



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**  
**INGENIERIA BIOQUIMICA**



**REPORTE DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

**ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**

**FECHA DE INICIO:**

06/AGOSTO /2012

**FECHA DE TÉRMINO:**

05/DICIEMBRE/2012

**ASESOR INTERNO:**

DRA.PATRICIA GUADALUPE SÁNCHEZ ITURBE

**ASESOR EXTERNO:**

DR. ADRIÁN HERNÁNDEZ MENDOZA

**REVISORES:**

ING.MARGARITA MARCELIN MADRIGAL

ING.JAVIER RAMÍREZ DÍAZ

**PRESENTA ALUMNA:**

ARIATNE MONZERRAT DE PAZ RAMOS

**No CONTROL:**

0827000

**ÍNDICE**

I. INTRODUCCIÓN .....	5
I. JUSTIFICACIÓN.....	7
III. OBJETIVOS .....	8
III.1 GENERALES.....	8
III.2 ESPECÍFICOS.....	8
IV.CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA .....	9
V.PROBLEMÁTICA A RESOLVER.....	11
VI.ALCANCES Y LIMITACIONES .....	11
VII.FUNDAMENTO TEÓRICO .....	12
VII.1 PROBIÓTICOS .....	12
VII.1.2 IMPORTANCIA DE LOS PROBIÓTICOS .....	13
VII.1.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA UN PROBIÓTICOS .....	14
VII.1.4 PROBLEMÁTICA DE LA VIABILIDAD DE LOS PROBIÓTICOS .....	14
VII.2 MICROENCAPSULACIÓN .....	14
VII.2.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MICROCÁPSULAS .....	15
VII.2.2 TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN .....	16
VII.2.3 TÉCNICA DE EXTRUSIÓN O GOTEO DE SOLUCIÓN DE MICROORGANISMOS.....	16
VII.2.4 TÉCNICA DE EMULSIÓN .....	17
VII.2.3 MATERIALES DE ENCAPSULACIÓN .....	18
VII.2.4 ALGINATO .....	18
VII.2.5 MECANISMOS DE GELIFICACIÓN CON ALGINATO .....	21
VII.2.6 GELIFICACIÓN EXTERNA .....	22
VII.2.7 GELIFICACIÓN INTERNA .....	22
VII.3 QUITOSANO COMO REVESTIMIENTO DE LAS MICROCAPSULAS .....	23
VIII.PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS .....	23
VIII.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
IX.ETAPA I .....	26
IX.1 REACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS .....	26
IX.2 ETAPA II.....	27
IX.2.1 CURVA DE CRECIMIENTO POR DENSIDAD ÓPTICA.....	27
IX.3 ETAPA III .....	28
IX.3.1 PROTOCOLO DE CONGELACIÓN DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS .....	28
IX.4 ETAPA IV .....	29

IX.4.1 PRE-SELECCIÓN DE BACTERIAS DE TRABAJO .....	29
IX.5 ETAPA V .....	30
IX.5.1 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO (CUENTA VIABLE).....	30
IX.6 ETAPA VI .....	30
IX.6.1 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA .....	30
IX.7 ETAPA VII .....	35
IX.7.1 MICROENCAPSULACIÓN CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 .....	35
X. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
XI. CONCLUSIONES .....	50
XII.RECOMENDACIONES.....	51
XIII.REFERENCIAS.....	52
XIV.ANEXOS.....	54

#### INDICE DE DIAGRAMAS

<b>Diagrama 1.</b> Esquema general	24
<b>Diagrama 2.</b> Microencapsulación por ultrahomogenización	24
<b>Diagrama 3.</b> Reactivación de las cepas probióticas	27
<b>Diagrama 4.</b> Curva de crecimiento por densidad óptica	28
<b>Diagrama 5.</b> Protocolo de congelación de bacterias probióticas	29
<b>Diagrama 6.</b> Evaluación del crecimiento a diferentes valores de pH	30
<b>Diagrama 7.</b> Medición de crecimiento a diferentes pH por vaciado en placa	32
<b>Diagrama 8.</b> Medición de resistencia a diferentes valores de pH	34
<b>Diagrama 9.</b> microencapsulación con homogeneizador pro-200	36

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Lista de bacterias probióticas empleadas en este trabajo	26
<b>Cuadro 2.</b> Bacterias seleccionadas para la evaluación del crecimiento a diferentes pH en medio de cultivo	42
<b>Cuadro 3.</b> Crecimiento (Log <sub>10</sub> UFC/g) de <i>L. reuteri</i> a diferentes valores de pH	43
<b>Cuadro 4.</b> Crecimiento a diferentes PH de <i>L. casei</i> 7r1	43
<b>Cuadro 5.</b> Crecimiento a diferentes PH de <i>L. casei</i> L9	44
<b>Cuadro 6.</b> Crecimiento a diferentes PH de <i>L. rhamnosus</i>	44
<b>Cuadro 7.</b> Crecimiento a diferentes PH de <i>L. casei</i> DCP	45
<b>Cuadro 8.</b> Resistencia a diferentes PH de <i>L. reuteri</i>	45
<b>Cuadro 9.</b> Resistencia a diferentes PH de <i>L. casei</i> L9	45
<b>Cuadro 10.</b> Resistencia a diferentes PH de <i>L. casei</i> 7r1	45
<b>Cuadro 11.</b> Resistencia a diferentes PH de <i>L. rhamnosus</i>	46
<b>Cuadro 12.</b> Resistencia a diferentes PH de <i>L. casei</i> DCP	46

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Tipos de microcápsulas	19
<b>Figura 2.</b> Modelo de “caja de huevos”	20
<b>Figura 3.</b> Curva de crecimiento ( <i>L. ferm</i> , <i>L. ferm 2</i> , <i>L. rha</i> )	37
<b>Figura 4.</b> Curva de crecimiento ( <i>L.30</i> , <i>Dcp</i> , <i>L.ac</i> )	38
<b>Figura 5.</b> Curva de crecimiento ( <i>L.r1471</i> , <i>L.c shi</i> , <i>L.ácido 4485</i> )	38
<b>Figura 6.</b> Curva de crecimiento ( <i>L.c 7r1</i> y <i>L.c L9</i> )	39
<b>Figura 7.</b> A) <i>L.ferm</i> , B) <i>L. ferm 2</i> , C) <i>L.rha</i> , D) <i>L. ac</i> , E) <i>L.r14171</i> , F) <i>L.9</i> , G) <i>L.30</i> ,H) <i>Dcp</i> , I) <i>L.c shi</i> , J) <i>L.acid 4495</i> y K) <i>L.c 7r1</i> a diferentes valores de pH	40
<b>Figura 8.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 5000 rpm	47
<b>Figura 9.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 5000 rpm a peso constante 37 <sup>0</sup> C	47
<b>Figura 10.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 17500 rpm	47
<b>Figura 11.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 17500 rpm a peso constante 37 <sup>0</sup> C	47
<b>Figura 12.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 35000 rpm	48
<b>Figura 13.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 35000 rpm a peso constante 37 <sup>0</sup> C	48
<b>Figura 14.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 5000 rpm	49
<b>Figura 15.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 5000 rpm a peso constante 37 <sup>0</sup> C	49
<b>Figura 16.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 17500 rpm	49
<b>Figura 17.</b> Microcápsulas con el homogenizador PRO-200 a 17500 rpm a peso constante 37 <sup>0</sup> C	49

## I. INTRODUCCIÓN:

Los recientes estilos de vida son los principales responsables de las enfermedades del ser humano, pues estos han llevado a los individuos a adoptar costumbres sedentarias, a aumentar el consumo de carbohidratos, grasas y alimentos escasos en fibra (Sanz, 2006).

El desarrollo de productos con varias ventajas nutricionales constituye una oportunidad real de contribuir al mejoramiento de la dieta, afectando positivamente la salud y el bienestar del individuo; de los nuevos productos se destacan aquellos que han sido modificados o les han sido incorporados nuevos elementos para ofrecer beneficios superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales (Lee *et al.*, 1995), tales como los alimentos probióticos, los cuales han sido formulados implementado la adición de microorganismos específicos capaces de generar un efecto benéfico.

En este respecto, algunos microorganismos no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas, fisicoquímicas y reológicas de los alimentos, sino que generan beneficios a la salud del consumidor, es por ello que la industria de los alimentos ha enfocado algunas investigaciones a la incorporación de estos microorganismos en los alimentos. Estos microorganismos son los denominados Probióticos, los cuales son “microorganismos vivos que, al ser ingeridos en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del anfitrión” (FAO, 2002). Dentro de los beneficios atribuidos a los probióticos se incluyen funciones protectoras del sistema digestivo, modulación del sistema inmunológico, reducción de los niveles de colesterol y presión sanguínea, mejora a la intolerancia a la lactosa, actividad anticarcinogénica (Penna, 1998).

Para que un microorganismos sea considerado probiótico tienen que cumplir determinados requisitos, por ejemplo, no ser patógenos ni generar metabolitos toxigénicos, tener propiedades tecnológicas, ser estables frente a las secreciones tracto gastrointestinales, ser capaces de adherirse a la células epiteliales del tracto digestivo y colonizar, y tener capacidad de influenciar positivamente la actividad metabólica local (FAO, 2001).

Diferentes alimentos han sido evaluados como vehículos para la incorporación de los probióticos, tales como productos lácteos, cárnicos y vegetales, entre otros; siendo las leches fermentadas las más estudiadas hasta el momento. Sin embargo, el problema que se presenta a la hora de incorporar probióticos a cualquier formulación, es la susceptibilidad de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, el oxígeno o la temperatura. Por todo esto, es

importante establecer alternativas que permitan a los microorganismos ser introducidos protegidos con una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno antes mencionadas (Gallardo *et al.*, 2009).

Para ello, se han explorado las técnicas de microencapsulación, que consisten en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica. Debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en la microencapsulación de sustancias. Dentro de ella están los polímeros naturales, los semi sintéticos y los sintéticos. Los polímeros naturales principalmente son de naturaleza polisacáridica, de origen animal y vegetal; se destacan el alginato, la dextrana, la goma arábiga y el Quitosano (Villena *et al.*, 2009).

El alginato ha sido uno de los polímeros más empleado en la microencapsulación, este forma una matriz altamente versátil, biocompatible y no tóxica. Estas ventajas del alginato y las recientes tendencias tecnológicas se han fusionado en la técnica de microencapsulación, resultando en un producto final que permite proteger a los compuestos encapsulados de factores adversos como el calor y la humedad mejorando así su estabilidad y biodisponibilidad (Parra Huertas, 2010).

Investigaciones han evidenciado que microcápsulas de alginato con quitosano mejora la estabilidad de las perlas de alginato, y por lo tanto mejora la viabilidad de los microorganismos probióticos encapsulados (Krasekoopt *et al.*, 2004).

La tecnología de encapsulación de probióticos presenta dos problemas, uno es el tamaño de las microcápsulas, y el segundo es que las bacterias tienen que permanecer viables. Estos dos aspectos son cruciales en la selección del material de encapsulación, además de que hace necesario la caracterización de las microcápsulas obtenidas en términos de tamaño de partícula, tipo de cápsula formada, eficiencia de encapsulación y la liberación bacteriana (Burgain *et al.*, 2011).

Por lo anterior, el objetivo principal de este estudio fue determinar la eficiencia de microencapsulación de probióticos mediante la evaluación de algunos parámetros de calidad de microcápsulas elaboradas con alginato de sodio y como revestimiento quitosano. Este procedimiento, deberá producirse bajo condiciones que aseguren un alto nivel de supervivencia de las bacterias después del tratamiento. Y que a su vez, permita alcanzar tamaños de partículas convenientes; a través del método de emulsión con ultrahomogenización.

## II. JUSTIFICACIÓN

La incorporación de microorganismos probióticos en la elaboración de alimentos funcionales, presenta el reto de superar la susceptibilidad de los microorganismos a las diferentes condiciones ambientales presentes durante los procesos tecnológicos. Por esta razón, constantemente se buscan alternativas para proteger a los microorganismos probióticos y aumentar su viabilidad y estabilidad sin restar las propiedades sensoriales del producto final. Siendo las técnicas de microencapsulación una alternativa interesante y de constante exploración. Sin embargo las técnicas y materiales empleados deben seleccionarse de forma apropiada dependiendo del microorganismo probiótico, las características del producto y el punto final de liberación de la bacteria. Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto fue determinar la eficiencia de microencapsulación de probióticos mediante la apropiada selección de materiales y métodos de microencapsulación, mismo que se lleva a cabo de forma paralela y complementaria a un estudio alterno como parte de un macro proyecto.



### III. OBJETIVOS

#### III.1 GENERALES

Determinar la eficiencia de microencapsulación de probióticos mediante la evaluación de algunos parámetros de calidad.

#### III.2 ESPECIFICOS

- Evaluar *in vitro* la supervivencia y capacidad de crecimiento de las bacterias probióticas.
- Elaborar microcápsulas con el método de emulsión con ultrahomogenización como revestimiento para microencapsular las bacterias probióticas.
- Caracterizar las propiedades micro-geométricas de las cápsulas obtenidas y determinar la eficiencia de microencapsulación de probióticos mediante la evaluación de algunos parámetros de calidad (forma, tamaño, integridad, uniformidad, autoagregación, hidrofobicidad y dispersabilidad).

#### **IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA**

##### **“CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.”**

CIAD se creó por decreto presidencial publicado en el Diario Oficial de la Federación el martes 22 de septiembre de 1981 y se constituyó como una empresa de participación estatal mayoritaria mediante acta constitutiva de fecha 16 de marzo de 1982. El 31 de marzo del año 2000 la Asamblea de Asociados autorizó la constitución del CIAD como Centro Público de Investigación con nuevos estatutos, al amparo de la Ley, para la Promoción de la Investigación Científica y Tecnológica. La vitalidad del CIAD se fundamenta en el reconocimiento de su razón de ser y se establece en el sentido de una organización que busca ampliar la frontera del conocimiento, así como contribuir a elevar el bienestar social a través de propuestas para abatir los problemas de marginación, desnutrición y deformación en la estructura competitiva en el sistema alimentario mexicano, a proporcionar los conocimientos y la tecnología adecuada para a) mejorar las condiciones de los alimentos y la alimentación en todas sus etapas, b) seleccionar aquellos proyectos que tengan una mayor relación beneficio: costo, particularmente para los grupos marginados y c) contribuir al aseguramiento de la calidad y la seguridad alimentaria.

##### **MISIÓN**

Ser un centro de reflexión crítica que genera conocimiento, innova, transfiere tecnología y forma recursos humanos especializados en alimentos, nutrición, salud pública, desarrollo regional y recursos naturales, vinculado con la sociedad.

##### **VISIÓN**

Ser una institución de liderazgo internacional con equilibrio entre sus actividades de investigación, vinculación y docencia, que desarrolle líneas emergentes afines y proyectos transdisciplinarios que impacten el bienestar social; que promueva en sus empleados la superación, sentido de permanencia, apertura y compromiso.

