



S.E.P. TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO de Tuxtepec

**"EFECTO DE UN MULTI-COMPUESTO POLIMÉRICO EN
LA ENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus reuteri*
Y FIBRA DIETARIA DE CARAMBOLA"**

TESIS

Para Obtener el título de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA:

L.I.A. KRYSHEL RODRIGUEZ PÉREZ

DIRECTORA:

M.C. ERNESTINA PAZ GAMBOA

CO-DIRECTORA:

DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES VIVAR VERA



MCA-2016/03

TUXTEPEC, OAXACA, FEBRERO 2016

COMITE TUTORIAL

M.C. Ernestina Paz Gamboa

Dra. Maria de los Angeles Vivar Vera

Dra. Cecilia Eugenia Martínez Sanchez

Dra. Roselis Carmona García

S.E.P. TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC

**“Efecto de un multi-compuesto polimérico en la
encapsulación de *Lactobacillus reuteri* y fibra dietaria de
carambola”.**

T E S I S

Para obtener el título de:

Maestro en Ciencias en Alimentos

Presenta:

I.I.A. KRYSTHEL RODRÍGUEZ PÉREZ

Directora:

M.C.ERNESTINA PAZ GAMBOA

Co-Directora:

Dra. MARÍA DE LOS ÁNGELES VIVAR VERA

TUXTEPEC, OAXACA, FEBRERO 2016.

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtepec

SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
División de Estudios Profesionales

Procedimiento para la Titulación
Autorización de Presentación del Trabajo Profesional
Referencia a la Norma ISO 9001:2008 7.5.1

SUBDIRECCION ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
EXPEDIENTE: DEP-ñ/16
Tuxtepec, Oaxaca., **02/FEBRERO/2016**
OFICIO: No. 0348

I.I.A. KRSTHEL RODRÍGUEZ PÉREZ
EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
CON NÚMERO DE CONTROL M13350004
PRESENTE.

POR MEDIO DE LA PRESENTE ME PERMITO COMUNICARLE QUE LA COMISIÓN REVISORA INTEGRADA POR LOS C.C. **M.C. ERNESTINA PAZ GAMBOA, DRA. MARIA DE LOS ÁNGELES VIVAR VERA, DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SANCHEZ Y DRA. ROSELIS CARMONA GARCÍA** REVISÓ Y APROBÓ EN SU TOTALIDAD EL TRABAJO PROFESIONAL DENOMINADO **"EFECTO DE UN MULTI-COMPUUESTO POLIMÉRICO EN LA ENCAPSULACIÓN DE Lactobacillus reuteri Y FIBRA DIETARIA DE CARAMBOLA"** PRESENTADO POR USTED COMO PRODUCTO DE **TESIS** DEL LINEAMIENTO DE TITULACIÓN CORRESPONDIENTE, PARA OBTENER EL TÍTULO DE **MAESTRA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**.

POR LO ANTERIOR Y DE ACUERDO A LOS LINEAMIENTOS INSTITUCIONALES, SE LE DA TRÁMITE LEGAL PARA QUE PROCEDA A LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO PROFESIONAL.

ATENTAMENTE
"CIENCIA Y TÉCNICA PRESENTES AL FUTURO"

M.E. JULIAN KURI MAR
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES.

C.c.p.-Coord. de titulación
JKM/has



**SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TUXTEPEC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS
PROFESIONALES**



Av. Dr. Victor Bra C.P. 68350 Col. 5 de Mayo, Tuxtepec, Oaxaca
Teléfono: (287) 87 5 10 44 Ext. 103, Fax: (287) 87 5 18 80
e-mail: info@ittux.edu.mx



REGISTRO SGC
Código ITTUX-AC-PO-008-09
Revisión: 1
Fecha de Autorización: 19/Junio/2014

“Efecto de un multi-compuesto polimérico en la encapsulación de *Lactobacillus reuteri* y fibra dietaria de carambola”.

POR:

I.I.A. KRYSTHEL RODRÍGUEZ PÉREZ

**TESIS PROPUESTA A LA COORDINACIÓN DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN DEL**

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC

**COMO REQUERIMIENTO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

FEBRERO 2016

DEDICATORIA

A Dios

Gracias infinitas por su infinito amor, apoyo e infinitas bendiciones, por darme la fortaleza de seguir adelante y recorrer conmigo el camino para llegar satisfactoriamente a cumplir otra de mis metas.

A mis padres y hermanos

Esta tesis se la dedico a mi mamá María del Carmen y papá Oscar por su amor y apoyo incondicional que infinitamente me brindan. Gracias infinitas por sus cuidados, dedicación, desvelos y su tiempo, por los sacrificios que han tenido que realizar para ver realizados los sueños míos y de mis hermanos. A mi hermano Guillermo y Antonio por su apoyo y amor incondicional. Gracias infinitas por tenerme la paciencia en mis momentos amargos, la comprensión por mis momentos de ausencia y motivarme a seguir adelante.

A mis seres queridos del Cielo

A mis abuelos por ese amor que me demostraron en vida y que sé lo sigo recibiendo por sus bendiciones. A Vicente por su apoyo, cariño, cuidados y lealtad que tuvo conmigo y mi familia. A mi hermana Lizet por los buenos momentos compartidos.

**“LO QUE HACEMOS PARA NOSOTROS MUERE CON NOSOTROS, LO QUE HACEMOS
PARA LOS DEMÁS Y PARA EL MUNDO PERMANECE Y ES INMORTAL”.**

-ALBERT PIKE-

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTO

A mi Asesora M.C. Ernestina Paz Gamboa por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado, por guiarme con sus conocimientos, por los consejos que me han de seguir sirviendo para mi desarrollo personal y profesional, por su calidad humana y su amistad.

A la Dra. María de los Ángeles Vivar Vera por su apoyo incondicional, alegría, gran optimismo y su amistad.

A la Dra. Cecilia por el aporte que le ha dado a este trabajo de tesis y su buen trato.

A la Dra. Roselis por los consejos que me dio a lo largo de mi paso por la maestría y su apoyo en este trabajo.

Al Dr. Adrián, Dr. Cirilo y Dr. Irving por el aporte que dieron al trabajo que fue de mucha ayuda.

Al Ing. Godínez por su amabilidad y comprensión que me brindo como coordinador de la Maestría.

A los doctores que forman parte del cuerpo académico de la Maestría por sus comentarios constructivos en mi desarrollo profesional.

A doña Edith por su amable trato y consejos.

A Dhorle y Zulema por el apoyo que me brindaron en su momento y su amistad.

A mis amigos y amigas que forme en mi estancia en la Maestría por su motivación y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo y las facilidades que proporcionaron para la realización de mi estudio en el posgrado.

A ellos y más personas que formaron parte en este momento de mi vida,

¡¡¡MUCHAS GRACIAS!!!



RESUMEN

Rodríguez Pérez Krysthel. M en C en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Febrero 2016. “Efecto de un multi-compuesto polimérico en la encapsulación de *Lactobacillus reuteri* y fibra dietaria de carambola”. Directora: M.C. Ernestina Paz Gamboa. Co-Directora: Dra. María de los Ángeles vivar Vera.

Las bacterias probióticas aportan beneficios a la salud, siendo importante su incorporación a nuevos productos alimenticios. Sin embargo, presentan sensibilidad a condiciones adversas de procesamiento del producto y a través del tracto gastrointestinal. Actualmente, la encapsulación múltiple (utilización de biopolímeros e ingredientes funcionales) es la tendencia para mejorar la viabilidad de dichas bacterias. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un multi-compuesto biopolimérico de encapsulación formulado con extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola en la viabilidad y características físicas de encapsulados de *Lactobacillus reuteri*. La concentración inicial de *L. reuteri* fue de 10 Log UFC/mL. A partir del concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola (CFDBC) se obtuvo el extracto (ECFDBC) mediante filtración. Los encapsulados se obtuvieron mediante extrusión manual (aguja 21Gx32mm), las formulaciones consistieron en 2% de alginato de sodio (AlgNa), 0.015% goma xantana (GX), 2% del ECFDBC y dos tipos de quitosano: bajo y medio peso molecular (QBPM y QMPM) a 0.2 y 0.4% y un control. Se determinó el rendimiento y eficiencia de encapsulación; así como la viabilidad (0, 15 y 30 días). Se analizó la tolerancia al pH (2, 3.5, 5 y 6.5) y temperatura (70,80 y 90 °C). Se determinó el peso unitario, tamaño y fuerza de compresión a las cápsulas. Los resultados fueron analizados por medio de un ANDEVA y tratados por un modelo matemático empleando un diseño factorial 2^k , utilizando Minitab 16 y MATLAB. El rendimiento de encapsulación fue de 63.03%. El porcentaje de eficiencia aumentó significativamente con la incorporación del ECFDBC. La viabilidad durante el almacenamiento se mantuvo por el ECFDBC sin importar el tipo y concentración de quitosano. Los encapsulados de *L. reuteri* a partir de AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM



0.4% con 30 días de almacenamiento, mostraron mantener la viabilidad en valores de 7 Log UFC/mL bajo condiciones de pH 2 y 3.5 y a temperatura de 90 °C/15 min con 15 días de almacenamiento. Los encapsulados incrementaron el peso unitario y tamaño cuando se utilizaron pH superiores a 3.5, con incrementos de fuerza de compresión cuando son sometidos a pH ácido. Por lo que, es factible utilizar estos encapsulados a condiciones de pH ácidos y temperaturas elevadas.



ABSTRACT

Rodríguez Pérez Krysthel. Master in Food Science. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. February 2016. "Effect of multi-polymer compound in the encapsulation of *Lactobacillus reuteri* and starfruit dietary fiber". Advisor. M.C. Ernestina Paz Gamboa. Co-Advisor: Dra. María de los Ángeles Vivar Vera.

Probiotic bacteria provide health benefits, being important the design of new food products. However, they are sensitive to adverse food processing conditions and through the gastrointestinal tract. Currently, multiple encapsulation (use of biopolymers and functional ingredients) is the trend for improving the viability of such bacteria. The aim of this study was to evaluate the effect of a multi-encapsulation compound formulated with a biopolymer extracted from a high dietary fibre powder from carambola viability and physical characteristics of encapsulated *Lactobacillus reuteri*. The initial cell counts of *L. reuteri* was 10 Log CFU/mL. From the high dietary fibre powder from carambola (HDFPC) the extract of HDFPC was obtained by filtration. The beads were obtained manually extruded through a sterile syringe (21Gx32mm needle). The formulations consisted of 2% sodium alginate (NaAlg), 0.015% xanthan gum (XG), 2% of extracted of HDFPC, chitosan of two types: low and medium molecular weight (ChLMW and ChLMW) from 0.2 to 0.4%. The encapsulation yield and efficiency was determined; and the viability stored (0, 15 and 30 days). Test for their tolerance at pH (2, 3.5, 5 and 6.5) and temperature (70, 80, and 90 °C). The unit weight, size and beads compression mode were determined. Regression equation and ANOVA performed to determine regression coefficients with statistical significance of mathematical model qualitative variables of 2^k factorial design, using Minitab 16 and MATLAB. The encapsulation yield was 63.03%. The efficiency (%) increased significantly with the addition of EHDFPC. The viability during storage is maintained by EHDFPC, no affect the type and concentration of chitosan. Encapsulates *L. reuteri* from NaAlg-XG-EHDFPC-ChLMW 0.4% with 30 days of storage, showed maintain viability in appropriated levels of 7 log CFU/mL under conditions of pH 2 and 3.5 and temperature of 90 °C/15 min with 15 days of storage. The encapsulated increased unit weight and size when used above pH 3.5, with increments of compressive mode when subjected to acid



pH. So, it is feasible to use these encapsulated at acidic pH conditions and high temperatures.



CONTENIDO

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
CONTENIDO.....	ix
LISTA DE TABLA	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
I.INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Alimentos Funcionales	3
2.2 Probióticos	4
2.2.1 <i>Lactobacillus reuteri</i>	6
2.2.2 Factores influyentes en la viabilidad de los probióticos	7
2.3 Prebióticos	9
2.3.1 Carambola.....	10
2.4 Encapsulación	11
2.4.1 Técnicas de encapsulación	12
2.4.1.1 Extrusión.....	13
2.4.2 Materiales encapsulantes	14
2.4.2.1 Alginato.....	15
2.4.2.1.1 Estructura del Alginato	15
2.4.2.2 Goma xantana	17
2.4.2.3 Quitosano	18
2.4.2.3.1 Propiedades y características del Quitosano	19
2.4.2.3.2 Combinación del Quitosano con Microorganismos	19
2.5. Caracterización de los encapsulados.....	20
2.5.1 Métodos de liberación	20
2.6 ANTECEDENTES.....	21
2.7 JUSTIFICACIÓN	24
2.8 OBJETIVOS.....	25
2.8.1 Objetivo General	25
2.8.2 Objetivos específicos	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
CONTENIDO	ix



3.1 Condiciones de cultivo	26
3.2 Obtención del Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.....	27
3.2.1 Determinación del contenido de Fibra dietaria Soluble en el ECFDBC.	28
3.3 Esquema general del trabajo experimental.....	28
3.4 Formulación del multi-compuesto encapsulante.....	29
3.5 Obtención del multi-compuesto biopolimérico formulado con ECFDBC en la encapsulación de <i>L. reuteri</i>	30
3.6 Liberación del <i>L. reuteri</i> de los encapsulados	31
3.7 Determinación de la Eficiencia y Rendimiento de la encapsulación	31
3.8 Determinación de la viabilidad durante el almacenamiento de <i>L. reuteri</i> encapsulado.	32
3.9 Determinación de la tolerancia a pH de <i>L. reuteri</i> libre y encapsulado	32
3.10 Determinación de termotolerancia de <i>L. reuteri</i> libre y encapsulado	33
3.11 Caracterización física de los encapsulados	33
3.11.1 Determinación del tamaño de las cápsulas	33
3.11.2 Determinación del Peso unitario de las cápsulas	33
3.11.3 Resistencia mecánica	34
3.12 Análisis estadístico.....	34
3.12.1 Diseño experimental.....	34
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4. 1 Determinación de la eficiencia de encapsulación de <i>L. reuteri</i> utilizando un multi-compuesto biopolimérico formulado con extracto de fibra dietaria de bagazo de carambola (ECFDBC).....	37
4.1.1 Determinación de la viabilidad durante los 0, 15 y 30 días de almacenamiento a 4 °C de <i>L. reuteri</i> encapsulado	41
4.2 Determinación de la tolerancia a pH de <i>L. reuteri</i> libre y encapsulado	45
4.3 Determinación de la termotolerancia de <i>L. reuteri</i> libre y encapsulado	52
4.4 Caracterización física de encapsulados de <i>L. reuteri</i>	54
4.4.1 Determinación de peso unitario, tamaño y fuerza de compresión durante el almacenamiento a 4 °C	54
4.4.2 Determinación del peso unitario, tamaño y fuerza de compresión de la formulación AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4 sometida a diferentes valores de pH.	59
V. CONCLUSIONES	64
VI. REFERENCIAS.....	65



LISTA DE TABLA

Tabla 1. Microorganismos empleados comúnmente como probióticos.....	5
Tabla 2. Retos involucrados en la incorporación de probióticos en alimentos.....	8
Tabla 3. Materiales empleados en la encapsulación.....	15
Tabla 4. Composición químico proximal del Concentrado de Fibra dietaria obtenido a partir del bagazo de carambola.....	11
Tabla 5. Formulación de cápsulas con mezcla de biopolímeros y ECFDBC	30
Tabla 6. Niveles codificados del diseño experimental.....	35
Tabla 7. Niveles codificados del diseño experimental.....	36
Tabla 8. Número de células viables antes y después de la encapsulación con y sin ECFDBC	38
Tabla 9. Eficiencia de la encapsulación.....	38
Tabla 10. Viabilidad de los encapsulados con QBPM después de someter a diferentes pHs durante 0 días de almacenamiento a 4°C.....	46
Tabla 11. Viabilidad de los encapsulados con QBPM después de someter a diferentes pHs a los 15 días de almacenamiento a 4°C.....	47
Tabla 12. Viabilidad de los encapsulados con QBPM después de someter a diferentes pHs a los 30 días de almacenamiento a 4°C.....	487
Tabla 13. Viabilidad de los encapsulados con QMPM después de someter a diferentes pHs a los 0 días de almacenamiento a 4°C.....	509
Tabla 14. Viabilidad de los encapsulados con QMPM después de someter a diferentes pHs a los 15 días de almacenamiento a 4°C.....	50
Tabla 15. Viabilidad de los encapsulados con QMPM después de someter a diferentes pHs a los 30 días de almacenamiento a 4°C.....	51
Tabla 16. Evaluación de la viabilidad de los encapsulados por efecto del tratamiento térmico a 70 °C por 10 y 15 min.....	53
Tabla 17. Evaluación de la viabilidad de los encapsulados por efecto del tratamiento térmico a 80 °C por 10 y 15 min.....	53



Tabla 18. Evaluación de la viabilidad de los encapsulados por efecto del tratamiento térmico a 90 °C por 10 y 15 min.....	53
Tabla 19. Determinación del Peso unitario de encapsulados de <i>L. reuteri</i> durante los días de almacenamiento a 4 °C.....	55
Tabla 20. Determinación del Tamaño de encapsulados de <i>L. reuteri</i> durante los días de almacenamiento a 4 °C	55
Tabla 21. Peso unitario de las cápsulas sometidas a diferentes pHs.....	598
Tabla 22. Tamaño de las cápsulas sometidas a diferentes pHs	59
Tabla 23. Fuerza de compresión de las cápsulas sometidas a diferentes pHs	60
Tabla 24. Peso de las cápsulas sometidas a diferentes temperaturas	62
Tabla 25. Tamaño de las cápsulas sometidas a diferentes temperaturas.....	62
Tabla 26. Fuerza de compresión de cápsulas sometidas a diferentes temperaturas	62



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Factores influyentes en la viabilidad de los probióticos.....	7
Figura 2. Representación del principio de funcionamiento del extrusor	13
Figura 3. Montaje empleado a nivel laboratorio en la obtención de cápsulas por gelificación iónica usando una bomba peristáltica	14
Figura 4. Monómeros de ácido algínico.....	15
Figura 5. Bloques poliméricos de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G).....	16
Figura 6. "Modelo de la caja de huevo" ilustrando formación de gel con un ion divalente de calcio.....	16
Figura 7. Estructura química del quitosano.....	18
Figura 8. Obtención del Concentrado de fibra dietaria a partir del bagazo de carambola (<i>Averrhoa carambola</i>)	27
Figura 9. Obtención del ECFDBC.....	27
Figura 10. Esquema conceptual del trabajo.....	29
Figura 11. a) Encapsulados de <i>L. reuteri</i> con ECFDBC; b) Encapsulados de <i>L. reuteri</i> sin ECFDBC	37
Figura 12. Superficie de respuesta de la viabilidad durante el almacenamiento de <i>L. reuteri</i> encapsulado sin ECFDBC recubiertos con quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 0.2 y 0.4%	43
Figura 13. Superficie de respuesta de la viabilidad durante el almacenamiento de <i>L. reuteri</i> encapsulado con ECFDBC recubiertos con quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 0.2 y 0.4%	43
Figura 14. Superficie de respuesta de la viabilidad durante el almacenamiento de <i>L. reuteri</i> encapsulado sin ECFDBC recubiertos con quitosano de medio peso molecular a una concentración de 0.2 y 0.4%	44
Figura 15. Superficie de respuesta de la viabilidad durante el almacenamiento de <i>L. reuteri</i> encapsulado con ECFDBC recubiertos con quitosano de medio peso molecular a una concentración de 0.2 y 0.4%	44
Figura 16. Gráficas de contorno de la fuerza de compresión de encapsulados de <i>L. reuteri</i> durante el almacenamiento a 4 °C	58

