



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DELESTADO DE PUEBLA

---

*FACULTAD DE NUTRICIÓN CLÍNICA*

***Encapsulación de probióticos para determinar su  
viabilidad como alternativa para la absorción  
intestinal***

**Tesis, que para obtener el Título de**

**Maestra en Nutrición Clínica**

**Presenta:**

**Velázquez Jiménez Martha**

**Director:**

**Dra. Beatriz Pérez Armendáriz**



**UPAEP – Secretaría General**

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

**Tesis Digitales Restricciones de uso:**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice

Índice de figuras.....	1
Índice de tablas .....	4
Resumen .....	5
Abstract.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
CAPITULO I.....	9
MARCO TEÓRICO .....	9
<b>1.1. Historia de los probióticos:</b> .....	9
<b>1.1.1 Probióticos</b> .....	10
<b>1.1.2 Microorganismos de los probióticos</b> .....	12
<b>1.1.3 Características del género <i>L. casei shirota</i> <i>L. leishmannii</i>.</b> .....	14
<b>1.1.4 Características del genero <i>B. tequilensis</i></b> .....	15
<b>1.2 Características generales de los probióticos:</b> .....	16
<b>1.2.1 Microorganismos en el hombre:</b> .....	18
<b>1.3 Mecanismos de acción:</b> .....	21
<b>1.4 Viabilidad y la estabilidad de la cepa probiótica:</b> .....	22
<b>1.4.1. Factores que condicionan la viabilidad de los probióticos</b> .....	22
<b>1.4.2 Viabilidad de los cultivos probióticos en el almacenamiento</b> .....	24
<b>1.5 Microencapsulación</b> .....	25
<b>1.5.1 Microencapsulación de probióticos</b> .....	25
<b>1.5.2 Microencapsulación y sus beneficios</b> .....	26
<b>1.5.3 Uso de la microencapsulación como mecanismo de protección de probióticos.</b> .....	27
<b>1.6 Encapsulación:</b> .....	28
<b>1.6. 1Estructura de las cápsulas</b> .....	29
<b>1.6.2 Materiales utilizados en la encapsulación</b> .....	30
<b>1.6.3 Métodos de encapsulación</b> .....	31
<b>1.7 Gelificación iónica</b> .....	34
<b>1.7.1 Mecanismos de gelificación con alginato</b> .....	36

<b>1.8 Supervivencia o viabilidad de los probióticos en el producto</b> .....	38
<b>1.8.1 Viabilidad durante el procesado y el a almacenamiento en refrigeración</b>	39
<b>1.9. Consideraciones de la ingesta de microorganismos probióticos</b> .....	40
<b>CAPITULO II</b> .....	42
<b>ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO</b> .....	42
<b>2.1 Planteamiento del problema</b> .....	43
<b>2.2 Justificación</b> .....	45
<b>2.3 Objetivo</b> .....	47
<b>2.3.1 Objetivos específicos</b> .....	47
<b>CAPITULO III</b> .....	48
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	48
<b>3.1. Preparación del inoculo (Heenan et al, 2004)</b> .....	48
<b>3.1.1.1 Empleo de alginato de sodio para formación de perlas</b> .....	48
<b>3.1.1.2 Determinación de tamaño de las perlas formadas</b> .....	50
<b>3.1.2 Supervivencia de microorganismos probióticos mediante técnicas de espectrofotometría</b> .....	51
<b>3.1.2.1 Supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados mediante técnicas de espectrofotometría</b> .....	51
<b>3.2 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular con ácido clorhídrico</b> .....	52
<b>3.2.1 Evaluación de bacterias probióticas en distintas concentraciones pH.</b> ....	52
<b>3.2.2 Evaluación de probióticos encapsulados en distintas concentraciones pH.</b>	53
.....	
<b>3.3 Evaluación de la viabilidad en microorganismos probióticos encapsulados a largo plazo</b> .....	54
<b>3.4 Determinación de viabilidad frente a diferentes condiciones de almacenamiento de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en alimento comercial.</b> .....	56
<b>3.4.1 Determinación de vida de anaquel de probióticos encapsulados mediante gelatina comercial a temperatura ambiente.</b> .....	56
<b>3.4.2 Determinación de vida de anaquel de probióticos encapsulados mediante gelatina comercial (sayes) a temperatura de refrigeración.</b> .....	58
<b>3.5 Viabilidad de bacterias probióticas en el encapsulado mediante vertido en placa y extensión en superficie</b> .....	60
<b>CAPITULO IV</b> .....	62

<b>RESULTADOS</b> .....	62
<b>4.1 Obtención del inóculo para elaboración de encapsulado</b> .....	62
<b>4.1.1 Obtención de encapsulado empleando alginato de sodio con microorganismos probióticos</b> .....	62
<b>4.1.2 Obtención del tamaño de las capsulas formadas</b> .....	63
<b>4.2 Evaluación de supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin capsula mediante técnicas de espectrofotometría</b> .....	63
<b>4.2.1 Evaluación de Cinética de crecimiento para probióticos encapsulados</b> ...	63
<b>4.2.1 Evaluación de Cinética de crecimiento para probióticos sin encapsular</b> .	65
<b>4.3 Optimación de las condiciones del estudio de supervivencia frente a condiciones gastrointestinales mediante técnicas de espectrofotometría</b> .....	68
<b>4.3.1 Evaluación de bacterias probióticas encapsuladas y sin encapsular en diferentes pH.</b> .....	68
<b>4.4 Evaluación de la viabilidad frente a diferentes condiciones de almacenamiento de microorganismos probióticos encapsulados</b> .....	70
<b>4.5 Evaluación de viabilidad frente a diferentes condiciones de almacenamiento de microorganismos probióticos encapsulados en alimento comercial.</b> .....	71
<b>4.5.1 Evaluación de probióticos encapsulados a temperatura ambiente.</b> .....	71
<b>4.5.2. Evaluación de probióticos encapsular en refrigeración.</b> .....	73
<b>CAPITULO V</b> .....	78
<b>DISCUSION DE RESULTADOS</b> .....	78
<b>CAPITULO VI</b> .....	81
<b>CONCLUSIONES</b> .....	81
<b>CAPITULO VII</b> .....	83
<b>FUNTES DE INFORMACIÓN</b> .....	83
<b>CAPITULO VIII</b> .....	94
<b>ANEXOS</b> .....	94

## Índice de figuras

Figura 1 Efectos benéficos de los microorganismos probióticos en la salud humana. ....	19
Figura 2. Población bacteriana a lo largo del tracto digestivo humano.....	20
Figura 3. Esquema de los diferentes procesos de microencapsulación. ....	33
Figura 4. Estructura química del alginato. ....	35
Figura 5. Estructura química del modelo “egg-box o caja de huevo”.....	36
Figura 6. Inoculo de bacterias probióticas: <i>Lactobacillus Casei Shirota</i> , <i>Lactobacillus Leichmannii</i> , <i>Bacillus Tequilensis</i> . ....	48
Figura 7. Alginato en forma de gel. ....	49
Figura 8. Diagrama esquemático del método de encapsulación por gelificación iónica.....	50
Figura 9. Bacterias probióticas en distintos pH.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 10. Bacterias encapsuladas en distintos pH. ....	54
Figura 11. Determinación de viabilidad durante 30 días por triplicado de bacterias encapsuladas: <i>Lactobacillus Casei Shirota</i> , <i>lactobacillus Leichmanni</i> , <i>Bacillus Tequilensis</i> .....	55
Figura 12 Determinación de vida de anaquel de probióticos encapsulados (Yakult ( <i>Lactobacillus casei Shirota</i> ), <i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>Bacillus tequilensis</i> ) a temperatura ambiente en gelatina de leche.....	56
Figura 13. Determinación de vida de anaquel de probióticos encapsulados ( <i>Lactobacillus casei Shirota</i> , <i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>Bacillus tequilensis</i> ) a temperatura ambiente en gelatina de agua. ....	57
Figura 14. Gelatina de leche (sayes /sabor coco).con probióticos encapsulados como: <i>Lactobacillus casei Shirota</i> , <i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>Bacillus tequilensis</i> a 4°C.....	58
Figura 15. Gelatina de agua (sayes/ sabor anís) con probióticos encapsulados <i>Lactobacillus casei Shirota</i> , <i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>Bacillus tequilensis</i> a 4°C de temperatura.....	59
Figura 16. Selección de perlas con la forma esférica.....	62
Figura 17. Capsulas con bacterias probióticas con la forma y tamaño apropiado 1-3 micras.....	63
Figura 18. Curva de crecimiento del <i>Lactobacillus. casei shirota</i> en los encapsulados a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs.....	64
Figura 19. Curva de crecimiento del <i>Lactobacillus. leichmannii</i> en los encapsulados a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs.....	64
Figura 20. Curva de crecimiento del <i>Bacillus tequilensis</i> en los encapsulados a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs. ....	65
Figura 21. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus. casei shirota</i> en los sin encapsular a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs.....	66
Figura 22. Curva de crecimiento del <i>Lactobacillus. leichmannii</i> en los sin encapsular a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs.....	66
Figura 23. Curva de crecimiento del <i>Bacillus tequilensis</i> en los sin encapsular a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs. ....	67
Figura 24. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei shirota</i> encapsulado a diferentes concentraciones de pH durante 48 horas en caldo MRS.....	68

Figura 25. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus leichmannii</i> encapsulado a diferentes concentraciones de pH durante 48 horas en caldo MRS. ....	69
Figura 26. Curva de crecimiento de <i>Bacillus tequilensis</i> encapsulado a diferentes concentraciones de pH durante 48 horas en caldo MRS. ....	69
Figura 27 . Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei shirota</i> sin encapsular a diferentes concentraciones de pH durante 48 horas en caldo MRS. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 28. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus leichmannii</i> encapsulado a diferentes concentraciones de pH durante 48 horas en caldo MRS. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 29. . Curva de crecimiento de <i>Bacillus tequilensis</i> encapsulado a diferentes concentraciones de pH durante 48 horas en caldo MRS. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 30. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei shirota</i> y su viabilidad durante 30 días a temperatura de refrigeración en agar MRS. ....	70
Figura 31. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus tequilensis</i> y su viabilidad durante 30 días a temperatura de refrigeración en agar MRS. ....	70
Figura 32. Curva de crecimiento de <i>Bacillus tequilensis</i> y su viabilidad durante 30 días a temperatura de refrigeración en agar MRS. ....	71
Figura 33. Vida de anaquel de bacterias probióticas encapsuladas en gelatina de agua almacenada a temperatura ambiente durante 30 días. ....	72
Figura 34. Vida de anaquel de bacterias probióticas encapsuladas en gelatina de leche almacenada a temperatura ambiente durante 30 días. ....	72
Figura 35 Vida de anaquel de bacterias probióticas encapsuladas en gelatina de agua almacenada a temperatura de 4°C durante 30 días. ....	73
Figura 36 Vida de anaquel de bacterias probióticas encapsuladas en gelatina de agua almacenada a temperatura de 4°C durante 30 días. ....	74



## **Índice de tablas**

Tabla 1.-Microorganismos considerados como probióticos.....	12
Tabla 2 Criterios de selección para microorganismos probióticos.....	17
Tabla 3. Principales bacterias presentes en el tracto gastrointestinal del hombre.....	20
Tabla 4. Efectos de cepas probióticas en estudios experimentales reportados.....	21

## Resumen

La mayoría de microorganismos considerados como probióticos pertenecen a las bacterias ácido láctico (BAL) y tienen un papel importante en el mejoramiento de la función intestinal, tanto para la salud humana como animal. Los probióticos poseen la habilidad de modular el sistema inmune del hospedero, competir para la colonización contra microorganismos patógenos y mejorar la digestión de los alimentos entre muchos otros beneficios.

Una de las desventajas del empleo de probióticos en el procesamiento de alimentos es la baja viabilidad de estos, la cual se puede ver afectada por condiciones ambientales como la humedad y la temperatura. Una alternativa para mitigar estos efectos es mediante el desarrollo de condiciones protectoras que garanticen dicha viabilidad y actividad de estos microorganismos durante su uso y aplicación en alimentos, asegurando que sean liberados en el intestino donde se precisa su acción.

El principal objetivo de la investigación fue encapsular bacterias probióticas utilizando técnicas y materia que se emplean en la actualidad con el fin de asegurar su sobrevivencia y manejo a nivel industrial.

Se emplearon materiales encapsulante como alginato de sodio, cloruro de calcio mediante la técnica de gelificación iónica, favoreciendo una exitosa encapsulación en las bacterias *L. casei shirota*, *L. leischmannii*, *B. tequilensis*. Así mismo se realizaron diversas pruebas tales como cinética de crecimiento, prueba de acidez, vida de anaquel y aplicación de encapsulado en alimento funcional (gelatina).

El estudio demostró que el uso de técnica gelificación iónica de encapsulación es una alternativa para aumentar la viabilidad a través del tiempo de *L. casei shirota*, *L. leichmannii* y *B. tequilensis*, con el fin de asegurar su sobrevivencia y facilitar su manejo a nivel industrial.

**Palabras clave:** encapsulación, probiótico, gelificación iónica, alginato de sodio.

## **Abstract**

The majority of microorganisms considered as probiotics belong to lactic acid bacteria (LAB) and have an important role in the improvement of intestinal function, both for human and animal health. Probiotics possess the ability to modulate the immune system of the host, compete for colonization against pathogenic microorganisms and improve the digestion of food among many other benefits.

One of the disadvantages of the use of probiotics in food processing is the low viability of these, which can be affected by environmental conditions such as humidity and temperature. An alternative to mitigate these effects is through the development of protective conditions that guarantee the viability and activity of these microorganisms during their use and application in food, ensuring that they are released into the intestine where their action is required.

The main objective of the research was to encapsulate probiotic bacteria using techniques and materials that are currently used in order to ensure their survival and management at industrial level.

Encapsulating materials such as sodium alginate, calcium chloride were used by the ionic gelation technique, favoring a successful encapsulation in *L. casei shirota*, *L. leischmannii*, *B. tequilensis* bacteria. Likewise, several tests were carried out such as growth kinetics, acidity test, shelf life and application of encapsulation in functional food (gelatin).

The study showed that the use of ionic gelation technique of encapsulation is an alternative to increase the viability of *L. casei shirota*, *L. leichmannii* and *B. tequilensis* over time, in order to ensure their survival and facilitate their management at the industrial

**Key words:** encapsulation, probiotic, ionic gelation, sodium alginate.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias probióticas son microorganismos vivos que al situarse en el tracto gastrointestinal pueden ejercer efectos benéficos en la salud del huésped. Algunos de estos efectos incluyen: control del colesterol, regulación de infecciones intestinales, mejora del sistema inmunológico, utilización de lactosa y disminución de actividad anticancerígena (Zhu et al., 2011; Tripathi et al., 2014). Cada una de estas propiedades dependen de la habilidad que presentan los probióticos de multiplicarse al interior del huésped, ya que para conferir los efectos benéficos mencionados previamente deben primero sobrevivir su paso a través del tracto gastrointestinal (Mohammadi et al., 2011). Dicha sobrevivencia se ve afectada por diversos factores: como la presencia o ausencia de oxígeno, el medio ambiente ácido, la interacción entre especies, las condiciones del cultivo, la producción de peróxido de hidrógeno por metabolismo microbiano, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de inhibidores de crecimiento. Dentro de las bacterias probióticas, el género *Lactobacillus spp* ha sido uno de los más estudiados y utilizados en la producción de alimentos funcionales en los años recientes (Ribeiro et al., 2014). Por consiguiente, una estrategia que permita la protección de bacterias probióticas en especial del género *Lactobacillus spp* frente a condiciones adversas resulta llamativa para una posterior aplicación en múltiples sistemas alimentarios. Una técnica usualmente utilizada en la protección de bacterias benéficas consiste en microencapsular la bacteria usando biopolímeros funcionales (Ribeiro et al., 2014).

La microencapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas son retenidas dentro de una matriz o sistema pared con el propósito de protegerlos frente a condiciones ambientales deletéreas (Shoji et al., 2013). Una microcápsula consiste de una membrana fuerte, delgada, semipermeable y esférica que rodea un núcleo sólido o líquido con un diámetro que varía de unas micras a 1 mm. Para preparar las microcápsulas existen numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos; siendo la metodología de gelación iónica un proceso desarrollado principalmente para inmovilizar células bacterianas, además no requiere el uso de elevadas temperaturas ni de solventes orgánicos (Patil et al., 2010). Dentro de las matrices más empleadas para la microencapsulación se encuentra el alginato y la goma gelana (Rosas et al., 2013). Los

alginatos (AS) son copolímeros lineales aniónicos compuestos de  $\beta$ - D ácido manurónico (M), y  $\alpha$ -L ácido gulurónico (G) unidos por enlace  $\beta$  1-4 y es estructurado por bloques que pueden ser homopoliméricos (M o G) o heteropoliméricos (MG) (Lee et al., 2012). Una de las aplicaciones más importantes de los alginatos en biotecnología, es la habilidad que tienen para formar geles estables a través de la interacción de dos cadenas adyacentes (G) con el  $\text{Ca}^{++}$  formando zonas de unión que estabilizan la estructura del gel (Fabich et al., 2012), esta estructura generalmente puede ser utilizada como microcápsula.

La viabilidad de los microorganismos probióticos en los productos donde se incorporen es relevante durante la selección de cepas probióticas, atendiendo a la importancia de que las cepas deben mostrar un buen crecimiento hasta elevadas concentraciones durante la obtención de biomasa y una resistencia moderada a las condiciones de procesado y almacenamiento. El requisito de viabilidad de los probióticos implica en cierto modo que cuando estos microorganismos son ingeridos deberían sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal y, en cierta medida, mantener activa su capacidad para interactuar con el epitelio o la microbiota intestinal, según su mecanismo de acción. Aunque los probióticos no sean colonizadores a largo plazo del tracto gastrointestinal, sí es relevante que puedan mantenerse funcionalmente activos en el intestino (Guarner, et al 2010).

# CAPITULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Historia de los probióticos:

Henry Tisser del Instituto Pasteur de París en 1906 aisló la primera bacteria ácido láctica (*Bifidobacteria*) de las heces fecales de un bebe lactante a la que se denominó *Bacillus bifidus communis* (Guarner et al., 2008). En el mismo año también descubrió que las heces fecales de niños con cuadro de diarrea tenían menores cantidades de bífidas en comparación con las de los niños sanos, por lo que sugirió la administración de este tipo de bacterias para pacientes con diarrea con el fin de ayudar a la recomposición de la flora intestinal sana (Olagnero et al., 2007).

En 1907, Eli Metchnikoff profesor del Instituto Pasteur y científico ruso ganó el Premio Nobel por investigación basada en los beneficios que ejercen ciertas bacterias al cuerpo humano. Dicha investigación se titula “La dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles” (Olagnero et al., 2007).

Metchnikoff en 1908 indicó que las bacterias fermentadas promueven beneficios para la salud y desde aquel momento los consumidores aceptaron a los alimentos con probióticos como “saludables” (Mazza, 1998).

El termino probiótico fue utilizado por primera vez por Lily y Stillwell en 1965, para denominar a las sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos, lo que la diferencia de los antibióticos (Guarner et al., 2008).

El término probiótico se utilizó como un antónimo de la palabra antibiótico, cuya raíz es de origen griego (pro = vida). Fue presentado por Lilly y Stillwell en el año 1965 a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. (WGO, 2008).

El interés científico por las bacterias como agente protector frente a diferentes enfermedades surge de la observación del biólogo Elie Metchnikoff, quien a principio del siglo XX remarcó la longevidad y buena salud de los campesinos búlgaros que consumían

grandes cantidades de yogurt. Propuso que el consumo regular de bacterias no patógenas ayudaba a mantener una flora intestinal saludable y que ese equilibrio entre bacterias patógenas y no patógenas era benéfico para la salud (Vergara, 2007)

Posteriormente, Roy Fuller en 1989 proporcionó la primera definición de probiótico “un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal”. En 1992 Havenaar y Huis plantaron una definición similar” un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona”.

En el 2001, la FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization) redefinió este concepto y manifestó que los probióticos son “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables” (De Vrese et al., 2008).

Actualmente, se mantiene que los probióticos son cultivos vivos de microorganismos, los cuales después de su ingesta en cantidades adecuadas son capaces de sobrevivir al tránsito gastrointestinal, de adherirse al estómago, de colonizar el intestino y de alterar de manera favorable el balance microbiano, ya que desplazan bacterias patógenas y crean un ambiente desfavorable para la proliferación de gérmenes perjudiciales aportando así al consumidor beneficios para su salud ( Travezaño et al., 2011) y (Geoffrey, 2006).

### **1.1.1 Probióticos**

Es considerado como un suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal. Es así que al restaurar la flora se vuelve al estado normal respecto a la nutrición, el crecimiento y salud (Fuller, 1998).

Los probióticos han sido consumidos por humanos desde tiempos inmemorables, en forma de leche fermentada, yogurt y otros alimentos fermentados, dependiendo de la cultura en particular, es el tipo de alimento fermentado a ocupar.

La Organización Mundial de la Salud define a los probióticos como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas producen un efecto beneficioso sobre la

salud del hospedador”. Para que los microorganismos puedan ser considerados probióticos deben de cumplir las condiciones (Arribas et al., 2008):

- Ser de origen humano ya que las cepas aisladas de los seres humanos sanos, posiblemente no sean patógenas y tengan más facilidad para colonizar el intestino, haciéndose utilizado para definir esta característica al acrónimo en inglés ”GRAS” (“*generally recognized as safe*”).
- Debe de poseer tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal (GI) ya que deben de llegar a condiciones viables al lugar de acción, por lo tanto es necesario que resistan factores como pH gástrico, enzimas digestivas y la acción de las sales biliares.
- Han de ser capaces de colonizar el intestino con un tiempo corto de replicación y adherirse a la mucosa intestinal para que tengan lugar a la modulación de la respuesta inmune, así como la exclusión de microorganismos patógenos.

Los probióticos utilizados en el mercado deben de ser evaluados detalladamente con el fin de estar conscientes de su inocuidad, y que estos no produzcan sustancias tóxicas ni afines a ésta, que pueda dañar al huésped (Hernández, 2009).

Denominados alimentos funcionales, al adicionarlos a determinados alimentos son eficaces en la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades como, *Clostridium difficile* o la inducida por el uso de antibióticos y la colitis alérgica (Ferre et al., 2001).

Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (Vergara, 2007).

Cuando nacemos, el tracto gastrointestinal es estéril pero poco después se instala de forma permanente un complejo conjunto de aproximadamente 400 tipos diferentes de microorganismos que trabajan en armonía para el mantenimiento de la salud (Caicedo, 2010).

Teniendo en cuenta que estos microorganismos benefician la salud del huésped, es necesario mantener la población de los probióticos alta ( $>1 \times 10^6$  ufc; FAO/WHO, 2001) en el intestino, esto se puede lograr mediante la introducción en nuestra dieta de alimentos

probióticos y prebióticos para estimular el crecimiento y la permanencia de los mismos (Páez., 2013).

La cantidad de probióticos vivos que debemos ingerir para observar un efecto positivo sobre el organismo, depende de la especie usada y del tipo de efecto buscado (Champagne et al., 2005). De manera general, se considera que consumiendo diariamente 100 g de alimento que contenga entre  $10^6$  y  $10^7$  ufc/g viables, se producirá un efecto benéfico para la salud (Ramos et al., 2012).

Tabla 1.-Microorganismos considerados como probióticos.