##### **OBJETIVOS**

- Contribuir a la generación y difusión del conocimiento científico y tecnológico, a través de proyectos de investigación en alimentos, nutrición y desarrollo.
- Formar recurso humano especializado en las competencias regionales a través de Programas académicos de Iniciación Científica y Posgrado con registro en el PNPC del Conacyt.
- Apoyar a los sectores público, social y privado mediante la gestión y desarrollo de proyectos, procesos, productos, servicios y asesorías orientadas a la producción, manejo y comercialización de alimentos.

- Impulsa la innovación y competitividad a través de alianzas Científico-Empresariales estratégicas.

### **COORDINACION DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL**

Desde su inicio, el desarrollo de las áreas y líneas de investigación de la DTAOA ha estado en función del interés institucional de constituirse en un centro de excelencia en investigación y docencia, del interés científico de los investigadores que la conforman y del afán de constituir al CIAD en una institución con capacidad de respuesta a los requerimientos del sector productivo regional, para desarrollar y consolidar sus procesos productivos y elevar su nivel de competitividad.

- Bioquímica posmortem y calidad
- Recuperación de compuestos bioactivos y utilización de subproductos
- Procesos Tecnológicos e Ingenieriles
- Composición y autenticidad
- Química del sabor.
- Fisiología de invertebrados marinos
- Genes e inmunidad de camarón
- Biología molecular de organismos acuáticos

### **Objetivos**

Desarrollar investigación básica, aplicada o dirigida y desarrollo tecnológico de alta calidad en sus áreas y líneas de competencia. Formación de recursos humanos de alto nivel a través de la participación en el programa de posgrado institucional. Brindar apoyo al sector productivo y de servicios en el desarrollo, consolidación y aumento del nivel de competitividad de sus procesos productivos, a través de proyectos conjuntos, asistencia técnica y prestación de servicios.

### **Nombre de la Institución:**

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), **Director General:** Pablo Wong González. **Dirección:** Carretera a la Victoria Km. 0.6, Hermosillo, Sonora. C.P. 83304 Apdo. Postal: 1735 **Teléfono y Fax:** (52) - 6622- 800146; (52) - 6622- 80 00 10 (52) - 6622- 89 24 0 Fax: (52) - 6622- 80 01 46.

## **V. PROBLEMÁTICA A RESOLVER**

En la industria de los alimentos, las bacterias ácido lácticas empleadas como cultivos probióticos para la elaboración de productos lácteos se encuentran expuestos a la presencia de antibióticos en la leche debido a su uso en el tratamiento de las enfermedades del ganado lechero, a factores químicos y/o físicos debidos a la composición del alimento en sí y a las condiciones de manipulación y almacenamiento en las que se encuentran. Todos estos elementos afectan la viabilidad de los microorganismos, y por lo tanto comprometen la funcionalidad que se espera de ellos. Por lo tanto, es importante establecer estrategias que permitan sobre pasar esta problemática y permita garantizar viabilidad, estabilidad y liberación de estas bacterias en el punto adecuado donde llevaran a cabo su efecto benéfico.

## **VI. ALCANCES Y LIMITACIONES**

### **ALCANSES**

Se reactivaron 11 bacterias probióticas del Laboratorio de Química y biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Hermosillo, Sonora.

Para conservar las 11 bacterias probióticas se colocaron en glicerol al 80%, en congelación a (-20<sup>0</sup>C) para tenerlas en reserva para investigaciones posteriores.

Se evaluó el crecimiento y la resistencia a diferentes pH de las bacterias probióticas.

Se realizaron pruebas preliminares de la microencapsulación con alginato de sodio y como revestimiento Quitosano por el método de emulsión con ultra homogenización.

Se observaron las estructuras y tamaños de las microcápsulas en el microscopio.

### **LIMITACIONES**

Debido a los tiempos extensos requeridos para la estandarización de los inóculos y la obtención de los cultivos apropiados de trabajo, así como de la caracterización de los mismo bajo diferentes condiciones solo se logró realizar pruebas preliminares de las microcápsulas por lo que quedó pendiente la caracterización de las microcápsulas y evaluación de los parámetros de calidad de las microcápsulas con las bacterias incorporadas.

## VII. FUNDAMENTO TEÓRICO

### VII.1 PROBIÓTICOS

El término probióticos, es de origen griego y significa “en pro de la vida”. Este concepto nació a partir de las observaciones del ruso Elie Metchnikoff, (ganador del premio Nobel en 1907 por sus trabajos en el Instituto Pasteur), quien sugirió que es posible modificar la flora de nuestro organismo con el fin de reemplazar microorganismos patógenos con microorganismos benéficos. En 1965 Lilly y Stillwell, dieron el nombre de probióticos a los factores promotores del crecimiento producidos por microorganismos. Parker en 1974 utilizó este término para organismos y sustancias con efectos benéficos en animales a través de la microflora intestinal. Sin embargo, no fue hasta 1989, cuando la palabra probióticos fue popularizada por Fuller quien describió a los probióticos como: “aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que benefician al huésped mejorando el balance microbiano de su flora intestinal” (Leahy, 2005).

Los probióticos son microbios vivos que pueden agregarse a la fórmula de muchos diferentes tipos de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* son las usadas más frecuentemente como probióticos, pero la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *E. coli* y *Bacillus* también son utilizadas como probióticos.

Las bacterias ácido lácticas, entre las que se incluye la especie *Lactobacillus* que ha sido utilizada para la conservación de alimentos por fermentación durante miles de años, pueden tener una doble función, actuando como agentes para la fermentación de alimentos y además potencialmente confiriendo beneficios a la salud.

La fermentación de alimentos ofrece perfiles de sabor característicos y reduce el pH, lo que impide la contaminación con posibles patógenos. La fermentación se aplica en todo el mundo para la preservación de una serie de productos agrícolas sin procesar (cereales, raíces, tubérculos, frutas y hortalizas, leche, carne, pescado, etc.).

Un probiótico se define como "un suplemento alimenticio microbiano vivo que beneficia al animal huésped mediante el mejoramiento de su equilibrio microbiano intestinal". Los probióticos se pueden usar para modular las bacterias del intestino. Las preparaciones comerciales de probióticos pueden ser de cepa única o múltiple y también como una mezcla de varias especies (multiespecies) de bacterias. (Yegani, 2010).

### VII.1.2 IMPORTANCIA DE LOS PROBIÓTICOS

El papel más importante de las bacterias probióticas es actuar en resistencia en contra de la colonización de agentes exógenos, patógenos potenciales. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas productoras de ácido láctico, constituyentes de una gran parte de la micro flora intestinal en animales. Por un microorganismos patógeno en acción actúa un probiótico, si este no es tóxico o causa enfermedad el probiótico debe ser capaz de resistir los ácidos y la bilis, así como el proceso de digestión del estomago del animal, el individuo que es capaz de establecerse y colonizar los intestinos; es cuando el probiótico establece la habilidad de inhibir el crecimiento de los patógenos. (Milian, 2005)

Los probióticos son capaces de prevenir la proliferación de enfermedades causadas por patógenos como lo son la *Escherichia coli* y Salmonella. Esto puede ocurrir de dos formas: Primero incrementando la resistencia a infecciones y enfermedades infecciosas por un antagonismo directo o por estimulación de la inmunidad (incremento de la actividad fagocítica y elevada secreción de Inmunoglobulina A (IgA). (Milian,2005)

Los probióticos están propuestos para el uso en animales y establecer la salud de la microflora de los intestinos y prevenir el establecimiento de bacterias patógenas, para restablecer la microflora benéfica agotada por antibióticos y prevenir la reinfección por patógenos y reducir los efectos del estrés (Salvador y Cruz, 2009).

Milian (2005), plantea que son muchas las bacterias y levaduras que se pueden usar de forma beneficiosa para mantener una flora digestiva sana y en equilibrio. Los microorganismos más usados son *Lactobacillus sp.*, *Sreptococcus faeccium*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophyllus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los *Lactobacillus* crecen rápidamente en el intestino son quizás los más conocidos, se trata de bacterias que pueden transformar la lactosa en ácido láctico. Este aumento de ácido láctico disminuye el pH intestinal a unos niveles tan bajos así como disminuye la supervivencia de microorganismos como *E. coli*, Salmonellas entre otros. El acido láctico que producen las bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* ayudan a controlar las bacterias patógenas como Salmonellas, *E. coli*, enteritis, al establecer un pH bajo (Botero, 2008).

Los probióticos producen acido láctico y acido acético los cuales crean una alteración del pH que funcionan como un antiséptico del sistema digestivo y al mismo tiempo minimiza la proliferación de microorganismos patógenos, al competir por nutrientes y alojamiento en las paredes intestinales (Lastras, 2009).

### VII.1.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA UN PROBIÓTICO

Según Nava (2008) un probiótico debe reunir las siguientes características:

- La seguridad biológica, no deben causar infecciones de órganos o de sistemas.
- La capacidad de ser toleradas por el sistema inmunitario del organismo huésped, por lo tanto, deben ser preferiblemente de proveniencia intestinal.
- La capacidad de resistir la acción de los ácidos gástricos y de las sales biliares para llegar vivas en grandes cantidades al intestino.
- La capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y de colonizar el segmento gastrointestinal.
- La sinergia con la microflora endógena normal del intestino.
- El efecto barrera, este término define la capacidad de producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio de la mucosa intestinal.
- La capacidad de potenciar las defensas inmunitarias del huésped.

### VII.1.4 PROBLEMÁTICA DE LA VIABILIDAD DE LOS PROBIOTICOS

El problema que se presenta a la hora de incorporar probióticos a cualquier formulación, es la susceptibilidad de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, el oxígeno o la temperatura.

Por todo esto, es necesario que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Para ello, recurrimos a las técnicas de microencapsulación. (Villena, 2009)

## VII.2 MICROENCAPSULACIÓN

Una alternativa para mantener la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento o procesos tecnológicos, es la inmovilización de las bacterias en una matriz protectora o también llamada microencapsulación. La microencapsulación es un proceso en que las células se retienen dentro de una matriz o membrana, donde una microcápsula consiste en una membrana semipermeable, esférica, ligera, y fuerte que rodea un centro sólido/líquido, con un diámetro que varía entre micras a milímetros. Para su elaboración con estas tecnologías se emplean algunos biopolímeros de calidad alimenticia como el alginato, el quitosano, la carboximetilcelulosa, carragenina, gretina y pectina principalmente (Krasaekoopt y col, 2003).

La microencapsulación es el proceso en el que los microorganismos son introducidos en una matriz o sistema de pared, con el objetivo de impedir su pérdida y protegerlos

de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento. Las técnicas de encapsulación aplicadas a probióticos para uso en productos lácteos o en la producción de biomasa, se pueden clasificar en dos grupos dependiendo del método utilizado para formar las perlas. La microencapsulación protege a los materiales encápsulados de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos y como barrera contra malos olores y sabores. Ayuda, además, a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia. En el caso de fármacos cuya liberación se lleve a cabo en el estómago o en el intestino, permite una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas. Además la microencapsulación protege a los probióticos de los bacteriófagos y de los ambientes adversos, como la congelación y las soluciones gástricas, y facilita la manufacturación de productos fermentados, ya que, proporciona unas condiciones más constantes. La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del coste. (Villeja, *et al* ;2009)

### VII.2.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MICROCÁPSULAS

El tamaño medio de las microcápsulas es un factor importante para su estabilidad y su capacidad para proteger al probiótico. Las microcápsulas más pequeñas, con diámetros entre 40 y 80  $\mu\text{m}$ , se han demostrado ineficaces a la hora de proteger a las bacterias probióticas en medio ácido; mientras que las de mayor tamaño (1-3 mm) le confieren una mejor protección. Por otra parte, las microcápsulas de mayor tamaño son demasiado grandes para añadirles al alimento sin que se vea afectada la textura de éste, y presentan una peor capacidad para dispersar el contenido, mientras que las más pequeñas contienen menor cantidad de probiótico (Annan, *et al*; 2011).



## VII.2.2 TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN

### VII.2.3 TÉCNICA DE EXTRUSIÓN O GOTEO DE SOLUCIÓN DE MICROORGANISMOS

Es la técnica más antigua y común para elaborar cápsulas a base de hidrocoloides. Esta consiste en preparar una solución hidrocoloidal, adicionar los microorganismos a esta y hacerla pasar por una aguja de jeringa (a nivel laboratorio) o tubos de extrusión (para planta piloto), para formar gotas, estas se dejaron caer en caída libre a una solución endurecedora (como el cloruro de calcio). comúnmente se utilizan mezclas de alginato de sodio con un exceso de iones  $\text{Ca}^{++}$ , lo que conlleva a la gelificación total del alginato, produciéndose cápsulas completamente geladas con diámetros entre 1-4 mm y de textura rígida, lo que genera cierto grado de rechazo por parte de los consumidores. El tamaño y la forma de la perla dependen del diámetro de la boquilla y la distancia de adición. Este método es el más popular debido a su facilidad, simplicidad, bajo costo y condiciones discretas de formulación. El material de soporte usado para la extrusión es el alginato de sodio que es un heteropolisacárido de ácido D-mannurónico y L-gulurónico extraído de varias especies de algas (Draget, 2000). Las propiedades funcionales del alginato de sodio están fuertemente relacionadas con la composición y secuencia de ácido L-gulurónico y D-mannurónico. Cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{++}$  se unen preferencialmente por el polímero de ácido L-gulurónico. La longitud del polímero de ácido D-mannurónico es su mayor rasgo estructural y contribuye a la formación de un gel (Krasaekoopt *et al.*, 2004).

Para formar las cápsulas, las células se mezclan en una dispersión con alginato de sodio, y la mezcla se gotea en una disolución endurecedora de cationes divalentes (normalmente en forma de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )). Las gotas forman las esferas de gel instantáneamente, atrapando las células en una red tridimensional de alginato de calcio unido iónicamente. Las concentraciones de alginato de sodio para formar el gel varían; Jankowski *et al.*, (1997) usaron una concentración de 0.6% p/v para formar un gel con 0.3 M  $\text{CaCl}_2$ . Otros autores usan concentraciones de alginato de 1–2% y 0.05–1.5 M  $\text{CaCl}_2$ . El tamaño de las cápsulas es aproximadamente 2–5 mm de diámetro. El tamaño y esfericidad de la cápsula dependen principalmente de la viscosidad de la dispersión del alginato de sodio y la distancia entre la jeringa y la disolución colectora de  $\text{CaCl}_2$ . Conforme aumenta la concentración y la viscosidad del Alginato de sodio, el tamaño de las cápsulas disminuye. El diámetro de orificio de la jeringa es otro factor importante que regula el tamaño de la gota (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990). La composición del alginato también influye en el tamaño de la cuenta; cápsulas pequeñas son el resultado de alginatos con baja proporción de ácido gulurónico (Martinsen *et al.*, 1989).