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

El mercado mundial de alimentos y bebidas funcionales, ha tenido un crecimiento importante en los últimos años proyectando para el año 2013 cifras del orden de los US\$ 90,5 billones (López-Córdoba, 2012). Las condiciones del tracto gastrointestinal, caracterizado por cambio de pH que tiene lugar durante el jugo gástrico y secreciones de sales biliares, siempre han sido un factor limitante tanto para la capacidad de sobrevivir y la entrega efectiva de los probióticos a su lugar de destino en el intestino delgado; además, la sensibilidad de las bacterias a temperaturas drásticas, el cambio durante el almacenamiento y el procesamiento son otros factores que limitan la multi-aplicación de probióticos en la industria alimentaria y farmacéutica. Como tal, un mínimo consumo probiótico de 6-7 Log UFC por gramo de un producto manufacturado es requerido para que ejerza beneficios funcionales. La incorporación de estos probióticos en cápsulas de componentes poliméricos es un método emergente para reducir la muerte celular durante el procesamiento y almacenamiento, así como una oportunidad para controlar la liberación de estas células a través del tracto intestinal. Esta técnica consiste en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto bioactivo mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica. 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 costo (Montes-Ramírez, 2013). La técnica de extrusión es un proceso físico que consiste en hacer pasar la solución con los microorganismos vivos por un inyector a presiones altas y bajo condiciones controladas, proceso denominado “prilling” (Burgain et al., 2011). Se considera el proceso más simple de encapsulación, y de mejores resultados, pues genera partículas esféricas y muy estables. Entre todos los materiales de encapsulación, el más ampliamente utilizado es el alginato, que es un heteropolisacárido lineal de ácidos D-manurónico y L-gulurónico, y se extrae de varias especies de algas. Las propiedades funcionales del alginato como material



de apoyo son fuertemente asociadas con la composición y la secuencia de sus monómeros. Sin embargo, el gel es susceptible a la desintegración en presencia de un exceso de iones monovalentes, Ca^{2+} , agentes quelatizantes y fuertes ambientes químicos. Algunas tecnologías de encapsulación han considerado el uso de diversos agentes de preservación que adicionados a la mezcla del material pared, tienen efectos de protección frente a los agentes activos encapsulados, durante la aplicación de la tecnología, el almacenamiento y algunos de ellos tras el consumo. El uso de goma xantana provoca una excelente protección de los probióticos contra ambientes ácidos y temperaturas altas además, de que estudios han demostrado la interacción molecular que tiene con el alginato, que conduce a la formación de un complejo-matriz-estructura (Fareez et al., 2015). De igual forma, el recubrimiento de cápsulas de alginato con poli-cationes puede mejorar la estabilidad química y mecánica de perlas de alginato, en consecuencia, mejorar la eficacia de encapsulación y para esto se han obtenido muy buenos resultados utilizando como revestimiento otro polímero como el quitosano ya que, no se disuelve en presencia de quelantes de Ca^{2+} o agentes antigelificantes y por lo tanto, mejora la estabilidad del gel. Algunas tecnologías de encapsulación han considerado el uso de diversos agentes de preservación que adicionados a la mezcla del material pared, tienen efectos de protección frente a los agentes activos encapsulados, durante la aplicación de la tecnología, el almacenamiento y algunos de ellos tras el consumo. Los prebióticos considerados como un ingrediente alimentario no digerible, son fundamentalmente de naturaleza polimérica y oligosacáridos que al no ser digeridos por las enzimas humanas, benefician de manera selectiva el crecimiento y actividad de los microorganismos benéficos del intestino. Su adición puede favorecer la viabilidad y acción de estos microorganismos benéficos en el tracto gastrointestinal. Debido al efecto que causa una mezcla de polímeros como un buen potencial protector como materiales de encapsulación, pueden proporcionar una mejor protección de los probióticos en los alimentos y, finalmente, en el tracto intestinal.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO



II. MARCO TEÓRICO

2.1 Alimentos Funcionales.

Los alimentos funcionales son aquellos que además de aportar los nutrientes básicos, otorgan beneficios adicionales en una o más funciones del organismo humano. Un alimento puede convertirse en funcional siguiendo alguna de las siguientes estrategias o sus combinaciones (López-Córdoba, 2012):

- Se pueden eliminar componentes perjudiciales presentes en el alimento (Ejemplo: alérgenos).
- La acción de incrementar la concentración de un componente presente de forma natural en el alimento hasta alcanzar niveles en que pueda inducir los beneficios esperados (Ejemplo: fortificación con micronutrientes) o incrementando la concentración de una sustancia no nutritiva hasta niveles en que se conoce su efecto beneficioso.
- El añadir un componente que no está presente de forma natural en el alimento y que no es necesariamente un macronutriente o micronutriente, pero cuyos efectos beneficiosos son reconocidos (Ejemplo: prebióticos, antioxidantes no vitamínicos).
- Con la sustitución de un componente, generalmente un macronutriente (Ejemplo: grasas), cuyo consumo excesivo tenga efectos perjudiciales por un componente de reconocido efecto (Ejemplo: inulina).
- Y con el incremento de la biodisponibilidad o estabilidad de un componente que se sepa que es capaz de producir un efecto funcional o reducir un potencial riesgo de enfermedad del propio alimento.

Los alimentos funcionales han tenido un crecimiento importante en los últimos años, trayendo consigo ganancias importantes (US\$ 90,5 billones) por lo que, las empresas buscan elaborar alimentos funcionales con características específicas para mercados exigentes y dispuestos a pagar un poco más por alimentos diferentes



a los convencionales (López-Córdoba, 2012). Generalmente los productos funcionales pueden contener uno de los siguientes ingredientes o una combinación de estos, involucrando en ello a los alcoholes del azúcar, ésteres de esteroides, diacilglicerol, proteínas de soja, péptidos, calcio, hierro, glucósidos, polifenoles, prebióticos como la fibra dietaria y probióticos como las bacterias ácido lácticas.

Se han desarrollado un sin número de productos funcionales, muy comúnmente, sobre la base de la incorporación de microorganismos probióticos por el efecto funcional que poseen al incorporarlos en los alimentos, siendo principalmente los productos lácteos los más comunes y tradicionales en el mercado (Amorós-López, 2013).

2.2 Probióticos.

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedero (FAO, 2002; Vodnar & Socaciu, 2014). Algunos requisitos que deben cumplir los microorganismos probióticos son (Amorós-López, 2013):

- Estar correctamente identificados a nivel de género, especie y cepa.
- Ser de origen humano, por poseer mayor facilidad para colonizar el intestino humano.
- Carecer de patogenicidad, de factores de virulencia y de la capacidad de producir metabolitos indeseables.
- Estar reconocidos como seguros por sus siglas en inglés GRAS (Generally Recognized As Safe).
- Mostrar tolerancia a las condiciones del entorno donde ejercen el beneficio.
- Ser viables en el momento de consumo y que se verifique su funcionalidad probiótica en ensayos de intervención en humanos.

Los probióticos se han utilizado para el alivio de enfermedades específicamente del tracto gastrointestinal. Los beneficios que podemos obtener a partir de la ingesta de probióticos son: reducción de intolerancia a la lactosa, protección frente agentes



infecciosos y la proliferación de especies microbianas con potencial patógeno como *Helicobacter pylori* y *E. coli*, síntesis de vitaminas esenciales, aumento de absorción de minerales y modulación del sistema inmune (De la Cruz-Molina & Terán- Ratti, 2013; Amorós-López, 2013).

Estos se encuentran bien establecidos en los productos lácteos, pero se espera que su uso a futuro se expanda considerablemente en la utilización de otros productos.

Los principales microorganismos usados como probióticos, son considerados en dos géneros: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Algunos ejemplos de estos microorganismos aparecen en la Tabla 2 que se muestra a continuación, la mayoría pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas. Que se conocen como BAL por su capacidad de convertir los hidratos de carbono en ácido láctico, y pueden ser homofermentativas o heterofermentativas (Amorós-López, 2013).

Tabla 1. Microorganismos empleados comúnmente como probióticos

Especies de <i>Lactobacillus</i>	Especies de <i>Bifidubacterium</i>	Otras bacterias ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Leuconstoc mesenteorides</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>

Fuente: Amorós-López, 2013.

Los *Lactobacillus* crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6.4-4.5, y con un óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 3.6 hasta 4.0 en dependencia de especies y cepas, y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos.



La mayor parte de los *Lactobacillus* son mesófilos (30-40 °C), con un límite superior de 40 °C (Caicedo-Cipagauta, 2010).

2.2.1 *Lactobacillus reuteri*.

Lactobacillus reuteri (*L. reuteri*) es una bacteria mesófila (37 °C) Gram-positiva que naturalmente habita en el intestino de los mamíferos y aves, y su crecimiento es óptimo en pH de 6.5. Fue descrita por primera vez a principios de 1980, nombrando a la especie "reuteri", en honor a su descubridor Gerhard Reuter. Esta bacteria está ahora bien establecida como uno de los miembros más ubicuos de las bacterias intestinales presentes en la naturaleza. Un descubrimiento relacionado es que cada huésped animal parece tener una cepa huésped específico de *L. reuteri*, por ejemplo, una cepa de rata para las ratas, una cepa porcina de los cerdos, etc. La universalidad de la *L. reuteri*, en conjunto con esta evolucionada especificidad de huésped, ha llevado a los científicos para hacer inferencias sobre su importancia en la promoción de la salud del organismo huésped (Giancarlo, 2012).

A finales de 1980, Walter Dobrogosz, Casas Iván, y sus colegas descubrieron que *L. reuteri* produce una novedosa sustancia de amplio espectro antibiótico a través del organismo durante la fermentación del glicerol. Llamaron a esta sustancia "reuterina". La reuterina es un multi-potente compuesto antimicrobiano producido por *Lactobacillus reuteri* (Schell & Beermann, 2014), durante el metabolismo del glicerol en 1,3-propanodiol catalizada por la coenzima B12- dependiente de diol deshidratasa. Consta de 3-hidroxi propionaldehído, su hidrato, y su dímero en equilibrio dinámico. A concentraciones superiores a 1,4 M, el dímero de HPA es predominante; a concentraciones relevantes para los sistemas biológicos, el hidrato HPA es más abundante, seguido por la forma aldehído. Es soluble en agua, eficaz en una amplia gama de pH, resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas, y se ha estudiado como un conservante de alimentos o agente terapéutico auxiliar. Su producción *in situ* en los alimentos mediante la aplicación de *L. reuteri* y glicerol se considera una alternativa a su adición directa como bioconservante (Giancarlo, 2012).



De hecho, a principios de 2008 se confirmó que es capaz de producir reuterina en el tracto gastrointestinal, y que esta mejora su capacidad para inhibir el crecimiento de *E. coli* (Giancarlo, 2012).

2.2.2 Factores influyentes en la viabilidad de los probióticos.

La viabilidad de las células probióticas en los productos a los que se incorporan es un aspecto de gran importante (Figura 1). Las cepas deben mostrar un buen crecimiento hasta elevadas concentraciones durante la obtención de biomasa, y posteriormente, resistencia a las condiciones de procesado y almacenamiento. El requisito de viabilidad implica además que, cuando estas células son ingeridas, deben sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal y, de cierto modo, mantener activa su capacidad para interactuar con el epitelio o microbiota intestinal, según su mecanismo de acción (Amorós-López, 2013). Ya que, para obtener los beneficios que prometen estos microorganismos deben permanecer en un nivel de viabilidad no menor a 10^6 - 10^7 UFC mL⁻¹ o g⁻¹ de producto en el momento del consumo (FAO/OMS 2002; Kamalian et al., 2014).



Figura 1. Factores influyentes en la viabilidad de los probióticos.



Los alimentos pueden ser utilizados como un vehículo eficaz para la entrega de compuestos bioactivos y micronutrientes en los niveles adecuados. Sin embargo, existen numerosas investigaciones que afirman la pérdida de viabilidad de las células probióticas en condiciones de procesado y almacenamiento (Tabla 2), y sobre todo, una gran pérdida asociada con su paso a través del estómago e intestino, lo cual se atribuye a la elevada acidez y concentraciones de sales biliares en los mismos (Amorós-López, 2013).

Tabla 2. Retos involucrados en la incorporación de probióticos en alimentos.

Aspectos	Retos de los probióticos
Factores asociados en el procesamiento de alimentos.	- El tratamiento con calor y el secado mejoran la vida de anaquel de un alimento, pero son perjudiciales para la viabilidad de las bacterias probióticas. - La restricción de la multiplicación de células bacterianas probióticas, una vez adicionada al alimento, provoca deterioro del producto. - Las condiciones perjudiciales para la supervivencia de cultivos probióticos en productos lácteos fermentados por: acidez, pH, peróxido de hidrógeno, temperatura de almacenamiento.
Exposición a ácido gástrico presente en el estómago.	La tolerancia a ácido es una cualidad importante que una cepa probiótica debe poseer porque el pH gástrico está alrededor de 2.0. Esta tolerancia puede ser mejorada por diversas vías: regulación de los genes responsables para la protección al estrés y por adaptación al medio ambiente ácido.
Exposición a sales biliares presentes en el fluido intestinal.	- La capacidad de supervivencia en el tránsito mediante el intestino delgado y la tolerancia hacia sales biliares presentes. - Algunas cepas son capaces de desconjugar los ácidos biliares usando la enzima hidrolasa sal biliar.
Intolerancia al oxígeno de cepas probióticas.	- El contenido de oxígeno y el potencial redox del medio ambiente son muy importantes para la viabilidad de los probióticos. - Las cepas probióticas anaerobias son directamente afectadas por la presencia de oxígeno en el ecosistema microbiano intestinal y en condiciones de estrés oxidativo exógeno, causando extensión de la fase Log y limitación del crecimiento, morfología celular alterada y cambios en los perfiles de ácidos grasos celulares.

Fuente: Pérez-Leonard et al., 2013.

La incorporación puede ser bajo la modalidad de cepas simples o múltiples y algunas veces combinadas con elementos o sustancias con carácter prebiótico, obteniéndose en este caso un efecto sinérgico entre ambos componentes, que afecta beneficiosamente al hospedero (Amorós-López, 2013). Ello puede realizarse



bajo técnicas muy diversas: simple agregado al producto, o buscando un medio que permita la protección a estos microorganismos, por lo que, el reto tecnológico en el desarrollo de productos funcionales con probióticos, es preservar la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos benéficos adicionados, en la cantidad adecuada según la legislación.

Para ello se ha planteado la aplicación de tecnologías como la encapsulación, el cual es un tema de investigación actual, así como, la utilización de agentes prebióticos, que se proponen pueden mejorar la viabilidad de los microorganismos probióticos en los alimentos y productos que los contienen, además de mantener su viabilidad durante el paso por el tracto gastrointestinal (García-Ceja et al., 2012).

2.3 Prebióticos.

Los prebióticos son considerados como un ingrediente alimentario no digerible, son fundamentalmente de naturaleza polimérica y oligosacáridos que al no ser digeridos por las enzimas humanas, benefician de manera selectiva el crecimiento y actividad de los microorganismos benéficos del intestino (Chávarri et al., 2010; Montes-Ramírez, 2013).

Algunos criterios considerados para la clasificación de ingredientes alimentarios como prebióticos incluyen: a) no debe ser hidrolizado ni absorbido en el tracto gastrointestinal, b) su fermentación debe ser por microorganismos potencialmente benéficos para el colon, c) alteración de la microflora colónica con efectos saludables y d) inducir beneficios para la salud del consumidor (Montes-Ramírez, 2013).

Algunos investigadores se refieren a los prebióticos como fibra, ya que este último es más familiar para los consumidores. La fibra dietaria (FD) incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias vegetales asociadas, que son resistente a la digestión y absorción en el intestino humano, con una fermentación parcial-completa en el colon por bacterias benéficas. Fracciones tanto de fibra insoluble (FDI) y fibra soluble (FDS) tienen respuestas fisiológicas y gastrointestinales que se



han considerado de largo beneficio a la salud, incluyendo la reducción del cáncer, la obesidad, enfermedades cardiovasculares, la hipercolesterolemia y riesgos de diabetes tipo II; en consecuencia, el consumo de alimentos que contiene FD es muy recomendable (Pantaleón- Velasco et al., 2014).

El interés en alimentos ricos en FD y antioxidantes se ha incrementado en décadas recientes y la importancia de estos constituyentes de los alimentos ha estimulado el desarrollo de un gran mercado para productos e ingredientes ricos en FD y antioxidantes.

Las frutas son rica fuente de fitoquímicos principalmente polifenoles y carotenoides que tienen la capacidad de captación de radicales libres, presentando actividad antioxidante. Por lo tanto, el consumo regular de frutas podría prevenir o reducir significativamente el riesgo de desarrollo de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, etc.

2.3.1 Carambola.

La Carambola o fruta estrella (*Averrhoa carambola*) es una fruta tropical perteneciente a la familia Oxilidaceae y se cultiva ampliamente en el sur Asia Oriental y muchos otros países como la India. Es una fruta de gran demanda que se consume ya sea fresco o transformada en una amplia variedad de productos, principalmente jugos y otras bebidas. Se usa tradicionalmente para el tratamiento de un número de dolencias. Contiene importante fitoquímicos como alcaloides, flavonoides y taninos. Los principales antioxidantes polifenólicos en carambola consisten en ácido L-ascórbico, epicatequina, ácido gálico en formas galotanino y proantocianidinas (Saikia et al., 2015). El subproducto o bagazo de la carambola se sabe contiene mucho mayor actividad antioxidante que la del jugo extraído (Pantaleón- Velazco et al., 2014; Saikia et al., 2015).

Lo que ha impulsado al desarrollo de nuevos procedimientos tecnológicos para la obtención de un concentrado de fibra dietaria a partir del bagazo de carambola (CFDBC) con casi 50% de FD, con polifenoles y actividad antioxidante (Tabla 3),



además de propiedades funcionales que sugieren su uso como ingrediente funcional (Pantaleón- Velazco et al., 2014).

Tabla 3. Composición químico proximal del Concentrado de Fibra dietaria obtenido a partir del bagazo de carambola.

Componente (g/100 g)	Concentrado de Fibra dietaria
Grasas	12.13
Proteínas	1.95
Cenizas	1.36
Fibra cruda	17.69
Carbohidratos	66.87
Azúcares reductores	1.77
Polifenoles	6.05
Actividad antioxidante	443.85
Fibra dietaria Soluble	16.57
Fibra dietaria Insoluble	67.44
Fibra dietaria Total	84.01

Fuente: Pantaleón-Velasco et al., 2014.

2.4 Encapsulación.

Es una tecnología utilizada para “atrapar” células microbianas en matrices poliméricas sin que exista exposición superficial de los probióticos al medio externo, para protegerlos de los factores ambientales perjudiciales, tales como, alta acidez, sales biliares, condiciones de procesamiento, etc. (Eng-Seng et al., 2011; Pérez-Leonard et al., 2013; Dong et al., 2013). Puede ampliamente clasificarse en dos tipos basados en el tamaño de la cápsula polimérica producida, es decir, macroencapsulación y microencapsulación. La macroencapsulación es el atrapamiento de las células en perlas poliméricas de tamaño que van desde unos pocos milímetros a centímetros, por otro lado, la microencapsulación produce cápsulas en el rango de tamaño de 1-1000 μm (Rathore et al., 2013).

Algunos de los propósitos de aplicar tecnología de encapsulación en la industria de alimentos son (López-Córdoba, 2012):

- La protección del compuesto activo de la degradación producida por el ambiente



(calor, aire, luz, humedad, etc.)

- La liberación controlada del compuesto activo desde la matriz encapsulante bajo condiciones específicas (pH, temperatura, etc.).
- La modificación en las características físicas del material original que haga más fácil su manipuleo. Por ejemplo, reducir la higroscopicidad, modificar su densidad, distribuir el material uniformemente en una muestra, convertir materiales líquidos en polvo, entre otros.
- El enmascarar sabores desagradables.
- Y la separación de componentes con el fin de que éstos no reaccionen.

Actualmente se utilizan una gran variedad de biopolímeros para formar encapsulaciones sencillas y múltiples. La selección se basa en sus características y propiedades, así como la compatibilidad que se puedan tener entre sí cada uno de ellos para realizar dicha interacción y formar más de una capa (García-Ceja et al., 2012). En cualquier técnica de encapsulación empleada, el proceso de encapsulación consiste en formar la primera capa con alguno de los biopolímeros para inmovilizar al agente activo y después se cubre a las cápsulas con el segundo material. Este proceso de encapsulación múltiple protege aún más al compuesto activo (Arzate-Vázquez et al., 2012).

2.4.1 Técnicas de encapsulación.

Existen diversas técnicas para la producción de encapsulados los cuales se dividen en dos grupos: procesos químicos y mecánicos. En los procesos químicos se encuentra el método de gelificación iónica; mientras que en los procesos mecánicos están los métodos de secado por aspersión, emulsión y extrusión, por mencionar algunos (García-Ceja et al., 2012).

Actualmente los procesos más empleados en la industria de alimentos son el secado por atomización y la extrusión, principalmente, debido al costo accesible y la producción en serie de encapsulados por medio de estos mecanismos. La selección del proceso de encapsulación adecuado dependerá de múltiples factores,

tales como: el tamaño partícula requerido, las propiedades fisicoquímicas del material encapsulante y el compuesto activo, la finalidad del producto encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (López-Córdoba, 2012).

