



# Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

## Informe técnico de residencia profesional

“Estudio de viabilidad de cápsulas simbióticas sometidas a pruebas de digestibilidad”

Presenta:

Martínez López Jorge Arturo-----08270351

Asesor:

Dr. Miguel Abud Archila

Revisores:

M.C. Lucía María Cristina Ventura Canseco

I.B.Q. Jaqueline leyra Hernández

## INDICE

<b>I. Introducción</b> .....	2
<b>II. Justificación</b> .....	3
<b>III. Objetivos</b> .....	4
III.1 Objetivo general .....	5
III.2 Objetivos específicos.....	5
<b>IV. Lugar de trabajo:</b> .....	5
<b>V. Problemas a resolver</b> .....	6
<b>VI. Alcance y limitaciones</b> .....	7
<b>VII. Marco teórico</b> .....	8
VII.1 Probióticos.....	9
VII.2 <i>Bifidumbacterium lactis</i> .....	9
VII.3 Microencapsulación .....	10
VII.3.1. Microencapsulación mediante secado por aspersión.....	11
VII.3.2. $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica como agente encapsulante .....	13
VII.4 Estudio de condiciones gastrointestinales simuladas .....	14
<b>VIII. Procedimiento y descripción de actividades realizadas</b> .....	16
VIII.1 Materiales.....	16
VIII.2 Cepas microbianas y activación celular .....	16
VIII.3 Obtención de la pasta celular.....	16
VIII.4 Preparación y encapsulación de la solución probiótica.....	16
VIII.5 Viabilidad de las bacterias encapsuladas.....	18
VIII.6 Viabilidad de las bacterias encapsuladas en condiciones ácidas y biliares .....	18
VIII.7 Diseño experimental y análisis estadísticos .....	19
<b>IX. Resultados, planos, graficas, prototipos y programa</b> .....	20
IX.1 Rendimiento de proceso .....	20
IX.3 Viabilidad de las bacterias microencapsuladas después de ser sometidas a condiciones ácidas y biliares.....	24
<b>IX. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	27
<b>X. Bibliografía</b> .....	28

## **I. Introducción**

Hoy en día, los problemas de alimentación en México son debido a dos vertientes: la desnutrición y la obesidad. Por ello, existen diferentes programas enfocados a terminar con la desnutrición por pobreza y de igual forma brindar opciones de enseñanza de conductas y hábitos que fomenten a una alimentación saludable. Actualmente, las investigaciones se encuentran dirigidas en la posibilidad de crear un alimento que favorezca la salud del individuo, logrando evitar y/o disminuir enfermedades.

El concepto de nutrición ha sido modificado con el paso de los años, donde en un inicio la dieta solo aportaba los nutrientes necesarios a la idea de consumir alimentos que, además de nutrir, promuevan la salud. Uno de los alimentos más famosos que entra en este nuevo concepto de dieta son los alimentos lácticos. Hace alrededor de 100 años atrás se sabe que la adición de microorganismos vivos a los productos lácteos además de conservar el alimento, proveen de un efecto benéfico en las personas que lo consumen. Eli Metchnikoff propuso que el envejecimiento es consecuencia de la acción de las sustancias tóxicas producidas por la flora intestinal y sugirió que la ingesta de bacterias benéficas que se encontraban en los productos lácticos podrían bloquear estas toxinas y prolongar la vida; la observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a él, y afirmó que "la dependencia de los microorganismos intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microorganismos nocivos por microorganismos útiles" (1).

Diversos microorganismos pueden ser adicionados en alimentos, además de eso, conocer el tipo de microorganismo no es suficiente, ya que, en los procesos industriales para poder elaborar productos alimenticios y adicionarlos con estos, es un reto. Es importante saber que el microorganismo debe mantenerse vivo y óptimo en condiciones adecuadas para ofrecer beneficios a nuestra salud.

La microencapsulación es un proceso que permite proteger y mantener en forma óptima estos microorganismos vivos es la microencapsulación, y existen diversa manera de llevarla a cabo, pero estudios anteriores, demostraron que el secado por aspersión es una buena técnica

para poder microencapsular estos microorganismos, el tiempo corto, y el tamaño de partícula es adecuado para la formulación de alimentos.

Estudios han mostrado que los microorganismos del género *Bifidobacterium* pueden ser una buena opción para la elaboración de alimentos probióticos. Por lo tanto, una vez seleccionados los tipos de cepas que serán utilizados, es importante estandarizar las técnicas para determinar la viabilidad de estos microorganismos. Así, los análisis de viabilidad deberían permitir la determinación de la evolución tanto de los cultivos iniciadores así como de los Probióticos previamente encapsulados. De igual manera, permitirían conocer la resistencia de este producto en condiciones de digestión gastrointestinal simulada.

## II. Justificación

Una opción de alimentación para poder favorecer la salud son los alimentos probiótico. Estos son característicos por contener microorganismos vivos que al ser alojados en tracto intestinal nos transmiten protección contra microorganismos patógenos. Muchos microorganismos han sido estudiados, y uno de ellos es *Bifidumbacterium lactis*, este microorganismo al alojarse en el tracto intestinal además de ayudarnos contra microorganismos patógenos, ayuda a prevenir el cáncer de colon, a la absorción de vitaminas y minerales y a la absorción de calcio en los huesos. Por estos beneficios de esta bacteria se ha pensado elaborar alimentos que la contenga, pero mantener vivas estas bacterias y protegerlas del daño tracto digestivo es muy importante, por esas razones se han estudiado medios de protección para ellas.

La microencapsulacion por medio de aspersion es una técnica para poder conferirle protección a la bacteria, para poder crear esta protección es necesario tener un agente que forme una pared alrededor de la bacteria y formar una microcapsula, obteniéndolas en forma de polvo después del secado por aspersion. Esta técnica por su tiempo corto y bajos costos, se adecua para la elaboración de alimentos.

La optimización de esta técnica variando el flujo de alimentación y la concentración de material de pared, para poder encontrar un tratamiento el cual sea el más eficiente, hablando sobre el mayor rendimiento y la mejor protección conferida por el agente encapsulante analizando la viabilidad después del secado y la cinética de comportamiento de viabilidad en una prueba de simulación gástrica, es la meta de este estudio.