<b>Lactobacilos</b>	<b>Cocos Positivos</b>	<b>Gram</b>	<b>Bifidobacterías</b>	<b>Levaduras</b>
<i>L.acidophilus</i>			<i>B. adolencensis</i>	
	<i>Lactococcus lactis</i>		<i>B. bifidum</i>	
<i>L. bulgaicus</i>			<i>B. breve</i>	
<i>L.casei</i>	<i>Streptococcus</i>		<i>B. lactis</i>	
<i>L. curvatus</i>	<i>Salivarius</i>		<i>B.adolescentis</i>	
<i>L.plantarum</i>	<i>Enterococcuss</i>			
<i>L.johnsoni</i>	<i>Faecium</i>		<i>B.longum</i>	<i>Saccharomycess</i> <i>boulardii</i>
<i>L. lactis</i>			<i>B. thermophilum</i>	<i>S.cerviciae</i>
<i>L. reuteri.</i>				<i>Streptococcus</i> <i>termophilus</i>
<i>L. rhamnosus.GG.</i>	<i>Streptococcus</i>			

Fuente: Sanders (2008).

### 1.1.2 Microorganismos de los probióticos

#### *Lactobacilos*

Los lactobacilos son bacterias Gram positivas, anaeróbicas o aeróbicas facultativas, que aparecen en grandes cantidades en la mayor parte del tracto gastrointestinal. Su utilización como probióticos viene dada, entre otras cosas, por su influencia sobre la microflora intestinal y su antagonismo con las bacterias patógenas. Los lactobacilos son capaces de generar y soportar pH bajos (Prats, 2006).

### ***Bifidobacterias***

Las *Bifidobacterias*, por su parte, son bacterias anaeróbicas Gram positivas, que habitan principalmente en el intestino delgado, tanto de los humanos, como de los animales.

Un elevado número de *Bifidobacterias* en el colon favorece significativamente la salud humana, ya que contribuyen a prevenir la colonización de patógenos, pueden influir positivamente sobre la peristalsis intestinal, el sistema inmune, la prevención del cáncer, el metabolismo del colesterol y de los carbohidratos en el colon. Estas bacterias se utilizan principalmente como aditivos en productos lácteos (Prats, 2006).

### ***Bacillus***

Las bacterias del género *Bacillus* se consideran Gram positivas. Tienen forma de bastoncillo y están agrupadas en cadenas, son mótils y poseen flagelación peritrica. No son bacterias adherentes y son productoras de sustancias antimicrobianas, así como de enzimas hidrolasas. Entre las especies de mayor importancia, como probióticos pertenecientes a este género, están *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. natto*.

La producción de endosporas es una característica típica de todas las bacterias de los géneros *Bacillus*. Estas son pequeñas estructuras ovoides o esféricas y constituyen formas celulares muy resistentes al calor y al medio adverso. Las endosporas estimulan el sistema inmune, contribuyen a la resistencia ante patógenos ambientales y actúan en la inmunología específica (Grethel et al., 2008).

### ***Lactobacillus:***

Son bacterias ácido lácteas y se ubican en la familia *Lactobacillus*, son bacterias gram-positivas, son microorganismos anaerobios y estrictamente fermentativos. Los carbohidratos les resultan indispensables para su buen desarrollo, pues los fermentan para dar lugar al ácido láctico (a veces con ácidos Volátiles), alcohol y dióxido de carbono como subproductos (Caicedo, 2008).

El género *Lactobacillus* es el más grande, comprendiendo alrededor de 80 especies reconocidas y organizadas en tres grupo, basados principalmente en las características fermentativas. El grupo 1 incluye especies homofermentativas estrictas, el grupo 2 está formada por especies heterofermentativas facultativas y el grupo 3 está formada por especies heterofermentativas estrictas (Mora, 2007).

Las especies homofermentativas se asocian principalmente con el hombre y animales ya que se les puede encontrar en la cavidad oral, y contenido intestinal y vagina de mamíferos; mientras que las especies heterofermentativas están asociadas con los alimentos en donde llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente en productos empacados, refrigerados, se pueden aislar fácilmente de productos (Mora, 2007).

### **1.1.3 Características del género *L. casei shirota* *L. leishmannii*.**

Su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducido. Crecen entre 2 °C y 53 °C, aunque su temperatura óptima es de 30 a 40 °C. Son acidúricos creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5,5 – 6,2. Se han descrito siete grupos sereológicos (A-G) de *Lactobacillus*, basándose en sus determinantes antigénicos específicos. Se han descrito más de 12 especies y la especie tipo *Lactobacillus delbrueckii* pertenece al grupo E. (Collado, 2004).

#### ***Lactobacillus casei shirota***

Descubierto por Orla-Jensen en 1916 (Hansen et al., 1971). Bacilos de 0.7 – 1.1x 2 – 4 µm. Se presentan en forma de cadenas. Especie de gran importancia económica, empleada en muchos alimentos, se ha aislado de quesos, leche, productos lácteos fermentados y tracto intestinal. Es capaz de mantener su actividad metabólica en medios con bajo contenido de carbohidratos (Hussain et al., 2009). Tiene un historial probado en la salud humana y animal.

La cepa *L. casei shirota* Yakult ha sido efectiva en ratones destetados con infecciones intestinales (Ljungh et al., 2009). Importante inhibidor de patógenos gastrointestinales como *Helicobacter pylori* y otros patógenos que causan diarrea, *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *V. cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* (Cats et al., 2003; D. Sgouras et al., 2004; B. E. González et al., 2006; Goyal et al., 2008). *L. casei shirota* GG ha detenido la fase de diarrea en niños con infección de rotavirus (Walker et al., 1998). Se cree que sus componentes celulares como ácido lipoteicoico (LTA), proteínas de la superficie celular (CSPs) y ácidos nucleicos tienen propiedades antiinflamatorias.

#### **1.1.4 Características del genero *B. tequilensis***

##### **Taxonomía**

*Phylum Firmicutes*, Clase Bacilos, Orden *Bacillales*, Familia *Bacillaceae*, Género

*Bacillus*, *Bacillus tequilensis*.

Morfología: Gram-positivo, bacilo móvil, 0.9 x 4.0 y produce endosporas.

Las colonias son lisas, de color amarillento circular, hasta 4 mm de diámetro después de 1 día a 37 ° C en agar triptona, no hemolítico, crecimiento anaeróbico, crecimiento entre 25-50 ° C y pH 5.5 -8.

##### **Características Bioquímicas**

Los resultados son positivos para oxidasa, catalasa, arginina, beta-galactosidasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, utilización de citrato, hidrólisis de la caseína e hidrólisis del almidón, además tiene producción de indol y reducción de nitrato.

##### **Ecología**

Aislado aproximadamente hace 2000 años de edad en una tumba de Huitzlapa, cerca de la ciudad del Tequila Jalisco México.

##### **Patogenicidad**

Indeterminado (Gatson et al., 2006).

## Como potencial probiótico a *Bacillus tequilensis*

Como mencionó Villaseñor et al 2015, en el artículo “Modulación por probióticos de la comunidad bacteriana intestinal de juveniles de *Litopenaeus vannamei* infectados con *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170”, donde demuestra que *Vibrio parahaemolyticus* fue tratadas con una combinación de dos probióticos de Bacillus (*Bacillus tequilensis* YC5-2 y *B. endophyticus* C2-2 y C3-B) y el probiótico comercial Alibio.

### 1.2 Características generales de los probióticos:

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico, debe cumplir ciertas características: (Kolida et al., 2006; Dunne et al., 2001; citado por Cervantes, 2014). Véase tabla 2.

1. Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, ya que si los organismos probióticos han de llegar viables al intestino, es preciso que resistan el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares. (Arribas, 2009)
2. Han de ser capaces de colonizar el intestino, con un tiempo corto de replicación, y de adherirse a la mucosa intestinal para que tenga lugar la modulación de la respuesta inmune, así como la exclusión de microorganismos patógenos, si bien en este último puede obtenerse también la capacidad de producir compuestos antimicrobianos (Arribas, 2009).
3. Origen humano, ya que algunos de los efectos sobre la salud pueden ser dependientes de la especie (Vergara, 2007).
4. Ser antagonistas de microorganismos perjudiciales por la producción de alguna sustancia antimicrobiana o por competencia (Vergara, 2007).
5. Ser inocuos para el consumo humano y tener validados clínicamente sus efectos sobre la salud (Vergara, 2007).
6. Ser resistente a antibióticos (Vergara, 2007).
7. Co-agregación y formación de flora normal balanceado (Vásquez et al., 2007).
8. Ser seguros, no invasivos, no carcinogénicos, no patogénicos (Vásquez et al., 2007).

Tabla 2 Criterios de selección para microorganismos probióticos.

Características de las cepas probióticas	Comentarios
Estabilidad en ácidos y sales biliares	<p>Importante para la administración oral, pero no puede ser relevante para otras aplicaciones.</p> <p>Para la supervivencia de probióticos en el intestino es importante para mantener su integridad celular, adhesividad y actividad metabólica.</p>
Adhesión a las superficie de la mucosa	<p>Modulación inmune, exclusión competitiva, colonización transitoria e interacción.</p>
Seguridad para uso clínico y alimentario	<p>Identificación y caracterización de la cepa.</p> <p>Documentación de seguridad.</p> <p>No deben generar degradación de la mucosa intestinal, invasión ni transferencia de genes de virulencia, ni resistencia a antibióticos.</p>
Dosis y cantidades	<p>La dosis de probióticos ingeridos, debe ser la necesaria para modular y estabilizar la composición de la microbiota, confiriendo efectos inmunomoduladores.</p>

Fuente: Serna (2012).

### **Estabilidad en el paso por el estómago**

Muchos de los microorganismos caracterizados como probióticos no han sido sometidos a pruebas de resistencia frente a ácidos. Estas pruebas son imprescindibles ya que las respuestas varían de acuerdo a la especie. En el estómago se tiene un tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago son 90 minutos. Por lo que las pruebas *in vitro* de resistencia de microorganismos susceptibles a ser catalogados como probióticos

deben verificar que son capaces de resistir ese tiempo y pH sin perder viabilidad. (Paitán, 2015).

### **Capacidad de adhesión al intestino**

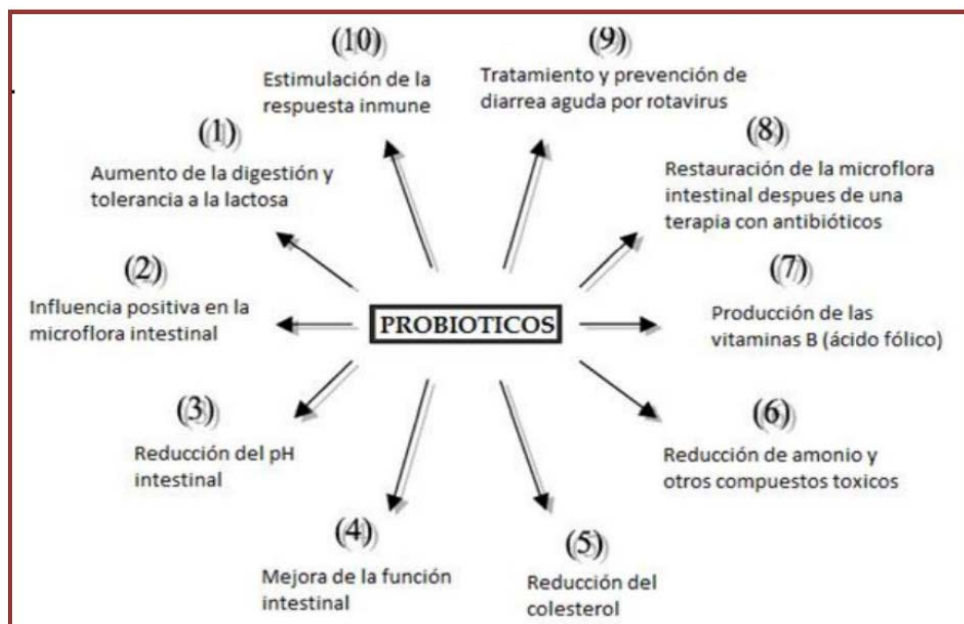
La capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino es un importante criterio para los probióticos ya que solo las cepas se puedan adherir podrán llevar a cabo una colonización efectiva (Gonzales et al., 2006).

Sin adhesión a la mucosa intestinal, la concentración de los probióticos sería diluida hasta un nivel insignificante después de una comida o bebida (Salminen et al., 2005).

#### **1.2.1 Microorganismos en el hombre:**

Las funciones básicas que desarrollan son: metabólica (descomposición de alimentos), barrera (protección contra el exterior) e interacción con el huésped (a través del sistema inmunológico) figura 1. En primera fase, las cepas aerobias y anaerobias facultativas colonizan el tubo digestivo, entre ellas las de *Lactobacillus* y *Escherchia coli* y se va instaurando, en consecuencia, un microsistema en el que también destaca una gran proliferación de bacterias anaerobias pertenecientes mayoritariamente a los géneros *Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidubacterium* (Rodríguez, 2009).2.1

La población bacteriana en el estómago es baja  $<10^3$  UFC, debido al pH ácido en este sitio, ya que las secreciones ácidas, biliares y pancreáticas destruyen casi todas las bacterias que pasan por este lugar, difícilmente éstas pueden incrementarse al llegar al intestino delgado, ya que el tiempo de tránsito es reducido (4 a 6 h). El número de bacterias aumenta progresivamente con un aprox. de  $10^4$  células en el yeyuno a  $10^7$  UCF/G de contenido en el íleon distal. En el intestino grueso las bacterias se incrementan de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  UFC/g, puesto que el tiempo de tránsito, hasta el recto, es de 54 a 56 horas (Ávila 2011).



Fuente: Ávila (2011).

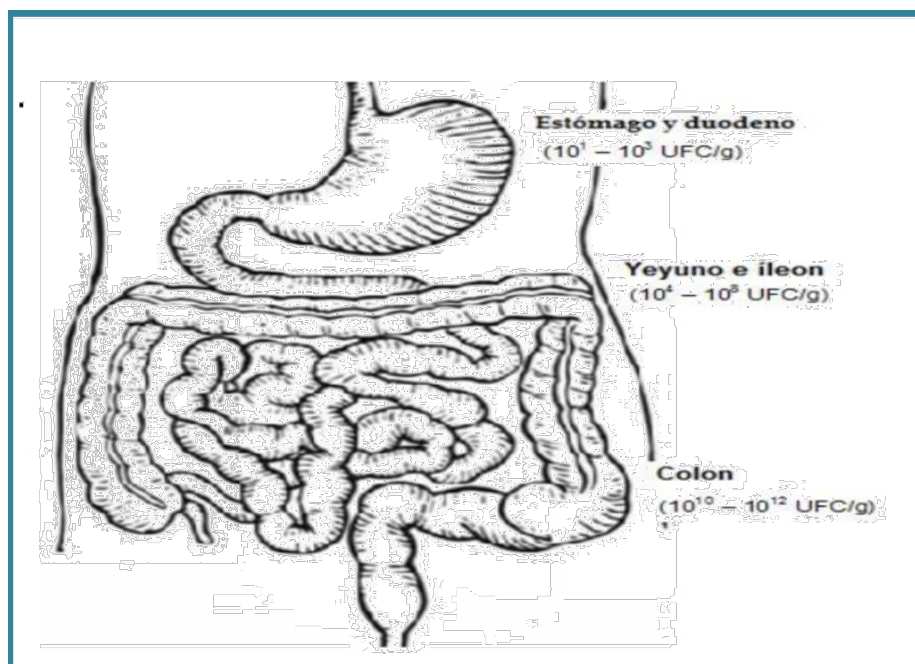
Figura 1 Efectos benéficos de los microorganismos probióticos en la salud humana..

### Tracto gastrointestinal

El intestino grueso de los seres humanos constituye un complejo ecosistema microbiano en el que habitan de 400 a 500 especies bacterianas distintas que se encuentran presentes en la microflora fecal (microflora endógena) a concentraciones de hasta  $10^{11}$  UFC/g (figura 2).

Asimismo, en el tracto gastrointestinal existen aproximadamente  $10^{14}$  bacterias. Las bacterias presentes a concentraciones de entre  $10^8$  y  $10^{11}$  células/gramo de heces se denominan dominantes, y las que se encuentran a concentraciones inferiores son la microflora subdominante.

La microflora subdominante se compone de miembros de los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y en menores cantidades, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* y levaduras. Por otra parte, después de la ingesta de alimento, las bacterias exógenas que atraviesan el tracto gastrointestinal constituyen la microflora transitoria. El desarrollo de la microflora intestinal se produce a lo largo de la vida y se ve alterado por la alimentación (Miranda, 2009).



Fuente: Ávila (2011).

Figura 2. Población bacteriana a lo largo del tracto digestivo humano.

La relación de microorganismos comúnmente asociados al tracto gastrointestinal se presenta en la tabla 3, así como sus principales productos de fermentación.

Tabla 3. Principales bacterias presentes en el tracto gastrointestinal del hombre.

<b>Género</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Productos de fermentación</b>	<b>de</b>
<i>Bacteroides</i>	Bacilo gram negativo	A, P, S.	
<i>Eubacterium</i>	Bacilo gram positivo	A, B, L	
<i>Bifidobacterium</i>	Bacilo gram positivo	A, L, F, E	
<i>Clostridium</i>	Bacilo gram positivo	A, P, B, L, E	
<i>Lactobacillus</i>	Bacilo gram positivo	L	
<i>Ruminococcus</i>	Coco gram positivo	A	
<i>Peptostreptococcus</i>	Coco gram positivo	A, L	
<i>Peptococcus</i>	Coco gram positivo	A, B, L	
<i>Metanobrevibacter</i>	Cocobacilo gram positivo	C	
<i>Desulfovibrio</i>	Bacilo gram negativo	A	

<i>Propionobacterium</i>	Bacilo gram positivo	A, P
<i>Actinomyces</i>	Bacilo gram positivo	A, L, S
<i>Streptococcus</i>	Coco gram positivo	L, A
<i>Fusobacterium</i>	Bacilo gram negativo	B, A, L
<i>Escherichia</i>	Bacilo gram negativo	Mezcla de ácidos

Fuente: Adaptado de Macfarlane et al, 1995, Rodríguez (2009); donde: A: Acetato; P: Propionato; B: Butirato; L: Lactato; S: Succinato; F: Formiato; E: Etanol; C: Metano.

### 1.3 Mecanismos de acción:

Los nutrientes están en cantidades limitada en el intestino, si las bacterias beneficiosas consumen estos nutrientes necesarios para el desarrollo del agente patógeno, limitan así su proliferación (Vergara, 2007).

Los microorganismos probióticos compiten con los patógenos no sólo por los nutrientes, sino que además por el espacio físico. Algunas bacterias pueden inhibir la adherencia de los agentes patógenos a los sitios receptores por un mecanismo de bloqueo específico del receptor por lo que se produce una prevención de la colonización de microorganismos patógenos por inhibición competitiva en los lugares de adhesión (Vergara, 2007).

Por otro lado, los probióticos producen numerosas sustancias antimicrobianas específicas, como peróxido de hidrógeno, ácido láctico (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*), por lo que reduce el pH, se considera el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias patógenas como *E. coli*, *Streptococcus* y *Salmonellas* (Vergara, 2007) (tabla 4).

Tabla 4. Efectos de cepas probióticas en estudios experimentales reportados.

Efectos reportados	Cepa probiótica	Referencia
Prevenición y tratamiento de diarreas como <i>Helicobacter pylori</i> e infecciones intestinales	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus GG</i>	Wangt et al., 2004 Galpn et al., 2005 Sheu et al., 2006 Seppo et al., 2004 Pessi et al., 1998 Pedonne et al., 2002

<b>Prevención del colesterol</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Greany et al., 2004
<b>Prevención de cáncer de colon y reducción de tumores</b>	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Wollowski et al., 2001 Prieto et al., 2002 Aso y Akazan 1992
<b>Efectos moduladores sobre el sistema inmune.</b>	<i>Lactobacillus casei</i>	Maldonado y Perdigón 2006

Fuente: Vergara (2007).

#### **1.4 Viabilidad y la estabilidad de la cepa probiótica:**

Varios factores influyen la viabilidad de las bacterias probióticas ácido lácticas ya sea en yogurt y otros fermentos lácteos. Estos factores incluyen las cepas usadas, las interacciones entre especie, el pH, la temperatura y condición de almacenamiento, la presencia de inhibidores microbianos en la matriz del alimento (cloruro de sodio y peróxido de hidrógeno, etc.). También la composición química del medio de la fermentación para el crecimiento (por ejemplo, la fuente de carbohidratos, contenido de sólidos en la leche, disponibilidad de nutrientes y promotores del crecimiento, contenido en oxígeno disuelto), las condiciones de cultivación (Vergara, 2007).

Otros factores que pueden afectar la viabilidad de los microorganismos son tratamientos térmicos, homogeneización, y envasado. La viabilidad de *Lactobacillus* y de *Bifidobacterium* disminuye drásticamente durante la refrigeración, almacenaje y transporte. Esto puede dar lugar a números bajos de células vivas al acercarse la fecha de vencimiento del producto (Vergara, 2007).

Para que el producto probiótico a la hora de ser consumido pueda realizar beneficios para la salud debe disponer de una concentración mínima de  $10^6$  células viables por mililitro o gramo del producto (Vergara, 2007).

##### **1.4.1. Factores que condicionan la viabilidad de los probióticos**

La capacidad de los microorganismos para sobrevivir y crecer depende en gran medida de su capacidad para adaptarse a los cambios del entorno. Su adaptación a entornos adversos es por lo general asociada con la distribución de un gran número de genes, la síntesis de

proteínas en respuesta del estrés y el desarrollo de respuesta cruzada a varios tipos de estrés (Doleyres et al., 2004).

La estrategia de microencapsulación de probióticos, protegen las cepas de diversas condiciones ambientales y fisiológicas a las que pueden ser expuestas. Se considera pertinente seleccionar una cepa que ya sea resistente a las condiciones gastrointestinales, tecnológicas y de procesamiento, para evitar la degradación de los probióticos, mejorar su liberación en el intestino y por consiguiente, obtener un mayor aprovechamiento de sus cualidades funcionales (Nag, 2011).

Factores que deben ser tomados en cuenta en la encapsulación de probióticos:

1.- Factores asociados con el procesamiento de alimentos:

a) El tratamiento con calor y el secado mejora la vida de anaquel de un alimento, pero son perjudiciales para la viabilidad de las bacterias probióticas.

b) La restricción de la multiplicación de células bacterianas probióticas, una vez adicionada al alimento, provoca el deterioro del producto.

c) Las condiciones perjudiciales para la sobrevivencia de cultivos probióticos en productos lácteos fermentados por: acidez, pH peróxido de hidrógeno, temperatura de almacenamiento, presencia de otras especies y cepas, concentraciones de los ácidos láctico y acético, presencia de la proteína de suero leche de leche.

2.- Exposición a ácido gástrico presente en el estómago.

a) La tolerancia al ácido gástrico es una cualidad que una cepa probiótica debe poseer ya que su pH oscila en 2.0. Esta tolerancia puede ser mejorada por diversas vías: regularización de los genes responsables para la protección al estrés y por adaptación al medio ambiente ácido.

3. Exposición a sales biliares presentes en el fluido intestinal.

a) La capacidad de supervivencia en el tránsito mediante el intestino delgado y la tolerancia a las sales biliares presentes.

b) Algunas cepas son capaces de des conjugar los ácidos biliares usando las hidrolasas de sales biliares.

4.- Intolerancia al oxígeno de cepas probióticas.

a) El contenido de oxígeno y el potencial redox del medio ambiente son muy importantes para los probióticos.

b) Las cepas probióticas anaerobias son directamente afectadas por la presencia de oxígeno en el ecosistema microbiano intestinal y en condiciones de estrés oxidativo exógeno, causando extensión de la fase *lag* y limitaciones del crecimiento morfológico celular alterada y cambios en los perfiles de ácidos grasos celulares.

La principal problemática que presenta el uso de probióticos son factores que influyen en la viabilidad y supervivencia de los microorganismos, entre ellos podemos resaltar la acidez gástrica, pH, sales biliares, entre otros. Así como las condiciones de almacenamiento. Esto conlleva a un decrecimiento en su supervivencia, provocando una baja en sus valores de concentración necesarios para llevar acabo sus efectos en el sitio de acción (Buriti et al., 2010).