2.4.1.1 Extrusión.

En la industria, la extrusión consiste en la utilización de un flujo continuo de materia primas para la obtención de productos, generalmente metalúrgicos, plásticos y alimenticios, en la que las materias primas son sometidas a fusión, presión, transporte o deformación. La partícula comienza a formarse como un menisco líquido en forma de cono invertido, en la punta de la aguja una vez que se suministra el aire al generador de partículas. Cuando el líquido fluye hacia abajo forma un filamento que se rompe y crea una forma esférica. El tamaño de la gota se puede controlar haciendo pasar una corriente de aire (aire de corte), para ejercer mayor fuerza para que se desprenda la gota (Figura 2).

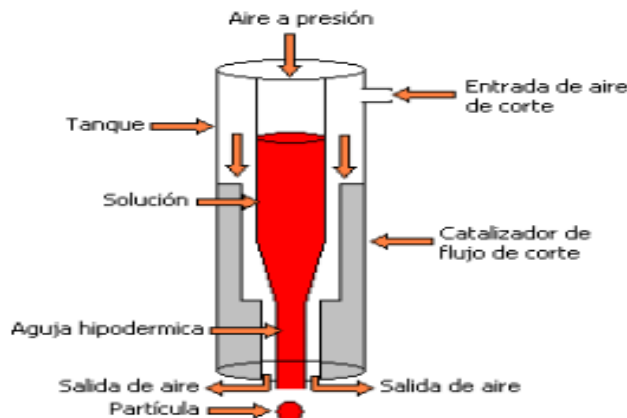


Figura 2. Representación del principio de funcionamiento del extrusor.

Fuente: González-Alvarado, 2009.

En términos simples consiste en preparar una solución hidrocoloidal, adicionar los microorganismos a esta y hacerla pasar por una aguja de jeringa (a nivel laboratorio) (Figura 3), o tubos de extrusión (para planta piloto), para formar gotas, estas dejan caer en caída libre a una solución endurecedora (como el cloruro de calcio). El

tamaño y la forma de la cápsula 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 (López-Córdoba, 2012; Pérez-Leonard et al., 2013).



Figura 3. Montaje empleado a nivel laboratorio en la obtención de cápsulas por gelificación iónica usando una bomba peristáltica.

Fuente: López-Córdoba, 2012.

2.4.2 Materiales encapsulantes.

Los biopolímeros son utilizados en diferentes áreas como la biomedicina, alimentaria y farmacéutica para formar, proteger y transportar los compuestos activos que van dirigidos a diferentes funciones específicas. Los biopolímeros se clasifican de acuerdo a su origen en naturales y sintéticos (García-Ceja et al., 2012).

En el caso de los microorganismos probióticos, normalmente se emplean como material de encapsulación polisacáridos de diferentes orígenes (Tabla 4).

Tabla 4. Materiales empleados en la encapsulación.

Clasificación	Agente encapsulante
Proteínas	Proteína de soya, gluten, caseína.
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, aceites, ácido esteárico.
Polisacáridos	Carragenina, Goma de Gellan, Alginato, Quitosano, Goma Xantana.

Fuente: Dong et al., 2013.

2.4.2.1 Alginato.

El alginato es un componente de la pared celular de las algas pardas de la familia de las “feofíceas”. En su estado natural, los alginatos se presentan como una mezcla de sales de los cationes que comúnmente se localizan en el agua de mar, principalmente Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ (González-Alvarado, 2009; Avendaño-Romero et al., 2013).

2.4.2.1.1 Estructura del Alginato.

Es un polisacárido aniónico, formado por residuos de los ácidos β -D manurónico (M) y α -L gulurónico (G) en bloques alternados y unidos mediante enlaces 1→4 (Figura 4 y 5) (Pérez-Leonard et al., 2013; Kamalian et al., 2014).

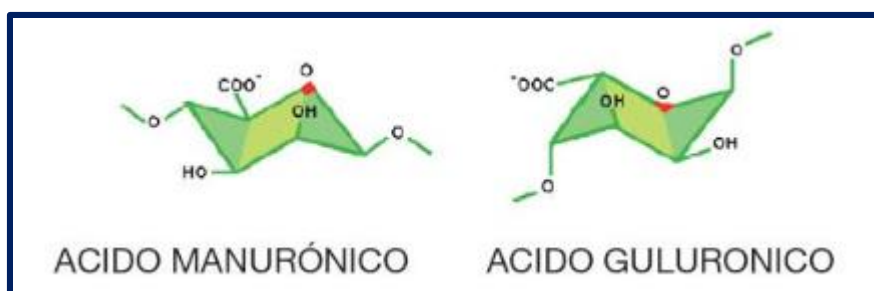


Figura 4. Monómeros de ácido algínico

Fuente: Cuatzo-Lozano, 2010.

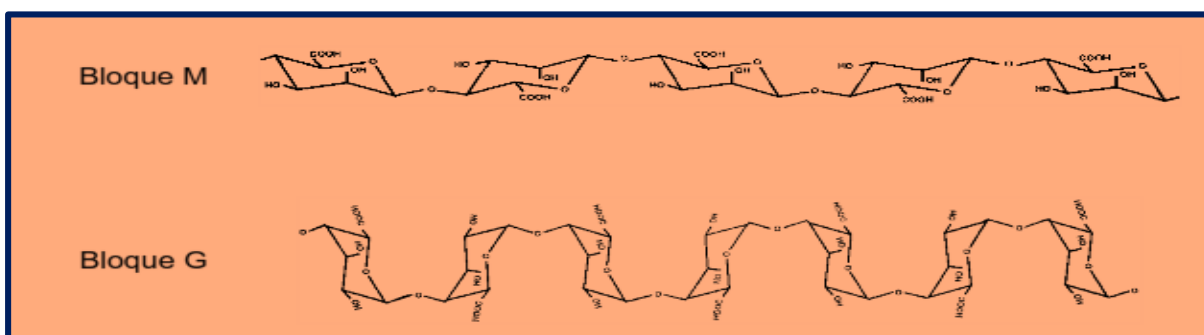


Figura 5. Bloques poliméricos de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G).

Fuente: Gonzáles-Alvarado, 2009.

Las sales del ácido alginico están formadas por tres bloques, M, G y MG. Cuando dos cadenas de bloque G se alinean, se forman sitios de coordinación. Debido a la forma de bucles de estas cadenas, existen cavidades entre ellas que tienen el tamaño adecuado para acomodar al ion calcio y además están revestidas con grupos carboxílicos y otros átomos de oxígeno electronegativos. Después de la adición de iones de calcio, el alginato sufre cambios conformacionales, dando lugar al conocido modelo de gelificación del alginato llamado como “caja de huevo” (Figura 6). Esto se basa en la dimerización de la cadena y, finalmente, en la mayor agregación de los dímeros (Avendaño-Romero et al., 2013).

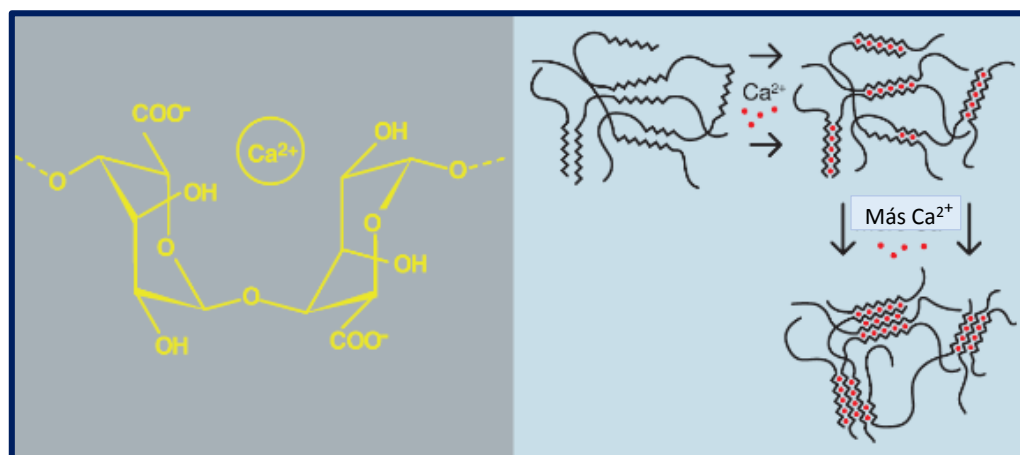


Figura 6. "Modelo de la caja de huevo" ilustrando formación de gel con un ion divalente de calcio.

Fuente: De la Cruz- Molina & Terán-Ratti, 2013.



El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y el contenido de los G-bloques (Lupo-Pasin et al., 2012).

La inmovilización o atrapamiento de bacterias probióticas en alginato es posible debido a que es un método rápido, no tóxico y versátil para las células. La ventaja de alginato es que forma fácilmente matrices de gel alrededor de las células bacterianas, es seguro para el cuerpo, que son, condiciones de proceso suaves baratos (tales como la temperatura) son necesarios para su funcionamiento, se pueden preparar fácilmente y se disuelven adecuadamente en el intestino y liberar células atrapadas. Sin embargo, se han atribuido algunas desventajas a las cápsulas de alginato, como dificultades en su aplicación a nivel industrial, susceptibilidad al ambiente ácido, con pérdida de su integridad y estabilidad mecánica, formación de poros en la superficie de la cápsulas y difusión relativamente rápida de la humedad. Estos defectos mencionados pueden ser eficientemente compensados al mezclar el alginato con otros compuestos poliméricos (almidón, goma xantana, entre otros), al cubrir las cápsulas con otros componentes (como el quitosano) y al modificar su estructura utilizando varios aditivos (glicerol) (Pérez-Leonard et al., 2013).

2.4.2.2 Goma xantana.

La goma xantana es un polisacárido extracelular producido por la fermentación de la bacteria *Xanthomonas campestris* y filtración o centrifugación posterior. Se compone químicamente por la glucosa, manosa, glucurónico, pirúvico y ácido acético (Gonçalves da Rosa et al., 2013). Este polímero es soluble en agua fría e hidrata rápidamente.

Se ha utilizado como un encapsulante para los compuestos aromáticos, medicamentos y microorganismos (Gonçalves da Rosa et al., 2013). Su comportamiento como antioxidante es mayor que el de otros polisacáridos debido a su gran capacidad de unirse a metales y su comportamiento viscoso. El uso de goma xantana provoca una excelente protección de los probióticos contra ambientes ácidos y temperaturas altas además, de que estudios han demostrado la

interacción molecular que tiene con el alginato, que conduce a la formación de un complejo-matriz-estructura (Fareez et al., 2015).

2.4.2.3 Quitosano.

El quitosano es un polímero biodegradable obtenido de la desacetilación parcial de la quitina (Figura 7). Tiene una estructura lineal de N-acetil-D-glucosamina con carga negativa que surge de sus grupos amina (Gonçalves da Rosa et al., 2013). Puede difundirse en la red tridimensional del gel de alginato. Bajo interacción simultánea electrostática entre los grupos amino protonados de quitosano y los grupos carboxilos del alginato, donde el complejo polielectrolito forma la membrana de la cápsula (Chi-Leung Hui et al., 2013).

Ofrece muchas ventajas para formular recubrimientos y películas, debido a su actividad antimicrobiana y su excelente compatibilidad con otras sustancias. Su funcionalidad y actividad del quitosano dependen de sus características como peso molecular (Mw), grado de acetilación (DA), célula huésped, presencia de nutrientes naturales, composición química o nutricional de los sustratos y condiciones ambientales. Es por ello, que se ha sugerido su uso como cubriente y protector para la formulación de cápsulas de bacterias lácticas (Martínez-Castellanos, 2009).

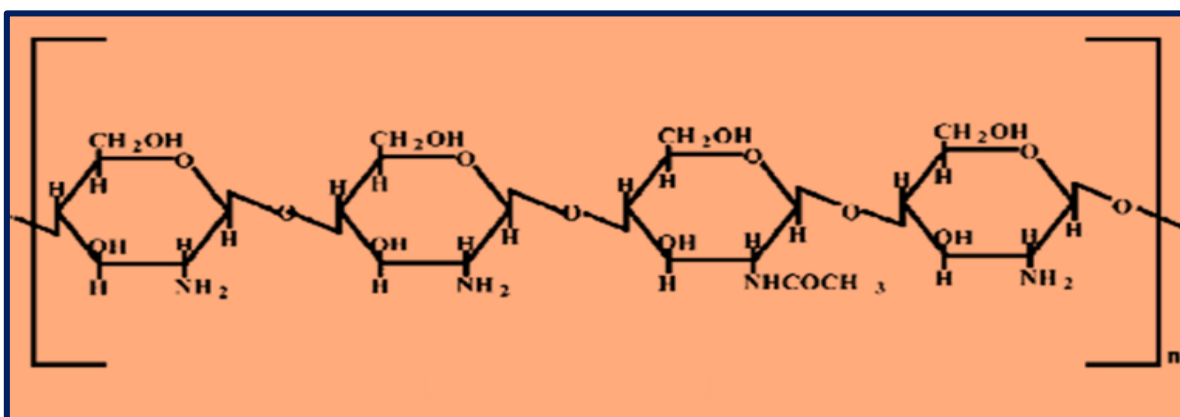


Figura 7. Estructura química del quitosano

Fuente: Martínez-Castellanos, 2009.



2.4.2.3.1 Propiedades y características del Quitosano.

Es insoluble en agua, disolventes inorgánicos y medios alcalinos, pero es soluble en ácidos orgánicos diluidos como: ácido acético, fórmico, succínico, láctico y málico, cuando el pH de la solución es inferior a 6. La viscosidad de las soluciones de quitosano se ven afectadas por el grado de acetilación, peso molecular, concentración, pH y temperatura, menores concentraciones del biopolímero permiten una mayor solubilidad, así como menores grados de acetilación, aumentan la viscosidad de la solución (Martínez-Castellanos, 2009).

La actividad antimicrobiana del quitosano es más alta a pH de 6.0 o menores, de 7.5 contra hongos fitopatógenos, debido a la protonación de la mayoría de los grupos aminos (Martínez-Castellanos, 2009).

Por otro lado, el peso molecular del quitosano es un factor que determina sus propiedades fisicoquímicas, así como su comportamiento, es decir, dependiendo de su grado de polimerización será mayor o menor su actividad biológica. El peso molecular del quitosano depende en gran medida de la fuente del mismo, y el grado de acetilación. Así como varios factores que afectan durante su obtención como la temperatura, concentración de álcali, tiempo de reacción, tratamientos previos de la quitina, tamaño de partícula, concentración de oxígeno disuelto y esfuerzo cortante (Rico-Rodríguez, 2013).

2.4.2.3.2 Combinación del Quitosano con Microorganismos.

En particular, algunos investigadores han probado la combinación de quitosano o sus derivados con microorganismos para mejorar productos alimenticios o mejorar las características de soportes para la producción de ácido láctico. Zhou et al., (1998) reportaron que el recubrimiento de este biopolímero a microcápsulas de alginato, puede ayudar a liberar controladamente bacterias ácido lácticas microencapsuladas durante la producción de productos lácteos como el queso. De acuerdo con estos reportes, se puede proponer la aplicación de quitosano con



algunas bacterias lácticas sin afectar severamente su viabilidad (Martínez-Castellanos, 2009).

2.5. Caracterización de los encapsulados.

La caracterización de las cápsulas constituye una etapa fundamental en el análisis de la micro y macroestructura, propiedades térmicas, propiedades mecánicas y reológicas y el análisis de superficie (López-Córdoba, 2012).

En cada sistema particular la selección y aplicación de las técnicas, estará en función de las características del encapsulado y de las futuras aplicaciones del mismo.

2.5.1 Métodos de liberación.

La liberación del contenido de las cápsulas se puede llevar a cabo por disolución en agua, esfuerzos de cizalla, temperatura, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. No obstante, esta liberación puede controlarse por difusión a través de la pared de la cápsula o bien por medio de una membrana que recubre la pared (López-Córdoba, 2012).



2.6 ANTECEDENTES

Muthukumarasamy & Holley (2006). Evaluaron a *L. reuteri* microencapsulado con alginato mediante técnica de extrusión y emulsión en salchichas fermentadas, utilizando un proceso de fermentación ≤ 26 °C y 88% de humedad relativa (HR) por 72 h y secado a 75% HR y 13 °C durante 25 días. Se determinó la cuenta viable de la cepa libre y encapsulada en el embutido durante el procesamiento, así como, un estudio sensorial. Los resultados indicaron que la cantidad de células de *L. reuteri* no encapsuladas se redujo en 2.6 unidades logarítmicas, mientras que con la microencapsulación se redujo en una unidad ≤ 0.5 después del secado. No hubo diferencia significativa en la calidad sensorial entre el control y las salchichas que contenían *L. reuteri* libre y microencapsulado.

Jiménez- Pranteda et al (2012). Evaluaron diferentes mezclas de polímeros de origen microbiano (goma de xantana, gellan, pullulan y jamicán) para encapsular *Lactobacillus plantarum* CRL 1815 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y determinar la efectividad que tienen como agentes encapsulantes durante el paso por el tracto gastrointestinal. Los resultados indicaron que las mezclas con goma de xantano (1%) y goma de gellano (0,75%) fueron las más adecuadas para la encapsulación prolongando su viabilidad por 6 h al exponerlas a sales biliares simuladas y pancreatina, mejorando su viabilidad en 1-2 Log UFC/mL en comparación con el control.

Roque-Martínez (2013). Desarrolló una bebida láctea con una mezcla de probióticos (*L. reuteri*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) enriquecida con concentrado de fibra de carambola (CFDC) y polvo de vainilla natural (PV). Demostró que el tratamiento con CFDC (2%) y PV (2.5%) favoreció la viabilidad de las bacterias manteniendo la carga de células viables al día 30 de 11.64 Log UFC/mL.



Pantaleón-Velasco et al (2014). Obtuvo un concentrado de fibra dietaria a partir del bagazo de carambola (CFDBC) con casi 50% de fibra dietaria, con polifenoles y actividad antioxidante, además de propiedades funcionales que sugieren su uso como ingrediente funcional.

Krasaekoopt et al (2014). Estudiaron el efecto del uso de prebióticos como inulina y oligosacáridos (GOS) en concentraciones de 0, 0,5, 1,0 y 1,5%, sobre la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* microencapsulados en una matriz de alginato recubiertas con quitosano, evaluados en yogurt y zumo de frutas. La presencia de GOS (0,3%) en la microencapsulación proporcionó la mejor protección con una reducción de 3.1 y 2.9 Log de *L. acidophilus* y *L. casei*, respectivamente, después de la incubación en jugo gástrico simulado (pH 1,55), seguido por el jugo intestinal simulado que contenía 0,6% de sales biliares. En el yogurt, el número de células con GOS fueron más altos por aproximadamente 1.1 y 0.4 Log de *L. acidophilus* y *L. casei*, respectivamente; el mismo comportamiento se vio en jugo de naranja, encontrando un número de células mayor con GOS, manteniendo la cantidad de células viables por encima de 10^7 UFC/mL durante el almacenamiento de ambos productos.

Fareez et al (2015). Integraron las potencialidades individuales del alginato, goma xantana y quitosano, desarrollando cápsulas con una mezcla única de estos tres polímeros naturales utilizando técnica de extrusión con una posterior liofilización. Informando por primera vez la utilización de esta mezcla de polímeros con *L. plantarum* LAB12 para mejorar su resistencia al pH, la tolerancia a temperaturas altas de hasta 90 °C y supervivencia durante el almacenamiento, ya que encontraron que con la combinación de estos polímeros al someterlos en jugo gástrico y fluido intestinal simulados se obtuvo una tasa alta de supervivencia de *L. plantarum* LAB12 (95%) a pH 1,8 y fácil liberación del probiótico (>7 log UFC / g) en un pH de 6.8, mientras que se minimiza la pérdida de la viabilidad a 75 y 90 °C. Con este multi-compuesto polimérico de alginato-goma xantana-quitosano la viabilidad



se ve mejorada durante el almacenamiento de *L. plantarum* LAB12 hasta por 4 semanas.

Saikia et al (2015). Obtuvieron un extracto de compuestos polifenólicos del bagazo de carambola (*Averrhoa carambola*), este extracto fue encapsulado utilizando maltodextrina por el método de secado por aspersión y liofilización a tres diferentes concentraciones. Encontraron que la más alta eficiencia de encapsulación fue obtenida en encapsulados liofilizados (78-97%). Por lo que, este modelo de microencapsulación de extractos polifenólicos podría ser utilizado para incorporarse en diferentes alimentos para mejorar sus propiedades antioxidantes.