### **III. Objetivos**

#### **III.1 Objetivo general**

Evaluar la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* en microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión

#### **III.2 Objetivos específicos**

- Encapsular *Bifidobacterium lactis* mediante secado por aspersión, empleando como agentes encapsulantes  $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica variando concentraciones y el flujo de alimentación.
- Analizar la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* posterior al secado por aspersión así como a la simulación de condiciones del tracto gastrointestinal

#### **IV. Lugar de trabajo**

Este estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de investigación ubicado dentro del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez que se encuentra en Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050, Apartado Postal: 599, bajo cargo de M.C.A. José Luis Méndez Navarro, Director del I.T.T.G. el instituto tiene la misión de Formar de manera integral profesionales competentes, en el campo de la ciencia y la tecnología, con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores Institucionales y la visión de ser una Institución de excelencia en la educación superior tecnológica, comprometida con el desarrollo socioeconómico, sostenido y sustentable de la región.

El laboratorio de investigación cuenta con mesas de trabajo, cámara de incubación, incubadoras, balanzas analíticas y granatarias, estufa de secado, y estufas de secado al vacío, bombas de vacío, homogeneizadores, equipos de refrigeración y congelación, autoclaves, agitadores, secador por aspersion, material de vidrio, equipos de calentamiento como mecheros y parrillas, campana de extracción, reactivos, etc.

Cabe destacar que para este estudio se utilizó el equipo de centrífuga con control de temperatura del laboratorio de biología molecular y analítica, dentro de las mismas instalaciones del instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

## **V. Problemas a resolver**

Al realizar este estudio se pretende optimizar el método de microencapsulación por medio de secado por aspersión de una solución de  $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica adicionada con *Bifidumbacterium lactis*, para lograr transferir protección a la bacteria y pueda ser más resistentes a agentes externos y también soportar el proceso gástro-intestinal, aunado a esto la bacteria sea alojada en buen numero en el intestino y donen sus beneficios al cuerpo humano.

La optimización del microencapsulado por medio de secado por aspersión se tomara en cuenta la variación de concentración del agente encapsulante, así como el flujo de alimentación al equipo de atomización, monitoreando el rendimiento de secado y la viabilidad de la bacteria antes y después del microencapsulado.

## **VI. Alcance y limitaciones**

Dentro del alcance de este trabajo de residencia, fue encontrar el tratamiento de relación óptimo de concentración de agente encapsulante y flujo de alimentación al atomizador del equipo de secado por aspersión, respecto al microencapsulado los resultados fueron llevados al análisis estadísticos el cual dedujo que los todos los tratamientos no tienen diferencia significativa.

En la prueba de simulación gástrica, donde se sometió a las microcapsulas a un ambiente simulado de acidez y sales biliares, fue donde se comparó con mejores resultados la protección que le transfiere el microencapsulado,

Se puede decir, que el tiempo en el que se realizó este estudio no fue suficiente para poder analizar el poder de protección a las bacterias en un ambiente de almacenamiento refrigerado, además de poder crear algún producto alimenticio adicionado con el polvo probiótico obtenido y hacer pruebas en animales, para poder asentar aún más el poder probiótico de esta bacteria y la protección que adquiere al ser microencapsulado.

## VII. Marco teórico

### VII.1 Probióticos

Los problemas de alimentación que existen en el mundo, se han estudiado diversos tipos de bacterias que pueden dar un tipo de beneficio siendo consumidos, los profesionales en la salud han prestado más atención en los efectos de los alimentos con microbios vivos (Probióticos) en la salud humana. El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que "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" (1). Por entonces el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos (2). Henry Tissier aisló por primera vez una bifidobacteria de un lactante alimentado a pecho, a la que denominó *Bacillus bifidus communis*. Tissier postulaba que las bifidobacterias desplazarían a las bacterias proteolíticas que provocan la diarrea y recomendó la administración de bifidobacteria a lactantes que padecían de este síntoma (2).

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, En 1917, antes del descubrimiento de Alexander Fleming de la penicilina, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *Escherichia coli* de las heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial que no había desarrollado enterocolitis durante un brote grave de shigellosis. Los trastornos del tracto intestinal frecuentemente eran tratados con bacterias no patógenas viables, para cambiar o reemplazar la microflora intestinal. La cepa de *Escherichia coli* de Nissle 1917 es uno de los pocos ejemplos de un probiótico no BAL. (3)

## VII.2 *Bifidobacterium lactis*

Las bacterias del género *Bifidobacterium*, son bacterias Gram positivas, catalasa negativo, no forman esporas, son estrictamente anaeróbicas. Su temperatura óptima de crecimiento es entre 37°C y 41°C (alcanzando una mínima de entre 25°C a 28°C y una máxima que fluctúa entre los 43°C a 45°C) y su pH óptimo oscila entre los 6,5 -7,0 (límite inferior entre 4,5-5,0 y un límite superior 8,0-8,5). Degrada exclusivamente la glucosa y produce ácido acético y ácido láctico en una proporción de 3:2 respectivamente (4).

Castillo (5), señala que estos microorganismos son de forma de bastón delgado con extremos algo más ahusados y generalmente bifurcados; recién aislado presenta con frecuencia engrosamientos terminales. Los bacilos, que jamás se presentan en cadenas, a lo sumo en parejas, son bastantes delgados y miden 2 – 8  $\mu$  de largo.

Entre los principales beneficios atribuidos a las bifidobacterias, está la inhibición de bacterias patógenas, disminución de riesgos de cáncer al colon, aumento de la absorción de calcio y de la síntesis de vitaminas. (6).

Baron *et al.*, (7), señalan que *Bifidobacterium lactis* produce principalmente ácido láctico, a partir de muchos azúcares y se considera como una especie de *Lactobacillus* por producir además acetaldehído, diacetilo y etanol sin la generación de CO<sub>2</sub>. Se descubrieron varias propiedades de este microorganismo, probándose que era incapaz de reproducirse en presencia de oxígeno. Por esta razón se clasificó en un género anaeróbico estricto llamado *Bifidobacterium*.

Este cultivo termófilo, se aplica principalmente en la elaboración de productos lácteos (fermentados o dulces). Tiene una sensibilidad salina al 2,5% NaCl de un 50% de inhibición y con un 3,0% de un 100% inhibición (8).

### VII.3 Microencapsulación

Los procesos de Microencapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante mediante un proceso de coacervación. La utilización de microcápsulas abarca una amplia gama de campos: la liberación controlada de sabores, colores, aromas, perfumes, drogas, fertilizantes y precursores en impresiones. (9).

La microencapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales) son introducidas en una matriz o sistema pared con el objeto de evitar su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se libera gradualmente del agente que lo ha englobado o atrapado y se obtienen productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales. Se utiliza también el término microencapsulación en la industria alimentaria o farmacéutica cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o pequeñas cantidades (9).