Para que un probiótico sea viable debe de exceder  $10^7$  UFC/g a la fecha de consumo que presenta un efecto terapéutico en el huésped, y manteniendo un nivel mínimo de  $10^6$ UFC/g para ser reconocido como probiótico y confiera un beneficio a la salud del hospedero (Heenan et al., 2004; Sue - Siang et al., 2009; Nualkaekul et al., 2011).

#### **1.4.2 Viabilidad de los cultivos probióticos en el almacenamiento**

Los probióticos deben mantener su carga microbiana desde la producción y almacenamiento del alimento hasta su ingesta. Es importante que los productos probióticos garanticen la ingesta. Es importante que los productos probióticos garanticen la ingesta del número de bacterias establecido durante toda la vida útil del producto (De Vrese-Schrezenmeir, 2008).

Champagne y colaboradores en el 2005, indican que no se ha establecido exactamente el número de microorganismos probióticos que deben de ingresar para alterar de manera positiva. Sin embargo, señalan que se ha determinado un rango de  $10^6 - 10^8$  UFC/g.

Aunque no se ha establecido la dosis y frecuencia de consumo necesario para garantizar de estos productos se sugiere que estos alimentos deben mantener valores de microorganismos viables de  $10^6 - 10^7$  UFC/ (g o ml). En varias investigaciones sea suministrado diariamente 100 (g o ml) de alimentos probióticos manteniendo esta descarga microbiana. Se han obtenido recuento de  $10^6 - 10^8$  UFC/g en la flora bacteriana (Sanz et al., 2003; Araújo et al., 2012).

### **1.5 Microencapsulación**

El termino microencapsulación se utiliza en la industria alimentaria y farmacéutica cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades, en este caso bacterias probióticas. La microencapsulación puede ser considerada una forma especial de empaquetar, en la que un material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente y de influencias deletéreas.

En un sentido amplio, este método provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica, formando una barrera entre el principio activo y el medio externo, hasta su liberación posterior bajo condiciones controladas (Del Piano et al., 2006). Dentro del término microencapsulación se incluyen las microcápsulas, micropartículas, nanocápsulas, sustancias activas atrapadas o en bebidas, aunque existe una terminología específica dependiendo de la industria de aplicación.

Además, ofrecen la ventaja de enmascarar olores y sabores desagradables, proteger frente a la oxidación, volatilidad o fotosensibilidad, y reducir la acción irritante gastrointestinal de algunos fármacos (Rodríguez et al., 2003). La microencapsulación puede mejorar la viabilidad de las células bacterianas reteniéndolas dentro de una membrana de polímeros o matriz protectora (Muthukumarasamy, 2006).

#### **1.5.1 Microencapsulación de probióticos**

Se define como la envoltura de sustancias sólidas, líquidas, gases o microorganismos en un material encapsulante dando lugar a la formación de microcápsulas de 1-100  $\mu\text{m}$  (Nazarro et al., 2012). Las razones principales por las cuales se microencapsulan los microorganismos probióticos son para facilitar su manejo durante los procesos de producción de alimentos protegerlos y garantizar su viabilidad durante el procesamiento y

almacenamiento y controlar su liberación en el momento y lugar adecuado luego de la ingestión (Sanguansri et al., 2010).

Varios estudios se han llevado a cabo con el fin de investigar el rol protector de esta técnica, demostrando que la microencapsulación asegura la estabilidad y alta viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos enriquecidos con probióticos (Das et al., 2014) así como durante la liberación en el tracto gastrointestinal (Zanjani et al., 2014; Divya et al., 2015).

Sin embargo, algunas técnicas pueden producir daño celular debido a diversos factores como la temperatura y presión del aire, pero la severidad del daño en la célula no sólo depende de la técnica utilizada sino también del material encapsulante y la cepa microbiana (Borges et al., 2012). Por lo tanto, la medición de la viabilidad celular dentro de la microcápsula es crucial a la hora de evaluar la eficiencia del proceso (Rathore et al., 2013).

### **1.5.2 Microencapsulación y sus beneficios**

La microencapsulación se ha definido como proceso en el cual se empaquetan partículas sólidas, líquidas o gaseosas en un recubrimiento polimérico homo o heterogéneo. Las microcápsulas están constituidas por membrana o matriz esférica semipermeable y resistente que envuelve al núcleo o material activo. Su estructura depende de las características fisicoquímicas del material activo y la membrana, además de la técnica de obtención usada (Lupo et al., 2012).

De manera general, Parra (2010), menciona las ventajas del proceso de microencapsulación, las cuales se citan a continuación:

- Protección del material activo frente a factores ambientales como calor, aire, luz, humedad, oxígeno etc.
- Liberación gradual del material encapsulado.
- Cobertura de sabores y olores.
- Separación de ciertos componentes, con el fin de evitar su reacción.

La microencapsulación de cultivos probióticos se efectúa con el objetivo de aislarlos del medio e inmovilizarlos dentro de la matriz, y así mejorar su supervivencia tanto en los productos que los contienen como su viaje a través del tracto gastrointestinal. La

incorporación de microcápsulas en los alimentos funcionales no debe alterar la textura ni sabor original de los productos (Lupo et al., 2010.).

### **1.5.3 Uso de la microencapsulación como mecanismo de protección de probióticos.**

Antes de que un probiótico pueda realizar un beneficio a la salud humana debe cumplir ciertos criterios, debe de tener buenas propiedades tecnológicas de modo que pueda ser fabricado e incorporado en productos alimenticios sin sufrir una pérdida de viabilidad y funcionalidad sin la creación de sabores o texturas desagradables (Semyonov et al., 2010).

Diversos factores provocan mortalidad en los probióticos antes de que llegue a su sitio de acción, ejemplo de estos son pH estomacales, temperatura, así como el oxígeno, para evitar que los microorganismos sufran daños al entrar en contacto con estos, se ha propuesto la microencapsulación como medida de protección, la cual consiste en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto, mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica (Krasaekoopt et al ., 2006).

Se han utilizado perlas de alginato como material de encapsulación de probióticos en el yogurt, aumentando su viabilidad, ya que se ha comprado su eficacia contra la acción del jugo gástrico en las cepas probióticas (Mokarram et al., 2009).

Algunas cepas probióticas pueden crecer potencialmente en el producto, pero la mayoría no lo hace y es necesario recurrir a técnicas como la microencapsulación (Mattila et al., 2002). La microencapsulación protege a los materiales encapsulados de variables como calor, humedad, aumentando su viabilidad y estabilidad. Además, la microencapsulación protege a los probióticos de los bacteriófagos y de los ambientes adversos. La congelación y la solución gástrica facilitan la manufacturación de productos fermentados, ya que, proporcionan condiciones constantes (Pérez et al., 2013).

El propósito de la microencapsulación de bacterias probióticas es estabilizar y mantener su viabilidad durante el almacenamiento y en su paso a través de las distintas barreras fisiológicas (Nag et al., 2011). Utilizar la microencapsulación para solucionar la mayoría de los problemas presentes en la incorporación de probióticos a los alimentos es una propuesta

prometedora, sin embargo, existe el desafío de seleccionar correctamente la técnica y el materia encapsulado (Allaert et al., 2011).

### **1.6 Encapsulación:**

La encapsulación es una técnica en la que el material o mezcla de materiales es atrapada en otro material. El componente que se recubre se denomina material activo, y la cubierta externa se conoce como agente encapsulante o cubierta. La encapsulación es un proceso por la cual ciertas sustancias bioactivas, son introducidas a una pared o matriz con el fin de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos, o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz a al oxígeno (Yañez et al., 2005; Hernández, 2011).

La encapsulación son una tecnología en las que el principio activo se encuentra dentro de un recipiente soluble o una cubierta dura o blanda (Gennaro, 2003). Pueden ser de diferentes tipos entre ellos se encuentran:

- Cápsulas duras.
- Cápsulas blandas.
- Cápsulas gastroresistentes.
- Cápsulas de liberación modificada.
- Sello.

Las ventajas y desventajas al utilizar este método varían de acuerdo a la técnica empleada, pero podemos mencionar algunas que generalmente afectan a este proceso.

#### Ventajas

- Un compuesto encapsulado se libera gradualmente del compuesto que lo ha englobado.
- Estabilización de principios activos.
- Tamaño más pequeño.
- Enmascarar el sabor desagradable.
- Las características físicas del material pueden ser modificadas y hacer más fácil su manejo.

- Protección ante las barreras fisiológicas y condiciones ambientales.
- Previene la oxidación.
- Fácil identificación por su código de colores.
- Tolerancias para el organismo.
- Rápida solubilidad de la capsula.

Desventajas obtenidas de Guevara (2008):

- Limitación en la elección del material encapsulante.
- No siempre óptimo para materiales sensibles al calor. Sensibles a la humedad.
- Tecnología restringida y patentada por lo que puede resultar costosa.
- Variación de peso, ya que es fácil de controlar el grosor de la película.

### **1.6. 1Estructura de las cápsulas**

Las cápsulas presentan una gran variedad de estructuras, algunas son de geometrías esféricas con una fase interna continua rodeada por una pared también continua (estructura de partícula simple), mientras que otras pueden tener una geometría irregular y pueden tener la fase interna distribuida en una matriz de material de pared o cubierta (estructuras agregadas) (Pedroza, 2002)).

En su mayoría, las capsulas son pequeñas esferas, aunque el tamaño y la forma dependen tanto del material, como el método de obtención. La forma de las capsulas depende de las propiedades fisicoquímicas del material encapsulado, la composición de la pared, la técnica de encapsulación, así, que se pueden obtener diferentes formas de capsulas:

- Esfera simple: material o núcleo rodeado de una capa con espesor uniforme. Se puede tratar de una cubierta inerte alrededor del núcleo (Lakkis, 2007).
- Partículas irregulares: con núcleo sin forma definida.

- Estructura agregada: con varios núcleos dentro del material de encapsulación (Gharsallaoui et al, 2007). El compuesto encapsulado se encuentra disperso en el medio encapsulante, como en el caso de los geles.
- En esta estructura combinada: este tipo de cápsulas se obtienen por congelación del material ya encapsulado y cubierto de nuevo con otro material de cubierta, como ejemplo tenemos unos medicamentos de liberación prolongada (Lakkis, 2007).

### **1.6.2 Materiales utilizados en la encapsulación**

La variedad de materiales que pueden emplearse en encapsulación se va ampliando gradualmente en la medida en que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones de la encapsulación. De un modo general, los materiales capaces de encapsular se clasifican en tres categorías: grasas, proteínas y polímeros (Pedroza, 2002).

#### **Grasas**

La cera de carnauba, el alcohol, estearílico y el ácido esteárico, son grasas que funden al elevar la temperatura y son aerosionables por la acción de la lipasa que existen a nivel gástrico (Pedroza, 2002).

#### **Proteínas**

Las proteínas (gelatina, caseinatos, suero de leche, zaina, etc...) que son biopolímeros muy complejos y de gran diversidad funcional debido a su naturaleza química. Su conformación especial se ve fuertemente afectada por el pH del ambiente y la fuerza iónica, por ejemplo, procesos de encapsulación por coacervación, el tamaño de las capsulas pueden variarse con cambios de pH que modifiquen las densidades de carga de la gelatina (carga positiva, neutra o negativa), dando lugar a moléculas expandidas o contraídas en función de las fuerzas de repulsión intramoleculares. Ello afecta también propiedades como la solubilidad, siendo mínima en el denominador punto isoeléctrico (PI) (Pedroza, 2002). La gelatina fue el primer material utilizado en encapsulación y sigue siendo, en la actualidad, un material

con un importante potencial. La albúmina es otro ejemplo de proteínas que se aplica en microencapsulación.

## **Polímeros**

Debido a su gran versatilidad, esta es la familia de materiales más utilizada en encapsulación. Dentro de esta gran familia podemos distinguir entre polímeros naturales, semisintéticos y sintéticos. Los polímeros naturales de naturaleza polisacárida de origen animal y vegetal; destacan el alginato, el dextrano, la goma arábica (goma acacia) y el quitosano. Los polímeros semisintéticos engloban los derivados celulósicos, de los cuales existen una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad; la etilcelulosa y el acetobutirato de celulosa, por ejemplo, son polímeros insolubles, mientras que el acetofalato de celulosa, presenta una solubilidad dependiente del pH. Los polímeros sintéticos más destacables son los derivados acrílicos y los poliésteres.

El pH es un factor que puede afectar a los polisacáridos que se comportan como electrólitos (goma arábica, goma de mezquite, alginato, carragenina), alterando su conformación debido a las cargas intramoleculares, lo que da como resultado diferentes tamaños de partículas de las cápsulas, modificaciones en la permeabilidad de las películas que forman y en la eficacia de encapsulación y de retención de los aceites (Pedroza, 2002).

Cada uno de los materiales tiene ciertas ventajas y desventajas. Por esta razón, muchas cubiertas son, actualmente, formulaciones compuestas por mezclas. La elección del material de cobertura depende de varios factores mencionados:

- 1 Especialización del producto que se quiere obtener.
- 2 Naturaleza del núcleo.
- 3 Proceso de encapsulación que se va a utilizar.
- 4 Costos.
- 5 Si el material de cobertura se encuentra probado por la legislación aplicable al alimento (Madene et al, 2006).

### **1.6.3 Métodos de encapsulación**

La microencapsulación aplicada en alimentos con el objetivo de preparar productos funcionales debe tener en cuenta que la incorporación de microcápsulas, macropartículas o microesferas no puede interferir con la textura ni sabor original del alimento. En este sentido, se han descrito diferentes aplicaciones de microencapsulación empleando como principio activo: vitaminas, minerales, ácidos grasos, microorganismos probióticos, proteínas, aminoácidos, polifenoles, fibras y enzimas (Lupo et al., 2012).

La elección de la técnica de microencapsulación depende principalmente de las características físico-químicas del material activo y de la membrana de recubrimiento, ya que su incorporación en un alimento no debe de alterar las propiedades sensoriales del producto (Lupo et al., 2010). Además, es importante considerar las condiciones de operación de cada técnica, puesto la viabilidad de los microorganismos probióticos incorporados en un alimento depende de la supervivencia que estos presenten al proceso de microencapsulación (Mohammed, 2010.)

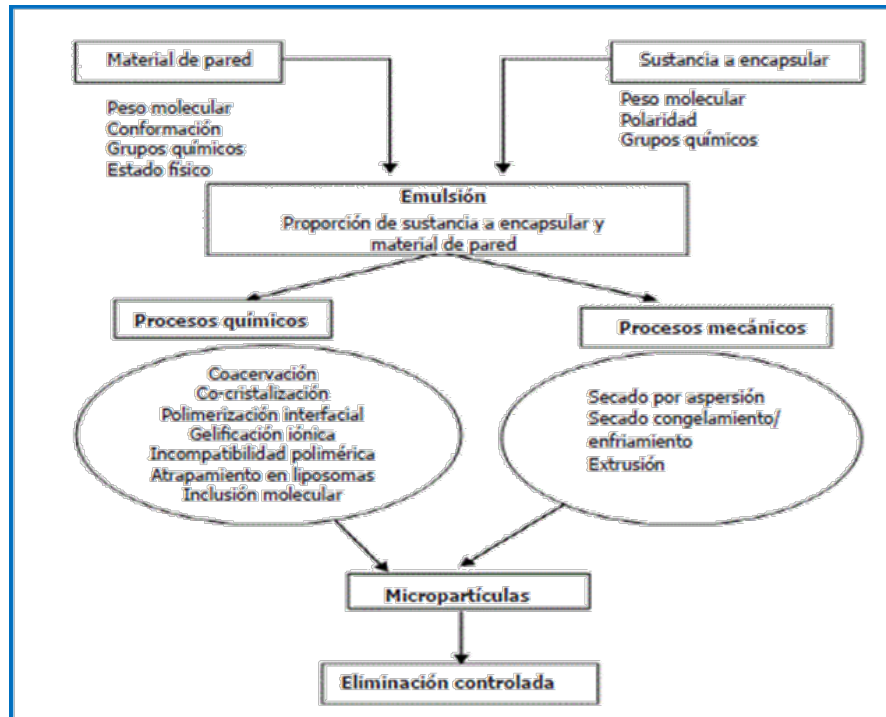
Para la preparación de las microcápsulas existen numerosos métodos y la selección del mismo para encapsular depende de los costos, el tamaño de la cápsula, las propiedades físicas y químicas de los materiales, la aplicación y el mecanismo de liberación deseado.

La encapsulación ha sido aplicada a diversos campos (medicina, industria alimentaria, industria farmacéutica, agricultura, cosmética, etc.). Los métodos de mayor aplicación en la industria de alimentos son: lácteos, jugos, aromas, aceites esenciales, saborizantes, colorantes, etc. y se clasifican en:

Métodos físicos: Secado por aspersión, enfriamiento por aspersión, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión, co-extrusión, extrusión, fusión, cocrystalización.

Métodos físico-químicos: Coalescencia, inclusión molecular, encapsulación por liposomas.

En la figura 3, se observa el esquema de los diferentes procesos de microencapsulación.



Fuente: Parra (2011).

Figura 3. Esquema de los diferentes procesos de microencapsulación.

Microencapsulación de probióticos en las soluciones de encapsulación y secado de la solución de encapsulación para alcanzar gránulos o polvos de células encapsuladas. Particularmente, para la microencapsulación de microorganismos probióticos se detallan las metodologías empleadas con éxito, cuyas técnicas antes del paso de microencapsulación describen la obtención de un cultivo de probióticos crecidos en condiciones óptimas (Pérez, 2013).

### Parámetros de funcionamiento ventajas y desventajas

Las tecnologías de microencapsulación se desarrollaron y aplicaron con éxito para proteger las bacterias probióticas del daño causado por factores externos como el secado, el envasado y las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, tiempo, temperatura, humedad y oxígeno) y la degradación del tracto gastrointestinal, especialmente debido al pH extremo (2.5 a 3.5) de los jugos gástricos y las sales biliares (Kailasapathy, 2006). La

selección del método de encapsulación depende del tamaño promedio de partícula requerida, las propiedades físicas y químicas del material de soporte, las aplicaciones del material encapsulado, el mecanismo de liberación requerido y el costo. Estos parámetros deben estudiarse para cada organismo y proceso específico (Parra-Huertas, 2010; Burgain et al., 2011).

### **1.7 Gelificación iónica**

Este método se desarrolló para lograr la inmovilización celular, utilizando esencialmente alginato como materia prima de la membrana en combinación con iones divalentes como calcio, para generar la gelificación. La correlación iónica entre los iones de calcio y los similares del ácido gulurónico del alginato, dan origen al gel que se conoce como “modelo de caja de huevo”(Cuatzo., 2010).

En el momento de interactuar los iones de calcio con el alginato el gel es formado de manera instantánea, es posible la manipulación y dureza del gel combinando las condiciones de fabricación como, por ejemplo, pH, concentraciones de iones etc. (Flores, 2011).

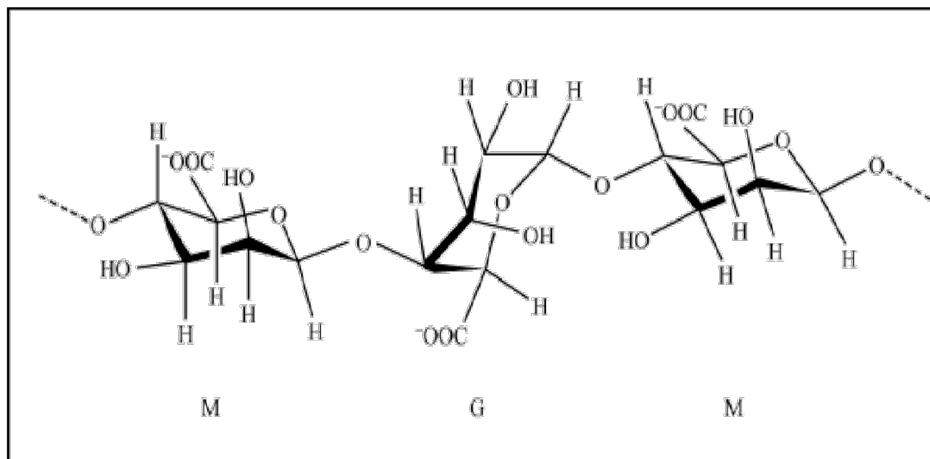
### **Alginato: material de recubrimiento**

Los alginatos son polisacáridos obtenidos del procesamiento de diversos tipos de algas, las cuales contienen en su composición seca hasta un 40 % de estos compuestos, siendo sus funciones dar elasticidad y flexibilidad. Los alginatos en estado natural están constituidos por mezcla de cationes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+2}$ ), los cuales después de una neutralización con carbonatos forman compuestos como alginato de sodio (Avendaño et al., 2013.).

La estructura química de los alginatos está conformada por dos tipos de monosacáridos  $\beta$ -D-ácido manurónico (M) y  $\alpha$ -L-ácido gulurónico (G), enlazados de manera homo (-GGG- o -MMM-) o heteropolimérica (1-4) (-MGMG-) como muestra la figura 4. El contenido de los bloques determina las propiedades del alginato, puesto que a mayor número de estos bloques el gel es más fuerte y frágil, mientras que a menor número de G-bloques el gel es más suave y elástico (Soma et al., 2009.).

Los alginatos sido utilizados ampliamente en la industria de alimentos por ser de fácil manejo, tener la capacidad para absorber agua y por sus propiedades gelificantes,

estabilizantes y espesantes. También se les ha atribuido otras características importantes como: alta biocompatibilidad, baja toxicidad, facilidad de solubilización con el catión calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), bajo costo en el mercado (Avendaño et al., 2013.; Lupo et al., 2010.).

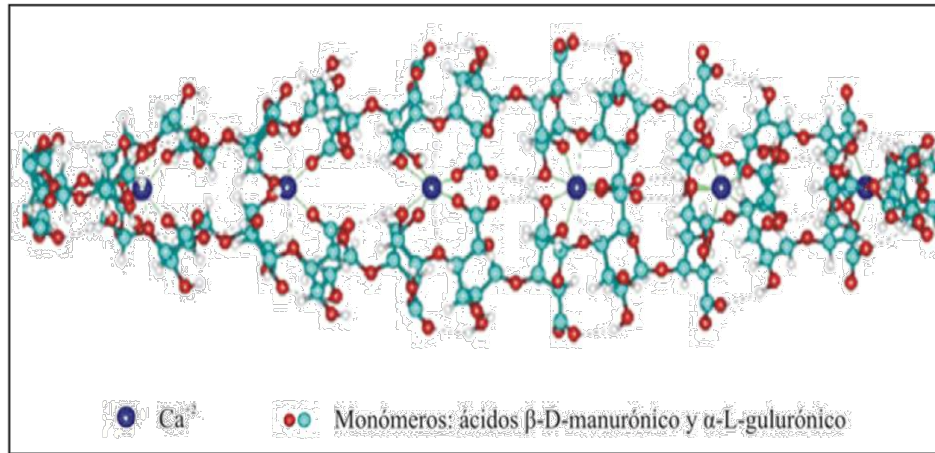


Fuente: Soma et al., 2009.

Figura 4. Estructura química del alginato.

Las técnicas de microencapsulación por extrusión y emulsión utilizan alginato como material polimérico para la formación de microcápsulas, siendo el más usado el alginato de sodio. Este alginato al entrar en contacto con una solución de calcio (generalmente cloruro de calcio) reemplaza los iones  $\text{Na}^{+1}$  por cationes  $\text{Ca}^{+2}$ , sufriendo un re ordenamiento estructural formándose de esta manera la matriz envolvente de alginato de calcio denominada “egg-box o caja de huevo” como se observa en la figura 5. – (Avendaño et al., 2013; Manojlovic et al., 2010.).