#### VII.2.4 TÉCNICA DE EMULSIÓN

En esta técnica, un pequeño volumen de suspensión hidrocoloidal con microorganismos (fase discontinua) se adiciona a un gran volumen de aceite vegetal (fase continua). La mezcla se homogeniza para formar una emulsión de agua en aceite utilizando un emulsificante. Una vez la emulsión se forma, esta se puede insolubilizar para formar cápsulas de gel en la fase aceitosa. El tamaño de la perla es controlado por la velocidad de agitación. El aceite vegetal, es usado en esta técnica como fase continua. En algunos casos se adicionan emulsificantes para mejorar la emulsión, porque el emulsificante disminuye la tensión superficial y se refleja en el tamaño de las esferas. (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

La técnica de encapsulación en emulsión se ha definido como el proceso de dispersión de un líquido en otro líquido inmiscible donde la fase dispersa consta de la matriz que incluye el componente a encapsular. La adición de un tensioactivo mejora la formación y estabilidad de la emulsión, así como la distribución de tamaño de las gotas (Poncelet, 2010).

En este sentido, la preparación de microcápsulas por emulsificación puede llevarse a cabo empleando el mecanismo de gelificación externa o interna. Para el primer caso, la gelificación externa en emulsión consta en la dispersión de una mezcla solución de alginato-componente en una fase continua no acuosa, seguido de la adición de una fuente de calcio que al difundirse a la fase dispersa inicie la gelificación permitiendo la encapsulación, y a su vez, la desestabilización de la emulsión para la separación de las cápsulas formadas. Mientras que, la técnica en emulsión por gelificación interna se fundamenta en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble o parcialmente soluble en cuyo caso se adiciona un agente secuestrante, contenido en una solución de alginato-componente el cual es dispersado en una fase continua no acuosa generando una emulsión agua en aceite (W/O) (Gouin *et al.*, 2006). La liberación del ion calcio ocurre con la adición de un ácido orgánico soluble en la fase continua que al difundirse disminuye el pH del medio solubilizando la sal y produciendo la gelificación. (Champagne y Fustier, 2007).

### VII.2.5 MATERIALES DE ENCAPSULACIÓN

Existe una amplia variedad de materiales para cobertura que pueden ser usados para encapsular ingredientes alimentarios, donde se incluyen aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones y gomas que proporcionan una encapsulación uniforme. En general existen tres categorías: grasas, proteínas y polímeros.

- **Grasas**

La cera de carnauba, el alcohol estearílico y el ácido esteárico son grasas que funden a una determinada temperatura y son erosionables por la acción de las lipasas que existen en la cavidad gástrica.

- **Proteínas**

La gelatina fue el primer material utilizado en la microencapsulación, y es, en la actualidad, un material con un importante potencial. La albúmina y el colágeno también se han empleado en la obtención de micropartículas.

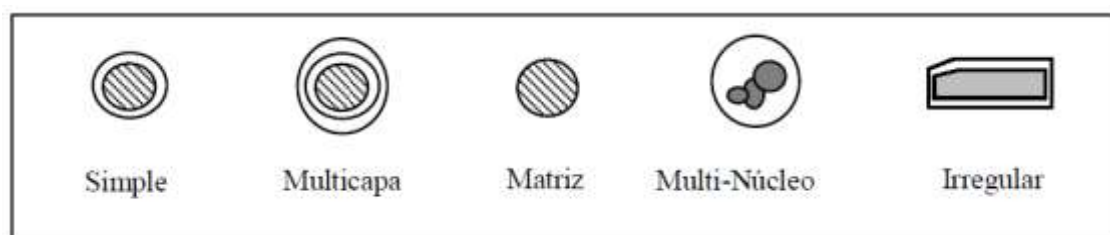
- **Polímeros**

Debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en la microencapsulación de sustancias. Dentro de ella están los polímeros naturales, los semisintéticos y los sintéticos. Los polímeros naturales principalmente son de naturaleza polisacáridica, de origen animal y vegetal; se destacan el alginato, la dextrana, la goma arábiga y el quitosano (Vivian *et al.*, 2007).

### VII.2.6 ALGINATO

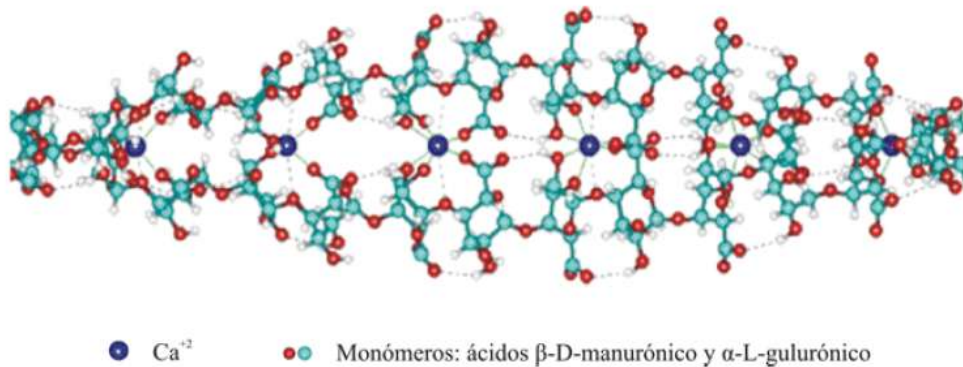
El alginato ha sido usado debido a sus múltiples ventajas tanto para el consumo humano como versatilidad en aplicaciones industriales. Tales aspectos han sido compilados en la literatura por Imeson (2010) resaltando el efecto prebiótico de los alginatos de bajo peso molecular, los beneficios de su ingesta como fibra diaria para la reducción de los niveles de azúcar y colesterol en sangre, así como, la capacidad para prolongar la vida útil en productos. Las nuevas tendencias tecnológicas se han enfocado en la producción de alimentos reestructurados y funcionales a partir de compuestos activos como antioxidantes, vitaminas, aminoácidos, minerales e incluso de pequeñas moléculas como células, enzimas y microorganismos probióticos beneficiosos para la salud, y por tanto, de su conservación en los alimentos durante el procesamiento y almacenaje (Huertas, 2010). Estas ventajas del alginato y las recientes tendencias tecnológicas se han fusionado en la técnica de microencapsulación, resultando en un producto final que permite proteger a los compuestos encapsulados de factores adversos como el calor y la humedad, mejorando así su estabilidad y biodisponibilidad. En este sentido, la microencapsulación puede ser usada como medio para enmascarar o preservar sabores y aromas al hacer funciones de aislante.

El concepto de encapsulación se ha fundamentado en la incorporación de una matriz polimérica, la cual forma un ambiente capaz de controlar su interacción con el exterior. La técnica de microencapsulación ha sido descrita como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con variadas aplicaciones (Borgogna *et al.*, 2010). Una definición general de encapsulación dada por Desai y Park (2005) se refirió al empaquetado de materiales sólidos, líquidos o gaseosos mediante cápsulas que liberan su contenido de forma controlada bajo condiciones determinadas. Estas especificaciones han llevado a describir la microencapsulación como, la técnica de obtención de una barrera que retarda las reacciones químicas con el medio que lo rodea promoviendo un aumento en la vida útil del producto, la liberación gradual del compuesto encapsulado e incluso facilitando su manipulación al convertir un material líquido o gaseoso a una forma sólida llamada microcápsula (Fang y Bhandari, 2010). Una microcápsula consiste en una membrana esférica, semipermeable, delgada y fuerte que rodea un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que varía de pocos micrones a 1000  $\mu\text{m}$ . El núcleo que compone la microcápsula es también denominado fase interna o principio activo, así como a la membrana se puede nombrar capa externa o matriz. En este sentido, las micropartículas, microcápsulas o microesferas son definidas como el producto del proceso de microencapsulación dependiendo de cual sea su morfología y estructura interna (Anal *et al.*, 2007). Las microcápsulas se han diferenciado de las microesferas principalmente por la distribución del principio activo. En el primer caso, el núcleo puede ser de naturaleza líquida o sólida incluido en una especie de reservorio recubierto por una película del material. Mientras que, en las microesferas, el principio activo se encuentra altamente disperso en forma de partículas o moléculas en una matriz. La obtención de un tipo de estructura u otra depende de las propiedades físico-químicas del principio activo y de la matriz, así como de la técnica empleada para su preparación (Lopretti *et al.*, 2007). Las microcápsulas pueden tener forma esférica o irregular. Asimismo, pueden estar constituidas por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos múltiples cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios (Gibbs *et al.*, 1999). **(Figura 1)**



**Figura 1. Tipos de microcápsulas**

Los hidrocoloides han sido empleados como matriz debido a su capacidad para absorber agua, fácil manipulación e inocuidad. El alginato es un hidrocoloide que posee tanto estas características como propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes, razones por las cuales ha sido de gran interés para la industria alimentaria. El alginato es descrito como un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico proveniente de algas marinas conformado por dos monómeros en su estructura, el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) y el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) que se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-), M-bloques (-MMM-) o heteropolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-). Tanto la distribución de sus monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido en G. Si en su estructura polimérica se tiene mayor cantidad de G-bloques, generalmente el gel es fuerte y frágil, mientras que con la presencia de mayor proporción de M-bloques el gel formado se presenta suave y elástico. El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes (excepto el magnesio) donde el ión calcio es el más empleado por la industria alimentaria. La gelificación tiene lugar al producirse una zona de unión entre un G-bloque de una molécula de alginato que se enlaza físicamente a otro G-bloque contenido en otra molécula de alginato a través del ión calcio. La visualización de la estructura física es denominada modelo “caja de huevos” por Draget (2000), mostrada en la **(Figura 2)** ( Reddy, 2010).



**Figura 2. Modelo de “caja de huevos”**

Entre las sales de alginato más empleadas se han encontrado la sal de sodio debido a su alta solubilidad en agua fría y característica transición sol-gel de forma instantánea e irreversible ante el ión calcio (Funami *,et al*; 2009). También, se han desarrollado alginatos modificados químicamente tales como el alginato de propilenglicol empleado en la fabricación de cervezas y aderezos para ensaladas por su alta solubilidad a bajos pH. Así como otras dos nuevas familias, los derivados de la sal de amonio cuaternaria del ácido algínico y los obtenidos de injertos con acrilato caracterizados por la obtención de geles fuertes y altamente deformables (Draget, *et al*; 1997).

En contraste con la mayoría de los polisacáridos, el alginato forma geles prácticamente independientes de la temperatura, aspecto que lo ha hecho atractivo en la elaboración de cremas, quesos, salsas, y aderezos. Sin embargo, la exposición prolongada a tratamientos de calor y variaciones extremas de pH degrada al polímero, presentado como consecuencia pérdidas en las propiedades del gel (Mancini, et al;1999). Adicionalmente, la condición de polielectrolito le ha conferido la capacidad de interactuar con otras moléculas permitiendo formar sistemas mixtos que muestran mejoras en las propiedades estructurales del gel de alginato. Por tanto, al seleccionar una matriz polimérica para la microencapsulación deben considerarse sus propiedades físico-químicas, solubilidad, transición sol-gel (cinética) y permeabilidad (Champagne y Fustier, 2007). La microencapsulación aplicada en alimentos con el objetivo de preparar productos funcionales, debe tener en cuenta que la incorporación de microcápsulas, micropartículas 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 (Sanguansri y Augustin, 2010). Su versatilidad incluso ha llegado a ser aplicada en la alta cocina con el término “Sferificación”, técnica culinaria con el propósito de modificar las propiedades texturales de los alimentos para así desarrollar nuevas sensaciones en el comensal (Corell ,*et al*; 2007).

### VII.2.7 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 ión 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 ión 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 ión vinculante al alginato. También se ha observado que la cinética de gelificación y las propiedades del gel pueden depender del tipo de contra-ión, es decir, el ión 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 que los geles de alginato de calcio obtenidos mostraron semejante estabilidad a simple vista, al ser analizadas sus propiedades reológicas 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 gúlico 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.

#### **VII.2.8 GELIFICACIÓN EXTERNA**

El proceso de gelificación externa ocurre con la difusión del ión calcio desde una fuente que rodea al hidocoloide hacia la solución de alginato de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interface y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el ión 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).

#### **VII.2.8 GELIFICACIÓN INTERNA**

El proceso de gelificación interna consiste en la liberación controlada del ión 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 ión 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. Los mecanismos de gelificación iónica son descritos en la Fig. 3 (Helgerud *et al.*, 2010).

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).

### VII.3 QUITOSANO COMO REVESTIMIENTO

En cuanto al recubrimiento, el polímero utilizado, puede ser de origen natural como sintético. Uno de los polímeros naturales utilizados es el Quitosano ( $\beta$ -1,4-glucosamina). Éste biopolímero policatiónico, es la forma soluble (desacetilada) de la quitina, un polímero lineal constituido por residuos de N-acetilglucosamina, presente en el exoesqueleto de los crustáceos, por ejemplo el camarón. Los principales parámetros que influyen en las características del Quitosano son: su peso molecular y el grado de desacetilación, representando la porción de unidades desacetiladas. Estos parámetros, son determinados por las condiciones de reacción durante el proceso de Preparación del quitosano (Varshosaz, 2005).

Por lo tanto es importante microencapsular a las bacterias probióticas por que al someterlos a procesos tecnológicos o a condiciones ambientales, hay pérdidas de estas bacterias probióticas, es por eso que una alternativa para conservar a estas bacterias viables es a través de la microencapsulación con alginato de sodio y como revestimiento Quitosano, utilizando el método de emulsión.

## VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS

### VIII.1 MATERIALES Y MÉTODOS:

El trabajo experimental se desarrollo en 7 etapas:

**Etapa I.** Reactivación de las bacterias ácido lácticas.

**Etapa II.** Determinar la fase exponencial de las bacterias ácido lácticas (curva de crecimiento por densidad óptica).

**Etapa III.** Elaboración de cultivo stock de las bacterias probióticas (protocolo de congelación).

**Etapa IV.** Pre-selección de bacterias de trabajo.

**Etapa V.** Evaluación del crecimiento de las bacterias seleccionadas a diferentes valores de pH por cuenta viable.

**ETAPA VI.** Evaluación de la resistencia a diferentes valores de pH .

**ETAPA VII.** Elaboración de las microcápsulas con alginato de sodio y quitosano por el método de emulsión ultrahomogenizado.

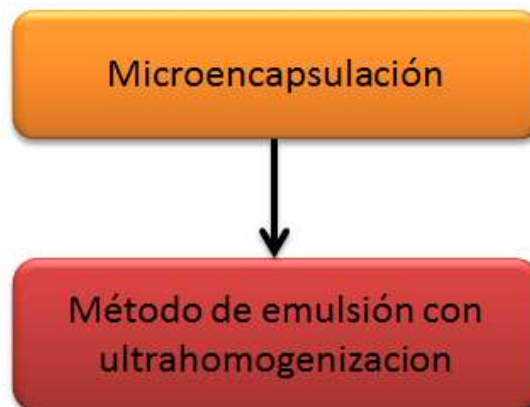


**TRABAJO EXPERIMENTAL**



**Diagrama 1. Trabajo general experimental de las bacterias probióticas**

**Microencapsulación**



**Diagrama 2. Microencapsulación por el método de emulsión con ultrahomogenización.**

**Materiales:**

Para la reactivación, propagación y cultivo de las bacterias ácido lácticas se utilizó medio de cultivo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, Difco™). Todos los reactivos empleados para la elaboración de las microcápsulas fueron de la marca Sigma (Chemical CO., St. Louis, MO, USA).