La microencapsulación actualmente, se aplica para preservar y/o proteger numerosos ingredientes comerciales. El material que es cubierto se define como fase interna y el material que recubre es denominado de pared y generalmente no reacciona con el material a encapsular (Figura 1) (10).

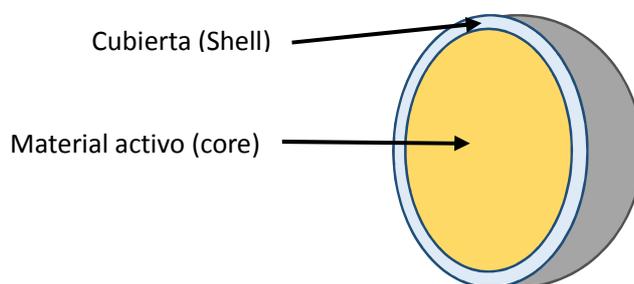
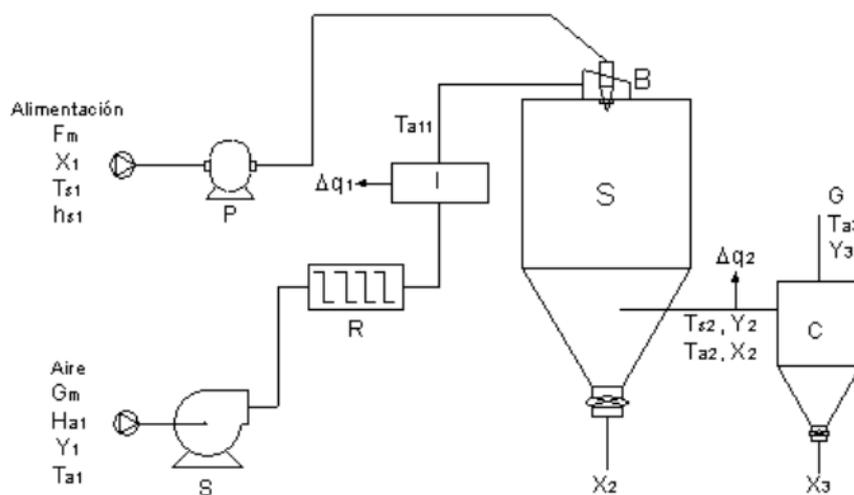


Figura 1. Estructura general de una microcápsula (11)

### VII.3.1. Microencapsulación mediante secado por aspersión

El secado por aspersión (figura 2) es usado ampliamente en las industrias de los alimentos debido a que es un método económico y efectivo en la protección de materiales, como en la deshidratación de leche. Los almidones modificados, la maltodextrina y las gomas son empleados como acarreadores o materiales pared. El material a encapsular es homogenizado con el acarreador; la mezcla es alimentada al secador por aspersión y se atomiza por medio de una boquilla o disco; las microcápsulas se colectan posteriormente. (9).



- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| S - Cámara de secado        | I - Supuesto intercambiador de calor (ficticio) |
| C - Separador ciclónico     | R - Calentador de resistencias                  |
| B - Boquilla de atomización | S - Soplador                                    |
| P - Bomba de alimentación   |   |

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de secado por aspersión

Por definición, el secado por aspersión es la transformación de un líquido en un material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio secado en caliente. La distribución del tamaño de las partículas obtenidas por este método es en general menor a  $100 \mu\text{m}$ , aunque debemos destacar que ello depende de las condiciones del proceso. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad a temperaturas elevadas es

muy corto (5 a 30 s). El tipo de material encapsulante tendrá influencia en la estabilidad de la emulsión antes de secar, el tamaño de la partícula, las propiedades de flujo, las mecánicas y en la vida útil del material deshidratado (10).

La microencapsulación es una técnica relativamente nueva que sirve para proteger a los materiales encapsulados de factores que puedan causar deterioro, tales como el oxígeno, la luz o la humedad (12).

### **VII.3.2. $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica como agente encapsulante**

Las Ciclodextrinas fueron descubiertas hace aproximadamente 100 años. En la industria farmacéutica, han sido principalmente utilizados para aumentar la hidrosolubilidad, biodisponibilidad y estabilidad de diversas drogas de uso terapéutico.

Las CD son oligosacáridos cíclicos, producidas por síntesis enzimática selectiva (cyclomaltodextrin glucanotransferasa, CGTase). Existen tres CD con similar estructura y constan de seis, siete, u ocho monómeros de glucosa (en forma de anillo) denominándose alfa, beta o gamma ciclodextrina, respectivamente (figura 3).

El acoplamiento específico de los monómeros de glucosa, da a cada ciclodextrina una rígida estructura molecular con una “cavidad interior” de volumen determinado.

Esta “cavidad interna” de naturaleza hidrofóbica, es una característica estructural fundamental de la ciclodextrinas, que le proporciona la capacidad de formar complejos con otras moléculas de muy diversa naturaleza. Estas moléculas, deberán tener un tamaño compatible con la cavidad interna de la CD, permitiendo formar así un “complejo de inclusión” estable.

Las Ciclodextrinas presentan como ventajas ser moléculas química y físicamente muy estables con capacidad de formar complejos con una gran variedad de compuestos orgánicos, como resultado de este proceso de “inclusión” de compuestos dentro de la molécula de ciclodextrinas, se logra mejorar las propiedades de biodisponibilidad,

solubilidad en agua, estabilidad en presencia de luz, calor y condiciones de oxidación.