2.7 JUSTIFICACIÓN

Las bacterias probióticas han demostrado servir como una defensa contra los trastornos del intestino, por lo cual, los productos alimenticios a base de probióticos están asociados con muchos beneficios para la salud. Es por eso que en la actualidad las investigaciones han sido dirigidas al estudio del efecto de la incorporación de bacterias probióticas en los alimentos. Dentro de las bacterias probióticas poco estudiadas se encuentra *L. reuteri*, una bacteria mesófila gram positiva, sensible a factores medioambientales tales como, altas temperaturas, pH y oxígeno durante el procesamiento, almacenamiento y durante su paso a través del tracto gastrointestinal. Por lo que, es necesario hacer uso de tecnologías que permitan su supervivencia, así como emplearlo en un mayor número de productos alimenticios. Una de las tecnologías que podría ser empleada con este fin, es la encapsulación ya que, se ha visto es una herramienta de protección contra el ambiente hostil al que pueden ser sometidos los probióticos durante la elaboración, almacenamiento y consumo del producto alimenticio. En este sentido, este trabajo de investigación se centra en la utilización de un multi-compuesto biopolimérico con alginato de sodio, goma xantana formulado con un extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola y un recubrimiento con quitosano que permita el crecimiento y supervivencia de la cepa probiótica bajo condiciones de pH, temperatura y de almacenamiento. Con la finalidad de diversificar la presentación e incorporación de estos microorganismos en los alimentos, así como, el control en la liberación de la bacteria probiótica a través del tracto intestinal.



2.8 OBJETIVOS

2.8.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto de un multi-compuesto biopolimérico formulado con extracto de fibra dietaria de carambola en la encapsulación de *Lactobacillus reuteri*.

2.8.2 Objetivos específicos:

- Determinar la eficiencia de encapsulación de *L. reuteri* utilizando un multi-compuesto biopolimérico formulado con extracto de fibra dietaria de bagazo de carambola (ECFDBC).
- Evaluar la viabilidad de los encapsulados de *L. reuteri* obtenidos y sometidos a diferentes valores de pH y temperatura.
- Realizar la caracterización física de los encapsulados de *L. reuteri* obtenidos y sometidos a diferentes valores de pH y temperatura.

CAPÍTULO III.
MATERIALES Y
MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizó como cepa ***Lactobacillus reuteri* NRRL 14171**, la cual fue proporcionada por la UNIDA (Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos) del Instituto Tecnológico de Veracruz.

El **alginato de sodio**, **goma xantana** y **quitosano** fueron adquiridos de Sigma Aldrich para la elaboración de los encapsulados, así como, fosfato de sodio mono y dibásico de J.T. Baker para la preparación del buffer utilizado para la liberación del microorganismo del encapsulado.

El **concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola** se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por Pantaleón-Velazco et al., 2014, y de este se obtuvo subsecuentemente un extracto el cual fue utilizado en la formulación del encapsulado.

3. 1 Condiciones de cultivo.

Previo a cada trabajo experimental se realizó la respectiva activación y paralelamente se llevó a cabo la obtención del paquete celular que fue empleado como inóculo en los tratamientos experimentales. Se prepararon suspensiones de células frescas para cada experimento.

❖ Activación y obtención del cultivo celular.

La activación se realizó elaborando subcultivos rutinarios de 12, 10 y 14 horas respectivamente. Se prepararon tubos con 9 mL de medio MRS. El cultivo celular (4 Lt) se incubó 18 horas a temperatura de 37°C y se centrifugó a 3000 x g durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se agregaron 15 mL de solución buffer de fosfato (PBS) para una segunda centrifugación. El cultivo celular obtenido se almacenó a 6°C y se mantuvo para su uso hasta máximo de 1 día.

3.2 Obtención del Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

El concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por Pantaleón-Velazco et al., 2014, como se muestra en el siguiente esquema (Figura 8):

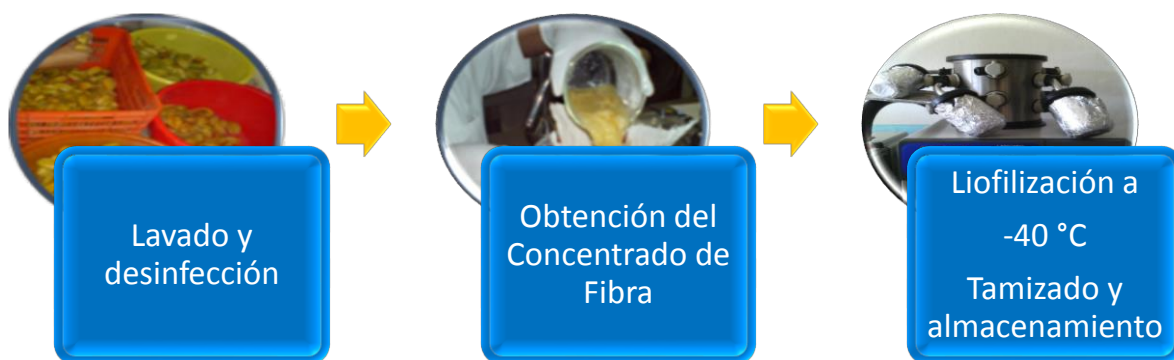


Figura 8. Obtención del Concentrado de fibra dietaria a partir del bagazo de carambola (*Averrhoa carambola*).

Posteriormente, de este concentrado se obtuvo mediante filtración el extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola (ECFDBC) como se muestra en la Figura 9. En donde primeramente, se adicionan 2% de CFDBC en agua destilada estéril, seguida de una agitación de aproximadamente 1 hora a 100 rpm. Pasado el tiempo, se filtra y se hace una segunda agitación durante 10 min.



Figura 9. Obtención del ECFDBC.



3.2.1 Determinación del contenido de Fibra dietaria Soluble en el ECFDBC.

Se determinó el contenido de Fibra dietaria Soluble al ECFDBC por el método enzimático de la AOAC (1997) 991.43 y AACC 32-21. El cual consistió como se describe a continuación:

Se pesó 1 g del ECFDBC por duplicado, en un vaso de precipitado se agregaron 50 mL de Buffer de Fosfato y se adicionaron 100 μ L de las enzimas α -amilasa, proteasa y amiglucosidasa incluyendo a los blancos. Posterior a esto se hizo las incubaciones a baño maría, primero para α -amilasa a una temperatura de 95° C/ 30 min. Seguida de la adición de la proteasa a una temperatura de incubación de 60° C/ 30 min y la misma temperatura y tiempo usados para la enzima amiglucosidasa. Se verificó el pH y se ajustó en cada incubación.

Después de esto, se realizó el filtrado en bomba al vacío. Se filtró y se hizo un lavado con agua destilada, etanol al 95% y acetona. El residuo obtenido de la filtración se conservó para determinación de fibra soluble. El cual se ajustó a 80 g agregando etanol caliente al 95% y después 325 mL del mismo alcohol. Nota: Se dejó reposar por una hora y se hizo una filtración, realizando lavados con EtOH al 78%, EtOH al 95% y acetona. Los crisoles fueron puestos en la estufa a temperatura de 103 °C. Se dejaron enfriar en desecador y se registró el peso de los crisoles.

3.3 Esquema general del trabajo experimental.

El trabajo experimental diseñado (Figura 10) consistió de manera general en la obtención del multi-compuesto biopolimérico formulado con ECFDBC y un control. Se determinó la eficiencia del encapsulado, así como, la determinación de las formulaciones adecuadas para el encapsulado de *L. reuteri*, usando como variable de respuesta la viabilidad del probiótico, siendo evaluada durante el almacenamiento a 4 °C durante 0,15 y 30 días, y al someterse las cápsulas a tratamientos de pH (2, 3.5, 5 y 6.5) y temperaturas (70, 80 y 90 °C). Por último se realizó la caracterización física de los encapsulados.

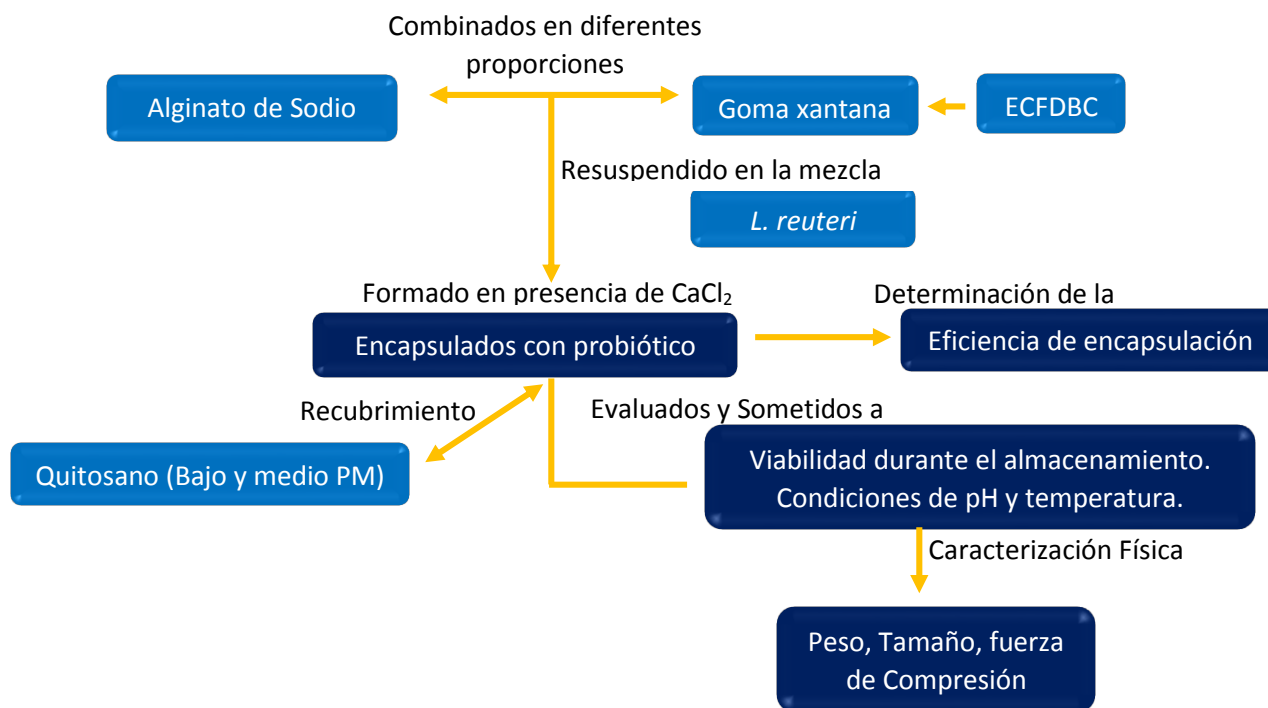


Figura 10. Esquema conceptual del trabajo.

A continuación se describe más detalladamente el análisis experimental realizado en esta investigación.

3.4 Formulación del multi-compuesto encapsulante.

Para la obtención de las cápsulas se utilizó una concentración única de alginato y goma xantana: 2% y 0.015% respectivamente, y del concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola se consideraron 2% de la concentración, para obtener el extracto; en el recubrimiento con quitosano se hicieron variaciones en: 0.2 y 0.4% respecto a su peso molecular bajo y medio, haciendo un total de 8 formulaciones, tal y como se muestra en la tabla 5.



Tabla 3. Formulación de cápsulas con mezcla de biopolímeros y ECFDBC.

Cápsulas	Composición			Recubrimiento	
	AlgNa	GX	CFDBC	QBPM	QMPM
AlgNa-GX-Q	2%	0.015%	-----	0.2%	0.2%
AlgNa-GX-Q	2%	0.015%	-----	0.4%	0.4%
AlgNa-GX-Q	2%	0.015%	2%	0.2%	0.2%
AlgNa-GX-Q	2%	0.015%	2%	0.4%	0.4%

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; Q: quitosano; QBPM: quitosano bajo peso molecular; QMPM: quitosano medio peso molecular; ECFDBC: extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

L. reuteri con aprox. 10^{10} UFC/mL fue usado en cada encapsulado.

L. reuteri libre fue utilizado como testigo.

3.5 Obtención del multi-compuesto bipolimérico formulado con ECFDBC en la encapsulación de *L. reuteri*.

Se tomó 1 mL de la suspensión activa (*L. reuteri*) a una concentración aproximada de 10^{10} UFC/mL que fue mezclada con 50 mL de una solución de alginato de sodio estéril al 2% (p/v) combinada con goma xantana al 0.015% (Tabla 5); para cápsulas con el extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola (ECFDBC), se utilizó una concentración de 2% para su incorporación a la suspensión activa, y posterior mezclado con la solución AlgNa-GX. Las soluciones preparadas fueron agregados por extrusión con un tamaño de aguja de 21Gx32 mm (con tecnología Ultra-Thin Wall que permite un mejor flujo de la solución), a una velocidad aproximada de 3.5 mL/min con una distancia de 10 cm entre la aguja y el contenedor en el cual se encontraban preparados 200 mL de una solución de cloruro de calcio (0.2 M) la cual sirvió como agente entrecruzante para la obtención de las cápsulas, se mantuvo en agitación suave durante 30 min, con la finalidad de evitar coalescencia y reticulación de las partículas. Las cápsulas fueron filtradas por un colador de metal estéril, finalmente lavadas con agua desionizada, recubiertas con quitosano y almacenadas a 4°C.



❖ Para el recubrimiento con quitosano:

Las cápsulas de alginato fueron recubiertas usando una concentración de 0.2% y 0.4% de quitosano de bajo y medio peso molecular, para cada una. El recubrimiento consiste en dos etapas: Quitosano de bajo y medio peso molecular (Sigma Aldrich) se disolvió cada uno por separado y de acuerdo a la concentración (0.2 y 0.4 %) en 90 mL de agua destilada y después se acidificó con 0.2 mL o 0.4 mL de ácido acético glacial para conseguir una concentración final de 0.2 % y 0.4 % (w/v) respectivamente; se ajustó el pH entre 5 y 6 mediante la adición de 1 M NaOH. La mezcla se filtró a través de papel filtro Whatman # 4 y el volumen se ajustó a 100 mL antes de la esterilización en autoclave a 121°C/15 min. Posteriormente, se hizo una inmersión en 100 mL de solución de quitosano de 15 g de perlas lavadas para el recubrimiento y se agitó a 120 Xg durante 40 min. Las perlas recubiertas de quitosano se lavaron con agua destilada estéril y se almacenaron a 4 °C.

3.6 Liberación del *L. reuteri* de los encapsulados.

Se tomaron 1 g de cápsulas y se adicionaron en 99 mL de solución buffer de fosfato de sodio a 0.1 M con un pH de 7. La suspensión se homogenizó 10 min en un homogenizador a 420 rpm seguido de 30 minutos de reposo. Se inocularon en agar MRS por la técnica de vertido en placa. Las muestras fueron incubadas por 48 horas a 37 °C.

3.7 Determinación de la Eficiencia y Rendimiento de la encapsulación.

De acuerdo con el método de liberación, una vez realizado fue tomado 0.1 mL de alícuotas de las diluciones y se sembraron en agar MRS, incubando a 37 °C/48 h. Así mismo, se sembró en MRS, 0.1 mL de alícuotas de las diluciones procedentes de 1 mL tomado de la suspensión celular preparada para encapsular antes de ser adicionada al cloruro de calcio. Se hizo por duplicado con cuatro repeticiones.



Fue calculado como la relación entre lo encapsulado y la concentración inicial de bacteria (Fareez et al., 2015).

$$EE = \frac{\text{Log}_{10} N_1}{\text{Log}_{10} N_0} * 100$$

Log₁₀ N₁= Logaritmo de números de células viables liberadas de las cápsulas

Log₁₀ N₀= logaritmo de números de células añadidas a la mezcla de polímeros

El rendimiento fue calculado mediante la relación entre la cantidad inicial de alginato comparada con el peso final de las cápsulas.

$$R = \frac{m}{v} * 100$$

m= Peso final de las cápsulas

v= cantidad inicial de material empleado

3.8 Determinación de la viabilidad durante el almacenamiento de *L. reuteri* encapsulado.

Se realizaron pruebas de viabilidad, para estimar el tiempo que la bacteria encapsulada logra mantener su concentración durante el almacenamiento. La prueba se realizó en un lote de cápsulas realizando conteos a los 0, 15 y 30 días. Alícuotas de 1 mL de la solución producida al liberar las cápsulas en buffer de fosfato de sodio a 0.1 M fueron diluidas decimalmente y sembradas en agar MRS por la técnica de vertido en placa. Las muestras fueron incubadas por 48 horas a 37°C. Se hicieron tres repeticiones por duplicado.

3.9 Determinación de la tolerancia a pH de *L. reuteri* libre y encapsulado.

Se tomaron 1 mL de cepa libre y 1 g de cápsulas en 9 ml de caldo MRS ajustado en pH de 2, 3.5, 5, y 6.5 (control) con 12 M de HCl y 1 M NaOH. Se incubaron a 37 °C



y se tomaron muestras de suspensiones microbianas y células encapsuladas después de 2, 4 y 6 h de exposición, siguiendo la técnica de Jiménez -Pranteda (2012). Se hicieron diluciones en serie en PBS para el recuento de microorganismos viables por duplicado, en placas de agar MRS. Para la enumeración de las bacterias encapsuladas, los microorganismos fueron puestos en libertad por disolución de las cápsulas en buffer de fosfato de sodio pH 7,0 homogenizando 10 min a 420 rpm seguido de 30 minutos de reposo.

3.10 Determinación de termotolerancia de *L. reuteri* libre y encapsulado.

La termoresistencia se determinó utilizando la metodología de Victoria-León, 2006. Se colocaron 1 mL de la cepa libre y 1 g de cápsulas en tubos con tapa verticalmente posicionados en baños de agua a diferentes temperaturas (70, 80 y 90°C), y se mantuvieron para cada temperatura durante 10 y 15 min, respectivamente. Después del tratamiento térmico, las cápsulas fueron liberadas y 1 mL de caldo de cada tubo calentado a las diferentes temperaturas y tiempos fue sembrado en cajas Petri con agar con medio MRS e incubado mediante anaerobiosis a 37°C durante 48 horas. Se reporta el número de colonias sobrevivientes.

3.11 Caracterización física de los encapsulados.

3.11.1. Determinación del tamaño de las cápsulas.

Para la determinación del diámetro se utilizó un Vernier (General UltraTECH) No. 147 con una precisión de $\pm 0.02\text{mm}$.

3.11.2. Determinación del Peso unitario de las cápsulas.

Se pesaron grupos diferentes de 50 cápsulas en una balanza analítica, el valor resultante de cada grupo se dividió por 50 para obtener el peso promedio de cada cápsula, y posteriormente se tomaron los pesos y se promedió finalmente. Se hicieron tres repeticiones.



3.11.3 Resistencia mecánica.

En un analizador de textura modelo TA-Xtplus (Texture Technologies Corporation Stable Microsystems) se midió la resistencia del gel de las cápsulas. En una sonda cilíndrica de aluminio 35 mm de diámetro, a una velocidad de 1 mm·s⁻¹ en un modo de compresión, utilizando una distancia de ruptura de 1,0 mm, diez cápsulas fueron probadas para cada tratamiento. La fuerza pico se midió en gramos. Se hicieron tres repeticiones (Krasakoopt et al., 2004).

3.12 Análisis estadístico.

Los resultados de las pruebas del porcentaje de eficiencia y viabilidad de *L. reuteri* encapsulado sometido a diferentes valores de pH y temperatura, fueron analizados por duplicado con cuatro y tres repeticiones respectivamente, mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía con una prueba de rango múltiple de Fisher y expresados como valores promedio con la desviación estándar, para un nivel de confianza del 95% utilizando como programa estadístico (Minitab 16).

3.12.1 Diseño experimental.

Se elaboró un modelo matemático de segundo orden (modelo de las variables cualitativas), utilizando el programa estadístico (MATLAB 7.8.0 2009) y un diseño factorial 2^k para el análisis de los resultados de viabilidad durante el almacenamiento, así como, para la caracterización física determinando peso unitario, tamaño y compresión de los encapsulados.

Expresado:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + Y_1 Z_1 + Y_2 Z_2$$



Donde:

$\hat{y}$ = variable de respuesta

X_1 = variable cuantitativa para la concentración de quitosano

X_2 = variable cuantitativa para el tiempo de almacenamiento

Z_1 = variable cualitativa para el ECFDBC

Z_2 = variable cualitativa para el tipo de quitosano

El análisis experimental sobre la viabilidad durante el almacenamiento se realizó por duplicado con tres repeticiones, el diseño factorial 2x2x2x3 (Tabla 6 y 7) fue con dos niveles respecto al tipo de quitosano (bajo y medio peso molecular), dos niveles para la concentración de quitosano (0.2 y 0.4%), dos niveles para el ECFDBC (con y sin) y tres niveles de tiempo (0, 15 y 30 días) para un total de 24 tratamientos.

Tabla 4. Niveles codificados del diseño experimental.

