Nielsen S, Cho S, Hanak A, Huch M, Franz M, Arneborg N. The effect of bacteriocin producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. Int J Food Microbiol. 2010;141(SUPPL.): S53–9. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.040

10. Khuituan P, K-da S, Bannob K, Hayeeawaema F, Peerakietkhajorn S, Tipbunjong C, et al. Prebiotic oligosaccharides from dragon fruits alter gut motility in mice. Biomed Pharmacother. 2019;114:108821. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108821

11. Papadimitriou K, Zoumpopoulou G, Foligné B, Alexandraki V, Kazou M, Pot B, et al. Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. Front Microbiol. 2015;6:58. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00058

12. Flores G. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud pública Méx. 2005;47(0036–3634):3.

13.Gotuzzo E. Listeriosis en embarazo. RMH. 2017;28(1):3–4. DOI: 10.20453/rmh.v28i1.3066

14. Mauricio M. Efecto de los antibióticos en el microbioma intestinal. 2016;19-25.

15. Amara A, Shibl A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. SPJ [Internet]. 2015;23(2):107. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.07.001

16. Raheem A, Liang L, Zhang G, Cui S. Modulatory effects of probiotics during pathogenic infections with emphasis on immune regulation. Front Immunol. 2021;12:571. DOI: 10.3389/fimmu.2021.616713.

17. Astó E, Huedo P, Altadill T, Aguiló García M, Sticco M, Perez M, et al. Probiotic properties of *Bifidobacterium longum* KABP042 and *Pediococcus pentosaceus* KABP041 show potential to counteract functional gastrointestinal disorders in an observational pilot trial in infants. Front Microbiol. 2022;12:4321. DOI: 10.3389/fmicb.2021.741391.

18. Chen Q, Wang S, Guo J, Xie Q, Evivie SE, Song Y, et al. The protective effects of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0344 on LPS-Induced Mastitis *in vitro* and *in vivo*. Front Immunol. 2021;12:4700. DOI: 10.3389/fimmu.2021.770822.

19. Rodríguez A, Castillejos L, López P, Cifuentes G, Rodríguez M, Moreno J, et al. Effects of the Administration of *Bifidobacterium longum* subsp. infantis CECT 7210 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and Their Synbiotic Combination With Galacto Oligosaccharides Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 in an Early Weaned Piglet Model. Front Microbiol. 2021;12:850. DOI: 10.3389/fmicb.2021.642549.

20. Buddhasiri S, Sukjoi C, Kaewsakhorn T, Nambunmee K, Nakphaichit M, Nitisinprasert S, et al. Anti-inflammatory Effect of Probiotic *Limosilactobacillus reuteri* KUB-AC5 Against *Salmonella* Infection in a Mouse Colitis Model. Front Microbiol. 2021;12:2463. DOI:10.3389/fmicb.2021.716761.

21. Riaz A, Noureen S, Liqat I, Arshad M, Arshad N. Antilisterial efficacy of *Lactobacillus brevis* MF179529 from cow: An *in vivo* evidence. BMC Complement Altern Med. 2019;19(1):1–9. DOI: 10.1186/s12906-019-2444-5

22. Golić N, Veljović K, Popović N, Djokić J, Strahinić I, Mrvaljević I, et al. In vitro and *in vivo* antagonistic activity of new probiotic culture against *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*. BMC Microbiol. 2017;17(1):1–9. DOI: 10.1186/s12866-017-1015-5

23. Ribeiro C, de Barros P, Rossoni D, Junqueira C, Jorge O. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors *in vitro* and modulates immune system in *Galleria mellonella*. J Appl Microbiol. 2017;122(1):201–11. DOI: 10.1111/jam.13324.

24. Epelboin L, Bossi P. Listeriosis. EMC - Tratado de Medicina [Internet]. 1 de enero de 2011 [citado 6 de julio de 2024];15(1):1–8. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1636541011709680

25. Buchanan L, Gorris G, Hayman M, Jackson C, Whiting C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food Control. 2017;75:1–13. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016

26. Rossi L, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso R. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. Rev. chil. infectol. 2008;25(5):328–35. DOI: 10.4067/S0716-10182008000500002

27. Denny J, McLauchlin J. Human *Listeria monocytogenes* infections in European opportunity for improved European surveillance. Euro Surveill [Internet]. 2008;13(13):9–10.