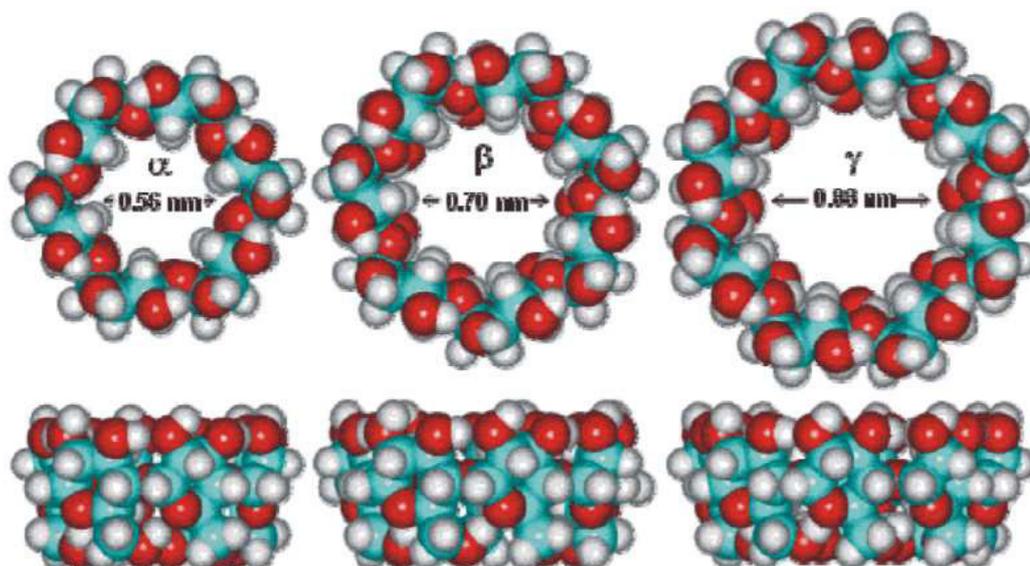


Figura 3. Ciclodextrina  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , respectivamente, representando en cada una de ellas el diámetro de su concavidad

#### VII.4 Estudio de condiciones gastrointestinales simuladas

Las bacterias usadas como complementos probióticos son comúnmente entregados en un sistema de alimentación y, por lo tanto, comienza su viaje a la parte inferior del tracto intestinal a través de la boca. Como tales bacterias probióticas, debe ser resistente a la enzimas en la cavidad oral (por ejemplo, lisozima) (14) y también debe tener la capacidad de resistir la digestión proceso en el estómago y el tracto intestinal. Berrada et al. (16) informaron que el tiempo desde la entrada hasta liberación en el estómago en unos 90 min. Sin embargo, otros procesos digestivos tienen más tiempo de residencia; por lo tanto, hay una necesidad de que las bacterias sean resistentes a las condiciones estresantes del estómago y el intestino superior, que contiene bilis.

El estrés celular comienza en el estómago, que tiene pH bajo de 1.5 (16), donde las bacterias pasan a través de la condición ácida de dicho órgano; en el intestino delgado, el obstáculo más importante para los microorganismos son las sales biliares (17), por lo que los probióticos para ejercer sus efectos benéficos no deben sucumbir a la acción de este bactericida natural (18). La concentración de sales biliares en el intestino humano son

variables y difíciles de predecir (19). Las transformaciones microbianas de los ácidos y sales biliares son numerosas. Entre ellas destaca la hidrólisis, reacción muy habitual en el tracto intestinal de los animales (20). En este sentido una de los microorganismos más estudiados es *Lactobacillus reuteri*. Esta bacteria tiene la capacidad de desconjugar las sales biliares y así inactivar su potente acción biocida (21). Mecanismo utilizado por la mayoría de las bacterias resistentes a estas sales y que es uno de los factores de disminución del colesterol plasmático (22,23). Para mejorar la resistencia al paso por el estómago y primera parte del intestino de los probióticos, Stanton y cols., (24) recomiendan someterlos a condiciones de estrés sub-lethal, como tratamiento con ácidos o calor, que les provoca la expresión de genes de respuesta adaptativa al estrés que los hacen más resistentes.

## **VIII. Procedimiento y descripción de actividades realizadas**

### **VIII.1 Materiales**

Los materiales utilizados para los análisis de viabilidad serán el caldo MRS (de Man, Rogosa, & Sharpe), pepsina, pancreatina, sales biliares y L-cisteína, fosfato mono potásico, Como agentes encapsulantes serán empleados  $\beta$ -ciclodextrina y goma arábica.

### **VIII.2 Cepas microbianas y activación celular**

*Bifidobacterium lactis* se activó en 20 ml de medio de cultivo MRS, adicionado con 0.05 % de L-cisteína, con la finalidad de crear un ambiente anaeróbico y así favorecer en su desarrollo. Se realizaron dos activaciones, la primera con la finalidad restructuración celular, y la segunda activación se hizo para tener un mejor desarrollo de biomasa de nuestra bacteria, con menos estrés viniendo de una cepa liofilizada. La activación tuvo una duración de 24 horas cada una a 35 °C, haciéndose por duplicado para cada activación.

### **VIII.3 Obtención de la pasta celular**

Para obtener la biomasa necesaria para el microencapsulamiento por secado por aspersión, de la última activación que se realizó se tomó 1 ml y transfirió a un matraz que contenía 800 ml de caldo MRS adicionado con 0.05% de L-cisteína, de la misma manera que la activación, esta se incubo por 24 horas a 35°C, las bacterias en fase de crecimiento estacionaria se recuperaron mediante centrifugación a 3900 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la pastilla de biomasa se disolvió con 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7) para un lavado, se sometió a centrifugación nuevamente a las mismas condiciones, de igual manera el sobrenadante se desechó y la pastilla celular se resuspendió con 2 ml de agua destilada estéril, obteniendo un promedio de 1 g de pasta celular. La pasta se mantuvo en condiciones de refrigeración a 4 °C.

### **VIII.4 Preparación y encapsulación de la solución probiótica**

Se preparó soluciones de  $\beta$ -ciclodextrina a diferentes concentraciones según el diseño experimental, estas soluciones serán esterilizadas en autoclave a 121°C durante 15 min. Las soluciones preparadas se mantuvieron a condiciones d refrigeración hasta su uso. La pasta celular obtenida de los microorganismos (*Bifidobacterium lactis*) se adicionó en la solución

de  $\beta$ -ciclodextrina para obtener 100 ml de solución probiótica y esta se mezcló con un homogeneizador (Ultra-Turrax IKA) a 5600 rpm.

Tabla 1. Diseño de experimento para el encapsulado por aspersión de *Bifidobacterium lactis*.

No. Exp	FA (mL/min)	CMP (%)
1	7.5	25.7372
2	7.5	20
3	10.37	20
4	10	25
5	5	15
6	7.5	20
7	7.5	20
8	7.5	14.2628
9	4.63	20
10	5	25
11	10	15

FA=flujo de alimentación, CMP=Concentración de material de pared

La cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC/g) en la solución probiótica (material pared- pasta celular) será determinaron por la técnica de Miles y Misra que consiste en sembrar por triplicado alícuotas de 20  $\mu$ l de cada una de las diluciones seriadas. Se realizó diluciones seriadas de 1 ml de la solución probiótica desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$  en solución amortiguadora de fosfatos, se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ l y se sembró en cajas Petri con agar MRS adicionado con L-cisteína al 0.05 %. Las placas se colocaron dentro de un desecador de policarbonato a una presión de vacío de 17 in Hg, para favorecer condiciones de anaerobiosis durante el periodo de incubación de 48 h a 35 °C.