Cook et al., 2012, indican que la supervivencia de bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* encapsuladas en una matriz de alginato de calcio mejoran en un ambiente ácido similar al del tracto gastrointestinal. También señalan que se ha estudiado probióticos con doble microencapsulación en alginato y se han obtenido mejores resultados en cuanto a su viabilidad en medios muy ácidos.



Lupo et al., 2010.

Figura 5. Estructura química del modelo “egg-box o caja de huevo”.

Adicionalmente, los alginatos presentan un efecto prebiótico, puesto que pueden ser digeridos por otras bacterias ya existentes en el intestino y como consecuencia generan beneficios para el individuo que lo consume como fibra dietética, puesto que ayuda a reducir los niveles de azúcar y colesterol en la sangre (Lupo et al., 2010.).

Una gran cantidad de microcápsulas que transportan las bacterias no se degradan al paso por tracto gastrointestinal, sino que son capaces de llegar hasta el intestino grueso donde la matriz polimérica es degradada por otros microorganismos, liberándose así de manera progresiva el material activo de la microesfera (Mohammed, 2010.).

### 1.7.1 Mecanismos de gelificación con alginato

El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ion calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica, como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel. El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y el contenido de los G-bloques (Funami et al., 2009). La transición sol-gel se ha visto esencialmente controlada por la habilidad de introducir el ion vinculante al alginato. También se ha observado que la cinética de gelificación y las propiedades del gel pueden depender del tipo de contra-ion, es decir, el ion monovalente de la sal de alginato (K o Na). De hecho, se ha encontrado que los alginatos de potasio presentan un proceso de transición

sol-gel más rápido respecto a los alginatos de sodio preparados a bajas concentraciones calcio. Y a pesar de que los geles de alginato de calcio obtenidos mostraron semejante estabilidad a simple vista, al ser analizadas sus propiedades geológicas se evidenciaron marcadas diferencias en los módulos elásticos; siendo menores los valores de módulos elásticos para los geles preparados a partir del alginato de sodio que en aquellos con alginato de potasio. En este sentido, se ha señalado que este aspecto de las propiedades viscoelásticas de los geles puede ser contrarrestado utilizando alginatos con mayor composición de ácido gúlorónico en su estructura (Draget,2000). Los mecanismos de gelificación iónica se han llevado a cabo fundamentalmente por dos procesos: la gelificación externa y la gelificación interna.

- **Gelificación externa**

El proceso de gelificación externa ocurre con la difusión del ion calcio desde una fuente que rodea al hidrocóide hacia la solución de alginato de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interfase y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el ion sodio proveniente de la sal de alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua. Este interacciona con los G-bloques de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí. Aunque, la fuente de calcio más usada ha sido el  $\text{CaCl}_2$  debido a su mayor porcentaje de calcio disponible, existen otras sales empleadas con menor frecuencia tales como el acetato monohidratado y el lactato de calcio (Helgerud et al., 2010).

- **Gelificación interna**

El proceso de gelificación interna consiste en la liberación controlada del ion calcio desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa en la solución de alginato de sodio. Donde la liberación del ion calcio puede ocurrir de dos formas, si se tiene una sal de calcio insoluble a pH neutro pero soluble a pH ácido, por lo que es necesario adicionar un ácido orgánico que al difundirse hasta la sal permita la acidificación del medio consiguiendo solubilizar los iones calcio. En este caso, las sales de calcio más empleadas son el carbonato de calcio y el fosfato tricálcico, y en casos específicos el fosfato dicálcico y el citrato tricálcico. Para la acidificación del medio se cuenta con ácidos orgánicos como el acético, adípico y el glucono delta-lactona. Si la sal de calcio es parcialmente soluble, el proceso de gelificación interna consiste en la adición a la mezcla

alginato-sal de calcio, un agente secuestrante como el fosfato, sulfato o citrato de sodio. Al adicionar un secuestrante este se enlaza con el calcio libre retardando así el proceso de gelificación, el sulfato de sodio ha sido comúnmente el más empleado debido a su bajo costo y conveniente solubilidad. La principal diferencia entre el mecanismo de gelificación externa e interna es la cinética del proceso. Si lo que se pretende es el control de la transición sol-gel, en el proceso de gelificación externa los factores a manipular son la concentración de calcio y composición del polímero. Mientras que, para el proceso de gelificación interna se deben considerar la solubilidad y concentración de la sal de calcio, concentración del agente secuestrante y del ácido orgánico empleado (Draget, 2000).

### **1.8 Supervivencia o viabilidad de los probióticos en el producto**

La incorporación de los cultivos probióticos a los alimentos no ha sido tan sencilla, esto es por las condiciones que dichos microorganismos necesitan para desarrollarse, entre ellas se destacan atmósferas anaeróbicas, pH entre 5,6 y 7. Hasta la fecha, han sido desde sus comienzos, muchos los productos lácteos (yogurt, helado, leches fermentadas y queso) que han servido de vehículo a las bacterias probióticas (Heenan et al, 2004).

Una consideración muy importante es que los productos contengan una dosis efectiva de células viables durante toda su vida de anaquel, aún no existe un acuerdo que establezca cual es la mínima concentración de microorganismos probióticos en un producto para obtener beneficios en la salud. Sin embargo, se ha establecido por diversos estudios que la concentración mínima deberá ser mayor a 10<sup>8</sup> UFC/mL (Donkor et al, 2006; Cruz et al, 2009).

La aplicación de probióticos en los alimentos depende de factores como: actividad acuosa (aw), pH, concentración de sal y de otros ingredientes que puedan funcionar como antimicrobianos y del estrés mecánico provocado por el proceso (Ipek et al 2005).

Además de las propiedades en beneficio de la salud, los probióticos deben cumplir ciertos requerimientos para poder desarrollar un producto comercial, tales como la supervivencia, la actividad en el producto y la estabilidad durante el almacenamiento. No deberán afectar

las características de sabor o aroma del producto ni acidificarlo durante su vida de anaquel (Donkor et al, 2006).

La viabilidad de un probiótico en el producto terminado dependerá de factores como la disponibilidad de los nutrientes, factores de crecimiento e inhibidores de crecimiento, la concentración de los solutos, el nivel de inoculación, la temperatura de incubación y la temperatura de almacenamiento (Donkor et al, 2006). Otros factores que determinan la viabilidad de los microorganismos en el alimento son la cepa seleccionada, las interacciones entre las especies microbianas presentes, la producción de peróxido de hidrógeno por metabolismo bacteriano y la acidez final del producto (Cruz et al, 2009). Muchos probióticos al tener origen en el intestino, son sensibles al oxígeno, calor y concentraciones elevadas de ácido lo que les genera estrés y esto provoca que se desempeñen pobremente en muchos alimentos (Dave et al., 1997).

Las matrices más comunes para bacterias probióticas en alimentos han sido diferentes tipos de productos lácteos fermentados. Durante los últimos años la necesidad de diversificar los probióticos en el mercado ha aumentado, por lo que hoy en día se ha demostrado que los jugos frutales son un vehículo adecuado para los probióticos, últimamente ha crecido el interés por aplicarlos en productos cárnicos fermentados, al encontrarse que la carne protege las bacterias lácticas en contra de la acción letal de la bilis (Gänzle et al, 1999).

Existen estudios donde se determina la viabilidad de probióticos en diferentes productos reportándose que a pesar de la disminución del pH los microorganismos probióticos permanecieron por encima del nivel terapéutico de  $10^6$  UFC/g (Donkor et al, 2006).

### **1.8.1 Viabilidad durante el procesado y el a almacenamiento en refrigeración**

Deben ser capaces de soportar las condiciones del proceso de producción industrial y mantener buena viabilidad durante el almacenamiento, en muchas ocasiones en refrigeración o congelación. De no soportar temperaturas de refrigeración o congelación, estos microorganismos al estar en un alimento como leche fermentadas que se almacenan en refrigeración, no podrían ejercer sus efectos benéficos por no estar activos o estar muertos (Lee et al., 1995).

Dentro de los requisitos tecnológicos, establece que los probióticos incorporados a un alimento deben tener una buena resistencia a la manipulación durante el proceso de manipulación durante el proceso de producción. Además, durante el almacenamiento y vida útil el producto debe de mantener su viabilidad. Para demostrarlo se deben realizar periódicamente pruebas de cuantificación de microorganismos (De Vrese et al., 2008, Trevezaño et al., 2011).

### **1.9. Consideraciones de la ingesta de microorganismos probióticos.**

La definición de alimentos probióticos enfatiza la necesidad que el producto alimenticio en cuestión contenga cantidades suficientes de microorganismos vivos; de este modo, los beneficios a la salud ya no están limitados tan sólo a las propiedades terapéuticas sino que también es fundamental que sean ingeridos en cantidades elevadas para poder ejercer el efecto metabólico deseado (SALMINEN et al., 1998).

En Japón fue desarrollado un estándar para leches fermentadas y bebidas de bacterias ácido lácticas, estipularon que un producto debe contener una cantidad de bacterias viables de  $1 \times 10^7$  bifidobacteria por g o ml para ser considerado un alimento probiótico (Ishibashi et al., 1993). Sin embargo, las cantidades mínimas requeridas y el período óptimo de la administración de probióticos necesario para tener un efecto en la salud, sigue siendo una dosis terapéutica mínima confusa de  $1 \times 10^5$  UFC/g o ml. En todo caso, la dosis mínima requerida para un efecto probiótico puede depender del alimento, en la cual se ingiere el probiótico y probablemente del género probiótico usado (Hamilton et al., 1996), (Lee et al., 1995) y (Saxelin et al., 1993).

En general, la concentración mínima de microorganismos probióticos necesarios para provocar un resultado benéfico aún no está clara. Sin embargo, autores como (Blanchette et al. 1996), (Hekmat et al., 1992), (Rybka et al., 1995) y (Gomes et al., 1999) señalan que un producto fermentado debería contener  $10^6$  Bifidobacterias por gramo de producto al momento de ser consumidos.

(Vinderola et al., 2000) la ingesta diaria debe ser mayor a 100 gramos de producto que contengan  $10^6$  de bacterias viables, mientras que (Kailasapathy et al., 1997), sugieren que la ingesta semanal de estos productos debe ser de 300 a 400 gramos, además que es

esencial que cualquier producto, vendido con pretensiones de ayuda a la salud, contenga un mínimo de  $10^6$  ufc/mL de bacterias probióticas en el producto en su fecha de vencimiento, sugiriendo como dosis terapéutica diaria  $10^8$  - $10^9$  células viables.

Por su parte (Lankaputhra et al., 1996), sugieren que para obtener algún efecto terapéutico, al momento del consumo del producto, éste debe contener un mínimo de  $10^5$  bacterias viables de *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus casei* por gramo de producto.

Esta cantidad varía de un país a otro en función de su legislación; sin embargo, generalmente un producto probiótico debería contener  $>10^6$ -  $10^8$  CFU/g ó  $>10^8$ -  $10^{10}$  UFC/dosis de células viables Champagne et al. (2011). Además, los probióticos son definidos como seguros según el acrónimo inglés “GRAS” (“generally recognized as safe”).

Así, para obtener beneficios sobre la salud, es recomendada una dosis de 5 mil millones de unidades formadoras de colonias (UFC) durante al menos 5 días ( $5 \times 10^9$  UFC / día) (Gupta V, et al. 2009). Puesto que la principal vía de administración de los microorganismos probióticos es la vía oral, con objeto de proporcionar estos efectos beneficiosos en el hospedador, las bacterias probióticas deben sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal, tolerar el ácido, la bilis y las enzimas a nivel gástrico y, posteriormente, adherirse al epitelio intestinal (Huang, et al., 2004) ; es por ello que deben administrarse incluidos en formas farmacéuticas o bien en alimentos que le otorguen protección frente a esas condiciones adversas. Estos productos probióticos, además, deben garantizar la supervivencia de los microorganismos en forma viable durante el almacenamiento hasta el final de vida útil ( $>10^6$  UFC/g) (Chaikham et al., 2012). El interés comercial de los probióticos se ve acrecentado de forma paulatina, según se avanza en el conocimiento acerca de la relación existente entre ellos y la microbiota intestinal, su interacción y el desencadenamiento de una serie de efectos positivos sobre el individuo, por tanto, abren una alternativa muy esperanzadora tanto en el ámbito de la alimentación funcional como en la mejora y profilaxis de determinadas patologías.

## **CAPITULO II**

### **ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO**

## **2.1 Planteamiento del problema**

La deficiencia de probióticos en la dieta humana ha traído consigo ciertas complicaciones, puesto que las bacterias son muy vulnerables cuando se exponen al ambiente del tracto digestivo, especialmente a los jugos gástricos que contienen ácido clorhídrico y enzimas digestivas y a la bilis en el duodeno.

El 90 % de las bacterias vivas que se administran oralmente se mueren cuando llegan al estómago.

El síndrome del Intestino Irritable (SII) es un trastorno funcional muy común que afecta a millones de personas en el mundo, alterando de manera significativa su calidad de vida por lo que constituye un motivo de consulta frecuente. La prevalencia del SII varía en la población general de 3-25% y se estima que alrededor de 3% de las consultas de atención primaria y de 16% a 25% de las consultas gastroenterológicas son debidas a esta afección. La fisiopatología es multifactorial y tiene un curso benigno caracterizándose por la presencia de síntomas gastrointestinales recurrentes, como dolor y distensión abdominal junto con alteraciones en el hábito de deposiciones, en ausencia de trastornos metabólicos o estructurales que justifiquen los síntomas, estas molestias pueden llevar incluso a cirugías innecesarias en estos pacientes ( Díaz., et al 2012).

La diarrea aguda es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, sus complicaciones son responsables de la muerte de 2 a 3 millones de niños en países en desarrollo.

La base fundamental para el tratamiento es la administración adecuada de líquidos y electrolitos, sin embargo, otros productos han sido evaluados con la finalidad de ofrecer una alternativa que pretende disminuir las complicaciones (Selinger., et al 2013).

El uso actual de los organismos probióticos pretende, en más del 90% de los casos, prevenir o erradicar las infecciones en la cavidad accesibles desde el exterior, principalmente, las del tracto digestivo (WGO., 2011).

Las bacterias intestinales contribuyen a la correcta permeabilidad de la mucosa intestinal, determinados microorganismos perjudiciales incrementan la permeabilidad y favorecen el paso de bacterias y macromoléculas de la dieta a través de la mucosa.

Diferentes probióticos que pueden prevenir y reparar dicho daño, lo cual ha sido constatado *in vitro* en cultivos celulares en *in vivo* utilizando animales de experimentación (Vizcaíno., et al 2016).

## **2.2 Justificación**

Los probióticos se han utilizado para el tratamiento de un gran número de patologías pediátricas y del adulto, principalmente, para el tratamiento de problemas gastrointestinales que cursan con la alteración en la microbiota intestinal.

Se ha demostrado que los probióticos promueven el crecimiento bacteriano. Además, ayudan a mejorar la absorción de minerales en el intestino, a reducir los niveles séricos del colesterol y a restaurar la microbiota autóctona del sistema digestivo cuando ha sufrido daños como consecuencia del estrés intestinal (uso de antibióticos), radiaciones, infecciones y en personas con el sistema inmunológico deficiente o neonatos en cuidados intensivos (Marín et al., 2016).

Las propiedades benéficas atribuidas a los microorganismos probióticos para la salud humana, donde dichas bacterias actúan como una barrera de protección del tracto gastrointestinal, induciendo la activación del sistema inmunológico y coadyuvado con una mejor digestión y absorción de nutrientes (Martínez et al., 2013). Además se ha comprobado que ayudan al tratamiento y manejo de diversas enfermedades (Amara et al., 2015) como la enfermedad inflamatoria intestinal (Martínez et al., 2013) y la diarrea asociada al uso de antibióticos (Selinger et al., 2013) , (Goginerni et al., 2013).

La baja viabilidad de los probióticos en condiciones difíciles, especialmente a lo largo del tiempo de procesamiento y consumo de productos alimenticios y en condiciones gastrointestinales (GI), ha persuadido a los investigadores a encontrar métodos para mejorar los criterios. Las tecnologías de microencapsulación se han extendido y aplicado con eficacia para proteger a las bacterias probióticas de los daños causados por el medio exterior en situaciones tales como procesamiento (alta temperatura), almacenamiento (en los productos alimenticios en el estante y en una matriz de alimentos como hogar), embalaje (temperatura, oxígeno, humedad) y la degradación en la región GI (el pH bajo en el estómago y la sal biliar en el intestino delgado) (Anal y Singh et al., 2007); (Moroeanu et al., 2015); (Zuidam et al., 2010).

Uno de los materiales más básicos que se utiliza para la microencapsulación probiótica es el alginato. Las principales ventajas de este material que lo hacen más preferible que otros materiales para la microencapsulación son que no es tóxico para las bacterias y las células

del cuerpo como un aditivo permitido, fácil de usar y económico (Krasaekoopt et al., 2004), (Rodklongtan et al., 2014).

Esta sustancia, como el alginato, es rentable e inocua y crea una red de gelatina (Li et al., 2015); (Zuidam et al., 2010).

### **2.3 Objetivo**

Determinar la sobrevivencia de probióticos encapsulados por medio de análisis microbiológicos y así ser una alternativa para la absorción intestinal permitiendo proteger al microorganismo para que ejerza su función.

#### **2.3.1 Objetivos específicos**

- Identificar los beneficios de encapsulación y no encapsulación en probióticos y para analizar le efectividad.
- Evaluar la encapsulación a distintos pH, para determinar la viabilidad de bacterias probióticas.
- Aplicar la encapsulación en distintas bacterias como soporte nutricional para mejorar los efectos.

## CAPITULO III

### MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. Preparación del inóculo (Heenan et al, 2004)

Para aislar al microorganismo *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis*, se inóculó en caldo MRS.

Para la preparación del medio se utilizó 3.3g caldo MRS para 60 ml de agua, el medio se disuelve y se realiza por triplicado para cada uno de los probióticos, para posteriormente colocar en autoclave, se realiza la esterilización a 15 minutos a 15 libras de presión una vez transcurrido el tiempo se deja enfriar para posteriormente en tubos de ensaye con 10ml de caldo de MRS, se adicionan 0.1mL de inóculo de *L. casei shirota*, *B. tequilensis*, *L. leichmannii*, posteriormente se incubo a 35° C durante 48 hrs. Todos los experimentos se realizaron en condiciones de esterilización bajo Campana de flujo laminar como se muestra en la figura 6.



Figura 6. Inóculo de bacterias probióticas: *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis* en medio MRS.

##### 3.1.1.1 Empleo de alginato de sodio para formación de perlas.

El alginato es un biopolímero natural extraído de varias especies de algas, comúnmente usado en la industria farmacéutica y en biotecnología como agente espesante, gelificante y

estabilizador coloidal, se utilizó para la formación de perlas mediante el método de gelificación iónica en un rango de concentración del 0.5% al 1%.



Figura 7. Mezcla de alginato de sodio con agua para la formación de gel.

Posteriormente se preparó la mezcla hidrocoloide 1% de alginato de sodio una vez logrado la mezcla homogénea se adiciona .5ml del inóculo para de *L. casei shirota* este procedimiento fue de la misma manera para ambos probióticos.

Por último la mezcla hidrocoloide de alginato de sodio junto el probiótico, con ayuda de una jeringa de 10ml se extrae la mezcla para posteriormente dejarla caer gota por gota en el cloruro de calcio disuelto durante 10 segundos, se retira de la solución para posteriormente enjuagar en agua esterilizada o agua destilada y colocarlos en un recipiente estéril como se muestra en la figura 8.

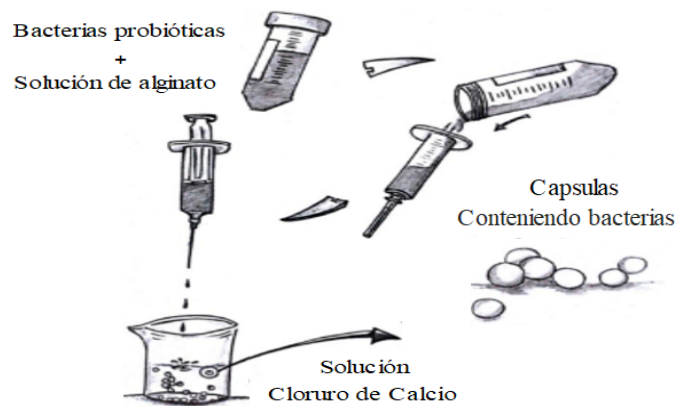


Figura 8. Diagrama esquemático del método de encapsulación por gelificación iónica.

### 3.1.1.2 Determinación de tamaño de las perlas formadas

El tamaño de las capsulas debe presentar un diámetro de 2 a 3 mm de diámetro (Muthukumarasamy et al., 2006).

Esta técnica ha sido aplicada a la encapsulación de bacterias Acido Lácticas (BAL) principalmente para observar su viabilidad en medios ácidos. Las ventajas que presenta este método son las siguientes: fácil formación de gel en las matrices de las células bacterianas, no es toxica para el ser humano (es segura y biocompatible), es económica y fácil de preparar, es apropiada para células bacterianas con tamaño de 1 -3--. Sin embargo se le atribuyen muchos inconvenientes como por ejemplo: susceptible a la acidez del ambiente que la rodea, perdida de la estabilidad mecánica, y la presencia de iones causa deterioro en el alginato (Mortazavian et al., 2007).

### Efecto del procedimiento de formación de perlas en la viabilidad de las cepas probióticas

El método de goteo para la encapsulación de probióticos ha sido ampliamente estudiado (Iyer, et al., 2005); (kailasapathy et al., 2002); (Krasaekoopt, et al., 2003); (Muthukumarasamy, et al., 2006); (Sun, et al., 2000).

La evaluación del efecto de encapsulación por gelificación iónica puede ejercer sobre las cepas probióticas se hizo necesario, dada su efectividad para reducir el tamaño de las perlas.

### **3.2 Supervivencia de microorganismos probióticos mediante técnicas de espectrofotometría**

#### **Preparación del inóculo (Heenan et al, 2004)**

Para aislar al microorganismo *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis*, se inóculó en caldo MRS 10ml y 0.1mL de *casei shirota*, *B. tequilensis*, *L. leichmannii*, se realizó por triplicado, posteriormente se incubó a 35° C durante 48 hrs.

#### **Cinética de crecimiento para probióticos**

Se preparó 13.2g de caldo MRS en 240ml de agua estéril para obtener 24 tubos de ensayo de 10ml de solución.

Se inócula 0.5ml de probióticos por cada tubo de 10ml de solución de caldo MRS, durante 48hrs en incubadora a temperatura de 37°C.

Una vez transcurrido el tiempo con la temperatura correcta se lee con espectrofotómetro (C304) Modelo -500 UV Serie N° AE1407042., cada una de las muestras por duplicado con una dilución de 1 a 3 una vez obteniendo una absorbancia de 1.

**Cinética de realiza por duplicado para *L. casei shirota*, *L. Leischmannii*, *B. Tequilensis* tomando en cuenta, 0 hrs., 4hrs., 8hrs, 12 hrs.**

**Esta prueba se hace cada una por separado para cada probiótico encapsulado.**

#### **3.2.1 Supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados mediante técnicas de espectrofotometría**

##### **Cinética de crecimiento para probióticos encapsulados**

- Se realizó una evaluación de crecimiento de las tres cepas probióticas encapsuladas.

Se preparó 13.2g de caldo MRS en 240ml de agua estéril para obtener 24 tubos de ensayo de 10ml de solución.

Se inócula tres capsulas de probióticos por cada tubo de 10ml de solución de caldo MRS durante 48hrs en incubadora a temperatura de 37°C.

Una vez transcurrido el tiempo con la temperatura correcta se lee con espectrofotómetro (C304) Modelo -500 UV Serie N° AE1407042., WL: 560nm cada una de las muestras por duplicado con una dilución de 1 a 3.