**Equipos:**

Los equipos utilizados en el experimento fueron: esterilizador Yamato Cientific, LTD modelo SM510; placa de calentamiento y agitación marca IKA, modelo C-MAG HS 4S1; placa de calentamiento y agitación marca Corning, modelo 6795-620 D; incubadora marca VWR Sheldon Manufacturing Inc , modelo 1545; centrifuga del laboratorio Thermo Fisher Scientific;microscopio marca Carl Zeiss AX10;estufa marca VWR, Sheldon Manufacturing. Inc; balanza analítica ,marca Sartorius AG GOTTINGEN ,modelo BP2215,campana de laboratorio ,marca LANCOBO CORPORATON ;homogenizador marca PRO SCIENTIFIC ,modelo PRO 200 BIO-GEN series;balanza granataria ,marca Oahus ,modelo Scout Pro SP602;lector de placas Elisa OPSYS MR DINEX TECHNOLOGIES;mini vortex marca VWR 120V,modelo 945300.

**IX. ETAPA 1**
**Bacterias probióticas**

Las bacterias probióticas empleadas en este proyecto fueron aisladas de productos lácteos comerciales o donadas por parte de colaboradores en otras Instituciones de Investigación (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1. Bacterias probióticas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Hermosillo, Sonora.**

NOMBRE	CODIGO	PROVEDOR / FUENTE
<i>L. casei</i> 7R1	Lc-7R1	
<i>L. casei</i> L9	Lc-L9	Universidad de Wisconsin,
<i>L. casei</i> L30	L.30	Laboratorio Dr. Steele
<i>L. fermentum</i> NRRL-B1932	L. ferm 2	
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 13075	L.rha	Universidad de las
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4796	L.ac	Americas ,Puebla,
<i>L. acidophilus</i> NRRL B-4495	L. acido 4495	Laboratorio Dr. Lopez-
<i>L. fermentum</i> ATCC 11976	L. ferm	Malo
<i>L. casei</i> DCP 3968	DCP	
<i>L. reuteri</i> NRRL 14171	L.r14171	Instituto Tecnológico de Veracruz, Laboratorio Dr. García
<i>L. casei shirota</i>	L.c shi	Yakult, Japan®

### IX.1 Reactivación de las bacterias

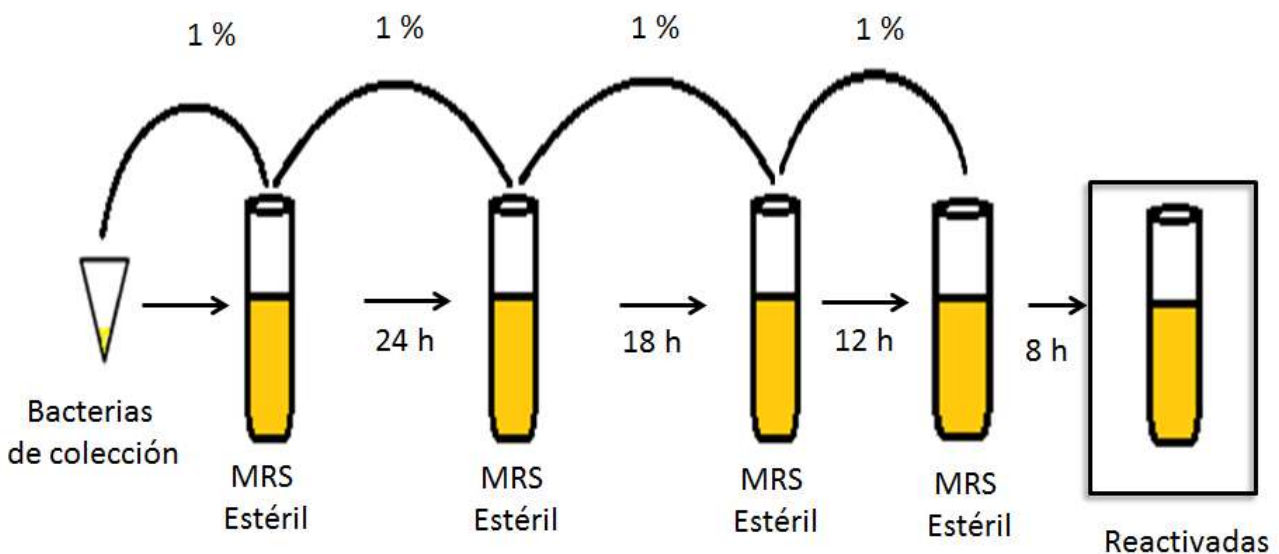
La reactivación de las bacterias probióticas se realizaron de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Hermosillo, Sonora.

#### 1. Reactivación de las cepas probióticas

100  $\mu$ L de los cultivos se inocularon en 10 mL de medio de cultivo MRS estéril con un pH de 6.2 durante 24 h a 37<sup>0</sup> C. Una vez reactivas las bacterias fueron consecutivamente subcultivadas durante 18 , 12 y 8 h, respectivamente a 37<sup>0</sup> C.

Diagrama 3. Reactivación de las cepas probióticas (Man y Sharpe, 1960)

## REACTIVACIÓN DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS



Incubadas a 37<sup>0</sup> C  
Caldo MRS con un PH 6.2

## IX.2 ETAPA II

### CURVA DE CRECIMIENTO POR DENSIDAD ÓPTICA

#### IX.2.1 Determinación de la fase exponencial de las bacterias probióticas (curva de crecimiento por densidad óptica).

##### 1.-PROPAGACIÓN

Primeramente se realizó la propagación de las 11 cepas, por cada cepa se tomaron 100  $\mu$ l y se inocularon en 10 ml de MRS estéril a pH de 6.2, se incubaron 12 horas a 37<sup>0</sup> C, pasadas las 12 horas, se tomaron 100  $\mu$ l y se inocularon en 10 mL de MRS estéril a pH 6.2, se incubaron por 10 horas a 37<sup>0</sup> C.

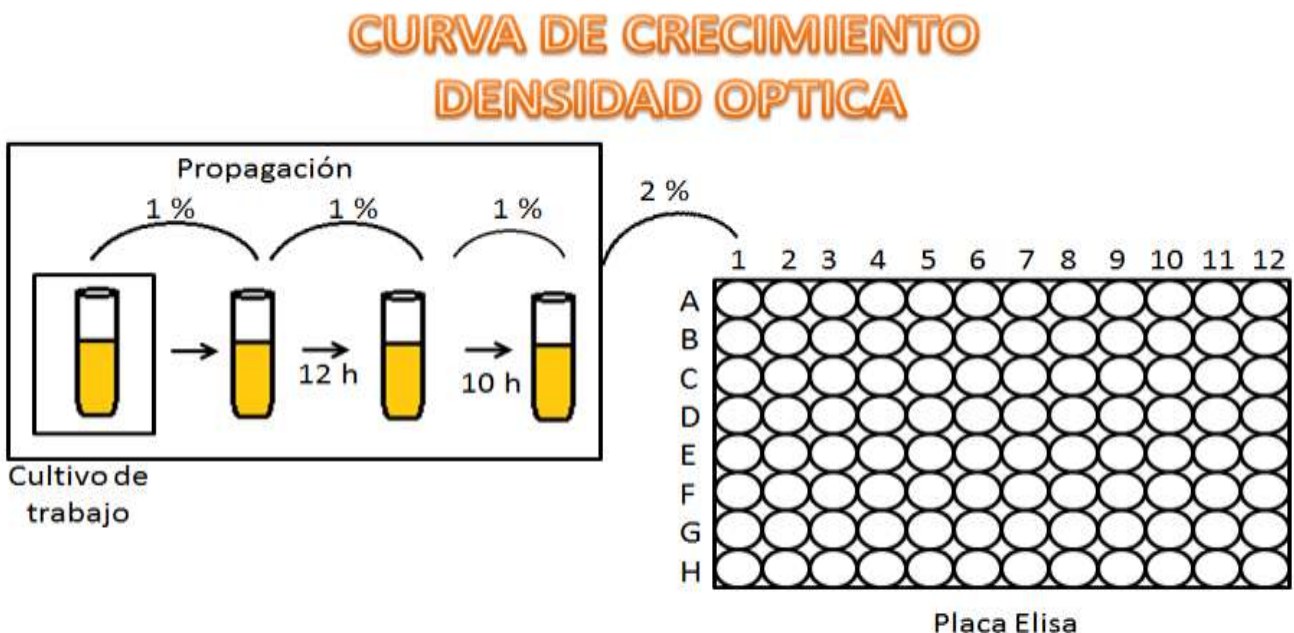
##### 2. PLACA ELISA

Una vez realizada la propagación, con una micro pipeta se tomaron 200  $\mu$ L por tubo de cada una de las bacterias y se colocó en los pocillos de una placa Elisa estéril.

##### 3. DENSIDAD OPTICA

Por densidad óptica se realizaron monitoreos cada hora durante 24 horas, por absorbancia con una longitud de onda de 600 nm.

Diagrama 4. Curva de crecimiento por densidad óptica



Monitoreos cada 1 h / 24 h  
Absorbancia 600 nm  
MRS estéril pH 6.2

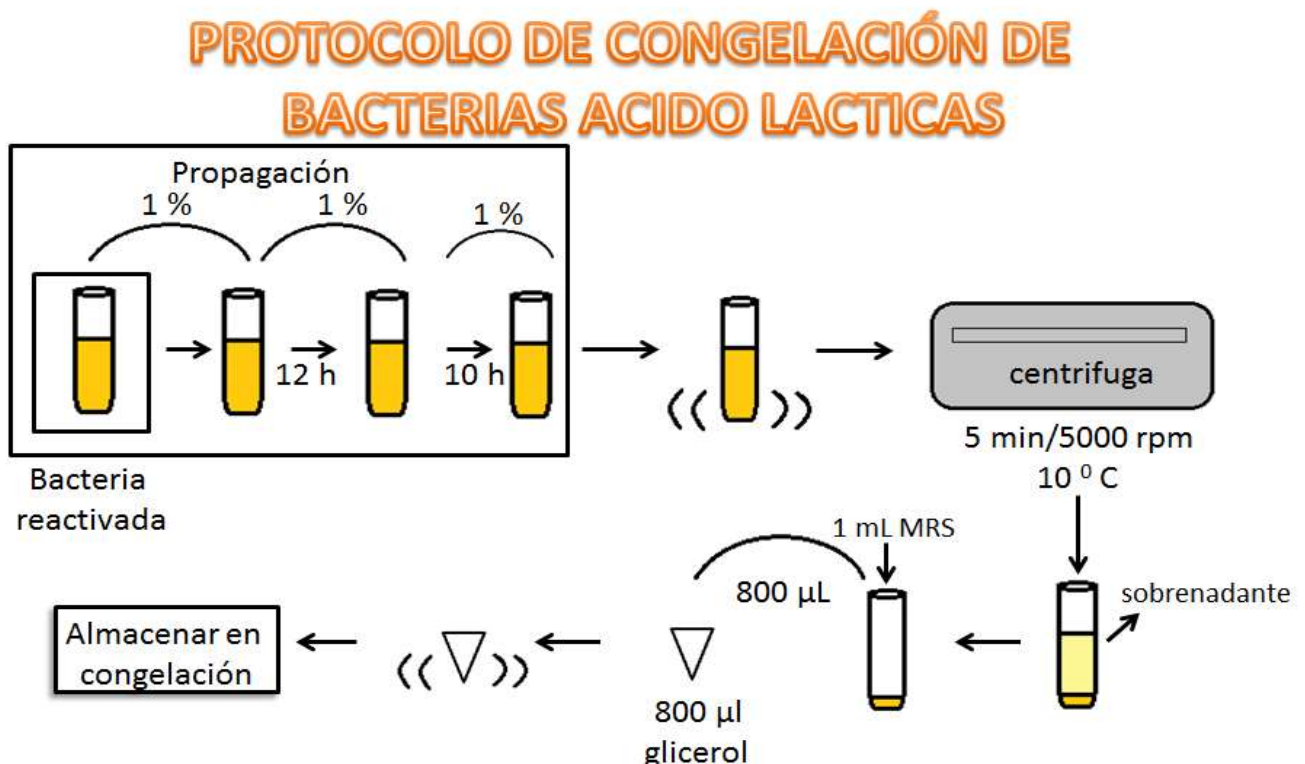
### IX.3 ETAPA III

#### IX.3.1 Congelación de las bacterias probióticas (protocolo de congelación).

Conservar las bacterias probióticas (-20 /-80°C)

- 1) Inocular 50 µl de la cepa en 5 mL de caldo MRS estéril
- 2) Incubar 8 h a 37°C
- 3) Después del periodo de incubación , mezclar en vortex
- 4) Transferir a un tubo falcón estéril y centrifugar
- 5) Centrifugar 5 minutos a 5000 rpm a 10°C
- 6) Descartar el sobrenadante y mantener el pellet
- 7) Resuspender el pellet con 1 ml de MRS caldo estéril
- 8) Anadir 800 µL de glicerol estéril en un vial estéril y 800 µL de la suspensión de la cepa
- 9) Mezclar en vortex
- 10) Identificar

Diagrama 5. Protocolo de congelación de bacterias probióticas



En condiciones estériles

#### IX.4 ETAPA IV

##### IX.4 .1 Evaluación del crecimiento a diferentes valores de pH en el medio de cultivo por densidad óptica.

###### 1.- PROPAGACIÓN (Etapa 2)

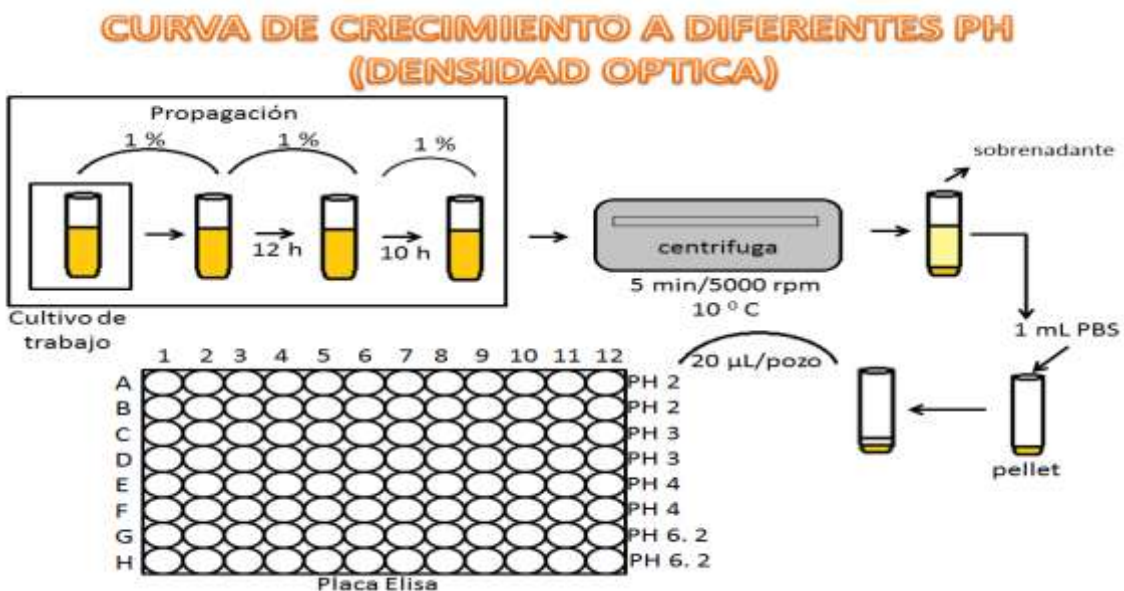
###### 2.-CENTRIFUGACIÓN

Se centrifugaron a las 11 cepas durante 5 minutos a 5000 rpm a 10<sup>0</sup>C, transcurrido este tiempo, se elimino el sobrenadante y al pellet se le agregaron 1 ml de PBS y se mezclaron.