Las bacterias contenidas en la solución probiótica fueron encapsuladas en un secador por aspersión Mini-Spray Dryer B-290. El aire que se utilizó como flujo de arrastre fue previamente filtrado y después calentado a través de resistencias eléctricas. Se utilizó un flujo volumétrico de aire caliente de 28 m<sup>3</sup>/h ajustando el aspirador a un 100% de su capacidad, un total de 11 experimentos fueron realizados, en donde se utilizaron temperaturas de entrada a 160°C y el flujo de alimentación varió dependiendo del experimento, la tabla 1 muestra los diferentes experimentos realizados.

Los polvos probióticos asperjados fueron monitoreados mediante la técnica de Miles y Misra, descrita anteriormente, durante almacenamiento.

### **VIII.5 Viabilidad de las bacterias encapsuladas**

Después del encapsulamiento por aspersión de la solución probiótica y la obtención de los polvos probióticos, se tomó 1 g de cada uno de los polvos Probióticos y se realizó diluciones seriadas desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-6</sup> en solución amortiguadora de fosfatos, de estas diluciones se tomaron alícuotas de 20 µl y se sembró en cajas Petri con agar MRS adicionado con L-cisteína al 0.05 %, siguiendo la técnica de Miles y Misra, las placas se colocaron dentro de un desecador de policarbonato a una presión de vacío de 17 in Hg, para favorecer condiciones de anaerobiosis durante el periodo de incubación de 48 h a 35 °C.

### **VIII.6 Viabilidad de las bacterias encapsuladas en condiciones ácidas y biliares**

El estudio de viabilidad en condiciones gástricas de bacterias probióticas encapsuladas se realizará siguiendo el método propuesto por Picot y Lacroix (25) con ligeras modificaciones. Las células de *Bifidobacterium lactis* serán expuestas primeramente a una solución de jugos gástricos simulados (HCl y pepsina a pH 1.9 por 30 min) y de forma continua, a una solución de jugos intestinales simulados (Sales biliares y pancreatina a pH 7.5 por 5.5 h) a una temperatura de 37°C monitoreándose los cambios en el contenido total de las bacterias vivas en la mezcla digestiva.

El jugo gástrico simulado será preparado mediante la dispersión de pepsina (0.26 g/L) en HCl 0.1N ajustando el pH a 1.9 con HCl 1N. El jugo pancreático será simulado mediante una dispersión de pancreatina (1.95 g/L) en un Buffer de fosfatos de sodio estéril (0.02M,

pH 7.5) ajustando el pH a 7.5 con NaOH 1N. La solución concentrada de sales biliares será preparada disolviendo el extracto biliar en polvo en agua destilada (150 g/L).

Para las bacterias encapsuladas, se tomarán 2 g del polvo y se colocarán en 12.5 mL de agua destilada en una probeta estéril, ajustando el pH a 1.9 con HCl 1N y el volumen a 15 mL con agua destilada estéril. Posteriormente se adicionará la solución de pepsina (5 mL), teniendo un volumen final de 20 mL. La suspensión bacteriana se incubará a 37°C (baño de agua) durante 30 min. Transcurrido este tiempo se detendrá la reacción incrementando el pH a 7.5 con NaOH 1N y se tomará una alícuota de 1 mL para determinar el número viable de células en condiciones ácidas. Inmediatamente se añadirá 1.25 mL de Buffer de fosfatos de sodio estéril (0.5M, pH 7.5) y 0.5mL de la solución de sales biliares. Se ajustará a un pH a 7.5 y un volumen a 22.5 mL con agua destilada estéril. Se añadirán 2.5 mL de jugo pancreático simulado, obteniendo un volumen final de 25 mL. Se incubará a 37°C y se tomarán alícuotas de 1 mL para la cuantificación bacteriana a 1, 3 y 6 h.

#### **VIII.7 Diseño experimental y análisis estadísticos**

Se empleó el software Statgraphics versión V.1 Centurion, para realizar el análisis de varianza con un nivel de significancia del 95%, para observar los factores significativos así como una prueba de tukey para la comparación de medias.

## IX. Resultados, planos, gráficas, prototipos y programa

### IX.1 Rendimiento de proceso

El proceso de secado por aspersion mostr6 porcentajes de rendimiento entre el 56 y 78%, con una viabilidad entre 82 y 99%, actividades de agua de 0.17 a 0.43 y con un porcentaje de humedad entre 1.3 a 13.0.

Tabla 2. Resultados del rendimiento de polvo asperjado, viabilidad, actividad de agua y porcentaje de humedad obtenidos despu6s de la microencapsulaci6n de *Bifidobacterium lactis*

No. Exp.	FA (ml/min)	CMP (%)	RPA (%)	V (%)	AW	H (%)
1	7,5	26	56	96	0,26	10,6
2	7,5	20	62	82	0,25	10,3
3	10,37	20	60	90	0,17	9,0
4	10	25	64	85	0,21	10,7
5	5	15	78	91	0,22	10,1
6	7,5	20	76	83	0,36	13,0
7	7,5	20	75	88	0,17	10,5
8	7,5	14	70	87	0,43	12,4
9	4,63	20	61	95	0,28	4,4
10	5	25	60	96	0,40	3,4
11	10	15	56	99	0,22	1,3

No. Exp. = n6mero de experimento; FA= flujo de alimentaci6n; CMP= concentraci6n de material de pared; RPA= rendimiento de polvo asperjado; V= viabilidad; AW= actividad de agua; H= porcentaje de humedad.

El estudio de rendimiento y viabilidad indica que el experimento 5 mostr6 un 78 % de rendimiento y una viabilidad del 91%, en el cual se emple6 un flujo de alimentaci6n de 5ml/min y una concentraci6n de material de pared del 15%, sin embargo, el experimento 11 es el que presenta mayor porcentaje de viabilidad con un 99 % y un rendimiento menor. Por lo que la elecci6n del mejor tratamiento ser6 con base a las diferentes variables de estudio. De igual forma todos los experimentos presentaron porcentajes de viabilidad superiores al 82 %.