28. Granada F. *Listeria monocytogenes*: transmisión, formas y tratamientos efectivos [Internet]. 2018 [citado 18 de julio de 2024]. Disponible en: https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/listeria-monocytogenes-listeriosis-transmision-tratamiento

29. Rogalla D, Bomar A. *Listeria Monocytogenes*. Laboratory Models for Foodborne Infections. 2023;185–96. DOI: 10.1016/B978-0-12-822521-9.00045-9

30. Osek J, Lachtara B, Wieczorek K. *Listeria monocytogenes* – How this pathogen survives in food production Environments? Front Microbiol. 2022;13:866462. DOI: 10.3389/fmicb.2022.866462

31. Luque L, Arroyo C, Fox M, McMahon J, Bai L, Li F, et al. Antimicrobial Resistance in *Listeria* Species . Microbiol Spectr. 2018;6(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0031-2017

32. Tao S, Chen H, Li N, Wang T, Liang W. The Spread of Antibiotic Resistance Genes *in vivo* model. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2022;3348695. DOI: 10.1155/2022/3348695

33. Organización Mundial de la Salud. Antibiotic resistance [Internet]. 2020 [citado 3 de agosto de 2024]. Disponible en: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance

34. Central Nacional de enfermedades zoonóticas y Emergentes (NCEZID), Centros para el control y la prevención de Enfermedades (CDC). Cómo ocurre la resistencia a los antibióticos. [Internet]. 2022 [citado 3 de julio de 2024]. Disponible en: https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html

35. Modi R, Collins J, Relman A. Antibiotics and the gut microbiota. J Clin Invest. 2014;124(10):4212. DOI: 10.1172/JCI72333.

36. Blair M, Webber A, Baylay J, Ogbolu O, Piddock J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat. Rev. Microbiol. 2014;13(1):42–51. DOI:10.1038/nrmicro3380

37. Wang K, Pei H, Huang B, Zhu X, Zhang J, Zhou B, et al. The expression of ABC efflux pump, Rv1217c-Rv1218c, and its association with multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in China. Curr Microbiol. 2013;66(3):222–6. DOI: 10.1007/s00284-012-0215-3.

38. Habboush Y, Guzman N. Antibiotic Resistance. StatPearls [Internet]. 20 de junio de 2023 [citado 16 de noviembre de 2024]; Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/

39. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. Pathogens. 2021;10(10):1310. DOI: 10.3390/pathogens10101310

40. Long S, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA Methyltransferase Confers Resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A Antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(7):2500. DOI: 10.1128/AAC.00131-06.

41. Wiśniewski P, Zakrzewski AJ, Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments. Pathogens. 2022;11(10):1099. DOI: 10.3390/pathogens11101099.

42. Olveira G, González I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. Endocrinol. nutr. 2016;63(9):482–94. DOI: 10.1016/j.endonu.2016.07.006.

43. Pandey K, Naik R, Vakil V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. J Food Sci Technol. 2015;52(12):7577. DOI: 10.1007/s13197-015-1921-1.

44. Rudas P. Elaboración de una bebida simbiótica a base de pulpa de *Hylocereus monacanthus* (Hort. Ex Lem.) Britton & Rose "pitahaya roja". [Tesis de grado]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2023.

45. Mokoena P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, Biosynthesis and applications against uropathogens: A Mini-Review. Molecules. 2017;22(8):1255. DOI: 10.3390/molecules22081255

46. Parada L, Caron R, Medeiros B, Soccol R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Braz. Arch. Biol. Technol. [Internet]. 2007;50(3):512–42. DOI: 10.1590/S1516-89132007000300018

47. Fernandes A, Jobby R. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential clinical applications. Appl. Biochem. Biotechnol. 2022;194(10):4377–99. DOI: 10.1007/s12010-022-03870-3

48. Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, et al. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. J Clin Lab Anal. 2022;36(1). DOI: 10.1002/jcla.24093

49. Domínguez A, Hernández I, Martínez J, Olmos A, Verduzco A, Mota D. The Importance of Animal Models in Biomedical Research: Current Insights and Applications. Animals (Basel) 2023;13(7):1223. DOI: 10.3390/ani13071223

50. Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, Nandi SK. Role of animal models in biomedical research: a review. Lab Anim Re. 2022;38(1):1–17. DOI: 10.1186/s42826-022-00128-1

51. Guzman M, Geuther BQ, Sabnis GS, Kumar V. Highly accurate and precise determination of mouse mass using computer vision. Patterns. 2024;5(9):101039. DOI: 10.1101/2023.12.30.573718

52. Bryda E. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. Mo Med. 2013 ;110(3):207.

53. Brochut M, Heinonen T, Snäkä T, Gilbert C, Le Roy D, Roger T. Using weight loss to predict outcome and define a humane endpoint in preclinical sepsis studies. Sci Rep. 2024;14(1):1–12. DOI: 10.1038/s41598-024-72039-1.

54. Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton C, Smith JM. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. Curr Protoc Mouse Biol. 2012;2(2):145. DOI: 10.1002/9780470942390.mo110217.

55. Guzman M, Geuther BQ, Sabnis GS, Kumar V. Highly accurate and precise determination of mouse mass using computer vision. Patterns. 2024;5(9):101039. DOI: 10.1101/2023.12.30.573718

56. Organización Panamericana de la Salud. Zoonosis.[Internet]. [citado 28 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://www.paho.org/es/temas/zoonosis

57. Karjalainen E, Repasky GA. Molecular Changes During Acute Myeloid Leukemia (AML) Evolution and Identification of Novel Treatment Strategies Through Molecular Stratification. Prog Mol Biol Transl Sci. 2016;144:383–436. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2016.09.005.

58. Chen G, Li C, Chen K. Fructooligosaccharides: A Review on Their Mechanisms of Action and Effects. J. Nat. Prod. 2016;48:209–29. DOI: 10.1016/B978-0-444-63602-7.00006-0

59. De la Calle N, Santa C, Cardona N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. CES Medicina. 2012;26(1):43–55.

60. Gallo G. Mechanisms Underlying the Initiation and Dynamics of Neuronal Filopodia: From Neurite Formation to Synaptogenesis. Int Rev Cell Mol Biol. 2013;301:95–156. DOI: 10.1016/B978-0-12-407704-1.00003-8

61. Schoentgen F. Insight on the role of RKIP in cancer through key protein partners and cellular protrusions. Prognostic and Therapeutic Applications of RKIP in Cancer. Elsevier, pp.3-35, 2020.

62. Elli M, Arioli S, Guglielmetti S, Mora D. Biocide susceptibility in bifidobacteria of human origin. J Glob Antimicrob Resist. 2013;1(2):97–101. DOI: 10.1016/j.jgar.2013.03.007

63. Uribe E, Rosales C. Phagocytosis. Encyclopedia of Infection and Immunity. 2022;1:99–109. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01066
.
64. González S, Bermúdez G, Ochoa A, Rutiaga O, Gallegos J. Synbiotics: a technological approach in food applications. J Food Sci Technol. 2021;58(3):811–24. DOI: 10.1007/s13197-020-04532-0.

65. Instituto Nacional de Salud. MINSA. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón [Internet]. FIMART S.A. Lima: Gráfica técnica S.R.L.; 2008 [citado 4 de julio de 2024]. 52 p. Disponible en: www.ins.gob.pe

66. Política del PHS sobre el cuidado y uso humanitario de animales de laboratorio | OLAW [Internet]. [citado 12 de octubre de 2024]. Disponible en: https://olaw.nih.gov/policies-laws/phs-policy.htm

67. Yang J, Lee J. Application of Sensory Descriptive Analysis and Consumer Studies to Investigate Traditional and Authentic Foods: A Review. Foods. 2019;8(2).54. DOI: 10.3390/foods8020054

68. AOAC. Métodos Oficiales de Análisis, 21ª Edición (2019) - AOAC INTERNACIONAL [Internet]. 2019. [citado 13 de agosto de 2024]. Disponible en: https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/

69. Colombo M, Oliveira AEZ de, Carvalho AF de, Nero LA. Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. Food Microbiol. 2014;39:89–95. DOI: 10.1016/j.fm.2013.11.008
.
70. García P, Gil E, Botero S, Valencia F, et al. Control de crecimiento de *Listeria monocytogene*s en co-cultivo con *Lactobacillus plantaram*. Rev Colomb Biotecnol. 2018;20(2):68–77. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77064

71. Muñiz A. Métodos de detección y control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria [Internet]. Universidad de Oviedo; 2018 [citado 10 de agosto de 2024]. Disponible en: https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/47625/TFM_AnaAlonsoMu%F1iz.pdf;jsessionid=F2E194BFF70C0EABB52C133F39037487?sequence=3

72. González M. Caracterización fenotípica de cepas de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) en pacientes pediátricos y sus perfiles de resistencia a aminoglucósidos, quinolonas y betalactámicos [Tesis de grado]. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República Uruguay; 2013.