Tratamientos	FACTORES			
	Concentración	Tiempo	*ECFDBC	Tipo de Q
1	0.2 (-1)	0 (-1)	SIN (0)	BPM (0)
2	0.2 (-1)	15 (0)	SIN (0)	BPM (0)
3	0.2 (-1)	30 (1)	SIN (0)	BPM (0)
4	0.2 (-1)	0 (-1)	CON (1)	BPM (0)
5	0.2 (-1)	15 (0)	CON (1)	BPM (0)
6	0.2 (-1)	30 (1)	CON (1)	BPM (0)
7	0.4 (1)	0 (-1)	SIN (0)	BPM (0)
8	0.4 (1)	15 (0)	SIN (0)	BPM (0)
9	0.4 (1)	30 (1)	SIN (0)	BPM (0)
10	0.4 (1)	0 (-1)	CON (1)	BPM (0)
11	0.4 (1)	15 (0)	CON (1)	BPM (0)
12	0.4 (1)	30 (1)	CON (1)	BPM (0)

* ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola; BPM: bajo peso molecular; Q: Quitosano

Niveles codificados para las cápsulas con quitosano de bajo peso molecular.



Tabla 5. Niveles codificados del diseño experimental.

Tratamientos	FACTORES			
	Concentración	Tiempo	*ECFDBC	Tipo de Q
13	0.2 (-1)	0 (-1)	SIN (0)	MPM (1)
14	0.2 (-1)	15 (0)	SIN (0)	MPM (1)
15	0.2 (-1)	30 (1)	SIN (0)	MPM (1)
16	0.2 (-1)	0 (-1)	CON (1)	MPM (1)
17	0.2 (-1)	15 (0)	CON (1)	MPM (1)
18	0.2 (-1)	30 (1)	CON (1)	MPM (1)
19	0.4 (1)	0 (-1)	SIN (0)	MPM (1)
20	0.4 (1)	15 (0)	SIN (0)	MPM (1)
21	0.4 (1)	30 (1)	SIN (0)	MPM (1)
22	0.4 (1)	0 (-1)	CON (1)	MPM (1)
23	0.4 (1)	15 (0)	CON (1)	MPM (1)
24	0.4 (1)	30 (1)	CON (1)	MPM (1)

* ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola; MPM: medio peso molecular; Q: Quitosano

Niveles codificados para las cápsulas con quitosano de medio peso molecular.

Para evaluar el efecto durante el almacenamiento en peso, tamaño y fuerza de compresión del multi-compuesto biopolimérico formulado con ECFDBC para la encapsulación de *L. reuteri*, se utilizó un diseño factorial 2x2x2x3 así como, un diseño factorial 2x2x2x3x4 al exponer las cápsulas a diferentes valores de pH. Ambos análisis se hicieron en tres repeticiones. Cada factor tuvo su ecuación desarrollada a través del modelo matemático anteriormente descrito.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1 Determinación de la eficiencia de encapsulación de *L. reuteri* utilizando un multi-compuesto biopolimérico formulado con extracto de fibra dietaria de bagazo de carambola (ECFDBC).

Las condiciones de proceso empleadas permitieron obtener cápsulas con un multi-compuesto biopolimérico formulado con ECFDBC en la encapsulación de *L. reuteri* como se aprecia en la Figura 11. La concentración inicial de células de *L. reuteri* utilizada fue de 10.2 a 10.6 Log UFC/mL, sin embargo, después de haber sido encapsulado la concentración de bacteria fue menor, reduciéndose de 2 a 3 ciclos logarítmicos en las diferentes mezclas poliméricas utilizadas (Tabla 8), lo que representa en una reducción significativa ($p < 0.05$) respecto de la concentración inicial de bacteria. La reducción de la concentración de células viables en el encapsulado no compromete la funcionalidad del probiótico pues en promedio mantuvo una concentración en un intervalo de 7.481 a 8.349 Log UFC/mL, valores que se encuentran dentro de los niveles requeridos ($\geq 10^6$ - 10^7 UFC/mL) para considerarse como probiótico (FAO/OMS, 2002; Kamalian et al., 2014).



Figura 11. a) Encapsulados de *L. reuteri* con ECFDBC.
b) Encapsulados de *L. reuteri* sin ECFDBC.



Tabla 6. Número de células viables antes y después de la encapsulación con y sin ECFDBC.

Cápsulas	Célula viable libre Log UFC/mL	Encapsulación de célula viable Log UFC/mL
AlgNa-GX-QBPM 0.2	10.623±1.08 ^a	7.481±0.05 ^b
AlgNa-GX-QBPM 0.4	10.623±1.08 ^a	8.239±0.06 ^b
AlgNa-GX-QMPM 0.2	10.623±1.08 ^a	7.835±0.06 ^b
AlgNa-GX-QMPM 0.4	10.623±1.08 ^a	7.781±0.03 ^b
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.2	10.274±0.49 ^a	8.349±0.05 ^b
AlgNa-GX-ECFDBC -QBPM 0.4	10.274±0.49 ^a	8.242±0.02 ^b
AlgNa-GX-ECFDBC-QMPM 0.2	10.274±0.49 ^a	7.947±0.01 ^b
AlgNa-GX-ECFDBC-QMPM 0.4	10.274±0.49 ^a	7.995±0.01 ^b

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Letras diferentes comparadas por columna muestran diferencia significativa $p < 0.05$.

Con respecto al porcentaje de eficiencia de encapsulación los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9. Las cápsulas control (sin ECFDBC) donde se empleó QBPM a 0.2% resultó en un porcentaje de eficiencia significativamente menor al comparado con 0.4% de QBPM, esto pudiera atribuirse a que a mayores concentraciones de QBPM existiría un mayor grado de entrecruzamiento por el número de grupos amino presentes en la molécula (Expósito-Harris, 2009; Rodríguez-Hamamura et al., 2010), acción que se estaría generando con la solución de alginato-goma xantana, resultado en la formación de cápsulas más densas y más resistentes (Mortazavian et al., 2007), favoreciendo por lo tanto, la eficiencia de encapsulación. Mientras que, cuando se utiliza QMPM a 0.2 y 0.4% presentaron valores similares de porcentaje de eficiencia, indicando que la concentración no tiene efecto sobre la eficiencia de encapsulación, esto podría deberse a que en quitosanos de un peso molecular más alto, existe un mayor número de grupos aminos para protonizar, lo que aumenta el entrecruzamiento (Espinoza-Espíritu, 2010; Rodríguez-Hamamura et al., 2010), sin embargo, no es conveniente utilizar quitosanos de alto peso molecular pues al haber un mayor grado de entrecruzamiento existe una mayor pérdida de células viables durante el proceso de gelificación (Espinoza-Espíritu, 2010).



Tabla 7. Eficiencia de la encapsulación.

Cápsulas	Eficiencia (%)
AlgNa-GX-QBPM 0.2	86.527±0.27 ^e
AlgNa-GX-QBPM 0.4	90.378±0.53 ^b
AlgNa-GX-QMPM 0.2	88.225±0.51 ^d
AlgNa-GX-QMPM 0.4	87.927±0.48 ^d
AlgNa-GX- ECFDBC-QBPM 0.2	91.135±0.58 ^a
AlgNa-GX- ECFDBC-QBPM 0.4	91.016±0.42 ^{ab}
AlgNa-GX- ECFDBC-QMPM 0.2	89.509±0.31 ^c
AlgNa-GX- ECFDBC-QMPM 0.4	89.142±0.52 ^c

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de cuatro repeticiones $\pm$ la desviación estándar. Los valores están reportados en porcentaje. Letras diferentes muestran diferencia significativa $p < 0.05$ entre todas las formulaciones y sus controles.

Sin embargo, comparando los valores de eficiencia con respecto al tipo de quitosano utilizado, se observaron valores significativamente mayores de eficiencia en aquellos encapsulados donde se utilizó 0.4% de QBPM, esto podría ser atribuido a que, estructuralmente, el quitosano de bajo peso molecular se difunde más rápido en la matriz de alginato en comparación con un peso molecular más alto (Mortazavian et al., 2007) mejorando la estabilidad del encapsulado.

Por otro lado, cuando se adiciona el ECFDBC a las cápsulas con QBPM 0.2%, QMPM 0.2 y 0.4%, el porcentaje de eficiencia aumenta en relación a su control, esto pudiera atribuirse posiblemente a la cantidad de fibra dietaria soluble presente en el ECFDBC (8% de fibra dietaria soluble (FDS), que podría servir como sustrato para la estabilidad de la bacteria. Sin embargo, cuando se adiciona el ECFDBC en cápsulas con QBPM a 0.4% no se observó diferencia estadística con respecto a su control, así como, con cápsulas con ECFDBC y QBPM 0.2%, lo cual podría atribuirse a que, el quitosano de bajo peso molecular presenta una baja viscosidad, una longitud de cadena corta, solubilidad en medios acuosos neutros lo que favorece en una mejor estabilidad del entrecruzamiento (Prashanth & Tharanathan, 2007).



De la Cruz-Molina & Terán-Ratti (2013), utilizando el gel de alginato obtuvo cápsulas de *L. casei* por el método de extrusión y encontró una eficiencia de encapsulado del 82.48%. Lo que indica que en este estudio, el uso del recubrimiento con quitosano, además de la adición del ECFDBC, se obtuvo entre el 89 y 91% esto es, un incremento del 7% de eficiencia en comparación con el autor.

El porcentaje de rendimiento después de encapsular fue de $63.03 \pm 0.01\%$, este valor refleja el porcentaje de cápsulas obtenidas respecto a la cantidad de material empleado. Los cálculos de rendimiento, se obtuvieron de la relación entre el peso final de cápsulas en gramos (87.45 g) con el promedio inicial de la mezcla de alginato-goma xantana + *L. reuteri* (en la que se extrudieron 150 mL de solución preparada) resultando tal rendimiento de encapsulación, autores como Chávarri et al., 2010, obtuvieron un porcentaje de rendimiento del 19.5% utilizando quercetina y *L. gasseri* como probiótico encapsulado en una matriz de alginato recubiertas con quitosano mediante extrusión y liofilización posterior, en este estudio y bajo las condiciones de elaboración de las cápsulas se alcanzó mejorar el rendimiento en un 44% cuando se utiliza el ECFDBC y un probiótico diferente (*L. reuteri*).



4.1.1 Determinación de la viabilidad durante los 0, 15 y 30 días de almacenamiento a 4 °C de *L. reuteri* encapsulado.

Se desarrolló un modelo matemático (modelo de las variables cualitativas) en el que la variable de respuesta fue la viabilidad durante el almacenamiento de *L. reuteri* encapsulado. Los resultados experimentales demostraron que la adición del ECFDBC (Z_1) ejerce un efecto positivo sobre la viabilidad, que sugiere, que al incorporar el ECFDBC en la matriz de encapsulación se logra mantener las UFC/mL dentro del mismo ciclo logarítmico hasta por 30 días.

La ecuación de regresión obtenida para el efecto en la viabilidad de *L. reuteri* encapsulado por el tiempo de almacenamiento (X_2) se muestra a continuación:

$$\hat{y} = 6.90 + 0.76z_1 - 0.06z_2 + 0.08x_1 + 0.03z_1x_1 - 0.10z_2x_1 - 0.51x_2 + 0.07z_1x_2 - 0.04z_2x_2 - 0.01x_1x_2 - 0.02z_1x_1x_2 + 0.06z_2x_1x_2 + 0.57x_2^2 - 0.45z_1x_2^2 - 0.01z_2x_2^2$$

Para visualizar la viabilidad de *L. reuteri* encapsulado con y sin ECFDBC durante el almacenamiento se empleó gráficas de superficie de respuesta (Figura 12-15).

En las Figuras 12 y 14 se muestra el efecto negativo del tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad para encapsulados de *L. reuteri* sin ECFDBC, independientemente del tipo y concentración de quitosano. Esto podría atribuirse a efecto de la temperatura de almacenamiento a 4 °C, ya que se considera que el quitosano muestra una mejor actividad antimicrobiana a esa temperatura de refrigeración y requiere de un tiempo prolongado de contacto para inhibir al microorganismo, ya que podría entrar en contacto con la bacteria y ser absorbido por la superficie celular bacteriana, incrementando la permeabilidad de los lípidos de la membrana celular y causando la muerte a través de la pérdida de los materiales esenciales de la célula (Rodríguez-Pedroso et al., 2009; Áviles-Palou, 2013). Sin embargo, la bacteria parece tolerar adecuadamente el encapsulado



recubierto con quitosano sin disminuir drásticamente la sobrevivencia o efectividad de este microorganismo.

Sin embargo, se observa el efecto positivo del ECFDBC (Figuras 13 y 15), encontrando valores de células viables en un intervalo $>7-8$ Log UFC/mL aproximadamente después de los 15 días, suponiendo un efecto amortiguador del ECFDBC durante el tiempo de almacenamiento. Esto pudiera atribuirse a la adición del extracto, el cual podría contribuir a mejorar la sobrevivencia por efecto del almacenamiento de *L. reuteri* en las cápsulas, obteniéndose un mejor desempeño en cuanto a la viabilidad de la cepa encapsulada con ECFDBC, lo que podría suponer que la bacteria se adapta mejor bajo estas condiciones de encapsulación favorecido por el extracto, independientemente de la concentración y tipo de quitosano.

Cabe mencionar, que el extracto obtenido procedió del concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola propuesto por Pantaleón-Velasco et al., 2014, el cual demostró en su investigación presentar un alto contenido en fibra dietaria, polifenoles y actividad antioxidante. Roque-Martínez, 2013, demostró que en la elaboración de una bebida fermentada el tratamiento con CFDC (2%) y PV (2.5%) favoreció la viabilidad de bacterias probióticas como *L. reuteri* manteniendo la carga de células viables al día 30. La presencia de tales compuestos bioactivos podría atribuir a la mejora en la viabilidad de la bacteria probiótica en los encapsulados.

Lo que demuestra que el quitosano puede funcionar como recubrimiento para algunos microorganismos probióticos permitiendo su sobrevivencia y actividad, incluso puede considerarse que la encapsulación celular con este recubrimiento y la adición del ECFDBC puede preservar por largos periodos la viabilidad de esta bacteria ácido-láctica, ya que la viabilidad se mantiene dentro de los valores para ser considerado como probiótico.

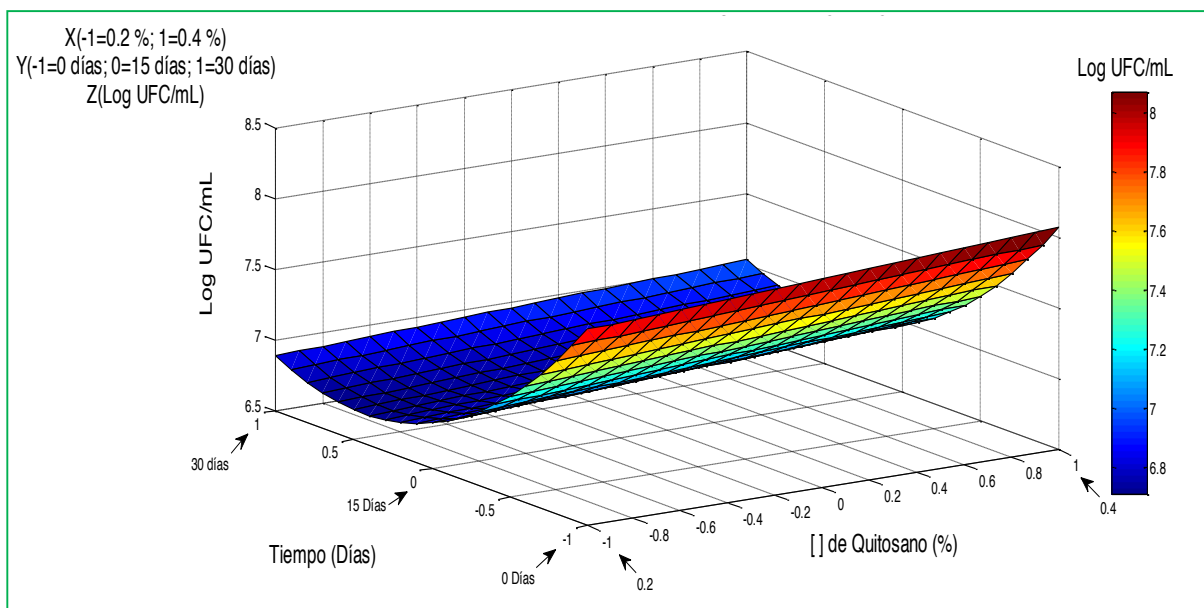


Figura 12. Superficie de respuesta de la viabilidad durante el almacenamiento de *L. reuteri* encapsulado sin ECFDBC recubiertos con quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 0.2 y 0.4%.

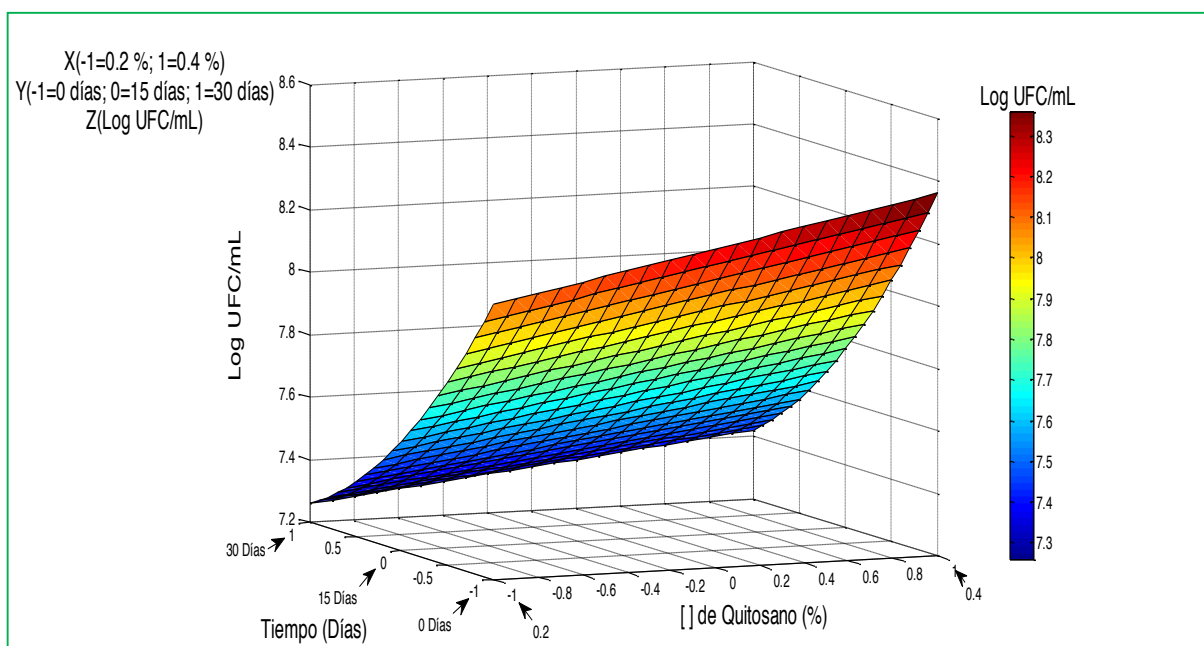


Figura 13. Superficie de respuesta de la viabilidad durante el almacenamiento de *L. reuteri* encapsulado con ECFDBC recubiertos con quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 0.2 y 0.4%.

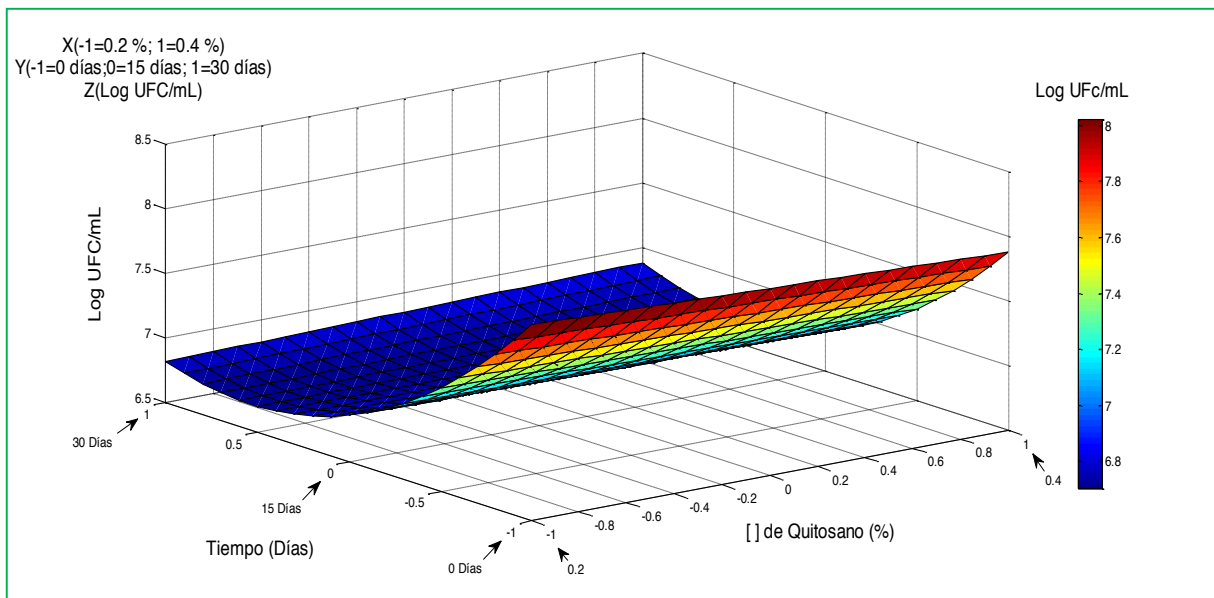


Figura 15. Superficie de respuesta de la viabilidad durante el almacenamiento de *L. reuteri* encapsulado sin ECFDBC recubiertos con quitosano de medio peso molecular a una concentración de 0.2 y 0.4%.