La actividad de agua ( $a_w$ ) es una medida indirecta del contenido de agua que se encuentra disponible en un producto y puede participar en diferentes reacciones y así favorecer o disminuir el crecimiento microbiano. Picot y Lacroix (25) indican que los alimentos secos o deshidratados deben presentar una  $a_w$  menor a 0.6 para ser consideradas estables; esto permite asegurar que el proceso de deshidratación permite proteger a las células mediante la disminución de la actividad de agua presente en la cápsula y con ello reducir las reacciones de inactivación. Sin embargo, una menor actividad de agua ( $a_w < 0.25$ ) garantiza la estabilidad de los microorganismos probióticos encapsulados, por lo cual la mayoría de los experimentos presentan las actividades de agua menores a 0.2, lo que nos indica que las cápsulas son estables.

Posteriormente, la prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95%, indicó que el rendimiento de secado, la viabilidad, la actividad de agua y el contenido de humedad no mostraron efecto significativo (figuras 4, 5, 6 y 7). Estadísticamente los resultados en todos los parámetros medidos son iguales, es decir, que cada uno de los experimentos entre si no hay diferencia significativa, la tabla 3 nos indica los valores de  $p$  de cada análisis de varianza

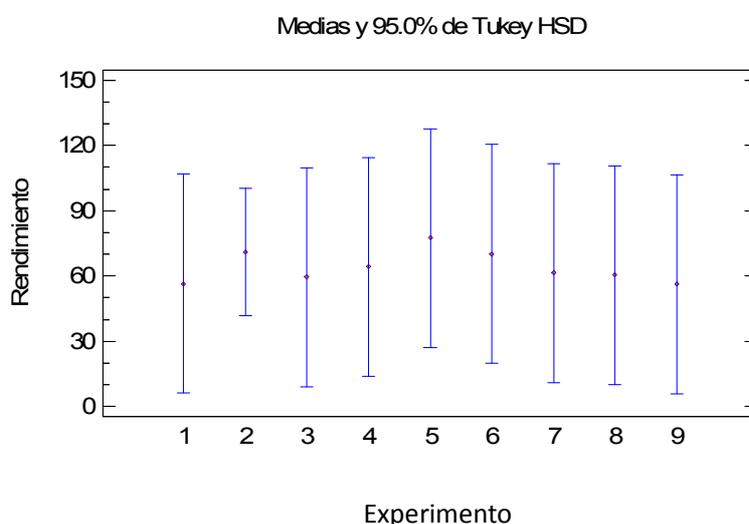


Figura 4. Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto al rendimiento del secado por aspersión.

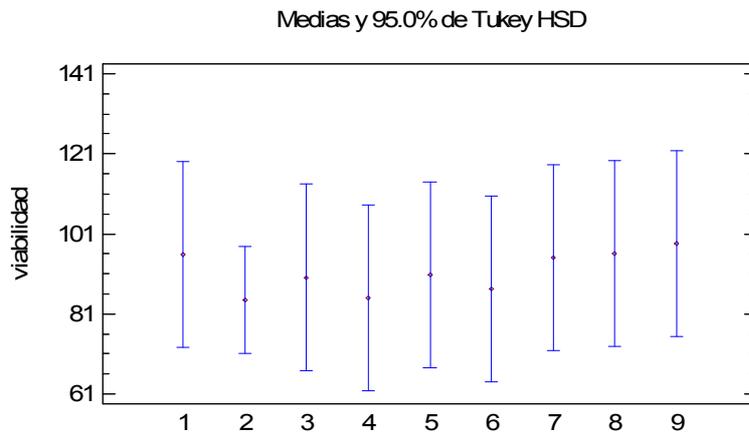


Figura 5. Prueba de tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto a la viabilidad de los microorganismos microencapsulados.

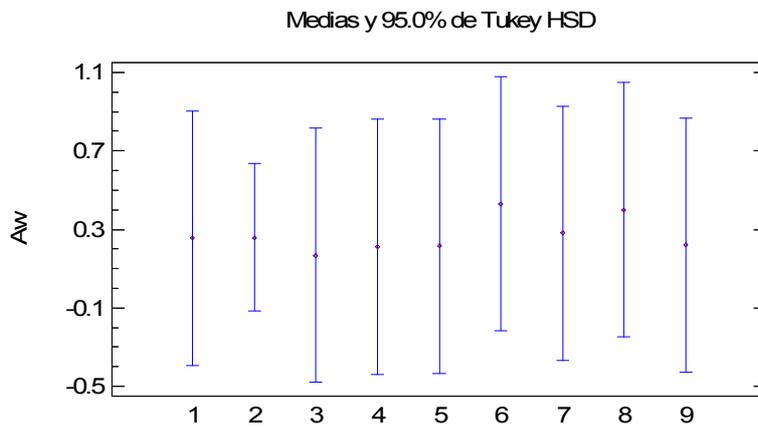


Figura 6. Prueba de tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto a la actividad de agua de los polvos probióticos.

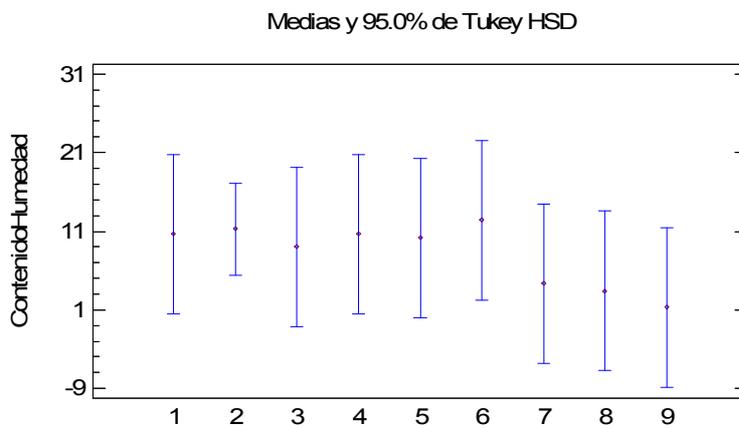


Figura 7. Prueba de tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto al contenido de humedad de los polvos probióticos.

El análisis de varianza nos indica que tratamientos tienen un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre los parámetros: rendimiento de secado por aspersión, viabilidad, actividad de agua y contenido de humedad, Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los parámetros utilizados (tabla 3).

Tabla 3. Análisis de varianza de las diferentes determinaciones en la optimización del secado por aspersión

<b>DETERMINACION</b>	<b>VALOR</b>
<i>RPA (%)</i>	
<i>Razón-F</i>	1,13
<i>Valor -p</i>	0,5498
<i>V (%)</i>	
<i>Razón-F</i>	3,13
<i>Valor -p</i>	0,2649
<i>AW (%)</i>	
<i>Razón-F</i>	0,85
<i>Valor -p</i>	0,6424
<i>H (%)</i>	
<i>Razón-F</i>	8,06
<i>Valor -p</i>	0,1151

El incremento de la velocidad del flujo de alimentación trae consigo un incremento del porcentaje de sobrevivencia, pero el rendimiento de secado es menor, esto puede deberse a la incompleta atomización y secado, resultando en una mayor protección de las células durante el proceso de asperjado.