###### 3.-PLACA ELISA

A la placa Elisa se le colocaron 150  $\mu$ L para cada pocillo de MRS caldo estéril a diferentes valores de PH (2, 3, 4 y 6.2), una vez colocado el medio de cultivo, se inocularon 20  $\mu$ L a cada pocillo con cada una de las 11 bacterias, se aplicó el mismo procedimiento a cada cepa bacteriana por duplicado.Se realizaron monitoreos cada 2 horas durante 16 horas , por absorbancia con una longitud de onda de 600 nm.

Diagrama 6. Evaluación del crecimiento a diferentes pH



Una vez realizada la evaluación de crecimiento por densidad óptica, se hizo una preselección de 5 bacterias probióticas; tomando en cuenta que crecieron en diferentes pH.

## IX.5 ETAPA V

### IX.5 .1 Evaluación del crecimiento por cuenta viable.

#### 1.- PROPAGACIÓN (Etapa 2)

#### 2.-CENTRIFUGACIÓN (Etapa 4)

#### 3.-INOCULACIÓN A DIFERENTES PH

Para cada cepa se inocularon 20  $\mu$ L en 10 ml de MRS estéril a diferentes valores de pH (2, 3,4 y 6.2)

#### 4.-DILUCIONES

Se realizaron diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  para valores de pH (2, 3 y 4) y diluciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  para valores de pH (6.2).Y se realizaron en tres tiempos diferentes (0 h, 4 h y 24 h).

#### 5.-VACIADOS EN PLACA

Se realizaron vaciados en placa para los valores de pH (2, 3 y 4) las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  ; agregando 1 ml en la placa estéril y posteriormente agregando el agar MRS estéril. Para valores de pH (6.2) las diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  ; agregando 1 ml en la placa estéril y posteriormente agregando el agar MRS estéril.

Después se homogenizaron mediante la norma **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.**

Todos los vaciados fueron realizados por duplicado.

#### 6.-INCUBACIÓN

Las placas se incubaron a 37<sup>0</sup>C durante 48 horas.

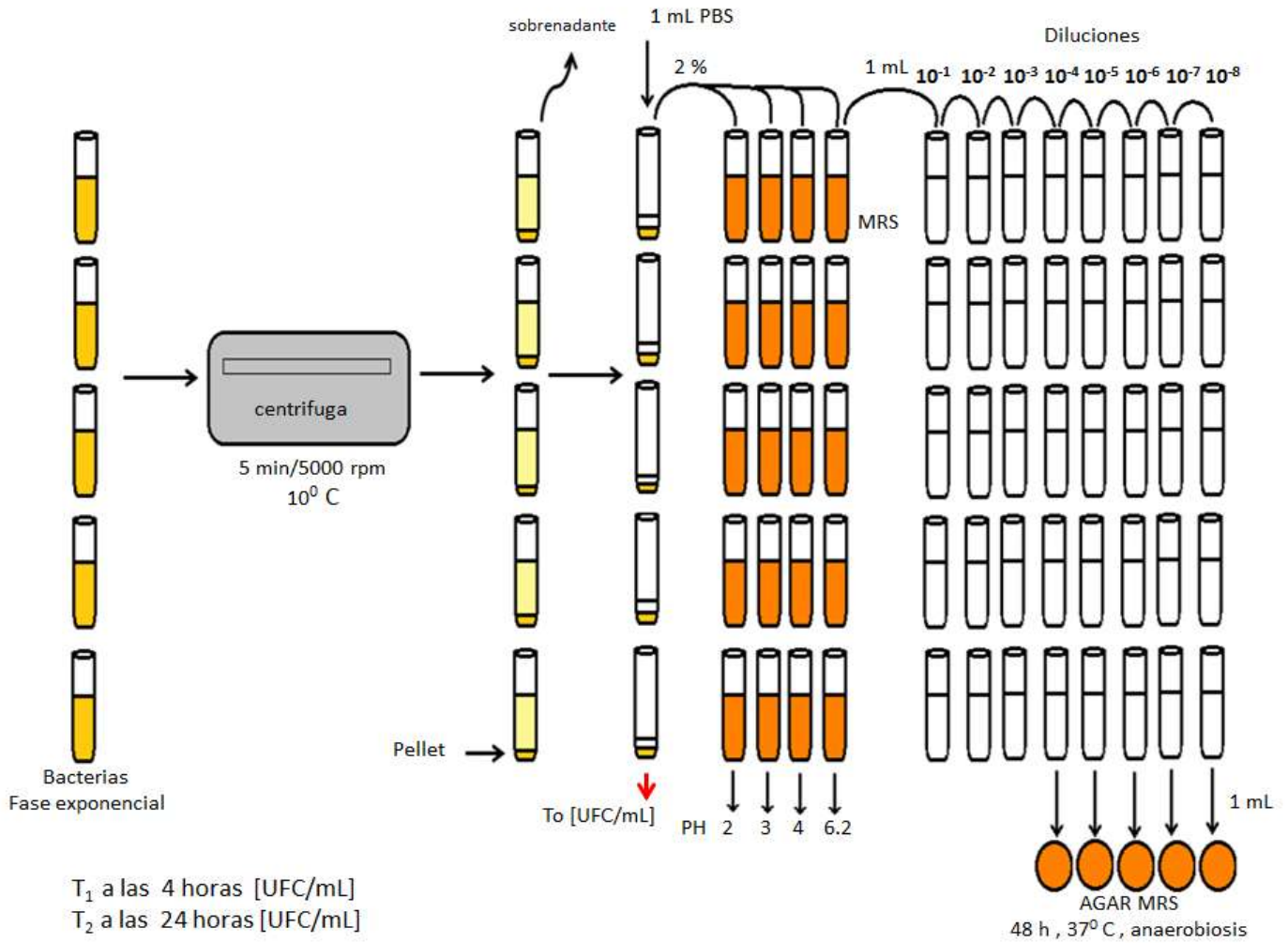
#### 7.-CONTEO

Después de 48 horas se realizaron los conteos de las placas.



Diagrama 7. Medición de crecimiento a diferentes pH, por vaciado en placa (Blanquet, *et al*; 2004).

## MEDICIÓN DE CRECIMIENTO



## IX.6 ETAPA VI

### IX.6 .1 Evaluación de la resistencia a diferentes PH

#### 1.- PROPAGACIÓN (Etapa 2)

#### 2.-CENTRIFUGACIÓN (Etapa 4)

#### 3.-INOCULACIÓN A DIFERENTES PH

Para cada cepa se inocularon 20  $\mu$ l en 10 ml de PBS estéril a diferentes valores de pH (2, 3,4 y 7)

#### 4.-DILUCIONES

Se realizaron diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  para valores de pH (2, 3 y 4) y diluciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  para valores de pH (7).Y se realizaron en tres tiempos diferentes (0 h, 4 h y 24 h)

#### 5.-VACIADOS EN PLACA

Se realizaron vaciados en placa de las diferentes diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en diferentes valores de pH (2, 3 y 4) ; agregando 1 ml en la placa estéril y posteriormente agregando el agar MRS estéril.

Y para el pH (7) las diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  ; agregando 1 ml en la placa estéril y posteriormente agregando el agar MRS estéril.

Se homogenizaron mediante la norma **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.**

Todos los vaciados se realizaron por duplicado.

#### 6.-INCUBACIÓN

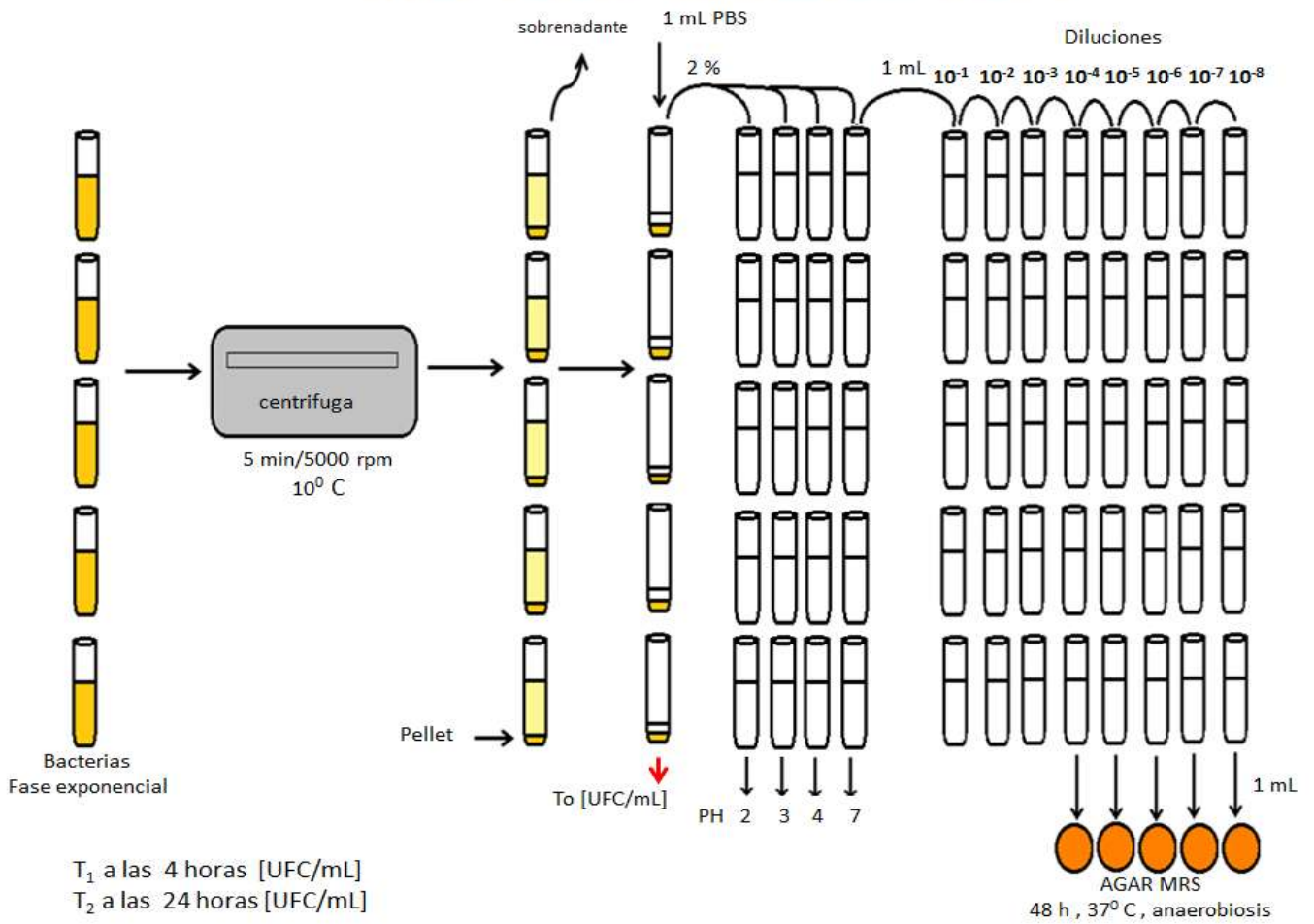
Las placas se incubaron a 37<sup>0</sup>C durante 48 horas.

#### 7.-CONTEO

Después de 48 horas se realizaron los conteos de las placas.

Diagrama 8. Medicion de resistencia a diferente pH (Blanquet , *et al*; 2004).

## MEDICIÓN DE RESISTENCIA



## IX.7 ETAPA VII

### IX.7 Elaboración de las microcápsulas por el método de emulsión con HOMOGENIZADOR PRO 200

#### a) PREPARACIÓN DEL MATERIAL

##### 1.-ALGINATO DE SODIO AL 3%

Se pesaron 0.9 g de alginato de sodio y se aforaron a 30 mL de agua destilada

##### 2.-ACEITE DE GIRASOL

50 mL de aceite de girasol

##### 3.-ACIDO ACETICO GLACIAL

Se midieron 0.425 mL de Ácido acético glacial

##### 6.-CaCl<sub>2</sub>

Se prepararon 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M

Peso molecular CaCl<sub>2</sub> 110.99

0.277 g de CaCl<sub>2</sub> en 25 mL de agua destilada

##### 7.-QUITOSANO AL 0.4%

Se pesaron 0.4 g de Quitosano en 100 ml de ácido acético al 1%

##### 8.-TWEEN 80 1%

Se prepararon 600 mL de tween 80 al 1%, pesando 6 g de tween 80 en 600 mL de agua destilada.

#### b) METODOLOGIA

Se realizo por triplicado (utilizando 3 velocidades diferentes en el homogenizador pro 200) velocidades de (5000 RPM ,17500 RPM Y 35000 RPM)

1.-Se colocaron 30 mL de alginato de sodio al 3% en un matraz Erlenmeyer, se le adicionaron 50 mL de aceite de girasol.

2.-Se mezclaron con el homogenizador pro 200 a diferentes velocidades, manejando velocidades de 5000 rpm durante 10 minutos, 17500 rpm y 35000 rpm durante 4 minutos.

3.-A la mezcla se le adicionaron una mezcla de soluciones (100 mL Quitosano, 0.425 de ácido acético) y 25 mL de  $\text{CaCl}_2$ .