73. Linkenhoker R, Linton G. Effect of nesting material on body weights of mice infected with *Toxoplasma gondii*. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2013;52(5):531.

74. Da Cunha Júnior C, De Oliveira L de S, Gouvêa L de P, De Alcantara M. . Symbiotic drink based on Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K): production, characterization, probiotic viability and sensory acceptance. Ciência Rural. 2020;51(2):e20200361. DOI: 10.1590/0103-8478cr20200361

75. Maftei M, Iancu V, Goroftei Bogdan R, Gurau V, Ramos A, Pelin M. A Novel Symbiotic Beverage Based on Sea Buckthorn, Soy Milk and Inulin: Production, Characterization, Probiotic Viability, and Sensory Acceptance. Microorganisms. 2023;11(3):736. DOI: 10.3390/microorganisms11030736

76. Dimitrovski D, Velickova E, Dimitrovska M, Langerholc T, Winkelhausen E. Synbiotic functional drink from Jerusalem artichoke juice fermented by probiotic *Lactobacillus plantarum* PCS26. J Food Sci Technol. 2016;53(1):766. DOI: 10.1007/s13197-015-2064-0.

77. Maia S, Domingos M, De São José F. Viability of Probiotic Microorganisms and the Effect of Their Addition to Fruit and Vegetable Juices. Microorganisms. 2023;11(5):1335. DOI: 10.3390/microorganisms11051335.

78. Verona A, Urcia J, Paucar L, Verona A, Urcia J, Paucar L. Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. Scientia Agropecuaria. 2020;11(3):439–53. DOI:10.17268/sci.agropecu.2020.03.16

79. Deziderio A, de Souza F, Kamimura S, Petrus R. Plant based fermented beverages: Development and characterization. Foods. 2023;12(22). DOI: 10.3390/foods12224128

80. Bianchi F, Rossi EA, Gomes RG, Sivieri K. Potentially synbiotic fermented beverage with aqueous extracts of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and soy. Food Sci Technol Int. 2015;21(6):403-15. DOI: 10.1177/1082013214540672

81. Shori AB. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. Food Biosci. 2016;13:1–8. DOI: 10.1016/j.fbio.2015.11.001

82. Shi LH, Balakrishnan K, Thiagarajah K, Mohd Ismail NI, Yin OS. Beneficial Properties of Probiotics. Trop Life Sci Res. 2016;27(2):73. DOI: 10.21315/tlsr2016.27.2.6

83. Hong L, Lee S, Kim W, Choi Y, Oh S, Li Y, et al. Synbiotics Containing Nanoprebiotics: A Novel Therapeutic Strategy to Restore Gut Dysbiosis. Front Microbiol. 2021;12:715241. DOI: 10.3389/fmicb.2021.715241

84. Pino A, Rapisarda M, Vitale G, Cianci S, Caggia C, Randazzo L, et al. A clinical pilot study on the effect of the probiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* TOM 22.8 strain in women with vaginal dysbiosis. Scientific Reports. 2021;11(1):1–12. DOI: 10.1038/s41598-021-81931-z

85. Servin A, Coconnier M. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003;17(5):741–54. DOI: 10.1016/s1521-6918(03)00052-0

86. Poimenidou S V., Skarveli A, Saxami G, Mitsou EK, Kotsou M, Kyriacou A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* Growth, Adherence and Invasion in Caco-2 Cells by Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fecal Samples of Healthy Neonates. Microorganisms. 2023;11(2):363. DOI: 10.3390/microorganisms11020363

87. Gueimonde M, Jalonen L, He F, Hiramatsu M, Salminen S. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected *lactobacilli*. Food Res lnt. 2006;39(4):467–71. DOI: 10.1016/j.foodres.2005.10.003

88. Nácher M, Elizaquível P, Fiszman S, Salvador A, Aznar R. Estudio de la producción de exopolisacáricos por bacterias lácticas y su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales. 4º Reunión de la Red Temática: participación de las bacterias lácticas en la salud humana y en la calidad alimentaria; 12-14 Nov 2009; Granada, España. Granada: (IATA) Comunicaciones congresos; 2009, P.12-15.