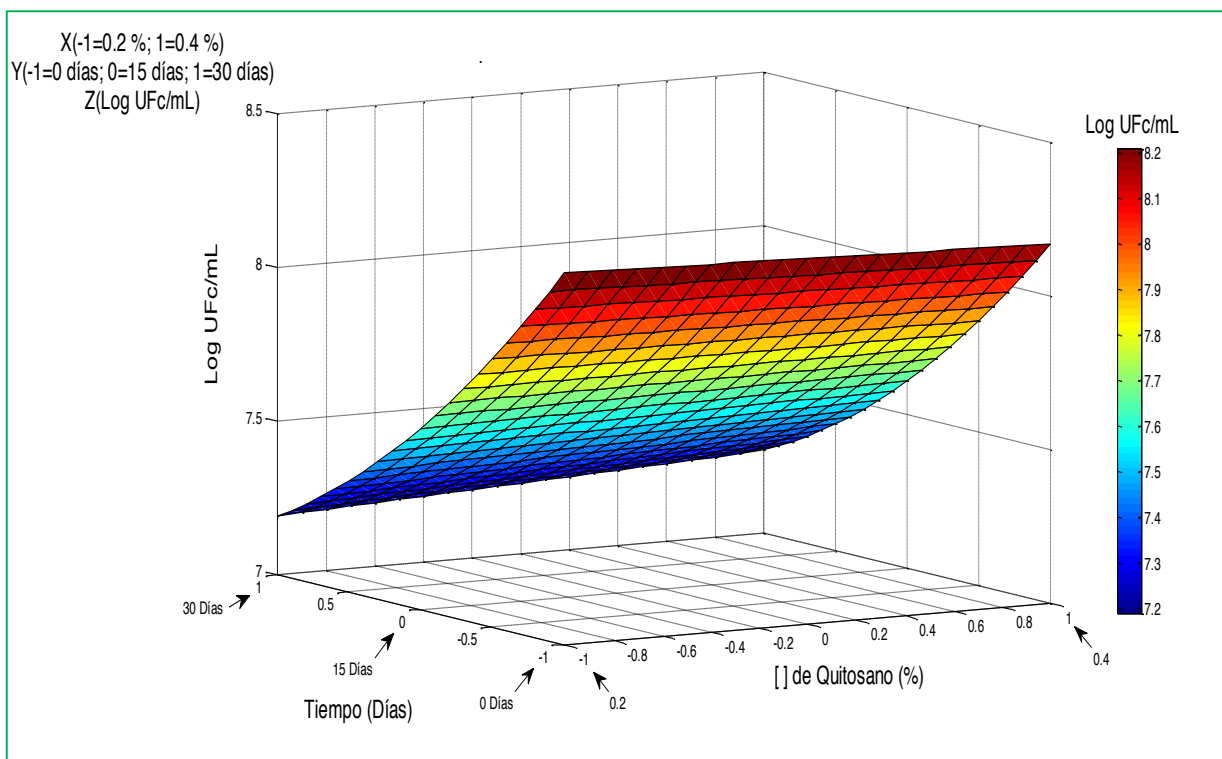


Figura 14. Superficie de respuesta de la viabilidad durante el almacenamiento de *L. reuteri* encapsulado con ECFDBC recubiertos con quitosano de medio peso molecular a una concentración de 0.2 y 0.4%.



4.2 Determinación de la tolerancia a pH de *L. reuteri* libre y encapsulado.

Se determinó el efecto de diferentes valores de pH (2, 3.5, 5 y 6.5) en la supervivencia de la bacteria probiótica libre y encapsulada. Los cultivos fueron expuestos a 37 °C durante 2, 4 y 6 horas de incubación.

L. reuteri en forma libre, presentó crecimiento sólo en el día cero a las 6 horas de exposición en un pH de 6.5, obteniéndose una cuenta viable de 9.4 Log UFC/mL, respecto a la concentración inicial de célula (10.02 Log UFC/mL) se observó una reducción de un ciclo logarítmico a las 6 h de incubación, cabe hacer mención que *L. reuteri* no implementó mecanismos de adaptación en medios ácidos (pH 2, 3.5 y 5), debido a que no se observó crecimiento a estas condiciones de pH.

De acuerdo con el análisis de varianza, en el día 0 de almacenamiento (Tabla 10), utilizando QBPM independientemente de la concentración y de la utilización del ECFDBC, se logra mantener con el encapsulado la cuenta viable de *L. reuteri* para ser considerado probiótico, cuando se somete a pHs de 2, 3.5, 5 y 6.5, sin embargo, cuando se utiliza el QBPM al 0.4 % y el ECFDBC se observa que a pH de 6.5, existe un incremento significativo ($p < 0.05$) de un ciclo logarítmico a las 6 h en relación a la cuenta inicial obtenida a las 0 h. Esto se puede atribuir, primeramente, a que el encapsulamiento provee un ambiente anaerobio, el cual se cree pueda contribuir al crecimiento de la bacteria dentro de la matriz biopolimérica (De la Cruz-Molina & Terán-Ratti, 2013). Además, al someter a un pH de 6.5 siendo el óptimo de crecimiento de *L. reuteri*, el crecimiento pudiera verse favorecido por la penetración del medio dentro de la matriz (Figueira-Maldonado, 2008), aunado a esto la hidratación provocada en las moléculas de quitosano disminuye la densidad de entrecruzamiento lo que provoca una separación de las cadenas de quitosano con el ion AlgNa-GX consiguiendo una liberación más rápida de la célula microbiana por el debilitamiento de la cápsula en el momento de la liberación de la bacteria durante la cuantificación de la misma, lo que concuerda con el aumento de la cantidad de células viables (Rodríguez- Hamamura et al., 2010).



Tabla 80. Viabilidad de los encapsulados con QBPM después de someter a diferentes pHs durante 0 días de almacenamiento a 4°C.

Formulaciones	pH	Día 0 (Log UFC/mL)			
		0 h	2 h	4 h	6 h
AlgNa-GX-QBPM 0.2	2	7.74±0.08^a	8.05±0.08^a	7.73±0.30^a	7.65±0.42^a
	3.5	7.74±0.08 ^a	7.86±0.53 ^a	7.95±0.61 ^a	8.15±0.36 ^a
	5	7.74±0.08 ^c	8.53±0.27 ^{ab}	8.61±0.13 ^a	8.28±0.30 ^b
	6.5	7.74±0.08 ^c	8.21±0.05 ^b	8.25±0.03 ^b	9.04±0.31 ^a
AlgNa-GX-QBPM 0.4	2	8.14±0.06^b	7.62±0.05^d	7.77±0.09^c	8.31±0.02^a
	3.5	8.14±0.06 ^a	7.98±0.30 ^a	8.02±0.42 ^a	8.08±0.47 ^a
	5	8.14±0.06 ^c	8.41±0.09 ^b	8.68±0.25 ^a	8.73±0.24 ^a
	6.5	8.14±0.06 ^b	8.36±0.08 ^b	8.49±0.07 ^b	9.20±0.63 ^a
AlgNa-GX-QBPM-ECFDBC 0.2	2	8.29±0.07^a	7.87±0.34^b	7.93±0.36^{ab}	8.18±0.20^{ab}
	3.5	8.29±0.07 ^a	8.14±0.17 ^a	8.36±0.32 ^a	8.24±0.45 ^a
	5	8.29±0.07 ^c	8.91±0.48 ^b	9.43±0.05 ^a	8.71±0.43 ^b
	6.5	8.29±0.07 ^c	9.32±0.13 ^{ab}	9.50±0.04 ^a	9.06±0.47 ^b
AlgNa-GX-QBPM-ECFDBC 0.4	2	8.34±0.12^a	8.14±0.03^b	8.04±0.03^b	7.67±0.13^c
	3.5	8.34±0.12 ^{bc}	8.09±0.28 ^c	8.53±0.46 ^{ab}	8.82±0.45 ^a
	5	8.34±0.12 ^c	9.49±0.08 ^a	9.46±0.04 ^a	9.31±0.12 ^b
	6.5	8.34±0.12^c	9.43±0.03^b	9.46±0.02^b	9.93±0.52^a

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

En la Tabla 11 para 15 días de almacenamiento, se observa que sin adición del ECFDBC y al usar QBPM independientemente de la concentración, existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en relación a la cuenta inicial a las 0 h, mostrando un crecimiento exponencial en pH de 3.5, 5 y 6.5 con aumento de 2 ciclos logarítmicos. Para un pH más ácido (pH 2) la viabilidad se ve incrementada significativamente por un ciclo logarítmico, encontrando valores aceptables para ser considerado como probiótico. Esto puede deberse a la fuerza iónica del medio, ya que si hay una disminución de pH, se favorece la disociación de los enlaces iónicos y la disolución de la red del quitosano, esto posiblemente ocurrió al exponer las partículas de quitosano al pH 2, ya que existe una mayor concentración de grupo amino protonados aumentando la densidad de entrecruzamiento, que induce a una disminución de la sensibilidad del pH, mejorando la estabilidad de la red, por lo que, se estaría disminuyendo la liberación de la cepa probiótica, lo que estaría interviniendo para que exista una cuenta viable detectable (Rodríguez-Hamamura et al., 2010).



Tabla 11. Viabilidad de los encapsulados con QBPM después de someter a diferentes pHs a los 15 días de almacenamiento a 4°C.

Formulaciones	pH	Día 15 (Log UFC/mL)			
		0 h	2 h	4 h	6 h
AlgNa-GX-QBPM 0.2	2	6.88±0.52^b	7.59±0.14^a	7.40±0.09^a	7.25±0.17^{ab}
	3.5	6.88±0.52 ^b	8.09±0.52 ^a	8.05±0.21 ^a	8.16±0.24 ^a
	5	6.88±0.52 ^c	8.21±0.16 ^b	8.61±0.39 ^{ab}	8.74±0.48 ^a
	6.5	6.88±0.52 ^c	8.07±0.25 ^b	8.33±0.17 ^{ab}	8.70±0.26 ^a
AlgNa-GX-QBPM 0.4	2	6.60±0.35^b	7.65±0.04^a	7.57±0.14^a	7.49±0.15^a
	3.5	6.60±0.35 ^c	8.26±0.63 ^b	8.48±0.26 ^{ab}	8.78±0.21 ^a
	5	6.60±0.35 ^c	8.25±0.63 ^b	8.92±0.37 ^a	8.80±0.63 ^{ab}
	6.5	6.60±0.35 ^b	8.43±0.81 ^a	8.67±0.37 ^a	8.73±0.61 ^a
AlgNa-GX-QBPM-ECFDBC 0.2	2	7.80±0.10^a	7.45±0.10^b	7.41±0.19^b	7.74±0.27^a
	3.5	7.80±0.10 ^b	8.52±0.46 ^a	8.29±0.36 ^a	8.24±0.15 ^a
	5	7.80±0.10 ^b	8.65±0.54 ^a	8.71±0.56 ^a	8.64±0.41 ^a
	6.5	7.80±0.10^b	8.65±0.56^a	8.72±0.58^a	8.77±0.48^a
AlgNa-GX-QBPM-ECFDBC 0.4	2	8.11±0.07^b	8.21±0.10^b	8.92±0.59^a	8.37±0.30^b
	3.5	8.11±0.07 ^c	8.52±0.60 ^{bc}	9.06±0.41 ^a	9.02±0.50 ^{ab}
	5	8.11±0.07^b	8.46±0.40^b	8.38±0.07^b	9.11±0.52^a
	6.5	8.11±0.07^c	8.77±0.54^{ab}	8.59±0.25^{bc}	9.11±0.52^a

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

Se observa que al adicionar el ECFDBC y utilizando QBPM a 0.4% la cuenta viable se ve favorecida con el aumento de un ciclo logarítmico en pHs de 3.5, 5 y 6.5., esto puede atribuirse al efecto que tiene la adición del ECFDBC, el cual actúa posiblemente como un prebiótico para *L. reuteri*., esto debido al contenido de fibra soluble presente en el ECFDBC el cual es de 8%. Este comportamiento también se observa en la viabilidad de los encapsulados a los treinta días de almacenamiento (Tabla 12) en el que se observa que con el uso de QBPM a 0.4% y ECFDBC se logra mantener la cuenta viable en el mismo ciclo logarítmico hasta las seis horas de incubación, sin embargo, cuando los encapsulados con QBPM 0.2 y 0.4% sin adición de ECFDBC son sometidos a pH de 2 y 3.5 se inhibe totalmente el crecimiento de *L. reuteri*, lo que sugiere que para mantener la viabilidad de *L. reuteri* por un periodo más largo de almacenamiento a estos valores de pH es necesaria la utilización del ECFDBC.



Tabla 12. Viabilidad de los encapsulados con QBPM después de someter a diferentes pHs a los 30 días de almacenamiento a 4°C.

Formulaciones	pH	Día 30 (Log UFC/mL)			
		0 h	2 h	4 h	6 h
AlgNa-GX-QBPM 0.2	2	6.70±0.22 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
	3.5	6.70±0.22 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
	5	6.70±0.22 ^b	7.90±0.05 ^a	7.09±0.43 ^b	7.01±0.49 ^b
	6.5	6.70±0.22 ^b	7.57±0.35 ^a	7.65±0.36 ^a	7.88±0.12 ^a
AlgNa-GX-QBPM 0.4	2	7.07±0.41 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
	3.5	7.07±0.41 ^b	7.66±0.07 ^a	7.68±0.46 ^a	7.41±0.26 ^{ab}
	5	7.07±0.41 ^b	7.21±0.17 ^{ab}	7.36±0.08 ^a	7.44±0.08 ^a
	6.5	7.07±0.41 ^b	7.22±0.16 ^{ab}	7.42±0.28 ^{ab}	7.43±0.27 ^a
AlgNa-GX-QBPM-ECFDBC 0.2	2	7.41±0.41 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
	3.5	7.41±0.41 ^b	8.08±0.46 ^a	7.63±0.10 ^b	7.26±0.35 ^b
	5	7.41±0.41^b	7.32±0.03^b	7.39±0.04^b	7.94±0.45^a
	6.5	7.41±0.41 ^b	8.18±0.25 ^a	8.00±0.33 ^a	8.04±0.32 ^a
AlgNa-GX-QBPM-ECFDBC 0.4	2	7.35±0.16^a	7.36±0.47^a	7.49±0.11^a	7.06±0.38^a
	3.5	7.42±0.17 ^c	8.28±0.41 ^a	7.97±0.11 ^b	7.96±0.16 ^b
	5	7.42±0.17^c	7.29±0.02^c	7.98±0.50^b	8.40±0.05^a
	6.5	7.42±0.17 ^b	8.23±0.23 ^a	8.41±0.06 ^a	8.08±0.49 ^a

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

Jimenez-Pranteda et al., 2012, reportaron que a pH 2 la viabilidad de *L. plantarum* y *L. rhamnosus* encapsulado con goma xantana-goma de gelano fue en un nivel aproximado de 5 Log UFC/mL prolongando la viabilidad hasta por 6 horas evaluado en el día cero. Destacando con ello, que en este estudio se obtuvo una concentración final de 7 Log UFC/mL a las 6 horas de exposición hasta los 30 días de almacenamiento. Por su parte, Muthukumarasamy et al., 2006, encontraron una baja supervivencia después de la exposición en jugo gástrico simulado de *Lactobacillus reuteri* encapsulado con goma xantana por método de extrusión. Encontrando en este estudio una mejor supervivencia de *L. reuteri* con la combinación de biopolímeros y un ECFDBC que refuerzan el encapsulado, dando mayor estabilidad a la bacteria, resultando en la recuperación de número de células viables.



De acuerdo a los resultados obtenidos utilizando QMPM como recubrimiento, se observa que sometiendo las cápsulas de *L. reuteri* a un pH de 2 y 3.5 sin adición del ECFDBC, la cuenta viable tiende a disminuir en cápsulas almacenadas a 0, 15 y 30 días de almacenamiento (Tabla 13, 14 y 15), esto pudiera ser atribuido a un mayor grado de entrecruzamiento de los enlaces entre los biopolímeros, ya que cuanto mayor es el peso molecular del quitosano, existe mayor número de grupos amino para protonarse en una solución ácida (Espinoza-Espíritu, 2009), de este modo al haber mayor número de cargas positivas pueden interaccionar con las cargas negativas de la solución AlgNa-GX, aumentando la densidad de entrecruzamiento, que induce a una disminución de la sensibilidad del pH, mejorando la estabilidad de la red (Rodríguez-Hamamura et al., 2010). Sin embargo, la actividad antibacteriana del quitosano es afectada por el pH, y su mayor actividad bactericida se encuentra en valores bajos de pH, por lo que, la pérdida de la cuenta viable en su totalidad pudiera atribuirse a efecto de la actividad antimicrobiana, el cual requiere de un tiempo prolongado de contacto para inhibir al microorganismo, que se estaría generando por el tiempo de almacenamiento, ya que podría entrar en contacto con la bacteria y ser absorbido por la superficie celular bacteriana, incrementando la permeabilidad de los lípidos de la membrana celular y causando la muerte a través de la pérdida de los materiales esenciales de la célula (Rodríguez-Pedroso et al., 2009). La actividad inhibitoria del quitosano bajo estas condiciones de pH, pudiera verse reducida por la adición del ECFDBC, ya que los resultados demuestran que, al adicionar el ECFDBC se mantuvo una cuenta viable para ser considerado como probiótico hasta los 30 días de almacenamiento con un valor final de 6.5 Log UFC/mL, utilizando una concentración de quitosano del 0.4%, no encontrando diferencias significativas en relación a la cuenta inicial obtenida en las 0 h.

Así mismo, con la utilización del ECFDBC se favorece el crecimiento de *L. reuteri* con un incremento de células bacterianas >8 Log UFC/mL en pH de 5 y 6.5 hasta 15 días de almacenamiento, independientemente de la concentración de quitosano.



Tabla 13. Viabilidad de los encapsulados con QMPM después de someter a diferentes pHs a los 0 días de almacenamiento a 4°C.

Formulaciones	pH	Día 0 (Log UFC/mL)			
		0 h	2 h	4 h	6 h
AlgNa-GX-QMPM 0.2	2	8.28±0.03 ^a	7.69±0.29 ^b	7.81±0.10 ^b	8.31±0.09 ^a
	3.5	8.28±0.03 ^a	8.12±0.26 ^a	8.14±0.24 ^a	7.98±0.25 ^a
	5	8.28±0.03 ^a	8.203±0.36 ^a	8.410±0.34 ^a	8.472±0.18 ^a
	6.5	8.28±0.03 ^b	8.52±0.18 ^a	8.33±0.16 ^{ab}	8.22±0.21 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	2	8.01±0.26 ^a	7.63±0.41 ^{ab}	7.74±0.22 ^{ab}	7.58±0.13 ^b
	3.5	8.01±0.26 ^{ab}	8.07±0.29 ^{ab}	8.16±0.25 ^a	7.77±0.33 ^b
	5	8.01±0.26 ^b	8.496±0.04 ^a	8.459±0.36 ^a	8.528±0.38 ^a
	6.5	8.01±0.26 ^b	8.64±0.37 ^a	8.51±0.20 ^a	8.79±0.53 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	2	8.18±0.07 ^a	7.56±0.16 ^c	7.80±0.11 ^b	7.84±0.09 ^b
	3.5	8.18±0.07^b	8.15± 0.23^b	8.49±0.29^a	8.58±0.09^a
	5	8.18±0.07^b	9.17±0.59^a	9.47±0.02^a	9.44±0.07^a
	6.5	8.18±0.07^b	9.38±0.04^a	9.43±0.06^a	9.32±0.40^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	2	8.03±0.05 ^b	8.13±0.01 ^a	7.90±0.08 ^c	7.89±0.06 ^c
	3.5	8.03±0.05^b	8.12± 0.27^b	8.60± 0.59^a	8.61±0.21^a
	5	8.03±0.05^b	9.48±0.10^a	9.45±0.02^a	9.51±0.09^a
	6.5	8.03±0.05^c	9.44±0.04^b	9.48±0.01^b	9.78±0.44^a

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPm: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa p<0.05.