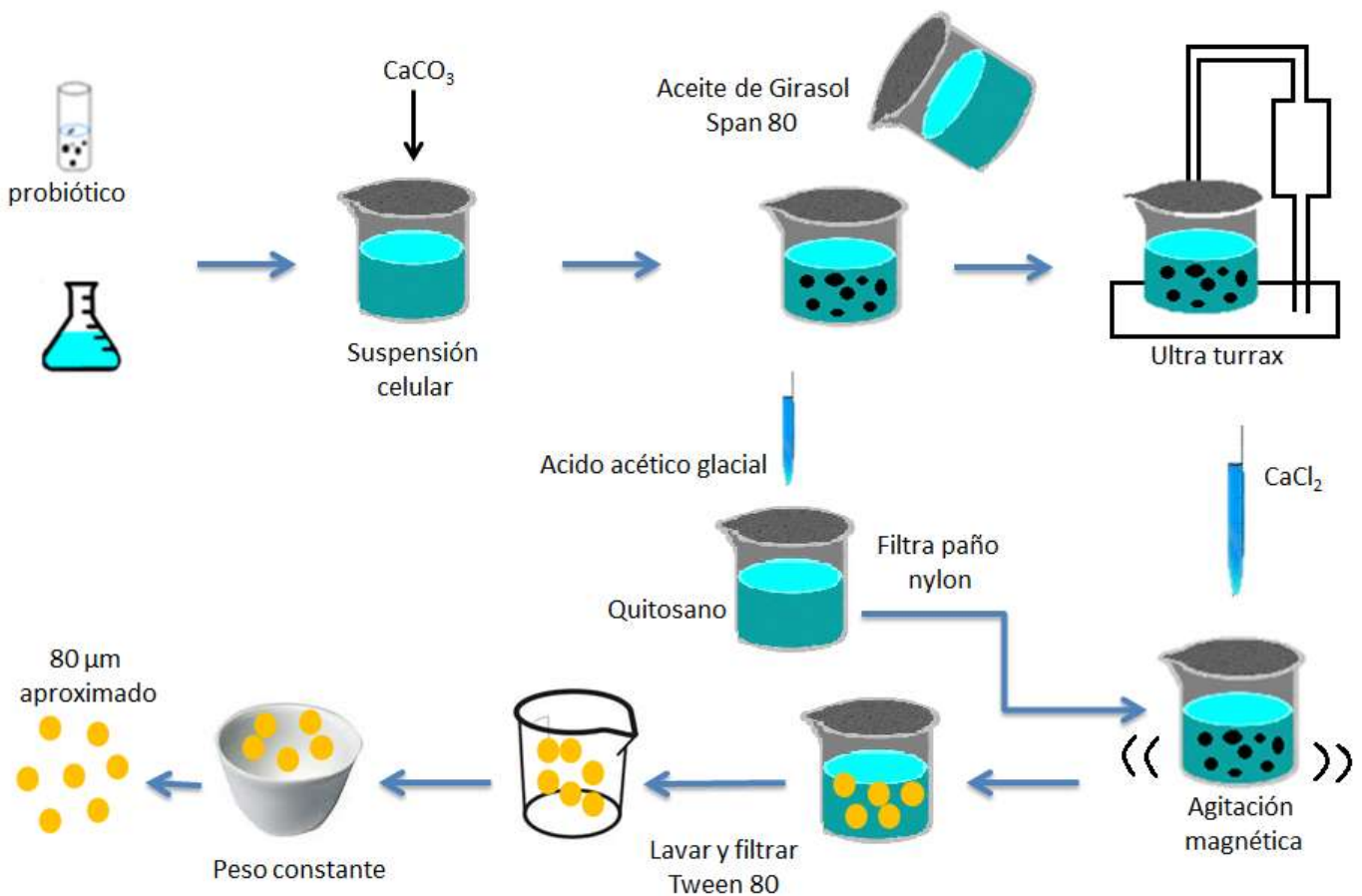
4.-se mezclaron con agitador magnético a 200 rpm

5.-Se lavaron con 100 mL de tween 80 al 1% y filtraron con una bomba de vacío.

6.-Las perlas se colocaron un una estufa a peso constante a  $37^\circ\text{C}$ .

**DIAGRAMA 9. MICROENCAPSULACIÓN POR EMULSIÓN CON HOMOGENIZADOR PRO 200 (McClements, 1999).**

## MICROENCAPSULACIÓN HOMOGENIZADOR PRO 200



**X. RESULTADOS Y DISCUSIONES:**

**ETAPA I**

**REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS**

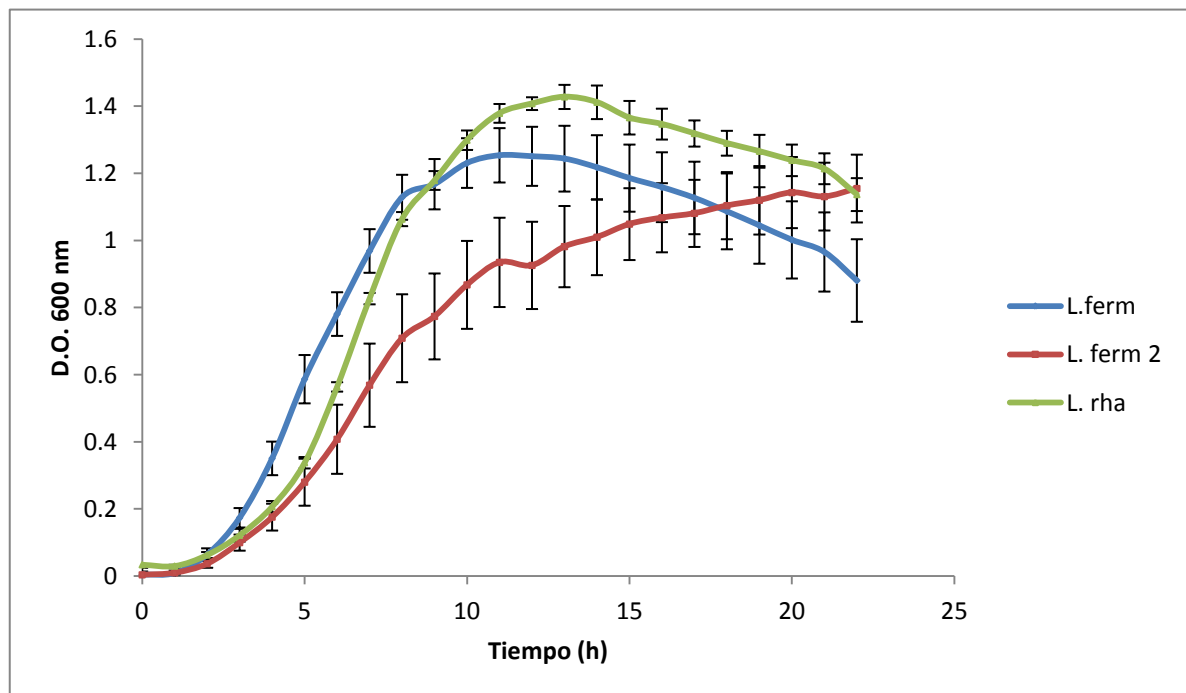
Se logro con éxito la reactivación de las 11 Bacterias probióticas para continuar con los experimentos posteriores del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Hermosillo, Sonora.

**ETAPA II**

**CURVA DE CRECIMIENTO POR DENSIDAD ÓPTICA**

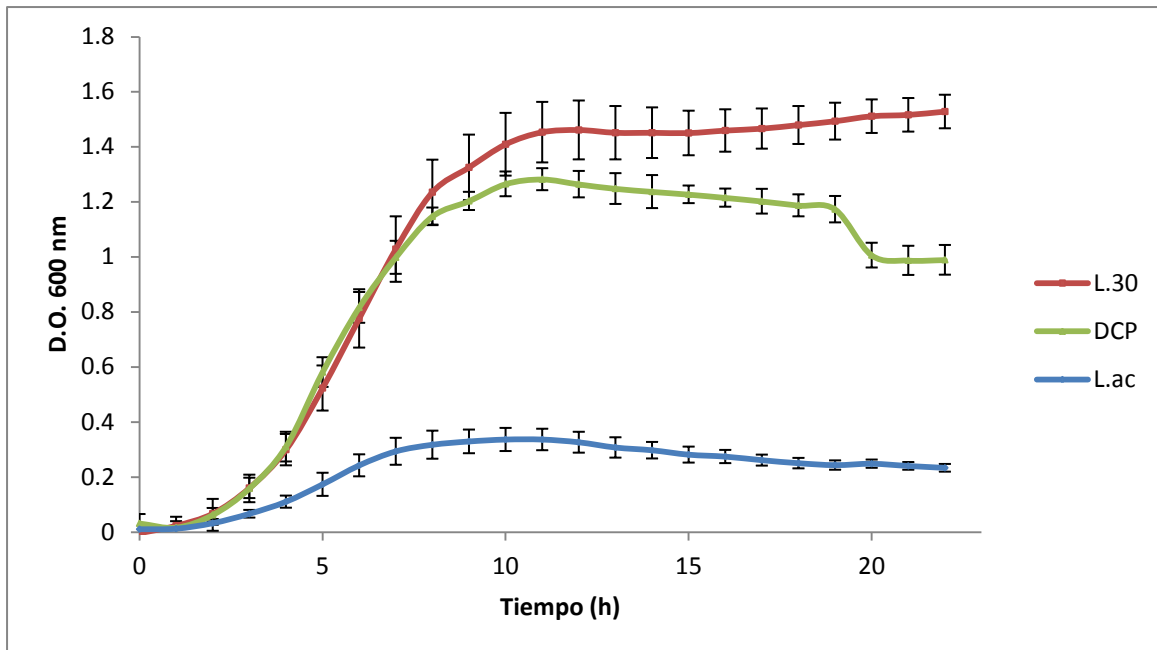
La finalidad de realizar la curva de crecimiento para las 11 bacterias fue para conocer su comportamiento de crecimiento y en que fases se encontraban en cada tiempo transcurrido los resultados obtenidos se observan en las siguientes gráficas: **(FIGURA 3-4-5-6)**

**FIGURA 3. CURVA DE CRECIMIENTO DE (*L. ferm*, *L. ferm 2*, *L. rha*)**



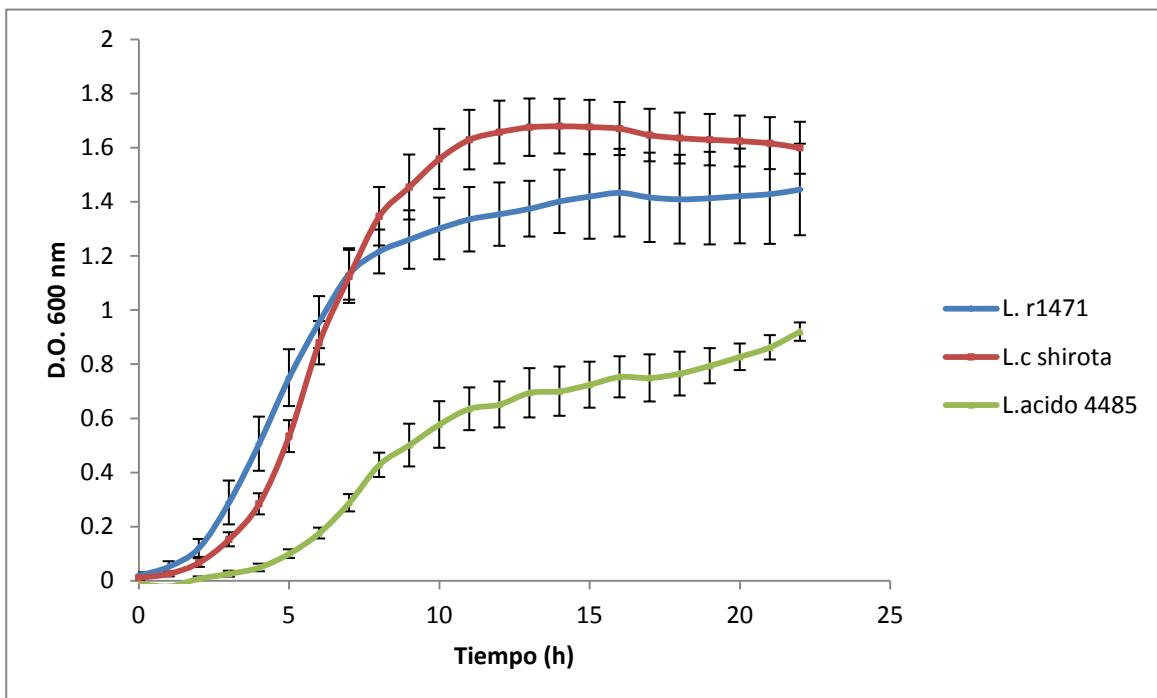
En la siguiente grafica se puede observar su fase exponencial de las bacterias probióticas *L.ferm* ,*L.ferm 2* y *L.rha* se encuentran entre un periodo de 7-9 horas en su fase exponencial.

**FIGURA 4. CURVA DE CRECIMIENTO (*L.30*, *Dcp*, *L.ac*)**



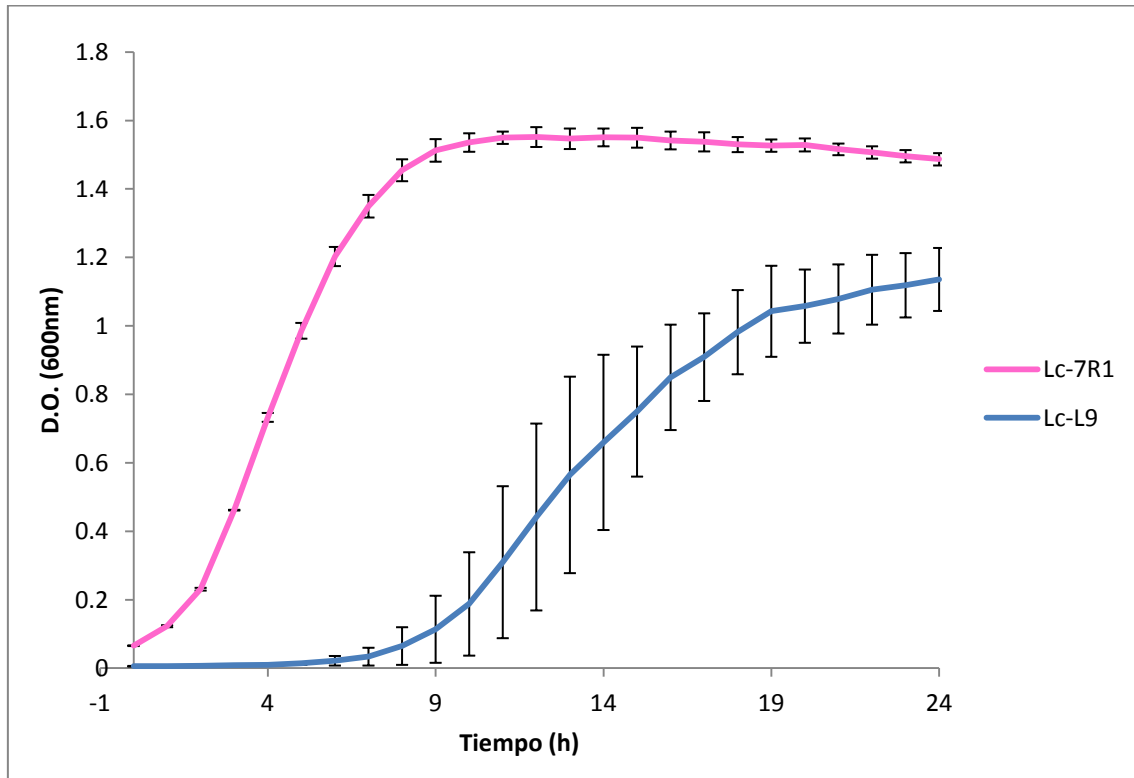
En la siguiente gráfica las bacterias probióticas *L.30*, *DCP* y *L.ac* se encuentran entre un periodo de 5-8 horas en su fase exponencial.