**Cinética de realiza por duplicado para *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis* tomando en cuenta, 0 hrs., 4hrs., 8hrs, 12 hrs.**

**Esta prueba se realizó, cada uno por separado para cada probiótico encapsulado.**

### **3.3 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular con ácido clorhídrico**

#### **3.3.1 Evaluación de bacterias probióticas en distintas concentraciones pH.**

Las pruebas de resistencia al ácido clorhídrico (HCl) se realizaron de acuerdo a lo propuesto por Rodríguez González, 2009.

Primero se realizó una curva de titulación con ácido clorhídrico, para conocer los intervalos de pH necesarios para la prueba (pH: 6.20, 5.62, 5.22, 4.31, 4.07, 3.50, 3.18, 2.51, 2.22, 1.50).

Para la preparación del HCl a 1M, se tomaron 8.28 ml de HCl al 37% de pureza hasta aforar a 100 ml de agua destilada, posteriormente en un vaso de precipitado se agregaron los 15 ml de medio MRS; en el vaso se introdujo una mosca de agitación, que se colocó en una parrilla de agitación junto con el potenciómetro.

Después se fueron adicionando de 100 µl en 100 µl de HCl en el medio MRS para conocer los cambios de pH.

A cada tubo de 10ml con distinto pH se adiciono .5ml se deja incubar a 37° C durante 48hrs., para posteriormente medir su absorbanciaWL:560 nm, con el espectrofotómetro.



Figura 9. Bacterias probióticas inoculadas a diferentes pH (6.20, 5.62, 5.22, 4.31, 4.07, 3.50, 3.18, 2.51, 2.22, 1.50) en medio MRS

### **3.3.2 Evaluación de probióticos encapsulados en distintas concentraciones pH.**

Las pruebas de resistencia al ácido clorhídrico (HCl) se realizaron de acuerdo a lo propuesto por Rodríguez González 2009.

Primero se realizó una curva de titulación con ácido clorhídrico, para conocer los intervalos de pH necesarios para la prueba (pH: 6.20, 5.62, 5.22, 4.31, 4.07, 3.50, 3.18, 2.51, 2.22, 1.50).

Para la preparación del HCl a 1M, se tomaron 8.28 ml de HCl al 37% de pureza hasta aforar a 100 ml de agua destilada, posteriormente en un vaso de precipitado se agregaron los 15 ml de medio MRS; en el vaso se introdujo una mosca de agitación, que se colocó en una parrilla de agitación junto con el potenciómetro.

Después se fueron adicionando de 100  $\mu$ l en 100  $\mu$ l de HCl en el medio MRS para conocer los cambios de pH.

A continuación, se preparó caldo MRS para los tubos con 10 ml a diferentes pH, de acuerdo a la curva de titulación. Para esta preparación se necesitó 1200 ml de agua destilada con 66gr del medio MRS para 120 tubos de ensayo, ya que cada pH se realizó por duplicado.



Figura 10. Crecimiento de las bacterias encapsuladas en distintos pH (6.20, 5.62, 5.22, 4.31, 4.07, 3.50, 3.18, 2.51, 2.22, 1.50) en agar MRS.

### **3.4 Evaluación de la viabilidad en microorganismos probióticos encapsulados a largo plazo**

Se preparó 64.35g de caldo MRS en 1170ml de agua estéril para obtener 117 tubos de ensayo de 10ml de solución.

Se inoculó tres capsulas de probióticos por cada tubo de 10ml de solución de caldo MRS durante 48hrs en incubadora a temperatura de 37°C.

Se realizó por triplicado para cada uno de los probióticos encapsulados durante un mes.

Una vez transcurrido el tiempo con la temperatura correcta se lee con espectrofotómetro (C304) Modelo -500 UV Serie N° AE1407042., WL: 560nm cada una de las muestras por triplicado como se muestra en figura 11.



Figura 11. Determinación de viabilidad durante 30 días por triplicado de bacterias encapsuladas: *L. casei shirota*, *L. leichmanni*, *B. tequilensis*, mediante un espectrofotómetro (C304) Modelo -500 UV Serie N° AE1407042., WL: 560nm.

### 3.5 Determinación de viabilidad frente a diferentes condiciones de almacenamiento de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsularen en alimento comercial.

#### 3.5.1 Determinación de vida de anaquel de probióticos encapsulados mediante gelatina comercial a temperatura ambiente.

- Gelatina de leche sabor coco (sayes).

Se preparó 10.8 g de las gelatinas de leche sabor coco en 90ml leche, se realizó por triplicado para cada una de las bacterias encapsuladas.

Se realizó una suspensión del microorganismo encapsulado, se dejó durante un mes a temperatura ambiente.

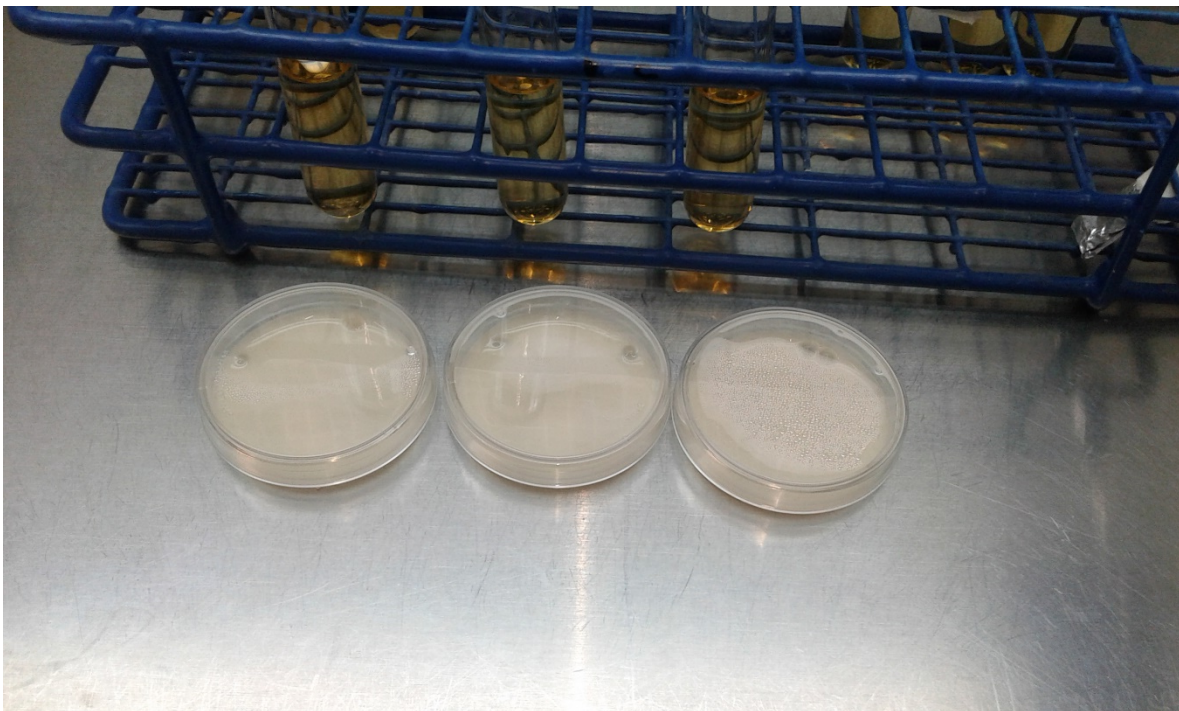


Figura 12 Determinación de vida de anaquel de probióticos encapsulados (*L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis*) a temperatura ambiente en gelatina de leche.

Se inoculó en 10ml en tubos de ensaye por triplicado con caldo MRS 1g de la gelatina en las que se adicionaron las capsulas de cada uno probióticos, *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis* se incubo a 37° C durante 48 hrs.

Se realizó una medición por medio con espectrofotometría (C304) Modelo -500 UV Serie N° AE1407042., WL: con una absorbancia a = 560nm.

- Gelatina de agua sabor anís (sayes)

Se preparó g 10.8 g de las gelatinas de agua sabor anís en 90ml de agua, se realizó por triplicado para cada una de las bacterias encapsuladas.

Se realizó una suspensión del microorganismo encapsulado se dejó durante un mes a temperatura ambiente.

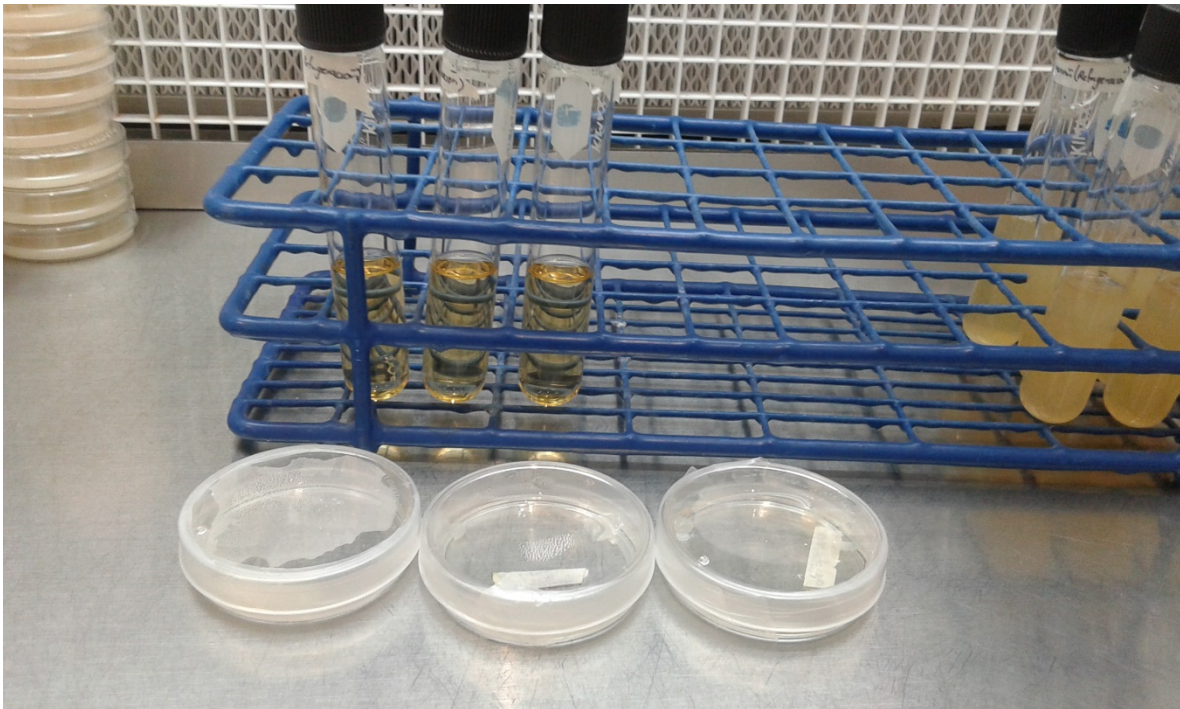


Figura 13. Determinación de vida de anaquel de probióticos encapsulados (*L. casei Shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis*) a temperatura ambiente en gelatina de agua.

Se inoculó en 10ml en tubos de ensaye por triplicado con caldo MRS 1g de la gelatina en las que se adicionaron las capsulas de cada uno probióticos, *L. casei shirota*, *L. leichmannii* *B. tequilensis* se incubo a 37° C durante 48 hrs.

Se realizó una medición por medio con espectrofotometría (C304) Modelo -500 UV Serie N° AE1407042., WL: con absorbancia de absorbancia a = 560nm.

### 3.5.2 Determinación de vida de anaquel de probióticos encapsulados mediante gelatina comercial (sayes) a temperatura de refrigeración.

- Gelatina de leche sabor coco (sayes).

Se preparó g 10.8 g de las gelatinas de leche sabor coco en 90ml de leche, se realizó por triplicado para cada una de las bacterias encapsuladas.

Se realizó una suspensión del microorganismo encapsulado se dejó durante un mes a temperatura 4°C.

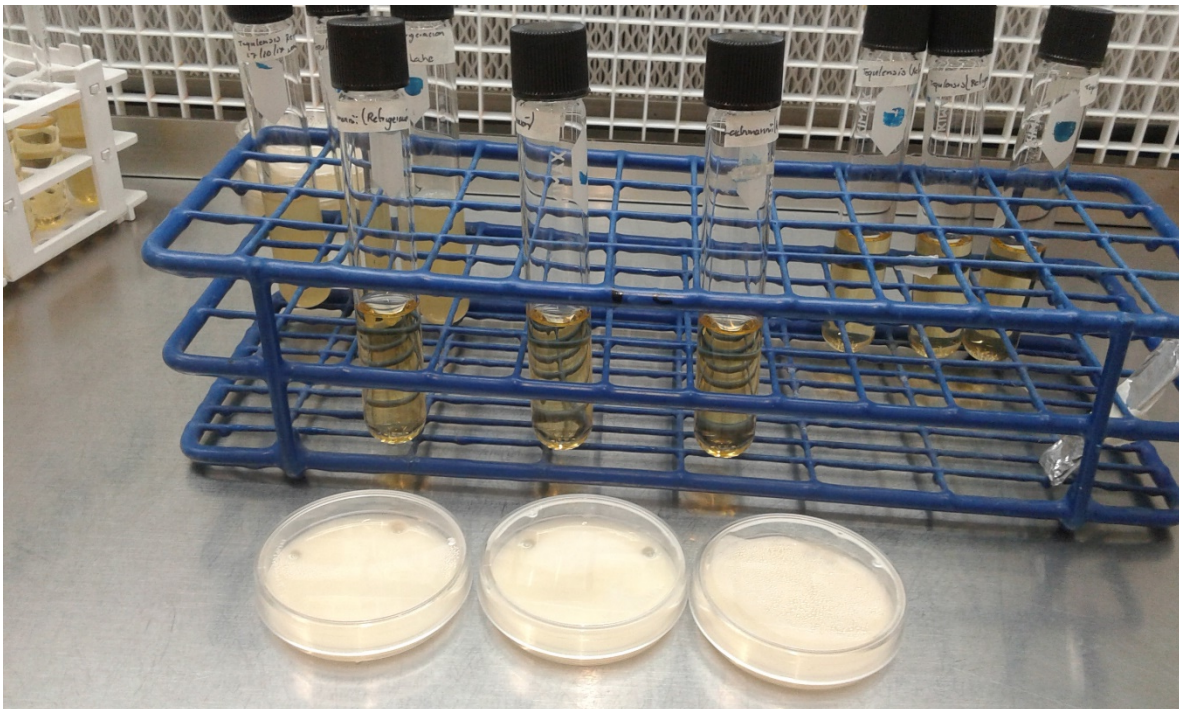


Figura 14. Gelatina de leche (sayes /sabor coco) con probióticos encapsulados como: *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis* a 4°C

Se inoculó en 10ml en tubos de ensaye por triplicado con caldo MRS 1g de la gelatina en las que se adicionaron las capsulas de cada uno probióticos, *L. casei Shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis* se incubo a 37° C durante 48 hrs.

Se realizó medición por medio de espectrofotómetro (C304) Modelo -500 UV Serie N° AE1407042., WL: tomando como referencia 560nm absorbancia.

- Gelatina de agua sabor anís de marca (sayes).

Se preparó g 10.8 g de las gelatinas de agua sabor anís en 90ml de agua, se realizó por triplicado para cada una de las bacterias encapsuladas.

Se realizó una suspensión del microorganismo encapsulado se dejó durante un mes con una temperatura de 4°C.

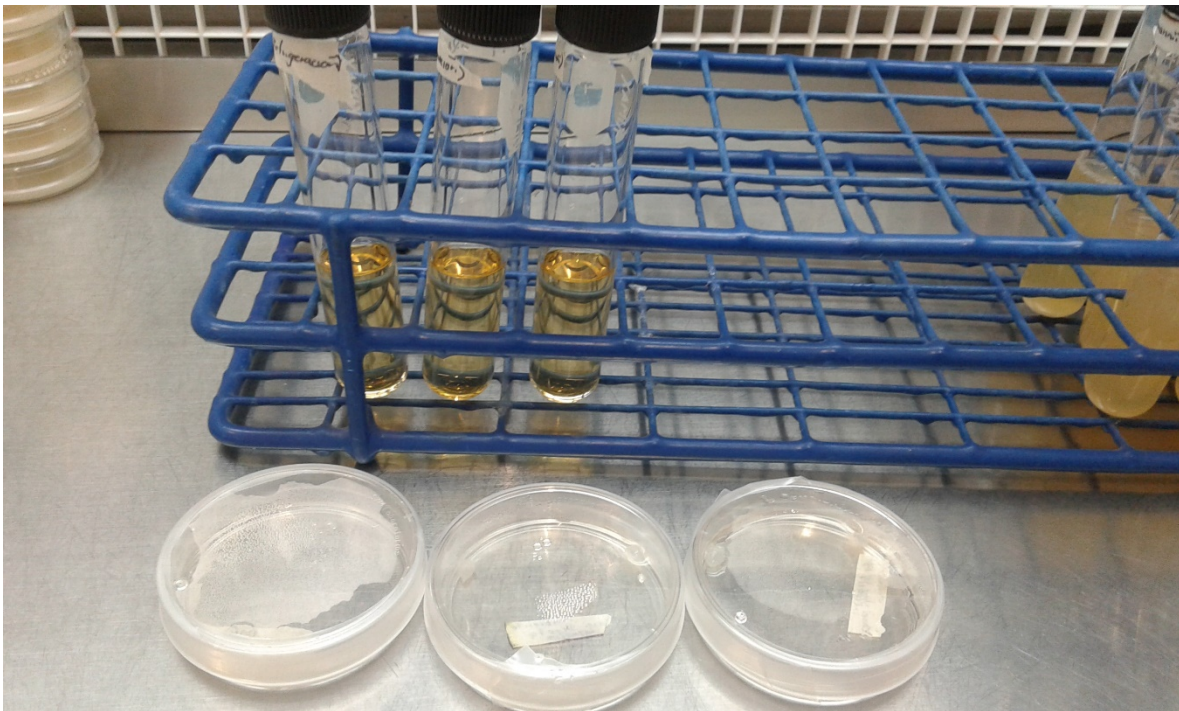


Figura 15. Gelatina de agua (sayes/ sabor anís) con probióticos *encapsulados* *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis* a 4°C de temperatura.

Se inoculó en 10ml en tubos de ensaye por triplicado con caldo MRS 1g de la gelatina en donde se adicionaron las capsulas de cada uno probióticos, *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis* se incubo a 37° C durante 48 hrs cada uno por separado.

Se realizó una medición por medio con espectrofotometría (C304) Modelo -500 UV Serie N° AE1407042., WL: con absorbancia de absorbancia a = 560nm.

### 3.6 Viabilidad de bacterias probióticas en el encapsulado mediante vertido en placa y extensión en superficie.

1. Las pruebas de las técnicas consisten en suspender las células microbianas, se diluyen antes de sembrar en la caja petri (Camacho et al., 2009).

#### Para la técnica de extensión superficial en placa.

1. Se inoculo tres capsulas de probióticos por cada tubo de 10ml de solución de caldo MRS durante 48hrs en incubadora a temperatura de 37°C.
2. Para la preparación de vertido en placa y extensión de superficie se preparó 3g de peptona de carne y 1.5g de NaCl, para 300ml, para realizar las diluciones de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  (bacterias encapsuladas) *L. casei shirota* y *B. tequilensis* ambas por duplicado.
3. Se preparó 24.8g de caldo MRS en 400ml de agua estéril para obtener 40 caja petri de 10ml se solución.

Inocular por duplicado, 0.1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril. Para distribuir de manera homogénea, extender el inóculo utilizando una varilla de vidrio estéril (en forma de escuadra o “L”) haciendo movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo, hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el inóculo se absorba antes de incubar (se recomienda un tiempo de espera aproximado de 10 minutos). El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se inocula en el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

4. Se deja incubar a 37° C durante 48hrs.,
5. Después de la incubación, contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas. Utilizar el registrador para contar las colonias.

La prueba **vertido en placa y extensión en superficie** para conocer la viabilidad de las bacterias en las capsulas se procedió a realizar la técnica de extensión de superficie para cada una de ellas excepto para *L. Leichmannii* la cual solo crece en medio líquido.

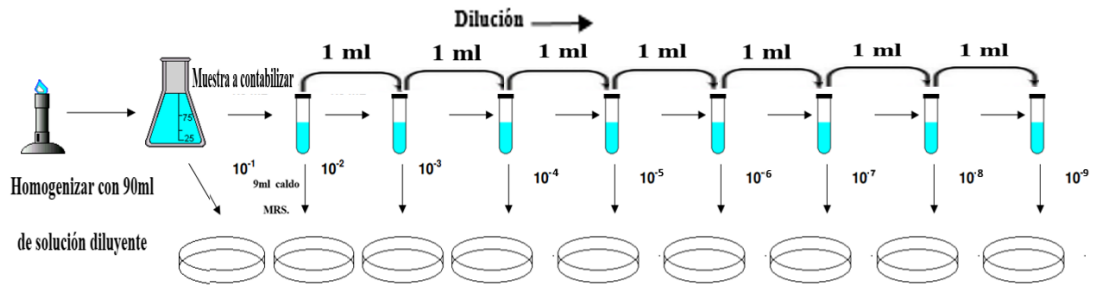


Figura 16. Vertido en placa y extensión en superficie de bacterias probióticas (*L. casei shirota* y *B. tequilensis*) encapsuladas en medios de cultivo como: peptona de carne y cloruro de sodio (NaCl) y agar MRS.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Obtención del inóculo para elaboración de encapsulado

El inóculo por triplicado de cada una de las bacterias probióticas *L. casei shirota*, *B. tequilensis*, *L. Leichmannii*, para así poder realizar el encapsulado exitosamente.

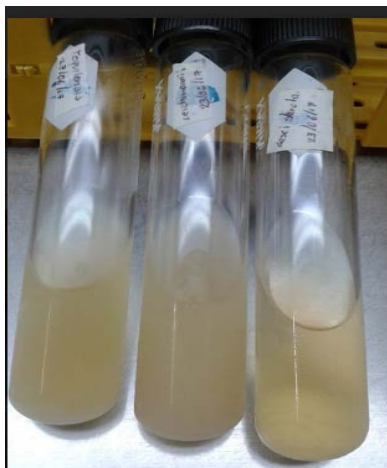


Figura 17. Inóculo de bacterias probióticas *L. casei shirota*, *B. tequilensis*, *L. Leichmannii*, en caldo MRS, incubado a 37°C, durante 48hrs.

#### 4.1.1 Obtención de encapsulado empleando alginato de sodio con microorganismos probióticos

La encapsulación por alginato de sodio en concentraciones de 1%, gelifica principalmente por la acción de cationes (iones  $\text{Ca}^{2+}$  de solución de  $\text{CaCl}_2$ ) a temperatura ambiente 25 °C y así obtener la formación de perlas, **figura 17**.



Figura 18. Obtención y selección de perlas con la forma esférica

#### 4.1.2 Obtención del tamaño de las capsulas formadas

El tamaño de las capsulas debe presentar un diámetro de 2 a 3 mm (Muthukumarasamy et al., 2006).



Figura 19. Capsula con bacterias probióticas con la forma y tamaño apropiado 1-3 micras

#### 4.2 Evaluación de supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsula mediante técnicas de espectrofotometría

##### 4.2.1 Evaluación de Cinética de crecimiento para probióticos encapsulados

En la técnica de cinética de crecimiento se aplicó para las tres bacterias encapsuladas por duplicado (*L. casei shirota*, *L. leishmannii*, *B. Tequilensis*) tomando tiempos de 0,4, 8 y 12hrs, los cuales se fueron evaluando mediante la medición de la densidad óptica mediante un espectrofotómetro para conocer el crecimiento paulatino de las bacterias y así conocer a curva de crecimiento de cada una de ellas.