Tabla 14. Viabilidad de los encapsulados con QMPM después de someter a diferentes pHs a los 15 días de almacenamiento a 4°C.

Formulaciones	pH	Día 15 (Log UFC/mL)			
		0 h	2 h	4 h	6 h
AlgNa-GX-QMPM 0.2	2	7.10±0.76 ^{ab}	7.63±0.12 ^a	7.02±0.59 ^{ab}	6.51±0.09 ^b
	3.5	7.10±0.76 ^b	8.22±0.55 ^a	8.33±0.28 ^a	8.09±0.44 ^a
	5	7.10±0.76 ^c	8.08±0.50 ^b	8.93±0.37 ^a	8.42±0.08 ^{ab}
	6.5	7.10±0.76 ^c	8.33±0.37 ^{ab}	8.76±0.31 ^a	8.16±0.18 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	2	7.06±0.73 ^a	7.36±0.20 ^a	7.19±0.42 ^a	6.68±0.27 ^a
	3.5	7.06±0.73 ^b	8.20±0.54 ^a	8.41±0.50 ^a	8.10±0.11 ^a
	5	7.06±0.73 ^b	8.20±0.50 ^a	8.54±0.56 ^a	8.81±0.53 ^a
	6.5	7.06±0.73 ^b	8.23±0.11 ^a	8.46±0.45 ^a	8.68±0.55 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	2	7.10±0.10 ^b	7.56±0.21 ^a	7.73±0.29 ^a	7.66±0.05 ^a
	3.5	7.10±0.10 ^c	8.71±0.22 ^a	8.55±0.13 ^a	8.32±0.16 ^b
	5	7.10±0.10 ^b	8.53±0.09 ^a	8.74±0.59 ^a	8.66±0.54 ^a
	6.5	7.10±0.10 ^b	8.65±0.57 ^a	8.88±0.46 ^a	8.83±0.62 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	2	7.51±0.19 ^b	7.72±0.14 ^{ab}	7.79±0.10 ^a	7.76±0.20 ^{ab}
	3.5	7.51±0.19 ^b	8.27±0.35 ^a	8.44±0.39 ^a	8.11±0.13 ^a
	5	7.51±0.19^b	8.39±0.81^a	8.67±0.62^a	8.71±0.60^a
	6.5	7.51±0.19 ^b	9.02±0.36 ^a	8.72±0.63 ^a	8.82±0.65 ^a

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPm: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa p<0.05.



Tabla 15. Viabilidad de los encapsulados con QMPM después de someter a diferentes pHs a los 30 días de almacenamiento a 4°C.

Formulaciones	pH	Día 30 (Log UFC/mL)			
		0 h	2 h	4 h	6 h
AlgNa-GX-QMPM 0.2	2	6.89±0.36 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
	3.5	6.89±0.36 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
	5	6.89±0.36 ^a	7.03±0.53 ^a	7.11±0.40 ^a	7.13±0.46 ^a
	6.5	6.89±0.36 ^b	7.32±0.08 ^a	7.36±0.08 ^a	7.30±0.21 ^a
AlgNa -GX-QMPM 0.4	2	6.90±0.44 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
	3.5	6.90±0.44 ^a	7.30±0.09 ^a	6.97±0.44 ^a	6.48±0.00 ^b
	5	6.90±0.44 ^c	7.77±0.08 ^a	7.30±0.37 ^{bc}	7.50±0.38 ^{ab}
	6.5	6.90±0.44 ^b	7.60±0.19 ^a	7.49±0.08 ^a	7.51±0.12 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	2	7.13±0.40 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
	3.5	7.13±0.40 ^b	7.57±0.13 ^a	7.58±0.11 ^a	6.81±0.39 ^b
	5	7.13±0.40 ^{ab}	7.03±0.20 ^{ab}	7.40±0.25 ^a	6.97±0.46 ^b
	6.5	7.13±0.40 ^b	7.99±0.51 ^a	8.03±0.43 ^a	7.86±0.42 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	2	7.19±0.23^a	7.40±0.14^a	6.54±0.06^a	6.53±0.05^a
	3.5	7.19±0.23 ^a	7.31±0.28 ^{ab}	7.51±0.37 ^{ab}	7.67±0.11 ^a
	5	7.19±0.23 ^b	7.09±0.29 ^b	7.64±0.23 ^a	7.60±0.19 ^a
	6.5	7.19±0.23 ^a	7.41±0.34 ^a	7.28±0.11 ^a	7.37±0.42 ^a

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

En general, la protección ofrecida por las formulaciones de encapsulación de *L. reuteri*, utilizados en este trabajo, principalmente las formulaciones con AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4 y AlgNa-GX-ECFDBC-QMPM 0.4, que demostraron ser más resistentes bajo condiciones más ácidas (pH 2) presentando una cuenta viable en un valor aceptable para considerarse como probiótico hasta los 30 días de almacenamiento. Es así como estos biopolímeros parecen ser una interesante fuente de material encapsulante.

Los resultados de este estudio coinciden con otros estudios similares (Krasaekoopt et al, 2004; Chávarri et al., 2010; Zamora-Vega, 2011; Fareez et al., 2015), donde se ha encontrado que la encapsulación con alginato en combinación con otros biopolímeros aumenta considerablemente la supervivencia de los microorganismos probióticos en condiciones de acidez.



4.3 Determinación de la termotolerancia de *L. reuteri* libre y encapsulado.

Se analizó la estabilidad de *L. reuteri* encapsulado en partículas de AlgNa-GX con y sin ECFDBC entrecruzadas con QBPM y QMPM en concentraciones de 0.2 y 0.4% a temperaturas de 70, 80 y 90 °C durante 10 y 15 min de exposición.

Los resultados obtenidos mostraron que todas las formulaciones presentaron una cuenta viable probiótica hasta los 15 días de almacenamiento a 70 °C durante 10 y 15 min de exposición (Tabla 16), mientras que para una temperatura de 80 °C a 10 y 15 min (Tabla 17) la formulación AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4% presentó una mejor estabilidad de la cuenta viable hasta los 15 días, con reducción de un ciclo logarítmico en el día 30. Así mismo, sólo la formulación AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4% logró mantener significativamente la cuenta viable a temperatura de 90 °C durante 10 y 15 min (Tabla 18) hasta los 30 días de almacenamiento, obteniendo un valor final de 7.4 Log UFC/mL, encontrándose en el rango para ser considerado como probiótico. Indicando con ello, que la adición del ECFDBC y el uso de QBPM con una concentración de 0.4% favorece la termotolerancia de *L. reuteri* a temperaturas de 70, 80 y 90 °C con tiempo de exposición a 10 y 15 min, al ser evaluado por un periodo de almacenamiento hasta por 30 días. Esto pudiera atribuirse a que con el uso de QBPM se obtienen cápsulas más densas y más resistentes por la facilidad de difundirse más rápidamente en la matriz de AlgNa-GX, aunado al uso de concentraciones altas de quitosano (Expósito-Harris, 2010).

Posiblemente lo que ocurre, es que al someter a temperaturas altas, la bacteria puede tener una adaptabilidad a estas temperaturas sin ser su óptima para crecer, ya que, las bacterias pueden desarrollar mecanismos de adaptación para enfrentar un entorno desfavorable y sobrevivir bajo estas condiciones conocidas como factores de estrés. Esta respuesta se ha estudiado intensamente y se ha reportado que durante el estrés se producen y liberan metabolitos al medio circundante capaces de brindar protección contra condiciones letales.



Tabla 96. Evaluación de la viabilidad de los encapsulados por efecto del tratamiento térmico a 70 °C por 10 y 15 min.

Cápsulas	70 °C por 10 min (Log UFC/mL)			70 °C por 15 min (Log UFC/mL)		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	7.59±0.07 ^b	7.50±0.14 ^c	7.53±0.15 ^{bc}	7.96±0.03 ^{ab}	7.12±0.25 ^c	0.00±0.00 ^c
AlgNa -GX-QMPM 0.2	7.81±0.03 ^a	7.72±0.12 ^b	7.78±0.81 ^{ab}	7.92±0.03 ^b	7.23±0.28 ^{bc}	0.00±0.00 ^c
AlgNa -GX-QBPM 0.4	7.86±0.04 ^a	7.50±0.19 ^c	6.86±0.45 ^{cd}	8.01±0.01 ^a	7.33±0.57 ^{bc}	6.55±0.82 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	7.86±0.04 ^a	7.44±0.16 ^c	6.45±0.33 ^d	7.99±0.01 ^a	7.38±0.19 ^{bc}	0.00±0.00 ^c
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	7.58±0.05 ^b	7.71±0.04 ^b	7.65±0.25 ^{ab}	8.00±0.01 ^a	7.85±0.15 ^a	6.94±0.07 ^{ab}
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	7.53±0.07 ^b	8.26±0.16 ^a	7.88±0.73 ^{ab}	7.97±0.02 ^{ab}	7.44±0.13 ^{bc}	0.00±0.00 ^c
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	7.57±0.11^b	8.29±0.03^a	8.30±0.48^a	7.99±0.06^a	7.93±0.03^a	7.21±0.28^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	7.81±0.04 ^a	8.11±0.05 ^a	7.98±0.64 ^{ab}	7.80±0.06 ^c	7.57±0.14 ^{ab}	6.80±0.57 ^{ab}
<i>L. reuteri</i>	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^c

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa p<0.05.

Tabla 17. Evaluación de la viabilidad de los encapsulados por efecto del tratamiento térmico a 80 °C por 10 y 15 min.

Cápsulas	80 °C por 10 min (Log UFC/mL)			80 °C por 15 min (Log UFC/mL)		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	7.69±0.00 ^b	7.25±0.07 ^b	6.98±0.65 ^a	0.00±0.00 ^d	7.38±0.20 ^{bc}	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.2	7.68±0.06 ^b	6.75±0.50 ^c	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM 0.4	7.43±0.06 ^d	7.16±0.53 ^{bc}	0.00±0.00 ^b	7.75±0.06 ^a	7.37±0.28 ^{bc}	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	7.57±0.07 ^c	7.49±0.12 ^b	0.00±0.00 ^b	7.62±0.16 ^b	7.06±0.19 ^c	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	0.00±0.00 ^e	7.47±0.06 ^b	7.76±1.01 ^a	7.61±0.06 ^b	7.67±0.31 ^{ab}	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	7.41±0.08 ^d	7.34±0.22 ^b	7.66±1.09 ^a	0.00±0.00 ^d	7.27±0.54 ^c	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	7.83±0.06^a	7.99±0.19^a	7.61±0.71^a	7.53±0.07^{bc}	7.79±0.11^a	6.45±0.52^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	7.46±0.05 ^d	7.37±0.11 ^b	0.00±0.00 ^b	7.49±0.03 ^c	7.41±0.16 ^{abc}	0.00±0.00 ^b
<i>L. reuteri</i>	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa p<0.05.

Tabla 108. Evaluación de la viabilidad de los encapsulados por efecto del tratamiento térmico a 90 °C por 10 y 15 min.

Cápsulas	90 °C por 10 min (Log UFC/mL)			90 °C por 15 min (Log UFC/mL)		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	7.21±0.10 ^{bc}	6.46±0.18 ^c	0.00±0.00 ^b	7.47±0.00 ^a	6.38±0.08 ^d	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.2	7.63±0.26 ^a	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	7.28±0.18 ^{ab}	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM 0.4	7.50±0.04 ^{ab}	7.60±0.22 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	7.56±0.10 ^{ab}	6.71±0.08 ^c	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	7.80±0.06 ^a	7.66±0.28 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	7.60±0.06 ^{ab}	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	7.09±0.43 ^c	7.65±0.16 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	7.52±0.06 ^{ab}	7.36±0.09 ^a	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	7.76±0.03 ^a	7.48±0.14 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	6.95±0.20 ^b	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	7.13±0.27^c	7.75±0.07^a	7.20±0.87^a	7.34±0.08^a	7.40±0.15^a	7.42±1.03^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	7.74±0.06 ^a	7.43±0.08 ^b	0.00±0.00 ^b	7.55±0.06 ^a	7.30±0.09 ^a	0.00±0.00 ^b
<i>L. reuteri</i>	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^b

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa p<0.05.



Cabe mencionar que la bacteria de forma libre no presentó resistencia a las condiciones en el tratamiento térmico, viéndose favorecida la viabilidad al ser encapsulado. Los resultados mostrados podrían ser atribuibles al posible efecto protector generado por la mezcla de la goma xantana con el alginato de sodio ya que, estudios han demostrado que puede ser una excelente protección de los probióticos contra ambientes ácidos y temperaturas altas (Fareez et al., 2015) que sumado al uso del quitosano como recubrimiento, mejora la estabilidad química y mecánica de las cápsulas (Krasaekoopt et al., 2004).

Este análisis es útil para obtener información que permita determinar si la cepa probiótica encapsulada con el uso del multi-compuesto biopolimérico formulado con ECFDBC puede ser utilizado para adicionarse en alimentos donde las condiciones de temperatura en el proceso son extremas.

4.4 Caracterización física de encapsulados de *L. reuteri*.

4.4.1 Determinación de peso unitario, tamaño y fuerza de compresión durante el almacenamiento a 4 °C.

Se determinaron las características físicas respecto al peso unitario, tamaño y fuerza de compresión de los encapsulados durante el almacenamiento a 4 °C.

Los resultados de la caracterización física indicaron que independientemente del tipo y concentración de quitosano, así como de la adición del ECFDBC, no existe un efecto significativo en peso unitario (Tabla 19) y tamaño (Tabla 20) de las cápsulas en función del tiempo de almacenamiento. Se encontraron valores en peso que oscilan en 0.22-0.26 g para el control, y 0.24-0.27 g con ECFDBC, y para el tamaño en un intervalo de 1.54-1.55 mm para el control, y 1.55 a 1.58 mm para cápsulas con ECFDBC. Esta estabilidad en peso pudiera atribuirse al entrecruzamiento entre el uso del alginato en combinación con la goma xantana y quitosano, ya que aumenta considerablemente, y se producen cápsulas más densas, lo que favorece en una menor velocidad de liberación de la bacteria (Expósito-Harris, 2010).



Tabla 19. Determinación del Peso unitario de encapsulados de *L. reuteri* durante los días de almacenamiento a 4 °C.

Cápsulas	Peso unitario (g)		
	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	0.251±0.01 ^a	0.284±0.01 ^b	0.253±0.01 ^a
AlgNa -GX-QMPM 0.2	0.222±0.01 ^a	0.235±0.01 ^a	0.231±0.00 ^a
AlgNa -GX-QBPM 0.4	0.267±0.09 ^a	0.232±0.02 ^a	0.238±0.00 ^a
AlgNa -GX-QMPM 0.4	0.278±0.02 ^a	0.264±0.00 ^a	0.265±0.00 ^a
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	0.255±0.04 ^a	0.249±0.01 ^a	0.247±0.01 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	0.273±0.00 ^a	0.289±0.04 ^a	0.261±0.00 ^a
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	0.230±0.01 ^a	0.248±0.04 ^a	0.245±0.00 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	0.258±0.01 ^a	0.299±0.04 ^a	0.265±0.01 ^a

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa p<0.05

Tabla 20. Determinación del Tamaño de encapsulados de *L. reuteri* durante los días de almacenamiento a 4 °C.

Cápsulas	Tamaño (mm)		
	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	1.56±0.05 ^a	1.54± 0.05 ^a	1.52± 0.05 ^a
AlgNa -GX-QMPM 0.2	1.56±0.05 ^a	1.53± 0.00 ^a	1.53± 0.11 ^a
AlgNa -GX-QBPM 0.4	1.57±0.01 ^a	1.54± 0.01 ^b	1.54± 0.01 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	1.61±0.06 ^a	1.53± 0.04 ^{ab}	1.50± 0.03 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	1.51±0.04 ^a	1.51± 0.04 ^a	1.51± 0.04 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	1.65±0.04 ^a	1.53± 0.10 ^a	1.53± 0.08 ^a
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	1.55±0.04 ^a	1.55± 0.10 ^a	1.55± 0.10 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	1.58±0.06 ^a	1.58±0.03 ^a	1.58± 0.03 ^a

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa p<0.05.



Además, el tener partículas de tamaño controlado compuestas de un multi-compuesto biopolimérico, otorga protección a *L. reuteri* encapsulado, aumentando su biodisponibilidad y facilitando su incorporación, lo cual se puede visualizar al mejorar la eficiencia de encapsulación, pues proporciona una liberación sostenida y controlada a lo largo del tiempo (Neira-Carrillo et al., 2013).

Muthukumarasamy et al., 2006, encontraron que cápsulas de alginato con un diámetro entre 2 a 4 mm hechas por la técnica de extrusión son capaces de proteger mejor a *L. reuteri* que cápsulas más pequeñas elaboradas por el método de emulsión. Así mismo, Lee & Heo, 2000, encontraron que *Bifidobacterium logum* después de ser sometido a condiciones gastrointestinales simuladas tiene una viabilidad directamente proporcional al tamaño de la cápsula en intervalos de diámetro entre 1 a 2.6 mm; Reyes-Ocampo, 2010, obtuvo cápsulas en un diámetro de 1.37 mm, mencionando que cápsulas pequeñas limitan a tener baja viabilidad, y cuando se producen cápsulas grandes, las propiedades texturales sensoriales de productos alimenticios a los que son añadidos pudiera afectar negativamente. Cabe mencionar que en este estudio el tamaño obtenido podría representar una ventaja para la protección de la bacteria probiótica a las condiciones de pH y temperatura.

La fuerza de compresión de las cápsulas es una propiedad física importante pues esta puede influir en la estabilidad de las cápsulas por un periodo corto o largo de almacenamiento (Nualkaekul et al., 2014).

De acuerdo al modelo matemático de las variables cualitativas, Z_1 que representa el ECFDBC, X_1 la concentración de quitosano y X_2 el tiempo de almacenamiento, resultaron ser significativos respecto a la fuerza de compresión.

A continuación se muestra la ecuación de regresión obtenida:

$$\hat{y}=81.24-20.09z_1-1.58z_2-6.88x_1-10.18z_1x_1-1.42z_2x_1+4.82x_2 - 0.85z_1x_2+0.40z_2x_2+0.36x_1x_2-1.36z_1x_1x_2+0.98z_2x_1x_2-4.59x_2^2+0.79z_1x_2^2+3.55z_2x_2^2$$



Lo anterior representa que, la adición del ECFDBC y el aumento de la concentración de quitosano tienen un efecto en la fuerza de compresión, pues de acuerdo con el modelo, tienden a disminuir la respuesta. Así mismo, la fuerza de compresión se ve afectada por el tiempo de almacenamiento pues al aumentar este, la resistencia a la compresión tiende a aumentar.

De acuerdo a Barco-Hernández et al., 2011, concentraciones altas de quitosano dan lugar a matrices más densas, por lo que, se esperarían valores de compresión mayores, sin embargo, en este estudio se encontró que la fuerza de compresión tiende a disminuir a una concentración de 0.4%. Esto podría atribuirse a efecto del entrecruzamiento por parte de los biopolímeros, ya que es sabido que el alginato de sodio por naturaleza es un polímero de una fuerte dureza, la cual disminuye con la adición de otros hidrocoloides (Zamora-Vega, 2011), que aunado al aumento en la concentración de quitosano, favorece a un mayor entrecruzamiento de la matriz polimérica (Expósito-Harris, 2010). La disminución por parte del ECFDBC pudiera afectar las fuerzas de cohesión que mantiene el entrecruzamiento, provocando un ablandamiento de la cápsula, disminuyendo su resistencia, además, que por el contenido de fibra dietaria soluble, se esperaría un contenido considerable de gomas y mucílagos que propiamente podrían conferirle un ablandamiento a las cápsulas.

Este comportamiento puede ser visualizado en gráficas de contorno (Figura 16). En el inciso a) se observa el comportamiento en la fuerza de compresión para encapsulados sin ECFDBC y QBPM 0.2 y 0.4% evaluado a los 0, 15 y 30 días de almacenamiento. Para el inciso b) se aprecian los valores dados por encapsulados con ECFDBC y QBPM en sus dos concentraciones, en los incisos c) y d) se representan los encapsulados sin y con ECFDBC utilizando QMPM a 0.2 y 0.4%. Se observa de acuerdo a la región experimental, que para las formulaciones sin ECFDBC con una concentración de 0.4%, la fuerza de compresión disminuye, viéndose todavía más reducida entre un 52.4 y 58.6% al interaccionar con el ECFDBC. Mientras que por periodo de almacenamiento la fuerza de compresión tiende a aumentar.