**FIGURA 5. CURVA DE CRECIMIENTO (*L.r1471*, *L.c shi*, *L.ácido 4485*)**



En la siguiente gráfica se puede observar la fase exponencial de las bacterias *L.r14171*, *L.c shirota* y *L.ácido 4485* su fase exponencial de estas bacterias se encuentra en un periodo de 7-9 horas.

**FIGURA 6. CURVA DE CRECIMIENTO (L.c 7r1 y L.c L9)**



En la siguiente gráfica se puede observar a la bacteria *L.c 7r1* su fase exponencial se encuentra entre 7-9 horas y *L.c L9* su fase exponencial se encuentra entre 13 y 16 horas.

De acuerdo con las fases de crecimiento de las bacterias probióticas, estas se encontraban entre un periodo de las 5 a las 9 horas en su fase exponencial y en un tiempo después de las 20 horas en fase de muerte, mientras que *L.c L9* el periodo de su fase exponencial estaba entre 13 y 16 horas

### ETAPA III

#### **Congelación de las bacterias ácido lácticas (protocolo de congelación).**

Esta prueba se realizó para conservar las bacterias probióticas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 80 % y así conservarlas durante mas tiempo en el Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Hermosillo, Sonora.

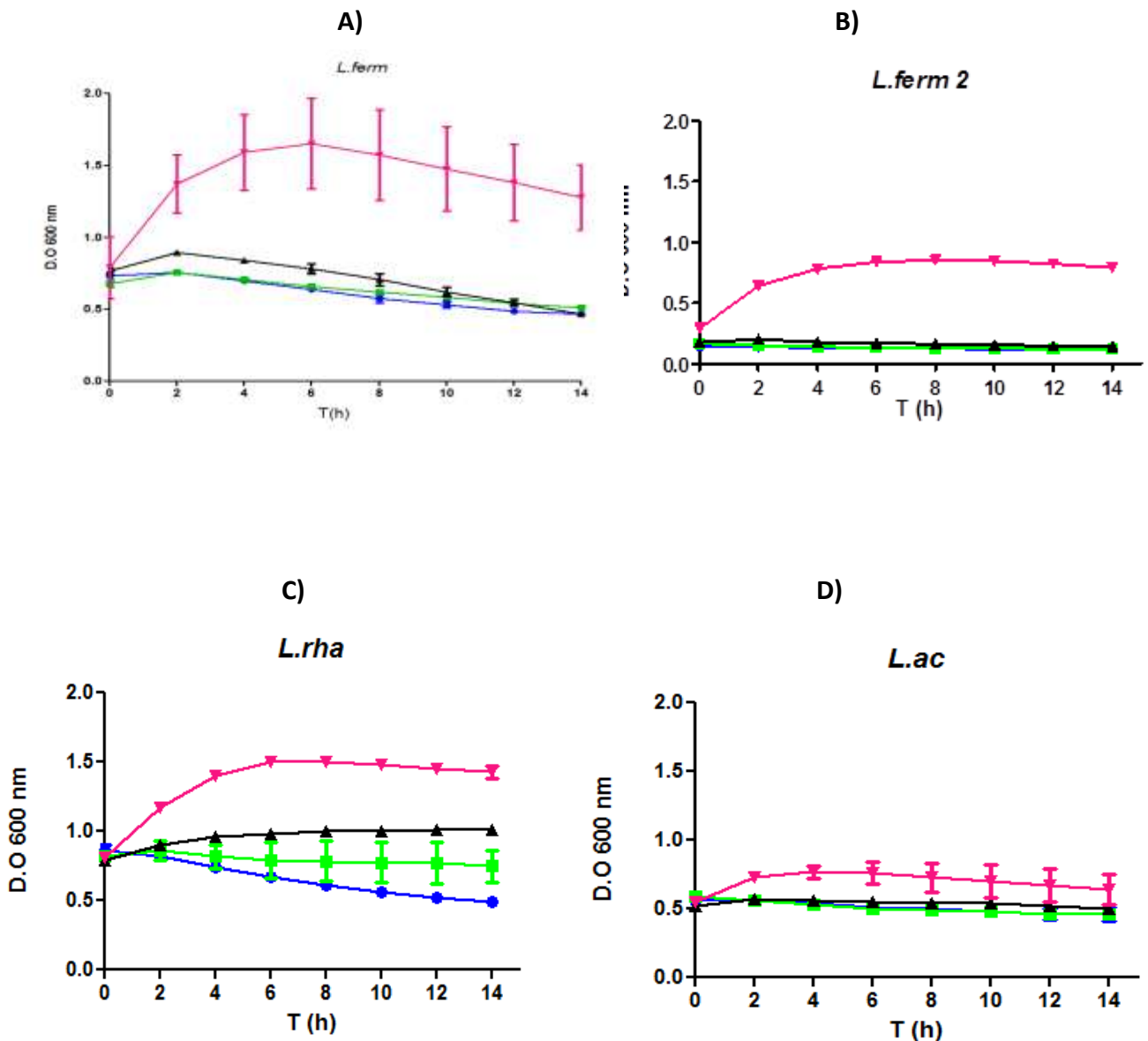


**ETAPA IV**

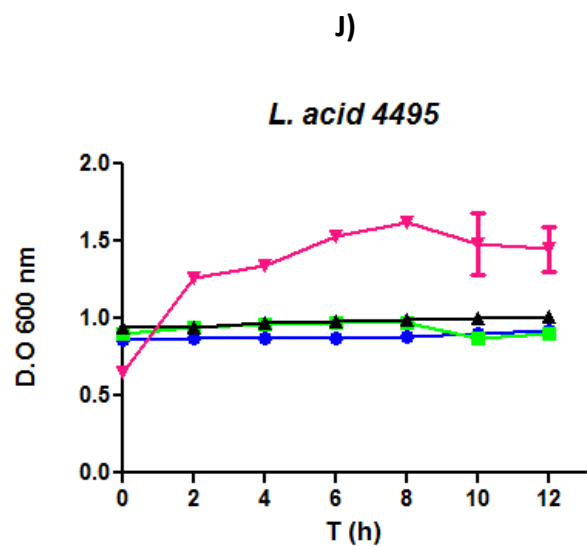
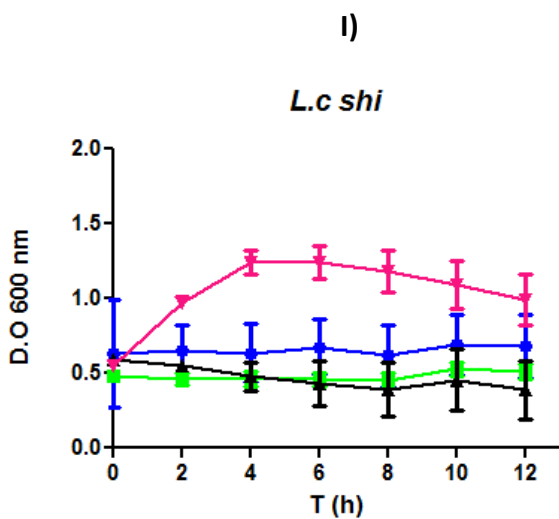
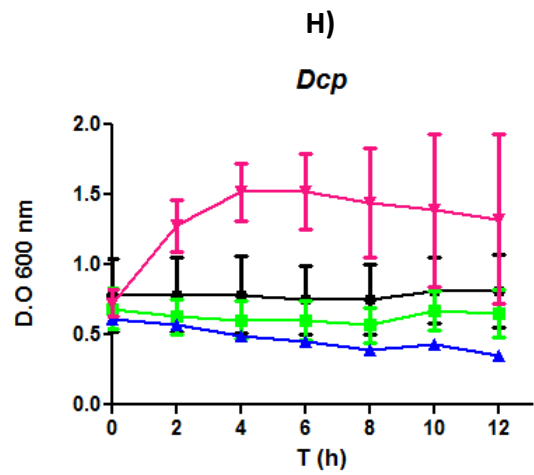
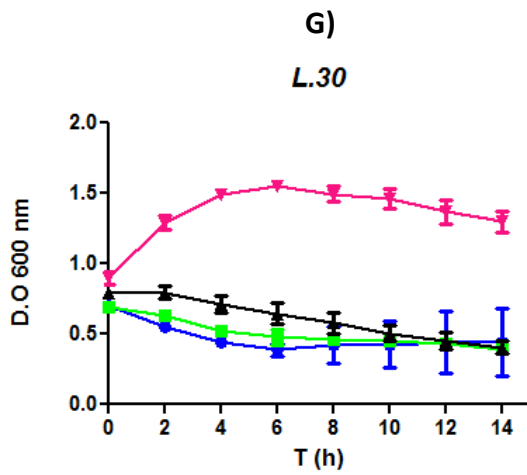
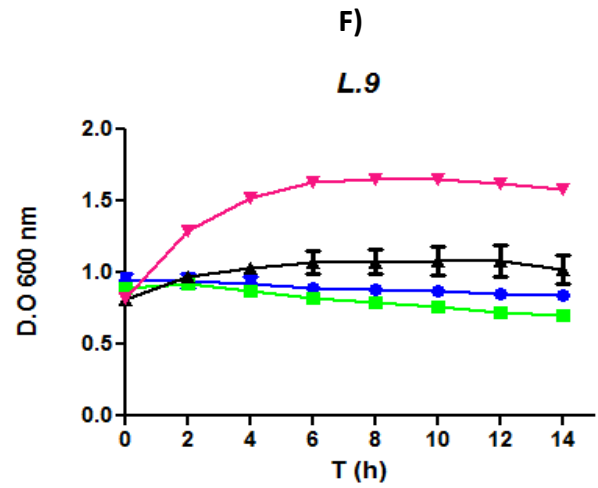
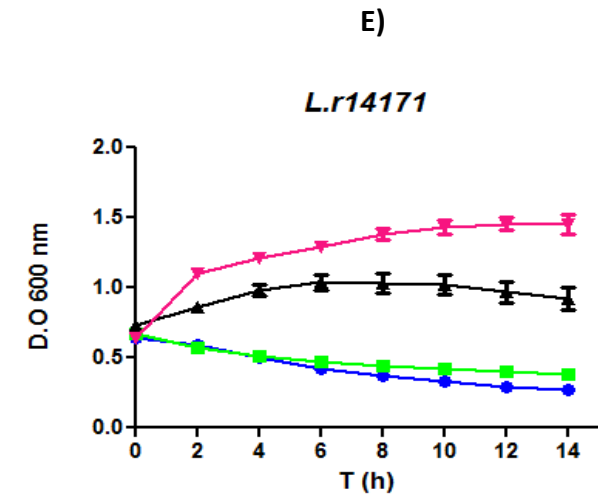
**Evaluación del crecimiento a diferentes valores pH por densidad óptica.**

Se evaluaron a las 11 bacterias probióticas en diferentes valores de pH. Esta técnica se llevó a cabo para realizar una preselección de las bacterias con mejor crecimiento y así continuar en la siguiente **etapa (v)** resultados son los siguientes:

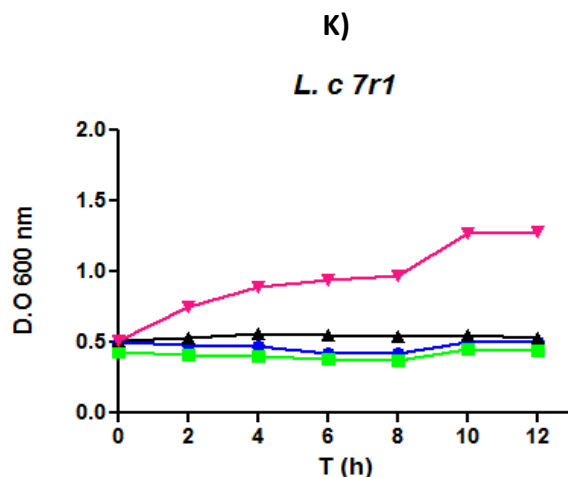
**FIGURA 7. CURVA DE CRECIMIENTO**



A) *L.ferm*, B) *L.ferm 2*, C) *L.rha*, D) *L.ac* a diferentes valores de pH: 6.2 (▲), 4.0 (▲), 3.0 (■) y 2.0 (●).



E) *L.r14171*, F) *L.9*, G) *L.30*, H) *Dcp*, I) *L.c shi*, J) *L.acid 4495* a diferentes valores de pH: 6.2 (▲), 4.0 (▲), 3.0 (■) y 2.0 (●).



K) *L.c 7r1* a diferentes valores de pH: 6.2 (▲), 4.0 (▲), 3.0 (■) y 2.0 (●).

A través de los resultados obtenidos se demostró que las bacterias *L.reuteri*, *L.casei* 7R1, *L.casei* L9, *L.casei* DCP y *L.rhamnosus*, sobrevivieron a concentraciones de pH bajos. Tomando en cuenta los resultados anteriores se realizó una preselección considerando a las bacterias que crecieron en diferentes valores de Ph bajos.

**Cuadro 3. Bacterias seleccionadas para la evaluación del crecimiento a diferentes pH**

NOMBRE	CODIGO	PROVEDOR/FUENTE
<i>L.reuteri</i> NRRL 14171	L.r14171	
<i>L.casei</i> 7R1	Lc-7R1	Universidad de Wisconsin,
<i>L.casei</i> L9	Lc-L9	Laboratorio Dr. Steele
<i>L.casei</i> DCP 3968	DCP	Universidad de las
<i>L.rhamnosus</i> ATCC 13075	L.rha	Americas ,Puebla, Laboratorio Dr. Lopez-Malo

**ETAPA V**

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO A DIFERENTES PH EN EL MEDIO DE CULTIVO**

Se midieron el crecimiento de las bacterias seleccionadas (*L.reuteri* , *L.casei* 7R1, *L.casei* L9, *L.casei* DCP y *L.rhamnosus*) a diferentes valores de pH de 2, 3, 4 y 6. 2, midiendo la concentración celular de las bacterias utilizando caldo MRS con diferentes pH a 2, 3,4 y 6.2. El vaciado en placa se realizo en tres tiempos (0, 4 y 24) a 37<sup>0</sup>C. Después de cada vaciado en placa, se incubaron las bacterias durante 48 h a 37<sup>0</sup>C en condiciones de anaerobiosis. Los resultados obtenidos en el conteo de las colonias formadas en las placas se represento en las siguientes CUADROS (3-4-5-6 y 7)

**CUADRO 3.Crecimiento (Log10 UFC/g) de *L. reuteri* a diferentes valores de pH**

pH	Tiempo (h)		
	0	4	24
2			
3	6.83	7.93	
4	7.37	8.34	9.09
6.2		9.71	9.45

A través de los resultados se observa a *L.reuteri* creció en pH 3,4 y 6.2; pero no tiene crecimiento a pH menores de 3, lo cual nos indica que a pH bajos no tiene supervivencia.