89. Prakash V, Madhavan A, Veedu AP, Babu P, Jothish A, Nair SS, et al. Harnessing the probiotic properties and immunomodulatory effects of fermented food-derived *Limosilactobacillus* fermentum strains: implications for environmental enteropathy. Front Nutr. 2023;10:1200926. DOI: 10.3389/fnut.2023.1200926

X. ANEXOS (*)

Anexo 1. Diseño experimental de la investigación

Tabla 9: Resumen del diseño experimental de la investigación

<table>
<tr><th colspan="3">ADQUISICIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BEBIDA SIMBIÓTICA CON PULPA DE PITAHAYA ROJA</th></tr>
<tr><td colspan="2">CARACTERIZACIÓN ORGANOLEPTICA
Evaluación de atributos como:
• Color, olor, sabor y aspecto general.</td><td>CARACTERIZACIÓN FISICOQUIMICA DE:
• pH, Grados Brix, % acidez y el recuento de BAL en la bebida.</td></tr>
<tr><th colspan="3">ADQUISICIÓN - ACONDICIONAMIENTO DE CEPAS PATÓGENAS Y MUESTRA ANIMAL</th></tr>
<tr><td colspan="2">CEPA PATÓGENA
Adquirida de GenLab:
Listeria monocytogenes ATCC® 7644™
ACTIVACIÓN:
Uso de caldo BHI (cerebro-corazón) y siembra en Agar TSA.</td><td>ADQUISICIÓN DE ANIMALES:
• Ratones albinos sanos (Mus musculus) de 3 a 4 semanas de edad del INS. Acondicionados por 1 semana a temperaturas controladas de 28 ± 2 °C, con fotoperiodos de 12 ciclos de luz/oscuridad y dieta basal proporcionados ad libitum.</td></tr>
<tr><th colspan="3">DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA INVESTIGACIÓN
(Duración: 17 días experimentales, tras la semana de acondicionamiento)</th></tr>
<tr><td colspan="3">DIVISIÓN DE GRUPOS EXPERIMENTALES:
Grupo control patógeno (GCP): dosis de Listeria monocytogenes ATCC® 7644™.
Grupos control sin patógeno (GCSP); sin dosis de Listeria monocytogenes ATCC® 7644™.
Grupo control bebida (GB): con dosis de bebida simbiótica al 1% v/p del ratón.
Grupo profiláctico 1 (GP1): con dosis de bebida simbiótica suministrada con 1% v/p del ratón + 500 µL de L. monocytogenes
Grupo profiláctico 2 (GP2): con dosis de bebida simbiótica suministrada con 0,5% v/p del ratón + 500 µL de L. monocytogenes
Grupo tratamiento 1 (GT1): con dosis de bebida simbiótica suministrada con 1% v/p del ratón + 500 µL de L. monocytogenes
Grupo tratamiento 2 (GT2): con dosis de bebida simbiótica suministrada con 0,5% v/p del ratón + 500 µL de L. monocytogenes</td></tr>
<tr><th colspan="3">EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LA BEBIDA SIMBIOTICA FRENTE A Listeria monocytogenes</th></tr>
<tr><th colspan="3">Las pruebas se realizaron en muestras de heces de los animales:</th></tr>
<tr><td>RECUENTO DE BAL
Sé utiliza: Agar MRS, las 3 últimas diluciones 10^{-8} a 10^{-10} y el método de siembra fue por incorporación (1 mL de muestra en el agar MRS)</td><td>RECUENTO DE Listeria monocytogenes
Sé utiliza: Agar Oxford, las 4 últimas diluciones 10^{-7} a 10^{-10} y el método de siembra es por extensión (100 uL muestra)</td><td>Recuento de Enterobacterias
Sé utiliza: Agar MacConkey, las 3 últimas diluciones, el método de siembra es por incorporación (1 mL de muestra en el agar)</td></tr>
<tr><th colspan="3">EVALUACIÓN FÍSICA DE HECES Y BIENESTAR GENERAL DE LOS RATONES</th></tr>
<tr><td>EVALUACIÓN FÍSICA DE MUESTRAS FECALES
Se realizó una escala de 1 al 4.
Siendo 1 la característica de heces sólidas y terrosas, como 4 caracterizaría a heces acuosas y con textura semilíquida o con presencia de sangre.</td><td>EVALUACIÓN GENERAL: Se usó una escala de 5 puntos, siendo (0) el valor que muestra al animal en estado activo, alerta y sin signos de malestar; caso contrario con (4) dado que reflejaría al animal con la espalda circunfleja, ojos semicerrados y hundidos, presentando heridas cutáneas.</td><td>EVALUACIÓN DE PESOS EN RATONES
Pesados desde el día 0 (pesos iniciales), estos fueron pesados 2 veces por semana.</td></tr>
</table>

Anexo 2: Evaluación de pesos de ratones en los grupos experimentales en el paso de los días

Tabla 10. Variación de pesos de ratones de los grupos experimentales en el paso de los días.