Las cepas probióticas mostraron cinéticas de crecimiento similares en cuanto a número de microorganismos presentes en los encapsulados de *L. casei shirota* y *B. tequilensis* tal y como se muestra en las figuras 19 y 21 , la etapa de latencia alcanzo mayor turbidez a .800nm en la medición en el espectrofotómetro con un crecimiento considerable de bacterias aun a las 12hrs, mientras que la bacteria *L. leishmannii*, la fase de latencia es más baja debido a que necesita mayor tiempo de crecimiento comparada con las dos anteriores las cuales muestran un mayor crecimiento antes de pasar a la fase de muerte.

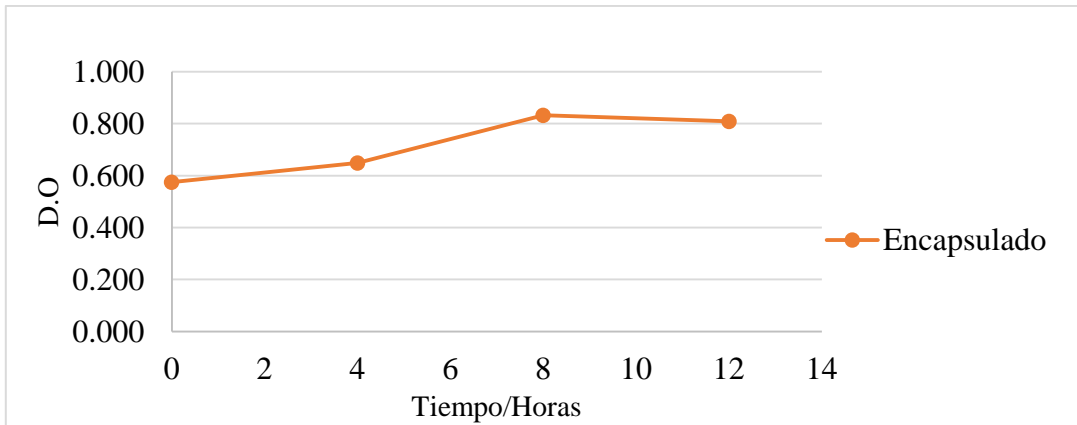


Figura 20. Curva de crecimiento del *L. casei shirota* en los encapsulados a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs con puntos de 0, 4, 8 y 12 hrs.

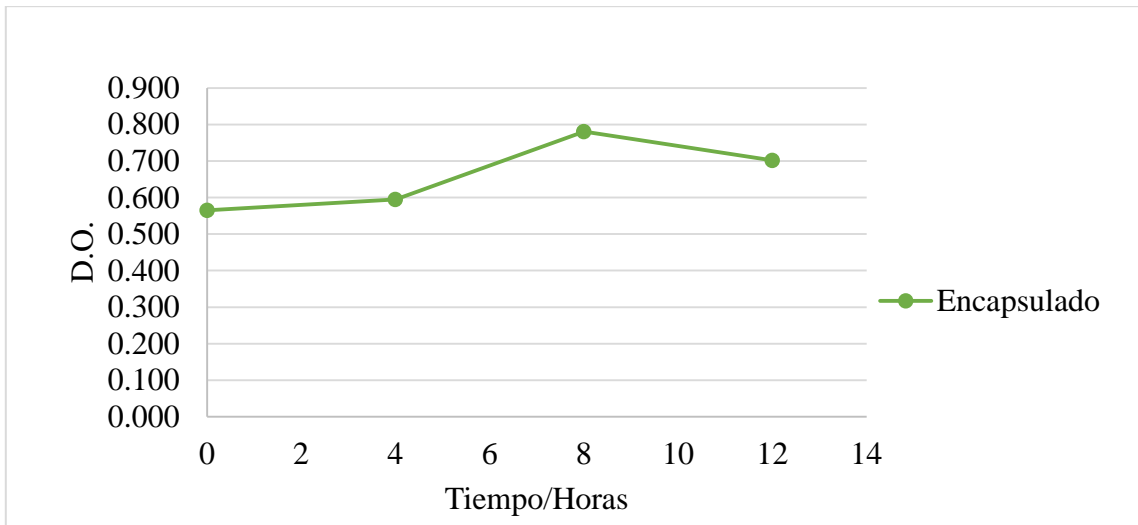


Figura 21. Curva de crecimiento del *L. leichmannii* en los encapsulados a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs.

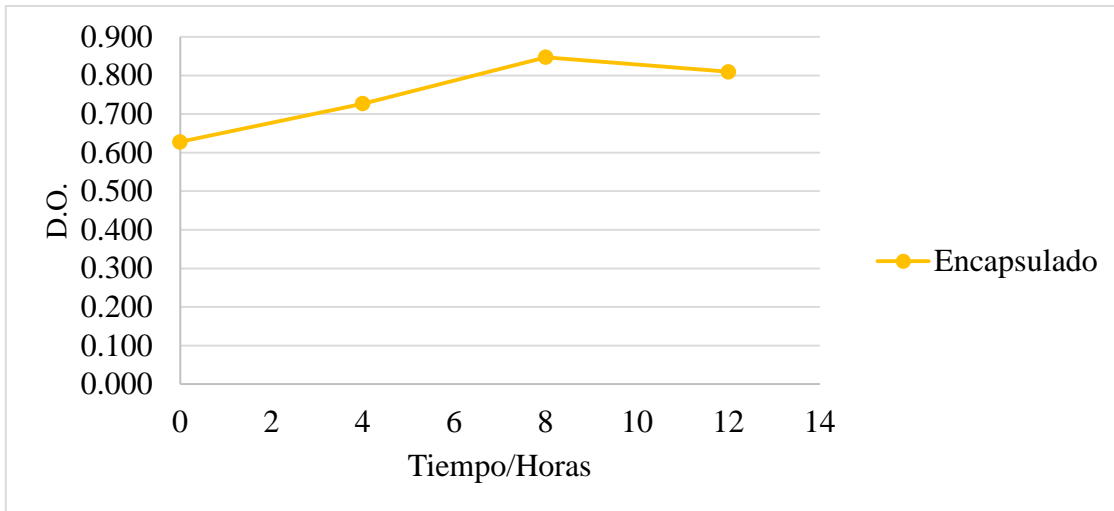


Figura 22. Curva de crecimiento de *B. tequilensis* en los encapsulados a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs tomando puntos de medición de 0,4, 8, y 12 hrs.

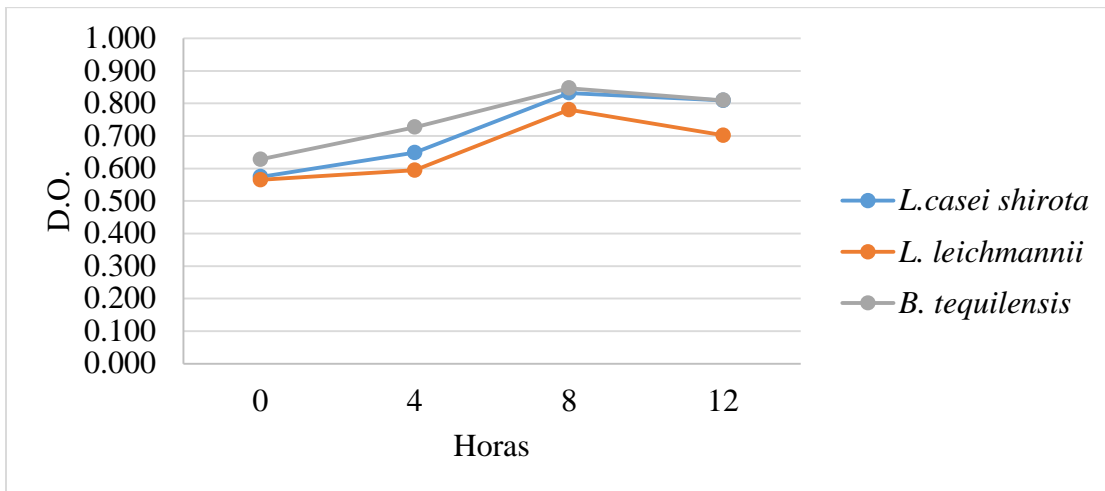


Figura 23. Curva de crecimiento de *B. tequilensis*, *L. leichmannii*, *L. casei shirota*, en los encapsulados a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs tomando puntos de medición de 0,4, 8, y 12 hrs.

#### 4.2.1 Evaluación de Cinética de crecimiento para probióticos sin encapsular.

En la cinética de crecimiento de los probióticos sin encapsular se realizaron para los tres microorganismos probióticos por duplicado (*L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis*)

tomando tiempos de 0,4, 8 y 12hrs, y así poder comparar el crecimiento con los encapsulados y los no encapsulados y observar si existían diferencias significativas en crecimiento de microorganismos, como se muestra en las siguientes figuras 23, 24 y 25.

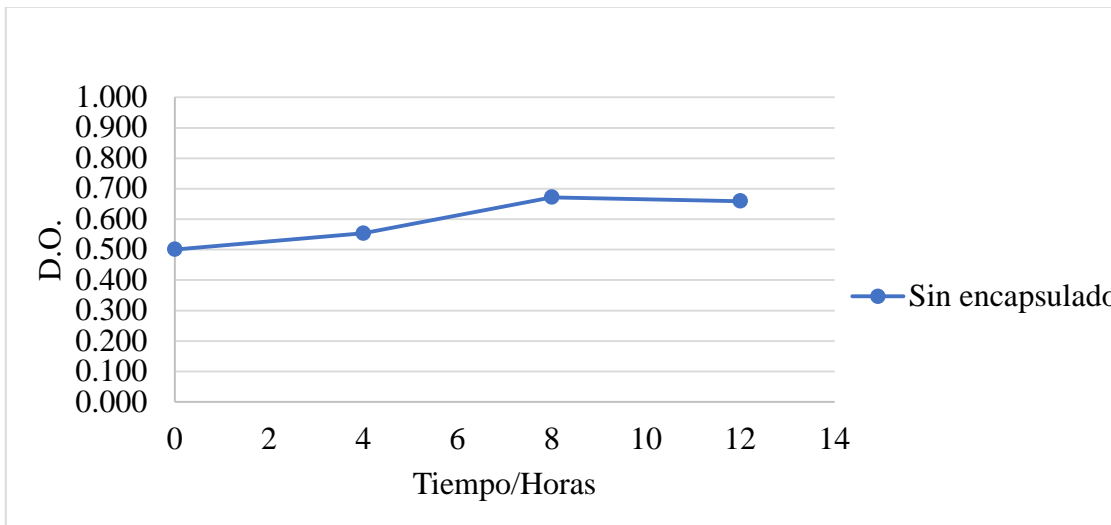


Figura 24. Curva de crecimiento de *L. casei shirota* en los sin encapsular a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs.

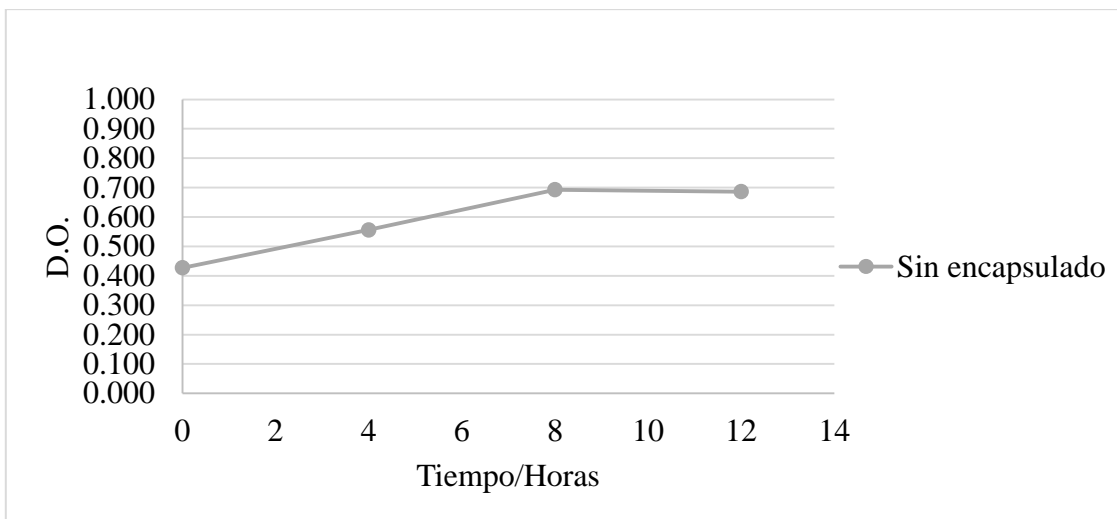


Figura 25. Curva de crecimiento del *L. leichmannii* en los sin encapsular a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs.

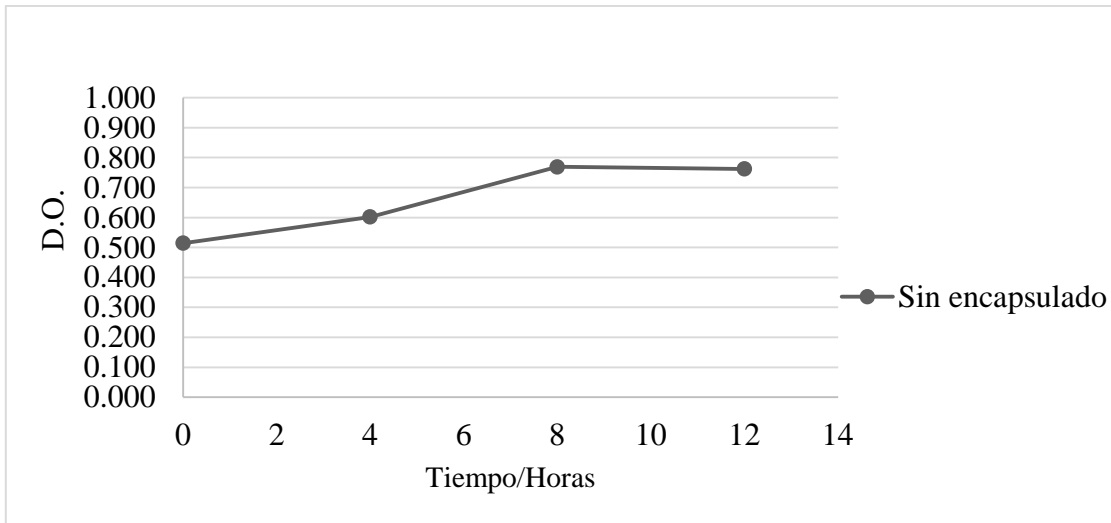


Figura 26. Curva de crecimiento del *B. tequilensis* en los sin encapsular a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs.

En el estudio observamos un mayor crecimiento de bacterias probióticas en los encapsulados que en las bacterias libres debido a que posiblemente al agregar 3 perlas con probióticos estas sean más numerosas que al agregar 500 ul de cultivo siendo concordantes con las gráficas de crecimiento.

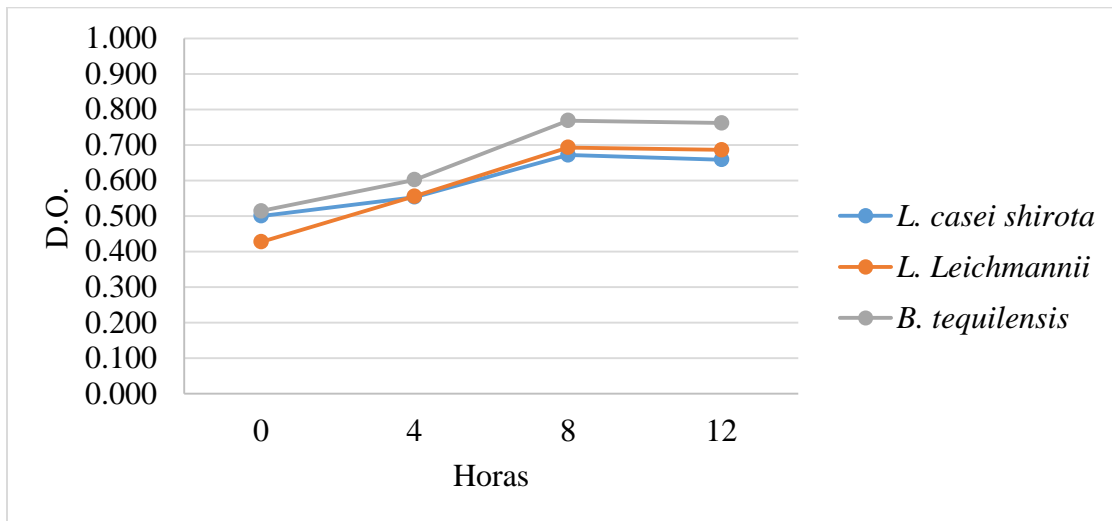


Figura 27. Curva de crecimiento del *B. tequilensis* en los sin encapsular a 37 °C en caldo MRS durante 12 hrs.

### 4.3 Optimización de las condiciones del estudio de supervivencia frente a condiciones gastrointestinales mediante técnicas de espectrofotometría

#### 4.3.1 Evaluación de bacterias probióticas encapsuladas y sin encapsular en diferentes pH.

El estudio de la viabilidad de las tres cepas probióticas (*L. casei shirota*, *L. leishmannii*, *B. tequilensis*) encapsuladas en perlas de alginato de sodio al 1% y  $\text{CaCl}_2$  1% al 2% mediante el método de gelificación iónica y también sin encapsular, se ensayó frente a diferentes pH (6.20, 5.62, 5.22, 4.31, 4.07, 3.50, 3.18, 2.51, 2.22, 1.50) durante 48 hrs incubadas a 37°C. El número de microorganismos se determinó en las perlas con probióticos (Cápsulas), los microorganismos que difundieron las perlas al medio de (Bacteria Liberada) y los controles realizados con el microorganismo sin encapsular (Bacteria control). Los resultados se muestran en las siguientes figuras. 27, 28 y 29 para *L. casei shirota*, *L. leishmannii*, *B. tequilensis* respectivamente.

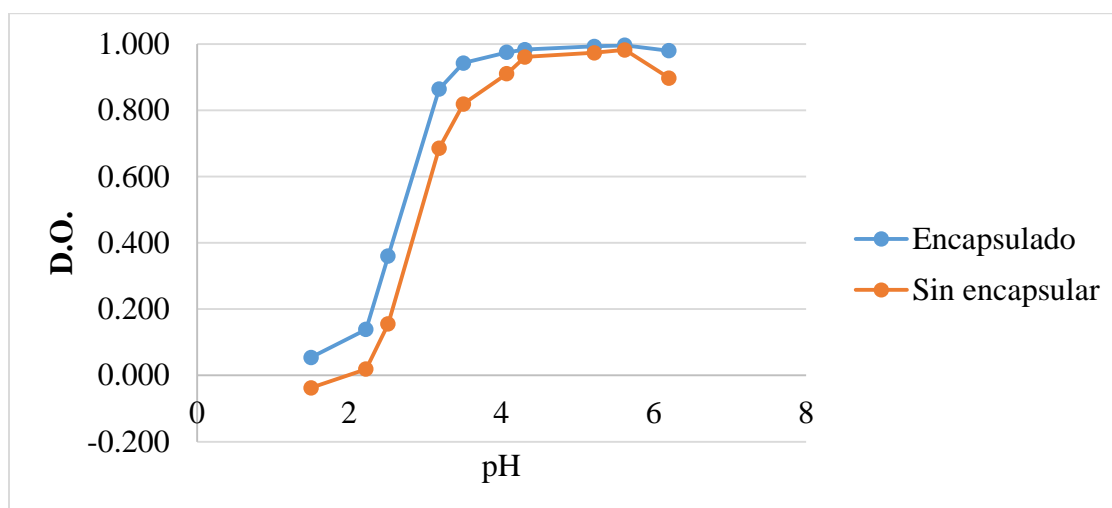


Figura 28. Curva de crecimiento del encapsulado y sin encapsular de *L. casei shirota* a diferentes concentraciones de pH durante 48 horas en caldo MRS.

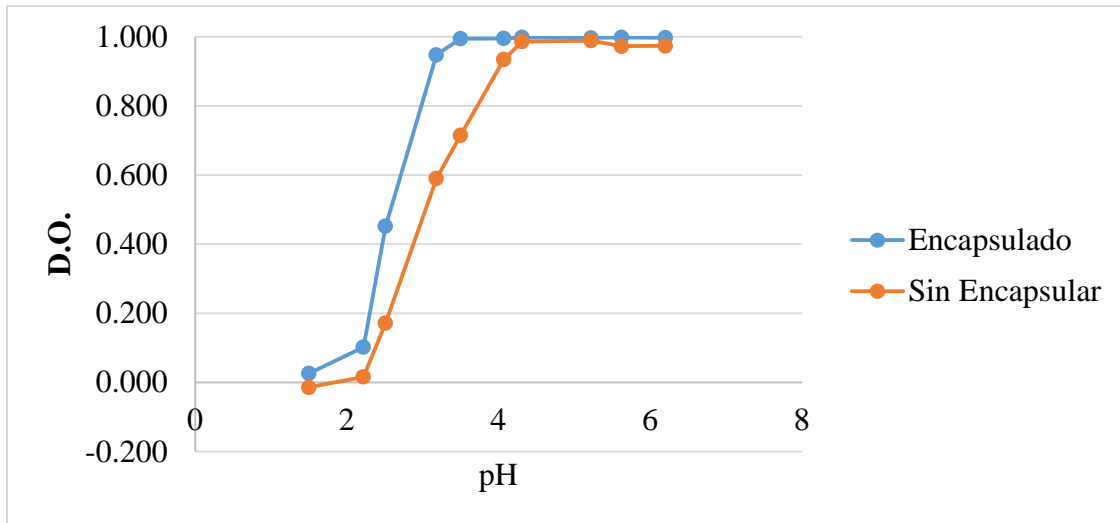


Figura 29. Curva de crecimiento de *L. leichmannii* encapsulado y sin encapsular a diferentes concentraciones de pH durante 48 horas en caldo MRS.

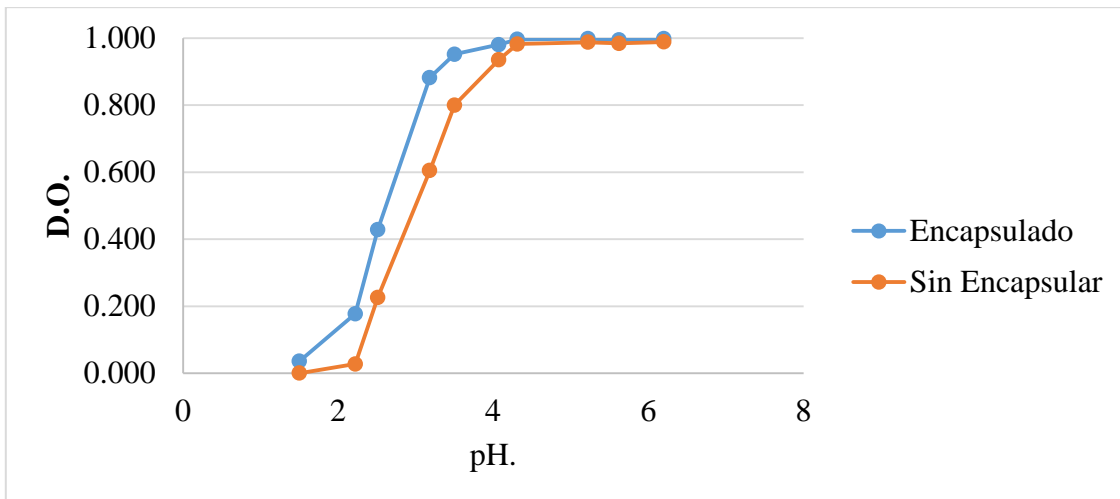


Figura 30. Curva de crecimiento de *B. tequilensis* encapsulado y sin encapsular a diferentes concentraciones de pH durante 48 horas en caldo MRS.