En investigaciones se indica que *Bifidobacterium lactis*, presenta una gran resistencia a la encapsulación por aspersión, observándose con reducciones mínimas o nulas de los ciclos logarítmicos posterior al proceso de aspersión. Favaro-Trindale y Grosso (2002), presentaron porcentajes de viabilidad de alrededor del 98% para *Bifidobacterium lactis* empleando

secado por aspersión a temperaturas de 160 y 190°C, datos que resultan similares a los encontrados en este trabajo.

### **IX.3 Viabilidad de las bacterias microencapsuladas después de ser sometidas a condiciones ácidas y biliares**

Con el fin de ejercer sus efectos benéficos en el huésped, las bacterias probióticas deben estar vivas y presentarse en el momento del consumo y ser capaz de alcanzar el intestino grueso en cantidades suficientemente altas (concentraciones superiores a  $10^6$  UFC/g de producto) para facilitar la colonización y proliferación (26).

Los resultados de la prueba de simulación gástrica mostraron que todos los experimentos sin excepción presentaron un descenso marcado al ser sometidas a los jugos gástricos simulados, después tras el cambio de pH (de 1.9 a 7.5), donde ocurre el transporte del estómago al intestino, son sometidas a la presencia de las sales biliares simuladas, los experimentos presentaron estabilidad sobre la viabilidad de estas, durando aproximadamente 3 horas. En el último periodo de la simulación, *Bifidobacterium lactis* tuvo una aparente regeneración celular mostrando un incremento en la viabilidad. Como podemos ver en la figura 8 los experimentos se pueden dividir en tres grupos y los podemos clasificar en muy resistentes, regulares y baja resistencia; cabe destacar que todos los experimentos muestran concentraciones superiores al valor óptimo requerido, por lo que su efecto benéfico es viable.

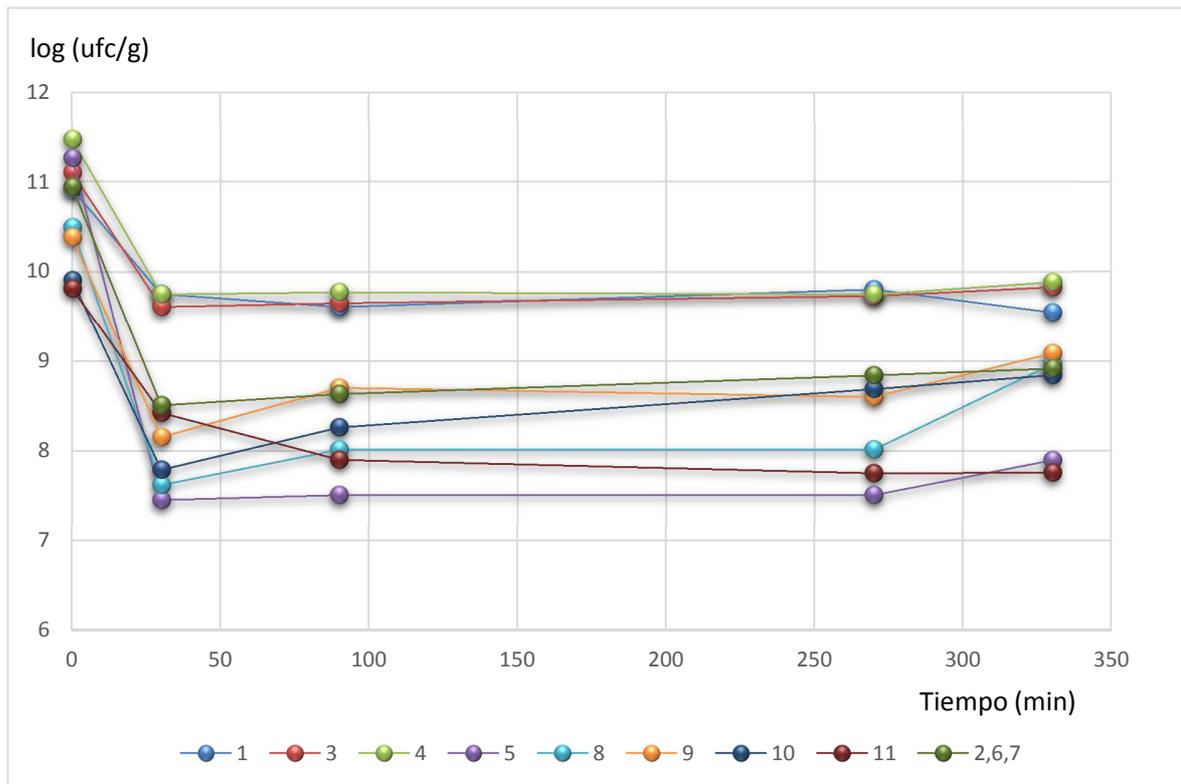


Figura 8. Viabilidad de los polvos probióticos en condiciones gástricas simuladas.

Para poder identificar que experimento fue el mejor en la prueba de simulación gástrica, no podíamos utilizar la figura 8, porque en esa grafica los valores iniciales varían en cada uno de ellos. Por lo tanto cada valor de la cinética se dividió en su valor inicial con la finalidad de que todas las cinéticas comenzaran en 1. La figura 9 muestra estos resultados.