Días	Grupo control sin patógeno (GCSP)	Grupo profiláctico + 1% de bebida simbiótica (GP1)	Grupo profiláctico + 0,5 % de bebida simbiótica (GP2)	Grupo control patógeno (GCP)	Grupo tratamiento + 1% de bebida simbiótica (GT1)	Grupo tratamiento + 0,5% de bebida simbiótica (GT2)	Grupo control bebida (GB)
0	30,83±2,67^{a}	30,16±1,38^{a}	30,08±1,05^{a}	30,25±0,68^{a}	30,07±0,88^{ab}	30,01±1,30^{a}	30,42±1,30^{a}
1	30,83±2,73^{a}	31,35±1,83^{a}	30,04±0,51^{a}	29,31±0,99^{b}	30,11±0,81^{ab}	30,30±1,25^{a}	30,59±1,25^{a}
3	30,85±2,65^{a}	31,27±1,41^{a}	30,21±0,44^{a}	27,33±0,55^{c}	30,12±0,79^{ab}	30,37±1,60^{a}	30,88±1,60^{a}
6	30,17±2,53^{a}	29,78±2,60^{a}	29,08±0,51^{b}	26,97±0,49^{c}	29,31±0,72^{ab}	29,58±1,42^{ab}	31,95±1,42^{a}
10	30,71±3,03^{a}	31,22±2,82^{a}	29,02±0,21^{b}	26,88±0,48^{c}	29,09±0,78^{b}	28,97±1,72^{bc}	31,78±1,72^{a}
13	30,50±2,30^{a}	32,49±0,83^{a}	29,66±0,35^{ab}	26,65±0,66^{cd}	30,00±0,31^{ab}	28,42±0,64^{c}	31,91±0,64^{a}
17	30,73±2,67^{a}	32,21±1,27^{a}	30,08±0,14^{a}	25,86±0,43^{d}	30,34±0,38^{a}	29,05±0,85^{bc}	32,29±0.85^{a}

Los superíndices (a, b, c y d) en las columnas muestran las diferencias significativas entre los valores de los pesos (g) según a la prueba estadística Duncan ($p < 0,05$)

Nota: Los ratones fueron pesados al ser adquiridos (día 0), posteriormente se realizó la monitorización de pesos al término de la semana de acondicionamiento (día 1), para finalizar el pesado se realizó dos veces a la semana.

Anexo 3. Análisis fisicoquímicos, recuento de probióticos, dosificación y almacenamiento de bebida simbiótica a base de pulpa de *Hylocereus monocanthus* (Hort.Ex Lem.) Brintton & Rose "pitahaya roja"



Figura 9. Evaluación de características fisicoquímicas como pH, acidez titulable y sólidos solubles para la bebida simbiótica con pulpa de *Hylocereus monocanthus* (Hort.Ex Lem.) Brintton & Rose "pitahaya roja"



Figura 10. Recuento de probióticos de la bebida simbiótica previa a la dosificación a los animales.

Anexo 4. Adquisición y acondicionamiento de las 28 muestras animales *(Mus musculus)*



Figura 11. Distribución en jaulas, marcado de los ratones para su identificación (*Mus musculus*) y control de temperatura del ambiente seleccionado.

Anexo 5. Manipulación de ratones *Mus musculus* y recolección de muestras fecales para posteriores evaluaciones.



Figura 12. Administración de cepa patógena, recolección de muestras fecales e inducción a la excreta, administración de la bebida simbiótica a los ratones *Mus musculus.*

Anexo 6. Evaluación del efecto inhibitorio de la bebida simbiótica con pulpa *Hylocereus monocanthus* (Hort.Ex Lem.) Brintton & Rose "pitahaya roja" frente a *Listeria monocytogenes*, mediante recuento bacteriano en muestras fecales.