En las gráficas observamos los diferentes comportamientos de crecimiento a distintos pHs simulando el paso al tracto gastrointestinal siendo óptimos ya que observamos que a pH de 1.5 a un tenemos crecimiento bacteriano por lo tanto la función de estos es aun factible.

Mientras que para los microorganismos sin encapsular son más vulnerables a las condiciones de acidez que presenta nuestro organismo por lo tanto no llegarían a ejercer su función.

#### 4.4 Evaluación de la viabilidad frente a diferentes condiciones de almacenamiento de microorganismos probióticos encapsulados

El estudio de viabilidad durante 30 días, con las mismas condiciones con tiempo y temperatura mostraron valores significativos en cuanto presencia de bacterias presentes dentro de las capsulas. Como se muestra en la siguiente figura 30.

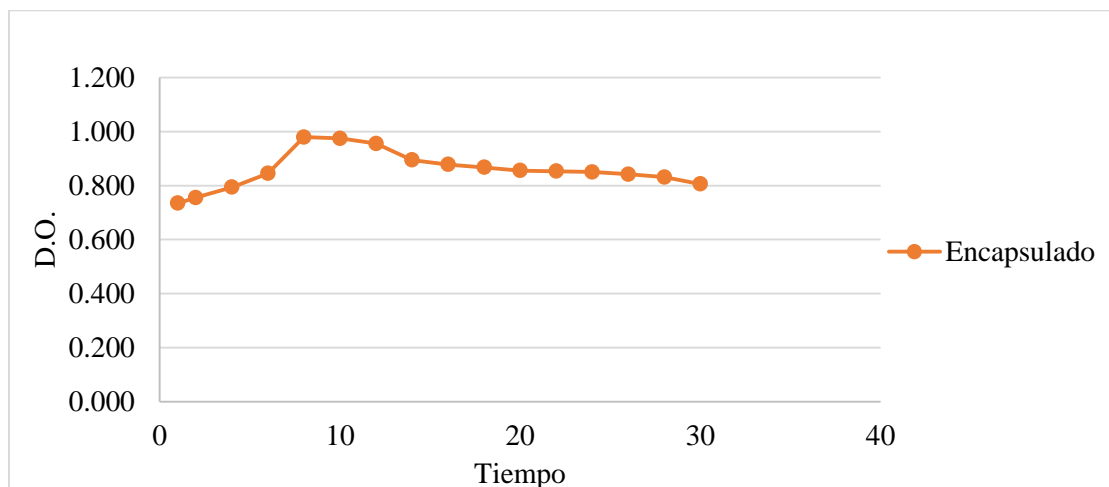


Figura 31. Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei shirota* y su viabilidad durante 30 días a temperatura de refrigeración en agar MRS.

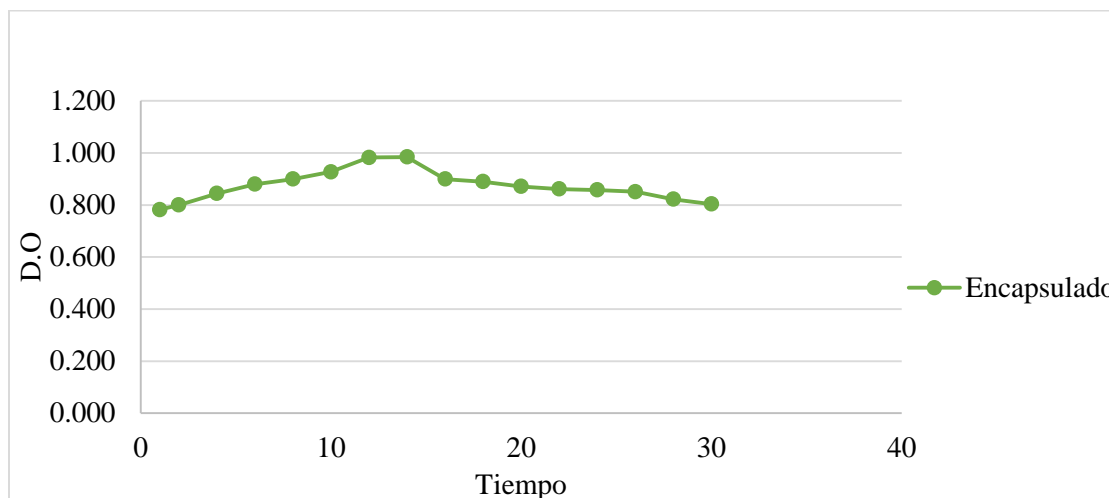


Figura 32. Curva de crecimiento de *L. Leichmannii* y su viabilidad durante 30 días a temperatura de refrigeración en agar MRS.

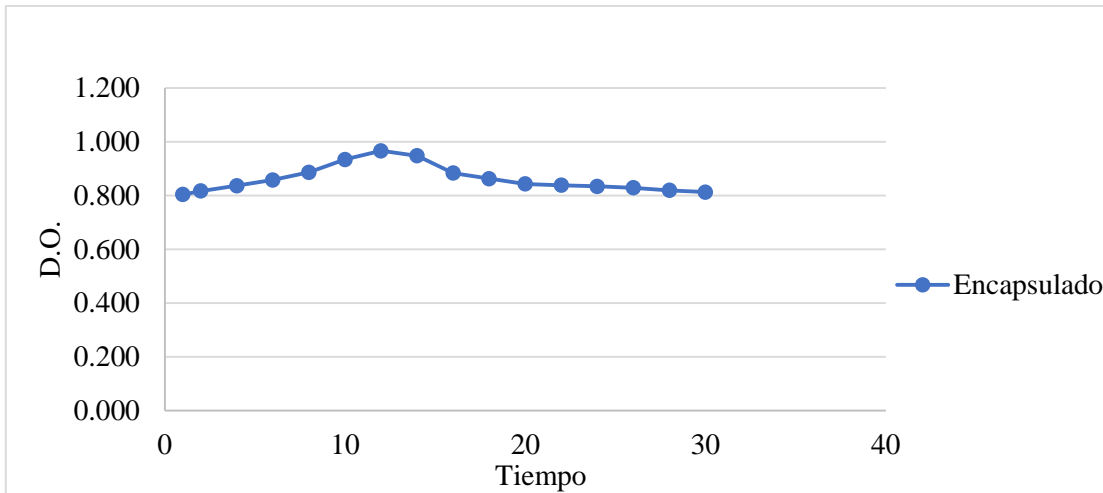


Figura 33. Curva de crecimiento de *B. tequilensis* y su viabilidad durante 30 días a temperatura de refrigeración en agar MRS.

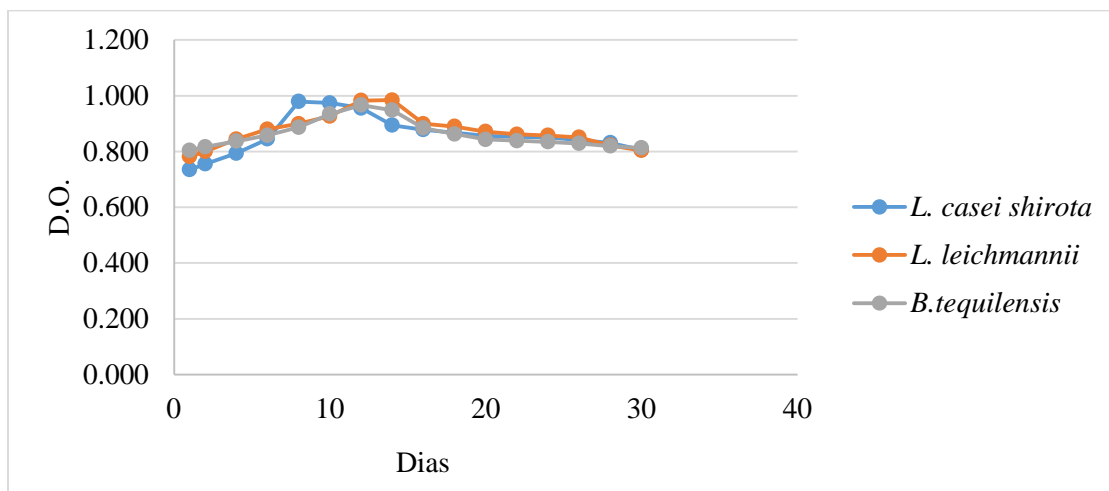


Figura 34 Curva de crecimiento de *B. tequilensis*, *L. leichmannii*, *L. caseishirota* y su viabilidad durante 30 días a temperatura de refrigeración en agar MRS.

#### 4.5 Evaluación de viabilidad frente a diferentes condiciones de almacenamiento de microorganismos probióticos encapsulados en alimento comercial.

##### 4.5.1 Evaluación de probióticos encapsulados a temperatura ambiente.

Con la finalidad de aplicar el crecimiento de la capsulas en un alimento se procedió a utilizar una gelatina con la incorporación de las capsulas con probióticos y observar su viabilidad durante un periodo de tiempo

El estudio de viabilidad se realizó durante 30 días, con las mismas condiciones que se describen anteriormente pero en distintas presentaciones de gelatina: de agua sabor anís y leche sabor coco y mismas condiciones de almacenamiento.

En la evaluación de la presencia de bacterias presentes dentro de las capsulas en la gelatina, se encontraron resultados significativos en la gelatina de leche sabor coco, como se muestra en las siguientes figuras 34 y 35.

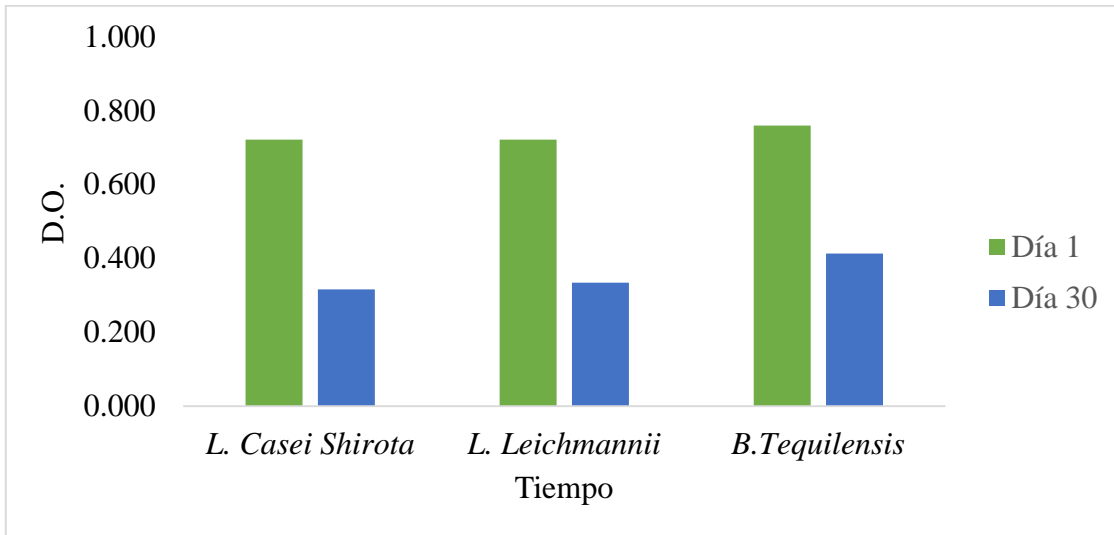


Figura 35. Vida de anaquel de bacterias probióticas encapsuladas en gelatina de agua almacenada a temperatura ambiente durante 30 días.

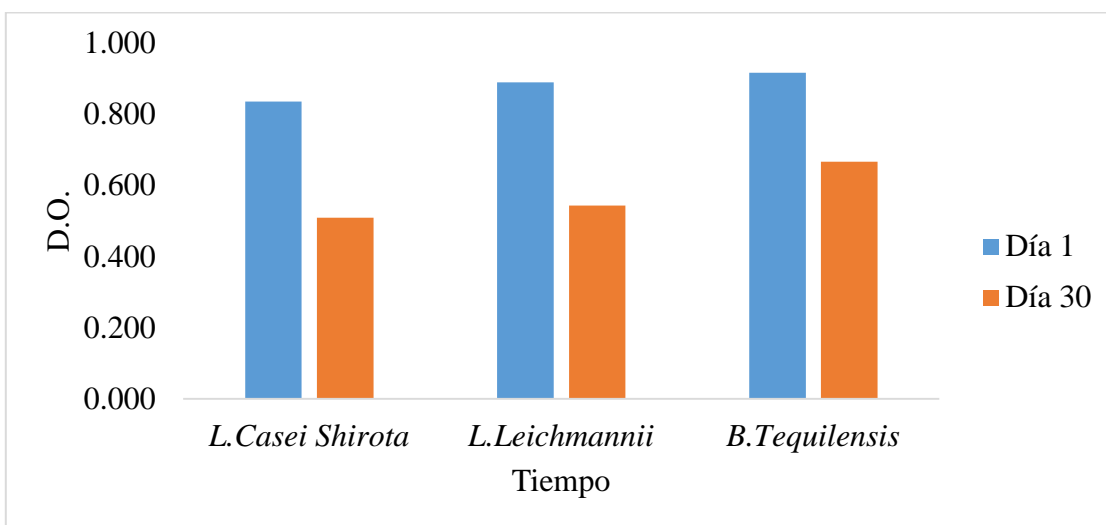


Figura 36. Vida de anaquel de bacterias probióticas encapsuladas en gelatina de leche almacenada a temperatura ambiente durante 30 días.

#### 4.5.2. Evaluación de probióticos encapsular en refrigeración.

El estudio de viabilidad durante 30 días, con las mismas condiciones pero en distintos medios comerciales como gelatina de leche sabor anís y leche sabor coco de almacenamiento.

En la evaluación del tiempo y temperatura mostraron valores significativos en cuanto presencia de bacterias presentes dentro de las capsulas.

La temperatura de almacenamiento muestra datos importantes en cuanto al comportamiento de probióticos encapsulados específicamente en la gelatina de leche sabor coco como se muestra en la figura 37, en comparación de la gelatina de agua sabor anís como se muestra en la siguiente figura 36.

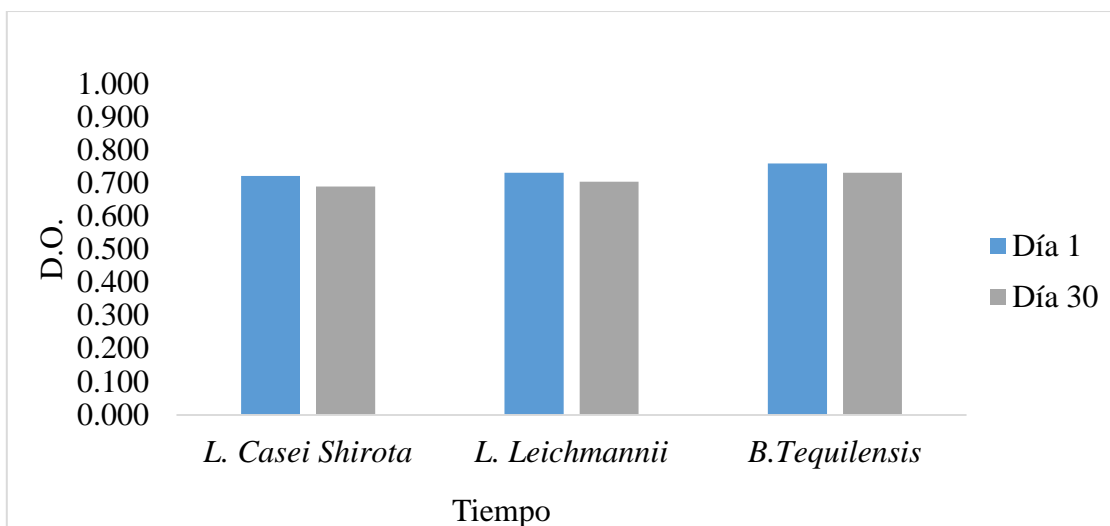


Figura 37 Vida de anaquel de bacterias probióticas encapsuladas en gelatina de agua almacenada a temperatura de 4°C durante 30 días.

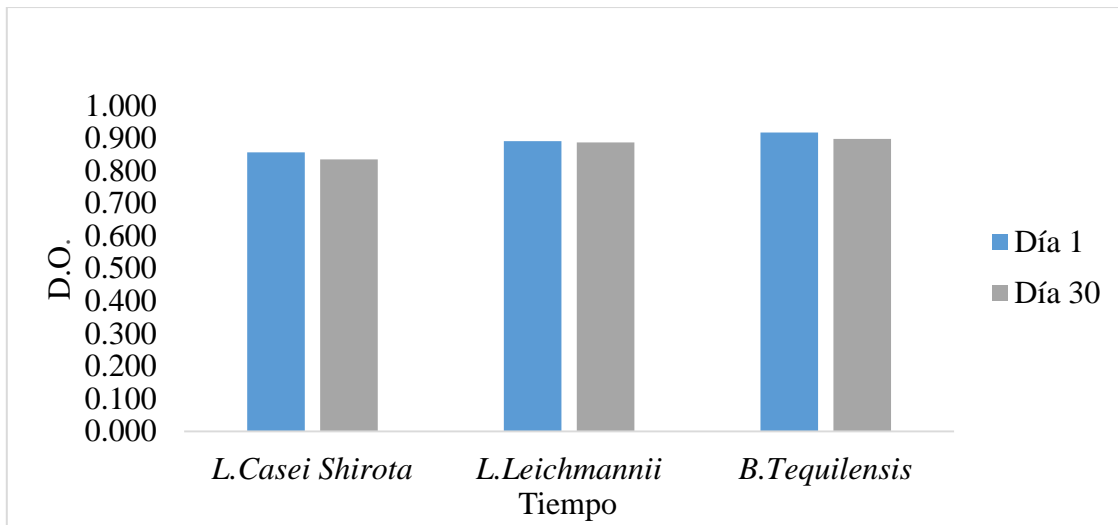


Figura 38 Vida de anaquel de bacterias probióticas encapsuladas en gelatina de leche almacenada a temperatura de 4°C durante 30 días.

#### 4.6 Viabilidad de bacterias probióticas en el encapsulado mediante extensión en superficie.

Para conocer la factibilidad de las capsulas con las bacterias probióticas se realizo la prueba de extensión en superficie de las capsulas con las bacterias. Se realizaron diluciones base 10 del crecimiento que fueron desde  $10^1$  hasta  $10^9$ , obteniendo los siguientes resultados en la tabla 5:

Tabla 5. Diluciones de las bacteria (*B. tequilensis*) encapsuladas mediante extensión en superficie en placa.



















DILUCIÓN	CONTEO BACTERIANO	
Dilución $1 \times 10^9$	<b><math>73 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^8$	<b><math>108 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^7$	<b><math>145 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^6$	<b><math>188 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^5$	<b><math>526 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^4$	<b>Incontables</b>	
Dilución $1 \times 10^3$	<b>Incontables</b>	
Dilución $1 \times 10^2$	<b>Incontables</b>	
Dilución $1 \times 10^1$	<b>Incontables</b>	

Tabla 6. Diluciones de las bacteria (*L. casei shirota*) encapsuladas mediante extensión en superficie en placa.

DILUCIÓN	DILUCIÓN	
Dilución $1 \times 10^9$	<b><math>16 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^8$	<b><math>50 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^7$	<b><math>87 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^6$	<b><math>181 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^5$	<b><math>189 \times 10^9</math> ufc/ml</b>	
Dilución $1 \times 10^4$	<b>Incontables</b>	
Dilución $1 \times 10^3$	<b>Incontables</b>	
Dilución $1 \times 10^2$	<b>Incontables</b>	
Dilución $1 \times 10^1$	<b>Incontables</b>	

**Así mismo se muestran en la figura z el conteo de las colonias bacterianas mencionadas anteriormente.**

Para el caso de la bacteria *L. leishmannii* no se realizó esta prueba debido a que la bacteria es selectiva a su medio de crecimiento líquido por lo tanto no crece en medio sólido sin embargo siempre se corroboró que hubiera crecimiento en medio líquido para asegurar su viabilidad en las capsulas

## **CAPITULO V**

### **DISCUSION DE RESULTADOS**

Con el propósito de medir la eficiencia del encapsulado, se realizaron pruebas de cinética de crecimiento, ácido clorhídrico con distintos pH, determinación de viabilidad, vida de anaquel con alimentos, indicados anteriormente en la metodología.

Las tres repeticiones realizadas en las tres distintas bacterias fueron homogenizadas uniformemente y encapsuladas el mismo día para disminuir el error en reducción de logaritmos que se podría dar por almacenamiento. La diferencia en la eficiencia se puede atribuir a que los probióticos encapsulados con una matriz de gel de alginato resultan encapsulas blandas, lo que da aparición a poros. La aparición de estos, además de la solución endurecedora (cloruro de calcio), el tamaño de las capsulas y la técnica de encapsulación por Mortazavian et al., en el 2007, fue apta.. Es importante mencionar que la presencia de poros no compromete la eficiencia del encapsulado, puesto que en estos micro espacios de aire, igual se puede alojar bacterias.

En el estudio se observó que al utilizar un volumen de cloruro de calcio de 200 ml en un vaso de precipitado, las capsulas tenían mayor turgencia. Además del volumen utilizado, el tiempo pudo haber sido una fuente de error, ya que según la metodología las capsulas debían permanecer en el cloruro de calcio 30 minutos con agitación constante. En cuanto este, más tiempo de reposo, crean condiciones en el alginato que pueden generar variación en las cápsulas.

Los resultados pueden variar dependiendo del equipo a utilizar debido a que la técnica utilizada no requirió de centrifuga, siendo el procedimiento manual, ya que el peso está ligado directamente a la cantidad de aire que se aloja en el embolo de la jeringa, el cual se manifiesta en cápsulas de menor peso tal como lo menciona el autor Mortazavian et al., en el 2007, más no crea ningún efecto significativo en la concentración de bacteria, ni afecta la vida de anaquel de las cápsulas

La caracterización de cápsulas y evaluación de su resistencia a condiciones pH, gastrointestinales simuladas.

Con la finalidad de establecer un protocolo de encapsulación eficiente se realizaron diversas pruebas preliminares. Inicialmente las bacterias se adicionaban directamente a la solución de alginato, adicionando colorante natural, sin embargo debido a la viscosidad de solución no lograban distribuirse de manera uniforme. Esto provocaba que al momento de realizar las cápsulas no todas tenían microorganismos por dentro. Para poder solucionar este problema se utilizó medio de cultivo como medio de incubación para los microorganismos. Luego de completar el proceso de incubación se agregaban 10 ml del inóculo a 100 ml de alginato, ambas soluciones siendo exitosamente homogenizadas. El problema ahora recaía en que las cápsulas obtenidas por si solas no contenían la concentración viable. Al muestrear el inóculo se descubrió que contenía una concentración deficientes. Para poder incrementar la concentración del inóculo se incluyó un proceso de agitación (De La Cruz et al., 2013). El proceso se concentró exitosamente elevando la concentración de las bacterias probióticas y al ser encapsuladas, el *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis* se redujo dentro de las cápsulas. Al ser completadas estas pruebas preliminares fue posible comenzar el experimento. Eficiencia de encapsulación.

**Determinación con diferentes pH:** Con el propósito de determinar la viabilidad y la resistencia que proveen las cápsulas se desarrolló con modelo convencional para simular los distintos pH del organismo.). Esta es la causa por la cual existe pérdida de peso en las primeras 2 horas. Según (González et al., 2006), los cuales se basaron en estudios previos que demostraron la resistencia del encapsulado con alginato a la digestión gástrica la cual posee en su mayoría HCl . Sin embargo que se han logrado detectar en el colon lo cual nos brinda la cantidad adecuada para considerarse como benéfico para la salud, por tal razón a partir de la hora 2 a la 6 las cuales representan la fase entérica y entérica final respectivamente, se mantiene el peso sin mostrar diferencias estadísticas.