**CUADRO 4.Crecimiento a diferentes pH de *L.casei* 7r1**

pH	Tiempo (h)		
	0	4	24
2			
3	6,73	8,68	
4	7,37	8,57	8,85
6.2	9,49	8,81	9,87

Se observó que *L.casei* 7r1 creció a pH 3,4 y 6.2, lo cual indica que no tiene supervivencia a pH 2.

**CUADRO 5. Crecimiento a diferentes pH de *L.casei* 7r1**

Tiempo (h)			
pH	0	4	24
2			
3	7,24	7,29	6,59
4	7,17	8,24	8,37
6.2		9,25	

Se observó que *L.casei* L9 creció a pH 3,4 y 6.2, lo cual indica que no tiene supervivencia a pH 2.

**CUADRO 6. Crecimiento a diferentes pH de *L.rhamnosus***

Tiempo (h)			
pH	0	4	24
2			
3			
4	6,70		7,52
6.2			10,83

Se observó que *L.rhamnosus* no crece a pH bajos por lo tanto esta bacteria probiótica es de baja supervivencia a diferentes pH.

**CUADRO 7. Crecimiento a diferentes pH de *L.casei* DCP**

Tiempo (h)			
pH	0	4	24
2			
3		7,18	
4		7,07	9,75
6.2	9,49		10,23

se observó que *L.casei* DCP después de 4 horas (T1) tiene crecimiento en pH de 3 y 4 sin embargo la supervivencia es baja a pH bajos.

**ETAPA VI**

**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A DIFERENTES PH**

Se midieron la resistencia inoculando las bacterias seleccionadas (*L.reuteri* , *L.casei* 7R1, *L.casei* L9, *L.casei* DCP y *L.rhamnosus*) en una solución amortiguadora de PBS ajustado a diferentes valores el pH (2,3,4 y 7). El vaciado en placa se realizo en tres tiempos diferentes (0, 4 y 24 horas de incubación a 37<sup>0</sup>C). Después de cada vaciado en placas se incubaron las bacterias durante 48 h a 37<sup>0</sup>C en condiciones de anaerobiosis. Los resultados obtenidos del conteo de colonias formadas se representan en el siguientes **CUADROS.8-9-10-11 Y 12**

**CUADRO 8.Resistencia a diferentes pH de *L.reuteri***

Tiempo (h)	
pH	0
2	
3	7,84
4	8,20
7	

*L.reuteri* no resiste a los diferentes pH como se puede observar, solo en el tiempo de 0 h , resistió, y posteriormente no hubo presencia bacteriana.

**CUADRO 9.Resistencia a diferentes pH de *L.casei* L9**

Tiempo (h)		
pH	0	24
2		
3		
4	6,98	
7		9,49

*L.casei* L9 no resiste en pH bajos como se puede observar en el (**CUADRO 9**) en ningún tiempo hubo crecimiento solo presento crecimiento bacteriano en los pH 4 y 7.

**CUADRO 10.Resistencia a diferentes pH de *L.casei* 7r1**

L. Tiempo (h)			
pH	0	4	24
2			
3			
4			
7	8,69	8,20	8,55

*L.casei 7r1* no resiste a pH bajos como se observa en el cuadro 10 solo presento crecimiento bacteriano en pH 7.

**CUADRO 11. Resistencia a diferentes pH de *L. rhamnosus***

Tiempo (h)	
pH	0
2	
3	
4	
7	9,01

*L. rhamnosus* no resiste a pH bajos, solo presento crecimiento bacteriano en pH 7.

**CUADRO 12. Resistencia a diferentes pH de *L. casei DCP***

Tiempo (h)			
pH	0	4	24
2			
3			
4			
7	8,15	9,24	8,16

*L. rhamnosus* no resiste a pH bajos como se observa en el **CUADRO 12** solo presento crecimiento bacteriano en pH 7.

Los resultados obtenidos demuestran que las bacterias probióticas cuando se someten a pH bajos presentan poca resistencia, debido que ellas presentan solo estabilidad en condiciones de pH de 6.2 a 7. Estos resultados obtenidos demuestran el por que incorporar a los microorganismos probióticos con una protección y así superar la susceptibilidad ya que se enfrentan a diferentes condiciones ambientales presentes durante los procesos tecnológicos. Por esta razón, constantemente se buscan alternativas para proteger a los microorganismos probióticos y aumentar su viabilidad y estabilidad sin restar las propiedades sensoriales del producto final. Siendo las técnicas de microencapsulación una alternativa.

ETAPA VII

a) MICROENCAPSULACIÓN CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200

Se realizo a 3 diferentes velocidades



FIGURA 8. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 5000 RPM



FIGURA 9. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 5000 RPM A PESO CONSTANTE



FIGURA 10. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 17500 RPM



FIGURA 11. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 17500 RPM A PESO CONSTANTE





FIGURA 12. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 35000 RPM



FIGURA 13. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 35000 RPM A PESO CONSTANTE

Las microcápsulas que se obtuvieron por el método de emulsión con el ultra homogenizador pro 200 a velocidades de 5000 , 17500 y 35000 rpm, resultando las partículas aparentemente de tamaños milimétricos sin embargo una de las problemáticas al realizarle los lavados es que quedaban compactadas unas con otras ya que estas se encontraban aun con residuos de aceite , es por ello que la técnica de emulsión aun se seguirá perfeccionando , debido a que uno de los objetivos es que las microcápsulas queden totalmente separadas y que se elimine por completo el aceite que se utiliza en la emulsión y este no afecte en lo sensorial en caso de ser incorporados a diversos alimentos.

**C) SE OBSERVARON EN EL MICROSCOPIO 40X/0.65 OIL**

**Las microcápsulas se observaron en el microscopio**



FIGURA 14. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 5000 RPM , TAMAÑO 56.643  $\mu\text{m}$



FIGURA 15. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 5000 RPM , TAMAÑO 26.433  $\mu\text{m}$  A PESO CONSTANTE



FIGURA 16. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 17500 RPM , TAMAÑO 37.813  $\mu\text{m}$

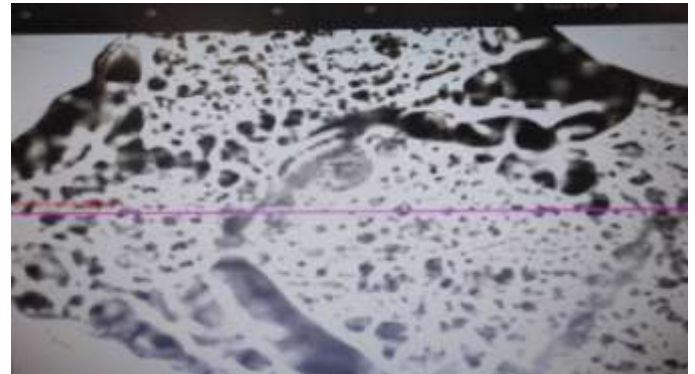


FIGURA 17. MICROCAPSULAS CON EL HOMOGENIZADOR PRO 200 A 17500 RPM , TAMAÑO 64.049  $\mu\text{m}$

## XI. CONCLUSIONES

El principal objetivo de el presente estudio es caracterizar capsulas de alginato recubiertas con Quitosano para las bacterias probióticas, dicho objetivo no se logro concretar por qué no se conto con el tiempo suficiente. No obstante, se concluye que las bacterias ácido lácticas probióticas tienen resistencia y mantiene su viabilidad en simulaciones del tracto gastrointestinales, sin embargo se ven afectadas cuando son incorporadas a los alimentos en el procesamiento y almacenamiento, la resistencia de las bacteria probióticas se ve afectada principalmente cuando son sometidas a diferentes valores bajos de pH y una de las mejores alternativas para proteger a las bacterias probióticas es colocándole un revestimiento y así no se vean afectadas en su supervivencia y viabilidad a través de la microencapsulación, para ello es importante caracterizar el método de obtención de capsulas en un tamaño micro y comprobar que el material encapsulate tenga la resistencia en el procesamiento y almacenamiento del producto y sobre todo no afecte sensorialmente al alimento, También se comprobó que al utilizar el homogenizador pro 200 en la formación de las microcápsulas, dio como resultado utilizando velocidades elevadas(17500-35000 rpm) una obtención de partículas más pequeñas comparadas con velocidades menores(5000). Por lo tanto la microencapsulación protegerá a las bacterias probióticas para que permanezcan viables y así cumpla satisfactoriamente sus funciones benéficas.

## XII. RECOMENTACIONES

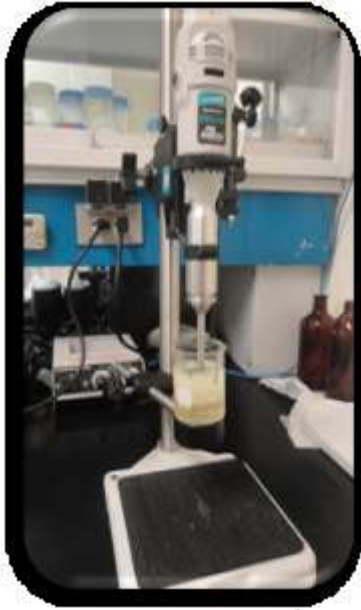
- ✓ Caracterizar la técnica de microencapsulación de emulsión por ultra homogenización
- ✓ Buscar una técnica que evite la compactación de las microcápsulas, permita su separación y genere partículas del tamaño deseado.
- ✓ Colocarle un revestimiento a las microcápsulas de Quitosano, para hacer a las microcápsulas más fuertes y resistentes.
- ✓ Evaluar la capacidad de liberación de las células así como la tasa de recuperación.
- ✓ Determinar la forma, tamaño, integridad y uniformidad de las micropartículas.
- ✓ Caracterizar las propiedades micro-geométricas de las capsulas obtenidas y determinar la eficiencia de microencapsulación de probióticos mediante la evaluación de algunos parámetros de calidad.

### XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Burgain, J., Gaiani. C., Linder, M., Scher J., 2011.** Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467-483.
2. **Champagne, Claude P., and Fustier, Patrick., 2007.** Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(2):184-190.
3. **Chan, Eng Seng., Lee, Boon Beng., Ravindra, Pogaku and Poncelet, Denis., 2009.** Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 338(1):63-72.
4. **Chan, Lai Wah., Lee, Huey Ying and Heng, Paul W.S., 2006.** Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*. 63(2):176-187.
5. **Chuah, Ai Mey., Kuroiwa, Takashi., Kobayashi, Isao., Zhang, Xain and Nakajima, Mitsutoshi., 2009.** Preparation of uniformly sized alginate microspheres using the novel combined methods of microchannel emulsification and external gelation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 351(1-3):9 17.
6. **De las Cagigas Reig., A & Blanco Anesto,J., 2002.** Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana aliment Nutr.* [http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16\\_1\\_02/ali10102.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.pdf)
7. **FAO/WHO., 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food.
8. **Fuller R, J Applied Bacter ., 1989.** Probiotics in man and animal.
9. **Imeson, A., 2010.** Food stabilizers, thickeners and gelling agents. United Kingdom:Wiley-Blackwell.
10. **JARAMILLO, D., 2011** Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. Universidad de Los Andes, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química. Carrera 1 Este, N° 19A-40, Edificio Mario Laserna, Bogotá D. C, Colombia. 2-4p. Consultado el 15-03.
11. **Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H., 2003.** Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Journal* 13, 3-13.
12. **Krasaekoopt, Wunwisa., Bhandari, Bhes and Deeth, Hilton., 2003.** Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13(1):3-13.
13. **LASTRAS, P., 2009.** Probióticos, Lactobacillus acidophilus y Bifidobacterium bifidum, Suplementos nutricionales, *Salud BIO*, 12 p. Consultado el 15-12.
14. **Lopes Peixoto L., 2010.** Os Efeitos dos Probióticos e Prebióticos na Promocao de um Organismo Saudável; Universida de Presidente Antonio Carlos; [www.nutritotal.com.br/.../1210--Monografia](http://www.nutritotal.com.br/.../1210--Monografia).

15. **Martín Villena MJ., Morales Hernández ME., Gallardo Lara V y Ruiz Martínez MA., 2009.** Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.
16. **MILIAN, G., 2010.** Empleo de probióticos a base de *Bacillus* sp y sus endosporas en la producción avícola. Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24. San José de las Lajas, La Habana, 16p. Consultado el 6-02.
17. **NAVA, J., 2008.** Evaluación de Bacterias Ácido Lácticas Comercializadas como Probióticas. Universidad de los Andes. Departamento de Biología. Merida Colombia. 15-16p.
18. **Pardio VT., Krzysatof N., Waliszewski KN., Robledo G., 1994.** Los probióticos y su futuro. Arch Latinoam Nutr.
19. **Parra-Huertas., Ricardo Adolfo., 2010.** Revisión: microencapsulación de alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín. 63(2):5669-5684.
20. **Penna FJ., 1998.** Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. Rev Enfer Infec Ped
21. **PINOS, A., 2010.** Breve reseña de los probióticos. Universidad Agraria de la Habana. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Consultado el 31-01.
22. **Razmovski, R. and Vučurović, V., 2011.** Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate–maize stem ground tissue matrix. Enzyme and Microbial Technology. 48(4-5):378-385.
23. **Reddy-K, Ravindra and Reddy-P, Sabitha., 2010.** Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. International Journal of PharmTech Research. 2(4):2198-2203.
24. **SALVADOR, F., CRUZ, D., 2009.** Nutracentricos. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia. México D.F. 88p.
25. **SAMANIEGO, L., SOSA, M., 2011.** Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Matanzas, Cuba. Consultado el 19-04.
26. **Y. Sanz. Co., 2006.** Contribución de la microbiota y del género “*Bifidobacterium*” a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. Instituto Agroquímica y tecnología de alimentos. Valencia.
27. **Yáñez J., Salazar J.A., Chaires L., Jiménez J., Márquez M., Ramos E.G., 2011.** Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Avance y perspectiva vol.21
28. **YEGANI, M., 2011.** Manipulación de la Flora Intestinal en Aves. Universidad de Alberta Canadá. Consultado el 02-03.

XIV.ANEXOS



MEZCLANDO LA EMULSIÓN CON  
EL HOGENIZADOR PRO 200



ADICIONANDOLE  $\text{CaCl}_2$



MEZCLANDO A 200 RPM  
AGITACIÓN MAGNETICA



LAVANDO Y FILTRANDO  
CON BOMBA DE VACIO



MICROCAPSULAS



MICROCAPSULAS