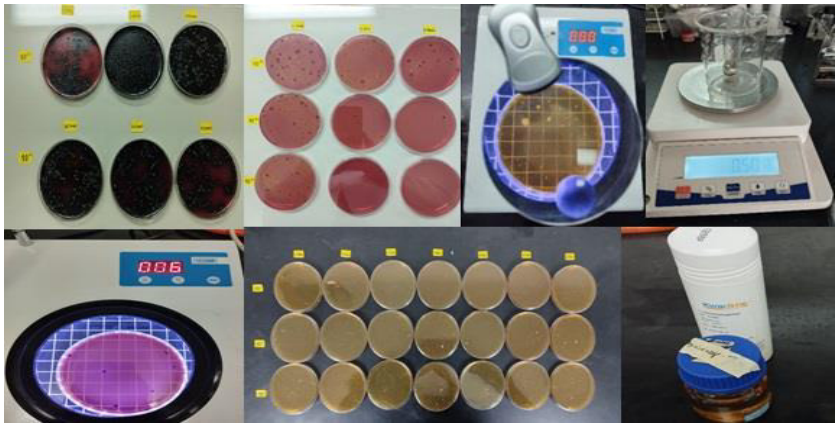


Figura 13. Recuentos bacterianos en diferentes diluciones, de *Listeria monocytogenes,* Enterobacterias y probióticos *(Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 53103™ *y Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™)

Anexo 7. Evaluación del bienestar general de los ratones albinos *Mus musculus* y caracterización de las heces recolectadas.



Figura 14. Puntuación del bienestar general (salud) y caracterización de las heces de los ratones

Anexo 8. Resumen ANOVA y análisis de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) del recuento de *Listeria monocytogenes* en heces de ratones por cada grupo experimental.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	25.8098	7	3.68711	35.70	0.0000
Intra grupos	0.8262	8	0.103275		
Total (Corr.)	26.636	15			

Figura 15. Resumen ANOVA para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo profiláctico 1 (GP1

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	2	0	X
1	2	2.69	X
7	2	2.81	X
11	2	3.035	X
3	2	3.305	XX
9	2	3.46	XX
5	2	4.025	XX
13	2	4.555	X

Figura 16. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo profiláctico 1 (GP1)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14.2193	7	2.03133	25.70	0.0001
Intra grupos	0.63225	8	0.0790313		
Total (Corr.)	14.8516	15			

Figura 17. Resumen ANOVA para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo control patógeno (GCP)

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	2	0	X
3	2	2.335	X
7	2	2.38	X
11	2	2.7	X
9	2	2.87	X
1	2	2.96	X
13	2	2.98	X
5	2	3.02	X

Figura 18. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo control patógeno (GCP)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	24.4288	7	3.48983	37.76	0.0000
Intra grupos	0.73945	8	0.0924313		
Total (Corr.)	25.1682	15			

Figura 19. Resumen ANOVA para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo terapéutico 1 (GT1)

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	2	0	X
7	2	1.31	X
1	2	2.655	X
3	2	3.235	XX
9	2	3.295	XX
5	2	3.34	XX
11	2	3.365	XX
13	2	3.935	X

Figura 20. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de *Listeria monocytogenes* del grupo terapéutico 1 (GT1)

Anexo 9. Resumen ANOVA y análisis de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de Enterobacterias en heces de ratones de todos los grupos experimentales.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	69.989	9	7.77655	25.33	0.0000
Intra grupos	3.0698	10	0.30698		
Total (Corr.)	73.0588	19			

Figura 21. Resumen ANOVA para el recuento de Enterobacterias del grupo profiláctico 1 (GP1)

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
17	2	3.61	X
15	2	4.53	XX
13	2	5.21	XX
11	2	6.145	XX
9	2	6.655	X
7	2	7.08	X
1	2	8.34	X
5	2	8.795	X
3	2	8.915	X
0	2	9.21	X

Figura 22. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de Enterobacterias del grupo profiláctico 1 (GP1)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11.645	9	1.29389	7.44	0.0021
Intra grupos	1.7393	10	0.17393		
Total (Corr.)	13.3843	19			

Figura 23. Resumen ANOVA para el recuento de Enterobacterias del grupo control patógeno (GCP)

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
17	2	6.3	X
13	2	7.665	X
15	2	7.755	X
11	2	8.08	XX
9	2	8.115	XX
5	2	8.545	XX
1	2	8.675	XX
3	2	8.81	X
7	2	8.835	X
0	2	8.97	X

Figura 24. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de Enterobacterias del grupo control patógeno (GCP)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	49.5944	9	5.51049	44.15	0.0000
Intra grupos	1.24805	10	0.124805		
Total (Corr.)	50.8425	19			