Métodos de gelificación han logrado incrementar la supervivencia de organismos probióticos utilizando alginato como medio encapsulante. (Jiménez et al., 2013).

Todas las cepas fueron sensibles a los cambios de pH, presentando diferentes perfiles de viabilidad en función de los mismos. Dentro de esta sensibilidad, las cepas *bacillus*, fueron más resistentes a la exposición de distintos pH simulados a los del ser humano.

La exposición a pH 2 fue la más agresiva para las tres cepas probióticas dándose tras su exposición disminución de niveles bacterianos por debajo de los límites de detección.

La viabilidad se vio modificada por el tiempo de exposición a cada uno de los pH. Los *Lactobacillus*, *Bacillus* sin encapsular mostraron una tendencia creciente de resistencia a pH.

Las bacterias ácido lácticas crecen óptimamente en valores de pH entre 4 – 5, deteniéndose su crecimiento en valores de 3.2 a 3.8 (Vedammuthu et al. 1992). Es por ello que al estar a pH bajos como 1.5 el valor de crecimiento es menor.

Comparación de la viabilidad, con *L. casei shirota*, *leichmannii*, *tequilensis* libre y encapsulado.

A lo largo del estudio se realizaron pruebas de vida de anaquel, para estimar el tiempo que las bacterias encapsuladas logran mantener su concentración durante el almacenamiento. La prueba se realizó en un lote de capsulas de los tres distintos microorganismos probióticos. Las concentraciones de los probióticos encapsulados no presenta variación significativa a través del tiempo como era lo esperado. El encapsulamiento provee un ambiente anaeróbico, el cual se cree puede contribuir al crecimiento de las bacterias dentro de la matriz del alginato (Ding and Shah 2008). Se pronostica que las capsulas almacenadas deberían tener un mejor desempeño, ya que estas no están en el contacto con un medio que les pueda causar estrés.

Los resultados de *L. casei shirota*, *L. Leichmannii*, *tequilensis* libre y encapsulados mostraron diferencia significativa con respecto a tiempo y temperatura.

Las concentraciones de bacterias encapsuladas cumple con lo que exigen los institutos de tecnología de alimentos y gastroenterología para productos probióticos, en donde se indica que para que el producto probióticos tenga un efecto funcional en el huésped, es necesario que se encuentre en concentraciones entre  $10^6$  y  $10^7$  (Sanz et al. 2003).

## **CAPITULO VI**

### **CONCLUSIONES**

Las cápsulas de alginato de sodio con *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis* son viables como recubrimiento de probióticos que favorece función en el tracto gastrointestinal

La encapsulación mejoró de manera significativa la supervivencia del probiótico *L. casei shirota*, *L. leichmannii*, *B. tequilensis*, manteniendo la concentración de dicho microorganismo dentro de la concentración viable (>6.03 Log UFC/g) durante la vida útil de las capsulas de alginato.

La vida de anaquel de las cápsulas determinadas en el tiempo del estudio es de 30 días. Por lo que pueden ser almacenadas a temperatura de refrigeración por este periodo de tiempo sin necesidad de estar elaborando cápsulas diarias o semanales.

La microencapsulación ha sido descrita por infinidad de trabajos de investigación como uno de los métodos más eficientes a la hora de preservar la estabilidad y viabilidad de los microorganismos probióticos cuando son expuestos al procesamiento, almacenamiento y en distintas condiciones de pH. Por lo tanto, el empleo de estas técnicas de encapsulación se convierte en una alternativa prometedora para darle solución a la mayoría de problemas que tienen que enfrentar estos microorganismos en las industrias de alimentos y farmacéutica.

### **\*Recomendaciones**

Las bacterias se rehidrataban y se agregaban directamente a la solución de alginato, sin embargo, debido a la viscosidad de la solución los probióticos no lograban distribuirse de

manera uniforme. Esto provocaba que al momento de realizar las cápsulas no todas tenían microorganismos por dentro.

## **CAPITULO VII**

### **FUNTES DE INFORMACIÓN**

2. Araújo, E. Dos Santos, A. Soares, P. Jan, G. y De Carvalho, A. (2012). Probióticos in Dairy Fermentes Products en Rigobelo, E.C.(Ed). Probiotics (pp. 129-148). Brasil: Intech. doi:10.5772/51939.

3. Arribas Belén, (2009). Probióticos: Una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune. Departamento de farmacología, Universidad de Granada – España
4. Arribas B, Rodriguez M. E., Camuesco D., Zarzuelo A. Galvez J.( 2008 ). Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharm* 49: 1-26.
5. Avendaño, G. López, A. y Palou, E. (2013). Propiedades de alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 7(1), 87-86., recuperado de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Avendano-Romero-et-al-2013.pdf>(Junio, 2014.).
6. Avendaño, G. López, A. y Palou, E. (2013). Propiedades de alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 7(1), 87-86. Recuperado de [http:// web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Avendaño-Romero-et-al-2013.pdf](http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Avendaño-Romero-et-al-2013.pdf) (Junio, 2014).
7. Ávila Sandra, (2011). Efecto del agente encapsulante en la viabilidad de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* B442). Instituto politécnico nacional, Yautepec – Morelos.
8. Borges, S., Barbosa, J., Camilo, R., Carvalheira, A., Silva, J., Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M.M., Silva, J.P., Costa, P., Amaral, M.H., Teixeira, P., Freitas, A.C. (2012). Effects of encapsulation on the viability of probiotic strains exposed to lethal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*. 47, 416-421.
9. Buriti F. C.A. 2007. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in-culture with *Streptococcus termophilus*. *Food Chemistry* 104: 1605- 1610.
10. Buriti C.A. F. and Castro A. I. 2010. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of food Microbiology* 137:121-129.
11. Burgain C, Gaiani C, Linder M, Scher J (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* 104:467-483
12. Caicedo Yanina, (2010). Estudio de la viabilidad de la incorporación de bacterias probióticas micro encapsuladas en helados. Universidad Nacional De Colombia, Bogotá.

13. Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
14. Cats, A., Kuipers, E.J., Bosschaert, M.A.R., Pot, R.G.J., Vandembrouckegrauls, C.M.J.E.,Kuster, J.G. (2003). Effect of frequent consumption of a Lactobacillus casei- containing milk drink in Helicobacter pylori-colonized subjects. Aliment. Pharmacol. Ther. 17:429-435.
15. Collado M. C. (2004) Caracterización de cepas del genero *Bifidubacterium* con carácter probiótico. Universidad de Valencia- España. 283 p. disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1907/tesisUPV2209.pdf?sequence=1>
16. Chaikham P, Apichartsrangkoon A, Jirarattanarangsri W, Van 22. de Wiele T.(2012) Influence of encapsulated probiotics combined with pressurized longan juice on colon microflora and their metabolic activities on the exposure to simulated dynamic gastrointestinal tract. Food Res Int. 49: 133-142.
17. Champagne, C. Gardner, N. y Roy, D.(2005). Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45(1), 61-84.doi: 10.1080/10408690590900144.
18. Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. (2011).Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. Int J Food Microbi. 149: 185-193.
19. Cook, M. Tzortzis, G. Charalampopoulos, D. y Khutoryanskiy, V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. Journal of Controlled Release 162 (1), 56-67.doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.003.
20. Cruz, A. Antunes, A. Sousa, A. Faria, J. y Saad S. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. ScienceDirect: Food Research International. 42(1), 1233-1239.doi: 10.1016/j.foodres.2009.03.020.
21. Das, A., Ray, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty,R. (2014). Microencapsulation of Probiotic Bacteria and its Potential Application in Food Technology. International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology, 7(1): 47-53.
22. De La Cruz A, Terán A. (2013). Evaluación de la viabilidad de Lactobacillus casei libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano-Honduras. 33.

23. De Prisco, A., et al. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment, *LWT -Food Sci Technol*, 61, 452-462.
24. De Vrese, M. y Schrezenmeir; J. (2008). *Probiotics, and Synbiotics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 111(1), 1-66.doi: 10.1007/10\_2008\_097.
25. Diaz FJ, Parra V, Bendaño T, Montes P, Solorzano P. Utilidad del Suplemento de Probioticos (*Lactobacillus acidophilus* y *bulgaricus*) en el Tratamiento del Síndrome de Intestino Irritable. *Rev. Gastroenterol. Perú*. 2012; 32(4): 387-393
26. Ding, W.K. and Shah, N.P.( 2008). Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. *International Food Research Journal*. 15(2). 219-232.
27. Doleyres Y. and Lacroix C. (2004). Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal* 15:973-988.
28. Draget, K.I. 2000. Alginates. In *Handbook of hydrocolloids*. (pp. 379-395). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited - Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.
29. Fabich, H., et al.(2012). Microbial and algal alginate gelation characterized by magnetic resonance, *J Biotechnol*, 161(3), 320–327.
30. Fritzen, C., et al.(2013). Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments, *LWT - Food Sci Technol*, 50, 39-44.
31. Ferre B. y Dalmau J. (2001). Alimentos funcionales. *Acta Pediatr Esp* 2001; 59: 150 – 155), disponible en: <http://es.slideshare.net/shareck09/alimentos-funcionalesprobioticos>
32. Fuller, R. (1998). Probiotics in man and animals. 1998, *My*; 66(5):365-378. [PubMed], disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2666378>.
33. Funami, Takahiro; Fang, Yapeng; Noda, Sakie; Ishihara, Sayaca; Nakauma, Makoto; Draget Kurt I. Nishinari, Katsuyoshi and Phillips, Glyn O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. *Food Hydrocolloids*. 23(7):1746- 1756.

34. Geoffrey, P.W.(2006). Complementos nutricionales y alimentos funcionales Alimentos funcionales. (1ra ed.). Zaragoza, España: Acribia S.A.
35. Gennaro A.R. (2003). Remington Farmacia. Belluci S., Blumetti L., Cortés C.J., et al. 20ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1408 p.
36. González, B.E., Jiménez, Z., Heredia, N.L., Villarreal, L., García, G., Gómez, M. 2006.Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de Salmonella enteritidis var. Typhimurium. Ciencia UANL. 9(4):365-374.
37. Gonzales F., Gonzales – Martínez B. (2006). Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. Volumen N° 1. Enero – Marzo, disponible en <http://www.respyn.uanl.mx/vii/1/ensayos/criterios>.
38. González J, Hernández H. (2006). Efecto de la simulación gástrica y sales biliares en cápsulas de alginato y k-carragenina para encapsular bacterias lácticas [Tesis]. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-México. 9.
39. González, R., et al. (2014). Efecto de la Microencapsulación sobre las Propiedades Reológicas y Fisicoquímicas del Yogurt Blando, Infor Tecnol, 25(6), 45-56.
40. González, R., et al. (2015) Caracterización Viscoelástica de Biopelículas Obtenidas a Base de Mezclas Binarias, Inf. Tecnol, 26(3).
41. Gonzales Rafael, Mendoza Jaime, Moron Lena (2015). Efecto de la microencapsulación sobre la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos gástricos simulados. Universidad de Cartagena, Colombia.
42. Goyal, N., Dixit, K., Gandhi, D., 2008. Antimicrobial activity of probiotic Lactobacillus strains towards Salmonella enterica ser enteritidis in whey. The Internet Journal of Microbiology. 5(1).
43. Guarner, F. Khan, A.G. Garish, J. Eliakim, R. Gangl, A. Thomson, A. Krabshuis, J. y Le Mair, T. (2008). Probióticos y Prebióticos. Guías prácticas de OMGE (Organización mundial de gastroenterología). Recuperado de [http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19\\_probioticos\\_prebioticos\\_es.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19_probioticos_prebioticos_es.pdf).(Febrero,2014)
44. Guarner, F., Marcos, Requena, T. (2010). Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific Evidence". Nutrición Hospitalaria 25:700–704
45. Gupta V, Garg R. Probiotics. Indian J Med Microbiol. (2009). 20. 136: 2015-2031.

46. Hansen, P.A., Lessel, E.F.(1971). *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) Comb. Nov. Int. J. Syst.Bacteriol. 21:69-71.
47. Heenan C.N. and Adams M.C. ( 2004).survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in nofermented frozen vegetarian dessert. *Lebnsn –Wiss. u Technol* 37:461-466.
48. Helgerud, Trond; Gåserød, Olav; Fjæreide, Therese; Andersen, Peder O. and Larsen, Christian K. (2010). Alginates. In Food stabilizers, thickeners and gelling agents. (pp. 50-72). United Kingdom: WileyBlackwell.
49. Hernández P. (2001). Encapsulación de aceites esenciales de clavo para su aplicación en la industria alimentaria.Tesis Doctoral. Universidad Ctolica San Antonio, Murcia-España.276 p.
50. Hernandez R.A.(2009). Evaluación del potencial probiótico de cepas de lactobacillus para su uso en un alimento funcional. Tesis de maestria Intituto Politecnico Nacional de Tlaxcala – Mexico. 112p.
51. Hoffmann CE, et al. (1948).Respuesta de *Lactobacillus leichmannii* 313 al factor de anemia antiperniciosa. J. Biol. Chem. 176: 1465-1466.
52. Hussain, M.A., Rouch, D.A., Britz, M.L. ( 2009). Biochemistry of non-starter lactic acid bacteria isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of metabolites by stationary-phase cultures. *International dairy journal*. 19:12-21.
53. Jiménez M, Juárez A. 2013. Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados. En: *Temas Selectos de Ingenieria de alimentos* 7 (2):15–24.
54. Kailasapathy K (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Lebensmittelwissenschaft und-Technologie* 39:1221-1227.
55. Lee Y. and Salminen S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in food Science and Technology*, disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224400890858>.
56. Lee, K. y D. Mooney. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications, *Progr Pol Sci*, 37(1), 106–126.
57. Lopo, P.B. Gonzales, A.C. y Maestro, G.A. (2012).Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y*

Tecnología, 3(1), 135-143. Disponible de [http://www.rvcta.org/Publicaciones/Vol3Num1/ArchivosV3N1/Lupo-Pasin et al. RVCTA.V3N1.pdf.\(Mayo,2014\).](http://www.rvcta.org/Publicaciones/Vol3Num1/ArchivosV3N1/Lupo-Pasin_et_al._RVCTA.V3N1.pdf.(Mayo,2014).)

58. Manojlovic, V. Nedovic, V. Kailasapathy, K. y Zuidam, N. (2010). Encapsulation of Probiotics for use in Food Products en Zuidam, N. y Nedovic, V. (Ed.). Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing (pp. 269-302.). New York, Estado Unidos. Springer-Verlag.doi: 10.1007/978-1-4419-1008-0\_10.
59. Mazza, G.(1998). Functional foods: Biochemical& Processing Aspects (1ra ed.). pennsylvania, USA: Techmomic Publishing Compañy.
60. Miranda Andrea, (2009). Percepción e impacto de la publicidad en los consumidores de probióticos. Universidad Isalud – Buenos Aires – Argentina.
61. Mohammed, N. (2010). Enhancement of probiotics survival by microencapsulation with alginate and prebiotics. MMG 445 Basic Biotechnology, 6(1), 13-18. doi: MMG445.4683026.
62. Mohammadi, R., et al. (2011). Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties,Ann Microbiol, 61, 411–424.
63. Mortazavian, A., Hadi, R. S., Reza, E. M. y Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Journal L of Food Biotechnology. 5(1): 1-15.
64. Muthukumarasamy, P., Allan- Wojtas, P., y Holley, R.(2006). Stability of *L. reuteri* in different types of microcapsules. Journal of Food Science. 71 (1): 20-24.
65. Nag A. (2011). Development of microencapsulation technique for probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 431 using a protein-polysaccharide complex. Thesis the degree of Master, Masey University, New Zeland. 219p.
66. Nancy Dora Marín Agudelo, Jhan Sebastián Saavedra Torres, Luisa Fernanda Zúñiga Cerón, Carolina Salguero.(2016). MEDICINA (Bogotá). 38 (3); (114):247-263.
67. Naulkaekul S.and Charalampopoulos D.(2011). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. International Journal of food microbiology 146:111-117.

68. Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., and Coppola, R. (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 182-186.
69. Olargnero, G. Abad, A. Bendersky, S. Granzella L. y Motonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *DIETA*, 25 (121), 27-29. Disponible en [http://www.fmed.uba.ar/depto/nutrinormal/funcionales\\_fibra.pdf](http://www.fmed.uba.ar/depto/nutrinormal/funcionales_fibra.pdf).(Febrero,2014).
70. Páez Roxana, (2013). Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para aplicación en alimentos. Estudios microbiológicos y tecnológicos, Universidad Nacional De La Plata.
71. Parra, H.R. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63 (2), 5672-5676. disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=179918602020> (Febrero, 2014.).
72. Parra-Huertas RA (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2):5669-5684.
73. Patil, J., et al. (2010). Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. *Dig J Nanomat Biost*, 5, 241–248.
74. Ramos Gabriela, Hernández Lily, et al., (2012). Strategies to improve the survival of probiotic in ice cream. *Revista de ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma de Sonora – México*.
75. Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng, P.W.S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116, 369-381.
76. Ribeiro, M., et al. (2014). Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt, *Food Res Int*, 66,424–431.
77. Rodríguez María. (2009). Aislamiento y Selección de cepas del genero *Lactobacillus* con capacidad probiótica inmunomoduladora, Departamento de genética y microbiología- Universidad de Barcelona.
78. Rosas, W., et al. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum, *Carb Poly*, 98 1011–1017.

79. Sanders, M.E. (2008). Products with probiotics, [en línea]. Disponible en: <<http://www.usprobiotics.org>>. [Fecha de acceso 10 de junio, 2012].
80. Salminen S., Gueimonde M, and Isolauri E., (2005). Probiotics that modify disease risk. The journal of nutrition, V. 135, disponible en: <http://jn.nutrition.org/content/135/5/1294.short>
81. Sanguansri, L., Augustin, M.A. Functional Food Product Development (2010), Microencapsulation in functional food product development (pp. 3-19). Charlottetown, Canada: Wiley-BlackWell.
82. Sanz, Y. Collado M.C. y Dalmau, J. (2003). Probióticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta pediátrica española. 61(9),476-482. Disponible en <http://educapalimentos.org/site2/archivos/orientacion/PROBIOTICO.pdf> (Febrero, 2014).
83. Serna Johanna (2012). Elaboración de jugos de fruta con adición de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. Universidad de la Sabana – Chía.
84. Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martínez-González, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoukos, G., Tsakalidou, E., Mentis, A. (2004). In vitro and in vivo inhibition of Helicobacter pylori by Lactobacillus casei strain Shirota. Appl. Environ. Microbiol. 70(1):518-526.
85. Shoji, A., et al. (2013). Viability of L. acidophilus microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt, Food bioprod proces, 91, 83–88.
86. Selinger, C.P., Bell, A., Cairns, A., Lockett, M., Sebastian, S., Haslam, N. Probiotic VSL#3 prevents antibiotic-associated diarrhoea in a double-blind, randomized, placebo- controlled clinical trial. Journal of Hospital Infection. 2013; 84: 159-165.
- 87.
88. Soma, P. Williams, P. y Lo, M. (2009). Advancements in non-starch polysaccharides research of frozen foods and microencapsulation of probiotics. Frontiers Chemical the science and Engineering in china, 3(4), 413-426 doi:10.1007/s11705-009-0254-x.
89. Sue-SIANG T., Rosma A., Wan - Nadiah W., and Min-tze L. (2009). Evaluation of Agrowastes as Immobilizers for Probiotics in Soy Milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry Article 57:10187-101198.
90. Thantsha, M. Mamvura, C. y Booyens, J (2012). Probiotics – What They Are, Their Benefits and Challenges en Brzozowski, T. (Ed.). New Advances in the Basic and

Clinical Gastroenterology (pp. 21-50). Cracovia, Polonia: Intech. doi: 10.5772/2238.

91. Travezaño, C.M. y Matos, Ch. A. (2011). Importancia de los probióticos, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y aplicación a la industria alimenticia mediante microencapsulamiento. I Congreso Nacional de Investigación, Lima, Perú. Recuperado de <http://papiros.upeu.edu.pe/bitstream/handle/123456789/177/CIn30Articulo.pdf?sequence=1>.(Febrero,2014).
92. Tripathi, M. y K. Giri. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, J Funct Foods, 9: 225–241
93. Vásquez S., Lopretti M., et al., (2007). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus spp.* para su uso como probiótico en la industria láctea, Publicado anual del laboratorio tecnológico del Uruguay.
94. Vedamuthu E.R., M. Raccach, Bonita A. Glatz, E.W. Seitz y M.S. Reddy. (1992). Acid-Producing Microorganisms. In: C. Vanderzant and D. Splittstoesser (Ed) Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Foods. Third Edition. Washington, United States, American Public Health Association P. 229 - 232
95. Vergara Ana (2007). Estudio de la viabilidad del *Lactobacillus casei* en jugo de pera. Universidad Austral de Chile – Valdivia.
96. Vizcaíno R, Macias-T C, Márquez S JC, Morales A, Torres N. (2016). Usos clínicos de los probióticos. Archivos venezolanos de puericultura y pediatría. 79 (1): 29 – 40.
97. Walker, A.W., Duffy, C.L., 1998. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. Journal Nutri. Biochem. 9: 668-675.
98. [WGO] (2011). World Gastroenterology Organisation. Probióticos y prebióticos. Publicado octubre del 2011, revisado en enero del 2017, disponible en <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probioticsspanish-2011.pdf>.
99. Yáñez F.J., Salazar J.A. and Chaires L. (2005). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Mundo Alimentario 2:24-30.

100. Zanjani, M.A.K., Tarzi, B.G., Sharifan, A., Mohammadi, N. (2014). Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastrointestinal Condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3),843-852.
101. Zhu, Y., et al., (2011). Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis, *Can let.*309:19–127.
102. Ziar, H. y otros dos autores, Calcium alginate-resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions, *Int J Food Sci Technol*, 47, 1421–1429 (2012)

## CAPITULO VIII

### ANEXOS

#### Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular con ácido clorhídrico

*L. casei shirota*

#### ANOVA de un solo factor: DO vs. pH

Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales

Nivel de significancia    $\alpha = 0.05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

#### Información del factor

Factor   Niveles   Valores

---

pH	10	1.50, 2.22, 2.51, 3.18, 3.50, 4.07, 4.31, 5.22, 5.62, 6.20
----	----	--

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
--------	----	-----------	-----------	---------	---------

---

pH	9	2.42387	0.269319	13636.40	0.000
----	---	---------	----------	----------	-------

Error	10	0.00020	0.000020		
-------	----	---------	----------	--	--

Total	19	2.42407			
-------	----	---------	--	--	--

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
---	---------	--------------------	----------------

---

0.0044441	99.99%	99.98%	99.97%
-----------	--------	--------	--------

## Medias

pH	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.50	2	0.05450	0.00495	(0.04750, 0.06150)
2.22	2	0.25100	0.00141	(0.24400, 0.25800)
2.51	2	0.36000	0.00424	(0.35300, 0.36700)
3.18	2	0.86400	0.00141	(0.85700, 0.87100)
3.50	2	0.94300	0.00283	(0.93600, 0.95000)
4.07	2	0.97500	0.00424	(0.96800, 0.98200)
4.31	2	0.98350	0.00212	(0.97650, 0.99050)
5.22	2	0.99300	0.00424	(0.98600, 1.00000)
5.62	2	0.99650	0.00212	(0.98950, 1.00350)
6.20	2	0.98000	0.00990	(0.97300, 0.98700)

*Desv.Est. agrupada = 0.00444410*

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
5.62	2	0.99650	A
5.22	2	0.99300	A
4.31	2	0.98350	A B
6.20	2	0.98000	A B
4.07	2	0.97500	B
3.50	2	0.94300	C
3.18	2	0.86400	D
2.51	2	0.36000	E
2.22	2	0.25100	F
1.50	2	0.05450	G

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**ICs simultáneos de 95% de Tukey**

**Gráfica de intervalos de DO vs. pH**