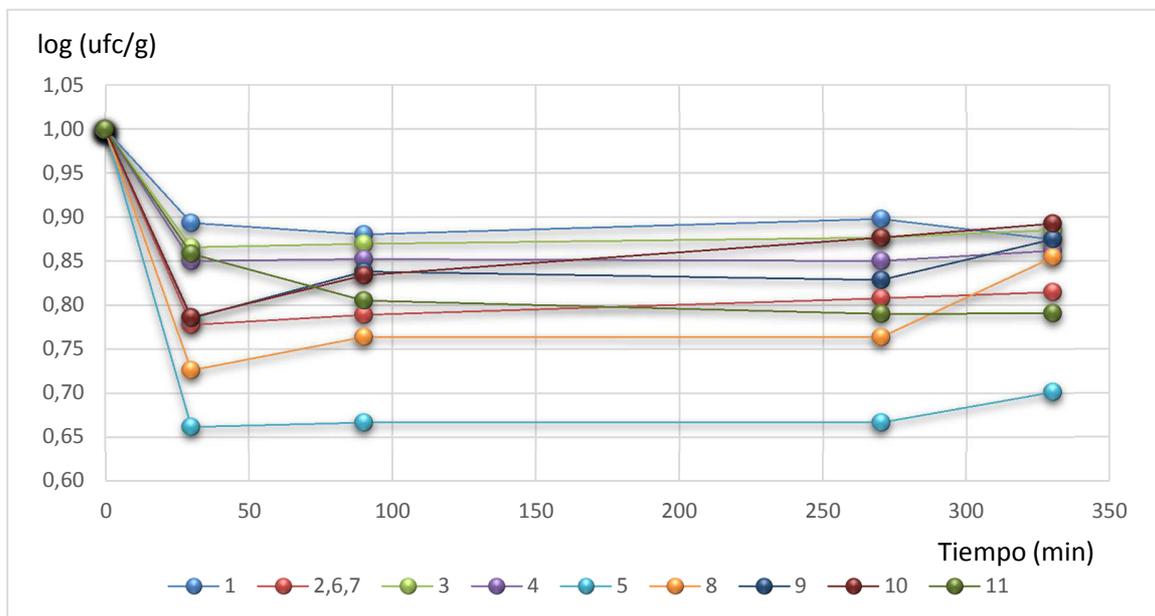


Figura 9. Viabilidad de los polvos probióticos con punto inicial único

En la figura 9 se evidenció que el experimento 1 mostró la mayor resistencia a los jugos gástricos simulados, pero no demostró tendencia a generación celular. Sin embargo, el experimento 3, aun presentando una menor resistencia en comparación al experimento 1, muestra regeneración celular permitiendo una concentración superior de  $10^6$  UFC/g superando a la cantidad de ufc/g del experimento 1. El experimento 5 exhibe ser más susceptible a la condición gástrica, esto podemos relacionarlo con el bajo rendimiento de polvo probiótico que tuvo, por lo que la cápsula no logró una cobertura total y permite el contacto de las bacterias con el ambiente dando lugar a la muerte celular. La viabilidad en todos los experimentos es evidente, y la “regeneración celular” se observa en todas las pruebas. El experimento 10 mostró tener una regeneración celular durante la estadía de las sales biliares simuladas y ser aquel con mayor regeneración en el diseño experimental. Aunque todas las pruebas estadísticamente son iguales en el secado por aspersion, en la prueba de la simulación gástrica se dan a conocer el poder de protección que le trasfiere la microencapsulación.

## **IX. Conclusiones y recomendaciones**

- La Microencapsulación mediante secado por aspersión es una técnica apropiada para poder encapsular *Bifidobacterium lactis*.
- En el proceso de secado por aspersión, un flujo de alimentación de 5 ml/min y una concentración de material de pared de un 15%, promueven un mayor rendimiento y alta viabilidad.
- Con base al diseño experimental, el flujo de alimentación y la concentración del material de pared no presentaron efecto significativo.
- La  $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica como material de pared presenta ser eficiente para la microencapsulación de *Bifidobacterium lactis* al resistir condiciones del proceso de secado por aspersión así como el proceso de gastrointestinal simulado.
- Es importante realizar réplicas de los bloques de experimentación, para poder compararlos y tener un análisis más certero y confiable.

## X. Bibliografía

- (1). Metchnikoff E (1907): *Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction*. In: The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London: 161-183.
- (2). Tissier H (1906) : *Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin*. CR.Soc Biol, 60 : 359-361.
- (3). Organización mundial de gastroenterología, 2008 probióticos y prebióticos : 3-4.
- (4). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. International Journal of food microbiology. 69: 167-182.
- (5). Castillo, J. 2005. Lactobacilos. Disponible en: <http://www.monografias.com/Trabajos15/Lactobacilos/Lactobacilos.html> (Leído 10/11/05).
- (6). Akalm, A., Fenderya, S. y Akbulut, N. 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated Storage. International Journal of Food Science and Technology. 39: 613–621.
- (7). Baron, M., Denis, R. y Vuilleumard, J. 2000. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. L`Lait 80: 465–478.
- (8). Hansen, C. 2005. Información de cultivos DVS liofilizados y congelado.
- (9). Yañez-Fernández y E. J.A. Salarzar Montoya, L. Chaires Martinez, J. hernandez, M. Marquez Robles y E. G. Ramos Ramirez. 2005. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. Mundo alimentario: 24-26.
- (10). Pedroza-Islas, R. 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la Microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola realizado en Quintana Roo. México.
- (11). Lozano-Berna M. 2009. Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de *Opuntia stricta* mediante secado por atomización. Universidad Politécnica de Cartagena. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial. España. Pp. 3-4.
- (12). Tonon R. V, Brabet C, Hubinger M. D. 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. Journal of Food Engineering. 88:411-418.
- (13). Ersus S. y Yurdagel U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. Journal of Food Engineering. 80: 805-812.

- (14). Fuller, R. 1992. Probiotics: The Scientific Basis. Chapman & Hall, New York, NY.
- (15). Berrada, N., J. F. Lemeland, G. Laroch, P. Thouvenot, and M. Piaia. 1991. Bifidobacterium from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74:409–413.
- (16). Lankaputhra W.E.V., and N. P. Shah. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* 30:2–7.
- (17). Bezkorovainy,A, 2001, Probiotics: determinants of survival and growth in the gut.: *Am J Clin Nutr.*, v. 73(suppl.), p. 399-405.
- (18). Chou,LS and B Weimer, Op. cit.
- (19). Lankaputhra W.E.V. and N. P. Shah, 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* 30:2–7.
- (20). Christiaens,H, R J Leer, P H Pouwels and W Verstraete, 1992, Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay.: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58(12), p. 3792-3798.
- (21). de Boever,P, R Wouters, L Verschaeve, P Berckmans, G Schoeters and W Verstraete, 2000, Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity.: *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 53, p. 709-714.
- (22). Gilliland,SE, C R Nelson and C Maxwell, 1985, Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*.: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, p. 377-381.
- (23). Pereira,DIA, A L McCartney and G R Gibson, 2003, An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties.: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69(8), p. 4743-4752.
- (24). Stanton,C. et.al., Op.cit.
- (25). Arnaud Picot, 2004, Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt, *International Dairy Journal*. 2004.
- (26). Shah N.P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal Dairy Science*.