Figura 25. Resumen ANOVA para el recuento de Enterobacterias del grupo tratamiento 1 (GT1)

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
17	2	4.875	X
15	2	5.47	XX
13	2	5.79	X
11	2	6.26	X
9	2	8.095	X
3	2	8.62	XX
5	2	8.625	XX
1	2	8.67	XX
7	2	8.945	XX
0	2	9.235	X

Figura 26. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) para el recuento de Enterobacterias del grupo tratamiento 1 (GT1)

Anexo 10. Resumen ANOVA y análisis de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) del recuento de probióticos en heces de ratones por cada grupo experimental.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.2131	9	0.912567	4.64	0.0125
Intra grupos	1.968	10	0.1968		
Total (Corr.)	10.1811	19			

Figura 27. Resumen ANOVA del recuento de probióticos para el grupo profiláctico 1 (GP1)

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	2	9.15	X
1	2	9.695	XX
5	2	9.94	XXX
7	2	10.145	XXX
9	2	10.225	XXX
3	2	10.415	XXX
13	2	10.72	XXX
11	2	10.98	XX
15	2	11.01	XX
17	2	11.37	X

Figura 28. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) del recuento de probióticos para el grupo profiláctico 1 (GP1)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	18.9813	9	2.10903	3.59	0.0294
Intra grupos	5.8681	10	0.58681		
Total (Corr.)	24.8494	19			

Figura 29. Resumen ANOVA del recuento de probióticos para el grupo control patógeno (GCP)

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
17	2	6.435	X
11	2	7.17	XX
13	2	7.23	XX
15	2	7.275	XX
9	2	7.605	XXX
7	2	7.725	XXX
5	2	8.92	XX
0	2	9.15	X
3	2	9.155	X
1	2	9.225	X

Figura 30. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) del grupo control patógeno (GCP)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7.6697	9	0.852189	3.11	0.0457
Intra grupos	2.73755	10	0.273755		
Total (Corr.)	10.4073	19			

Figura 31. Resumen ANOVA del recuento de probióticos para el grupo tratamiento 1 (GT1)

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	2	9.13	X
7	2	9.29	X
5	2	9.315	X
1	2	9.36	X
3	2	9.45	XX
11	2	9.64	XX
9	2	9.8	XXX
13	2	10.355	XXX
15	2	10.695	XX
17	2	11.0	X

Figura 32. Prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05) del recuento de probióticos para el grupo terapéutico 1 (GT1).

Anexo 11. Matriz de consistencia:

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	HIPÓTESIS	VARIABLES	OBJETIVO GENERAL	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	MÉTODOS	INSTRUMENTO(S)
¿La bebida simbiótica tendrá capacidad antagónica frente a *Listeria monocytogenes* en un modelo animal?	La bebida simbiótica tiene capacidad de inhibir a *Listeria monocytogenes* evaluado en un modelo animal.	**Independiente:** •Dosis alternadas de la bebida simbiótica en muestra animal.	Evaluar la capacidad antagónica de una bebida simbiótica en un modelo animal frente a *Listeria monocytogenes*	Realizar la evaluación fisicoquímica y microbiológica de la bebida simbiótica	Potenciométrico	Potenciómetro
					Refractométrico	Refractómetro
					Volumétrico	Bureta, Matraz
					Recuento en placa de probióticos viables.	Placas de vidrio
				Realizar el recuento de bacterias acido lácticas en heces de ratones *Mus musculus.*	Recuento en Log UFC/g de bacterias ácido lácticas	Placas descartables estériles, contador de colonias
		Dependiente: •Efecto inhibitorio frente a *Listeria monocytogenes.*		Realizar el recuento de *Listeria monocytogenes* en heces de ratones *Mus musculus*	Activación de Log UFC/mL de *L,monocytogenes*	Caldos enriquecidos y placas descartables estériles
					Recuento en Log UFC/g del patógeno	Placas descartables estériles, contador de colonias
				Realizar el recuento de Enterobacterias proveniente de la microbiota nativa en heces de ratones *Mus musculus.*	Recuento en Log UFC/g de Enterobacterias	Placas descartables estériles, contador de colonias
				Evaluar las características físicas de las heces del modelo animal y su salud general.	Observación física de las heces del modelo animal	Fichas virtuales, cámara móvil
					Observación física del animal	Fichas virtuales, cámara móvil