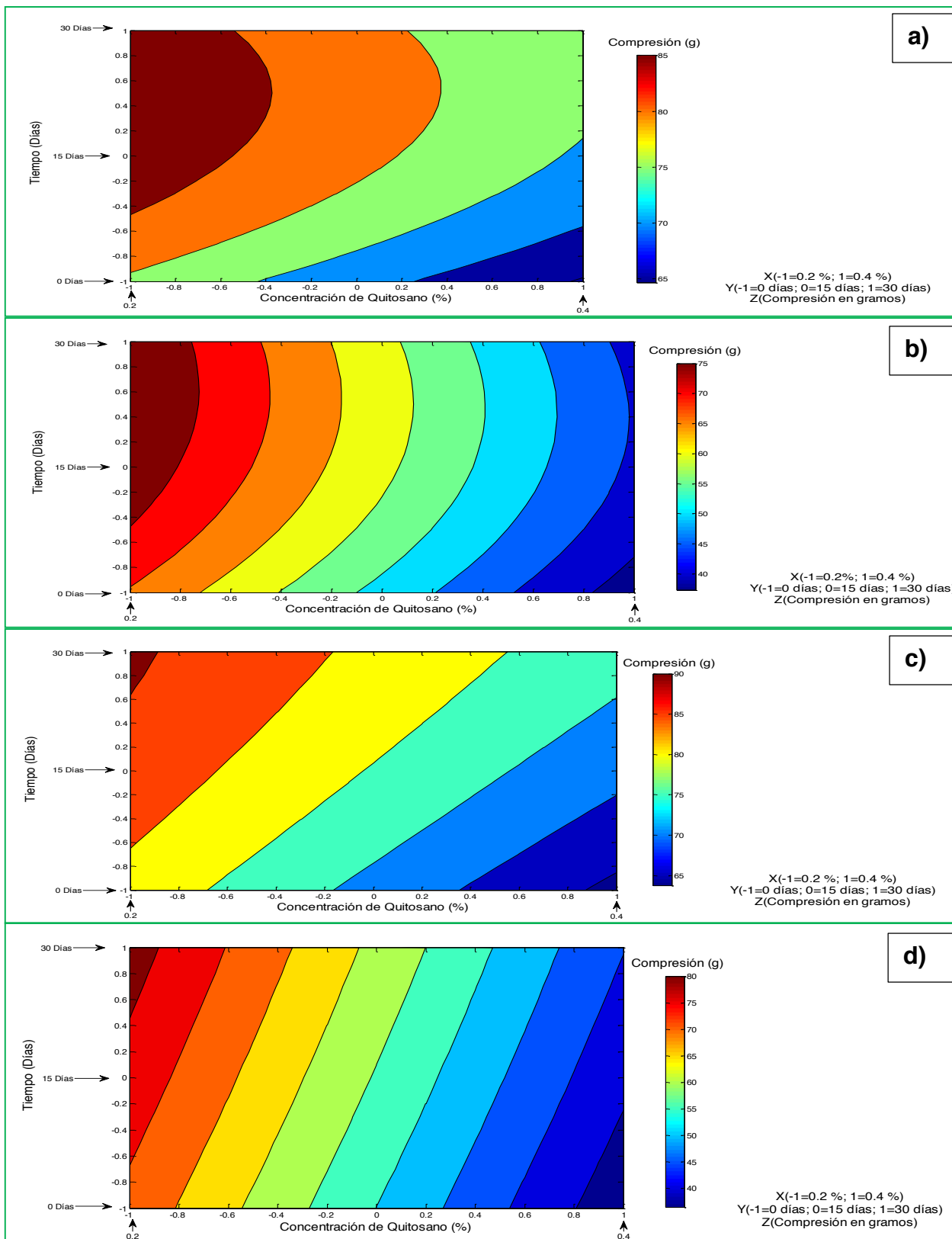


Figura 16. Gráficas de contorno de la fuerza de compresión de encapsulados de *L. reuteri* durante el almacenamiento a 4 °C.



4.4.2 Determinación del peso unitario, tamaño y fuerza de compresión de la formulación AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4 sometida a diferentes valores de pH.

Se determinó el peso unitario, tamaño y fuerza de compresión en relación a la formulación de encapsulados que obtuvo los mejores resultados con base al análisis de viabilidad bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, por lo que, la formulación con AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4 fue la seleccionada para su caracterización, con la finalidad de determinar si existe un efecto del pH sobre el estado físico de las cápsulas.

Tabla 21. Peso unitario de las cápsulas sometidas a diferentes pHs.

Cápsula	pH	Peso (g)		
		0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4	2	0.20±0.01 ^a	0.21±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a
	3.5	0.45±0.00 ^b	0.45±0.00 ^b	0.44±0.00 ^b
	5	0.55±0.00 ^c	0.55±0.00 ^c	0.55±0.00 ^c
	6.5	0.88±0.00 ^d	1.25±0.05 ^d	1.23±0.04 ^d

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla 22. Tamaño de las cápsulas sometidas a diferentes pHs.

Cápsula	pH	Tamaño (mm)		
		0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4	2	1.17±0.08 ^a	1.15±0.01 ^a	1.13±0.01 ^a
	3.5	1.64±0.07 ^b	1.64±0.01 ^b	1.65±0.01 ^b
	5	1.84±0.07 ^c	1.83±0.10 ^c	1.89±0.02 ^c
	6.5	2.46±0.36 ^d	2.30±0.07 ^d	2.33±0.07 ^d

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.



En las Tablas 21 y 22 se muestran los valores en peso y tamaño para las cápsulas formuladas con QBPM 0.4% y ECFDBC, respectivamente, de acuerdo al análisis se encontraron diferencias significativas respecto al valor de pH, observándose un aumento proporcional al aumento de pH. Algo importante que ocurre con los polímeros cargados iónicamente es que confieren características únicas para que ocurra un efecto de hinchamiento (Zamora-Vega, 2011). Esta hidratación es uno de los factores que influyen en la liberación del principio activo a través de las matrices poliméricas (Zamora-Vega, 2011), esto podría verse favorecido por la penetración del medio dentro de la matriz (Figueira-Maldonado, 2008) provocando una ganancia en peso y tamaño de las cápsulas, aunado con el aumento de la cantidad de células viables (Rodríguez- Hamamura et al., 2010).

Amorós-López, 2012, encontró que al evaluar cápsulas de alginato-almidón en jugo gástrico simulado durante 90 min, estas presentaron una ligera disminución en peso y tamaño, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio al someter las cápsulas a pH 2.

Tabla 23. Fuerza de compresión de las cápsulas sometidas a diferentes pHs.

Cápsula	pH	Fuerza de Compresión (g)		
		0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4	2	135.46±5.02 ^a	175.40±5.89 ^a	175.53±3.68 ^a
	3.5	110.67±0.00 ^b	174.83±8.41 ^a	181.16±0.66 ^a
	5	95.03±0.00 ^c	104.79±6.51 ^b	113.42±2.97 ^b
	6.5	135.91±0.00 ^a	98.20±3.03 ^b	81.23±9.17 ^c

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

En relación a los resultados obtenidos de la fuerza de compresión de las cápsulas sometidas a los diferentes pHs (Tabla 23). Se observa que los valores de la fuerza de compresión tienden a disminuir con el aumento del pH a 6.5, no encontrando diferencia significativa en el día 0 de almacenamiento entre pH 2 y 6.5. Esto pudiera atribuirse a efecto de entrecruzamiento ya que, al someter las cápsulas a un pH más



ácido tiende a aumentar la densidad de entrecruzamiento, estabilizando la cápsula, por lo que, se podría aumentar la compresión. Para pH de 6.5 el debilitamiento del entrecruzamiento permite una disminución de la densidad del mismo, lo que ocasiona mayor solubilidad del quitosano, con la consecuente liberación de grupos aminos, desestabilizando la partícula, con lo que se presume disminuiría la compresión, sin embargo, este debilitamiento del entrecruzamiento podría verse más influenciado en función del tiempo de almacenamiento.

En general, el contenido de pH tiene un efecto en la fuerza de compresión, ya que al aumentar disminuyó la fuerza necesaria para comprimir, en consecuencia la resistencia de las cápsulas.

Esto concuerda con lo expresado por Gonçalves et al., 2005, en donde establece que el grado de entrecruzamiento es el principal parámetro que influye en las propiedades de hinchamiento, difusión y resistencia mecánica, que a su vez, se encuentra influenciado por parámetros como la concentración del agente entrecruzante, peso molecular y grado de desacetilación del quitosano.

Esto es posible debido a la cualidad que tiene el quitosano como policatiónico a mantener una carga positiva en pH ácido, confiriéndole la capacidad de interaccionar, ya que los grupo amino que se liberan tienen la característica de que en medios ácidos se comportan como base, mientras que en medio básico se comportan como ácido. Por lo que, las partículas probablemente sufren disolución a pH 2, mientras que a pH de 6.5 muestran hinchamiento.

Resultados similares fueron encontrados por Nualkaekul et al., 2012, en donde al evaluar cápsulas de alginato-quitosano en pH 1.5 la fuerza de compresión tendió a aumentar, mientras que con un aumento de pH esta fuerza tendía a disminuir.

Así mismo, como parte de la caracterización se midió el peso unitario, tamaño y fuerza de compresión a las cápsulas cuando fueron sometidas a diferentes temperaturas.



Tabla 24. Peso de las cápsulas sometidas a diferentes temperaturas.

Cápsula	T°	Peso (g)		
		0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4	70/10	0.64±0.01 ^a	0.64±0.00 ^a	0.63±0.01 ^a
	70/15	0.59±0.02 ^a	0.58±0.02 ^a	0.59±0.02 ^a
	80/10	0.69±0.00 ^a	0.69±0.01 ^a	0.69±0.01 ^a
	80/15	0.72±0.00 ^a	0.74±0.02 ^a	0.72±0.00 ^a
	90/10	0.72±0.01 ^a	0.72±0.02 ^a	0.73±0.00 ^a
	90/15	0.79±0.02 ^a	0.81±0.03 ^a	0.80±0.02 ^a

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa $p<0.05$.

Tabla 25. Tamaño de las cápsulas sometidas a diferentes temperaturas.

Cápsula	T°	Tamaño (mm)		
		0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4	70/10	1.84±0.01 ^a	1.83±0.01 ^a	1.84±0.01 ^a
	70/15	1.57±0.04 ^a	1.66±0.05 ^a	1.57±0.01 ^a
	80/10	1.86±0.03 ^a	1.86±0.04 ^a	1.81±0.05 ^a
	80/15	1.63±0.05 ^a	1.63±0.04 ^a	1.65±0.03 ^a
	90/10	1.71±0.07 ^a	1.71±0.03 ^a	1.69±0.08 ^a
	90/15	2.00±0.01 ^b	2.04±0.01 ^{ab}	2.07±0.04 ^a

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa $p<0.05$.

Tabla 26. Fuerza de compresión de cápsulas sometidas a diferentes temperaturas.

Cápsula	T°	Fuerza de Compresión (g)		
		0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4	70/10	137.95±8.72 ^a	99.05±7.45 ^b	95.83±0.92 ^b
	70/15	142.67±10.51 ^a	132.61±8.33 ^{ab}	120.35±3.58 ^b
	80/10	122.99±12.65 ^a	99.65±1.44 ^b	94.40±3.36 ^b
	80/15	133.38±7.11 ^a	118.79±5.56 ^b	106.48±1.88 ^c
	90/10	107.65±4.36 ^a	91.89±5.64 ^b	88.03±1.47 ^b
	90/15	85.93±8.41 ^a	69.34±10.67 ^b	53.26±1.22 ^c

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa $p<0.05$.



De acuerdo al peso (Tabla 24) y tamaño (Tabla 25) de las cápsulas sometidas a diferentes temperaturas, no se encontraron diferencias significativas respecto al tiempo de almacenamiento., existiendo un aumento proporcional en peso y tamaño en relación a la temperatura de 90 °C por 15 min. Así mismo, se observa que la fuerza de compresión (Tabla 26) disminuye en función del tiempo de almacenamiento, encontrando valores menores para una temperatura de 90 °C por 15 min, en comparación con el resto de los valores obtenidos para las demás temperaturas (70 y 80 °C). Aunque no existen reportes del comportamiento en las características de encapsulados sometidos a tratamiento térmico, esto se pudiera atribuir a un posible hinchamiento de los encapsulados por efecto de la temperatura, indicando que a mayor temperatura hay una más rápida degradación del entrecruzamiento, por la solubilidad del quitosano, desestabilizando el encapsulado, aunado a una liberación más progresiva de la bacteria, lo que concuerda con la cuenta viable observada en el análisis de viabilidad a esta temperatura. Así mismo, es sabido que con el aumento de la temperatura decrece la viscosidad (Espinoza-Espíritu, 2007), lo que disminuiría la fuerza de compresión por efecto de la reducción del entrecruzamiento.

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES



V. CONCLUSIONES

- La encapsulación de *L. reuteri* utilizando el multi-compuesto biopolimérico formulado con el extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola, aumentó significativamente la eficiencia de encapsulación.
- Independientemente del tipo y concentración de quitosano la viabilidad de *L. reuteri* se mantiene significativamente con el multi-compuesto formulado con el extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola, durante el almacenamiento, encontrándose en valores de UFC/mL para ser considerado como probiótico.
- La utilización del multi-compuesto biopolimérico con quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 0.4% y formulado con el extracto, logró mantener la viabilidad en valores de 7 log UFC/mL bajo condiciones de pH 2 y 3.5 hasta 30 días de almacenamiento y temperatura de 90 °C/15 min durante 15 días de almacenamiento.
- El peso y tamaño de los encapsulados no tuvieron efecto significativo respecto a los días de almacenamiento. Los resultados de la fuerza de compresión indican que a mayor tiempo de almacenamiento mayor es la fuerza ejercida, y que con mayor concentración de quitosano, junto con la adición del extracto existe una disminución de la misma.
- Los encapsulados presentaron un incremento en peso unitario y tamaño cuando se utiliza un pH superior a 3.5, mostrando un comportamiento inverso en la fuerza de compresión, que tiende a incrementarse a un pH por debajo de este valor.

CAPÍTULO VI.

REFERENCIAS



VI. REFERENCIAS

- Amorós-López, D. (2013). Efecto del almidón en la viabilidad gastrointestinal de *Lactobacillus acidophilus* en biosoportos de alginato/almidón. *Universidad de Oviedo. Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria*.
- Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J., Calderón-Domínguez, G., Terres-Rojas, E., Garibay-Febles, V., Martínez-Rivas, A. & Gutiérrez-López, G. (2012). Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydrate Polymers*. (142): 185-189.
- Avendaño-Romero G.C., López- Malo A., Palou E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*. 7-1: 87-96.
- Avilés-Palou, M. (2013). Desarrollo y caracterización de una capa de biopolímero sobre titanio con efectos antibacterianos. *Depto. Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica. Universidad Politécnica de Catalunya*. Vol. I.
- Barco- Hernández, P. L., Burbano-Delgado, A. C., Mosquera-Sánchez, S. A., Villada-Castillo, H. S., Navia-Porras, D. P. (2011). Efecto del recubrimiento a base de almidón de yuca modificado sobre la maduración del tomate. *Redalyc.Org. Revista Lasallista de Investigación*. 2(8): 96-103.
- Burgain J, Gaiani C., Linder M., Scher J. (2011). Encapsulation of Probiotic living cells: From laboratory scale to industrial. *Vandoeuvre les Nancy, France: ELSEVIER, Journal of Food Engineering*, (104). 467- 483 p.
- Caicedo-Cipagauta Y.M. (2010). Estudio de la viabilidad de la incorporación de bacterias probióticas microencapsuladas en helados. Tesis de la Especialidad en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Pp. 1-68.



- Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanes, F. C., Marzo, F., Villaran Mdel, C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 185-189.
- Chi-Leung Hui P., Wen-Yi W., Chi-Wai K., Sau-Fun Ng F., Chang-E. Z., Wat E., Xin-Zhang V., Chung-Lap C., Bik-San Lau C., Ping-Chung L. (2013). Preparation and characterization of chitosan/sodium alginate (CSA) microcapsule containing Cortex Moutan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects*. 434: 95-101.
- De la Cruz Molina A.V. & Terán- Ratti A. R. (2013). Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba. Escuela Agrícola Panamericano, Zamorano, Honduras. Pp. 1-36.
- Dong, Q.Y., Chen, M.Y., Xin, Y., Qin, X.Y., Cheng, Z., Shi, L. E., Tang, Z. X. (2013). Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science & Technology*. 48: 1339-1351.
- Eng-Seng C., Sze-Ling W., Peh-Phong L., Jau-Shya L., Tey-Beng T., Zhibing Z., Poncelet D., Pogaku R., Soon-Hock P., Zhi-Hui Y. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cell. *Carbohydrate Polymers*. 83: 225-232.
- Espinoza-Espíritu, E.V. (2007). Propiedades físicas y biológicas de dos tipos de esponjas de quitosano para su aplicación como biomaterial. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Lima, Perú.
- Expósito-Harris, R. (2010). Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Madrid. *Facultad de Ciencias Biológicas, Depto. de Bioquímica y Biología Molecular I*. ISBN: 978-84-693-5983-9.
- FAO/OMS. (2002). Report on Join FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in foods. Disponible: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.



- Fareez I.M., Lim S.M., Mishra R. K., Ramasamy K. (2015). Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. *Int. Journal of Biological Macromolecules* 72: 1419-1428.
- Figueira-Maldonado, E. (2008). Degradación hidrolítica a diferentes pH de un material compuesto Poli (ácido láctico)/Quitosano. *Universidad Simón Bolívar. Decanato de Estudios profesionales. Coordinación de Ingeniería d Materiales*.
- García- Ceja A. & López- Malo A. (2012). Biopolímeros utilizados en la encapsulación. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6-1:84-97.
- Giancarlo A. (2012). *Lactobacillus reuteri*. Scribd. Disponible: <http://es.scribd.com/doc/97717177/LACTOBACILLUS-REUTERI#scribd>.
- González- Alvarado G.G. (2009). Estabilidad e intercambio de iones calcio en geles de alginato. Depto. De Ingenierías Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico de Durango. Victoria de Durando, Dgo. Pp. 1-44.
- Gonçalves da Rosa C., Dellinghausen-Borges C., Zambiasi R.C., Ramos-Nunes M., Valmir-Benvenutti E., Rickes da Luz S., Farias-D'Avila R., Kuhn Rutz J. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β - cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*. 46: 138-146.
- Jiménez-Pranteda M.L., Poncelet D., Náder.Macías M.E., Arcos A., Aguilera M., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A. (2012).Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 133(2): 179-184.
- Kamalian N., Mirhosseini H., Mustafa S., Abd Manap M.Y. (2014).Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. *Carbohydrate Polymers*. 111: 700-706.
- Krasaekoopt W. & Watcharapoka S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *Food Science and Technology*. 57: 761-766.



- Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14: 737-743.
- Lee, K.Y., Heo, T. R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied environmental Microbiology*. 66:869-873.
- López- Córdoba A.F. (2012). Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate. Tesis de maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos. Universidad Nacional de la Plata. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) *Facultad de Ciencias exactas*. La Plata, Buenos Aires. pp. 1-155.
- Lupo- Pasin B., González-Azón C., Maestro- Garriga A. (2012). Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3 (1): 130-151.
- Martínez-Castellanos G. (2009). Uso de bacterias lácticas en recubrimientos de quitosano para la conservación poscosecha de litchi y rambután. Tesis de Doctorado en Biotecnología. *Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa*. Pp. 1-126.
- Montes- Ramírez L.M. (2013). Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469). *Tesis de maestria en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia*. Bogotá D.C., Colombia. Pp. 1- 106.
- Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, R. & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5, 1–18.
- Muthukumarasamy P. & Holley A.R. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated



Lactobacillus reuteri. *International Journal of Food Microbiology*. 111: 164-169.

- Neira-Carrillo, A., Yáñez-Muñoz, D., Aguirre-Zazzali, P., Amar-Marini, Y., Vidal-Vilches, S., Egaña-Palma, R. (2013). Encapsulación de Biomoléculas usando polímeros naturales: “Un nuevo enfoque en la entrega de Fármacos en Medicina”. *Avances en Ciencias veterinarias*. 2(28): 31-40.
- Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., Charalampopoulos, D. (2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydrate Polymers*. 90: 1281-1287.
- Pantaleón-Velasco M.R., Ruiz-López I.I., Pérez- Silva A., Bravo-Clemente L., Mateos R., Ruiz-Espinosa H., Vivar-Vera M.A. (2014). Antioxidant and functional properties of a high dietary fibre powder from carambola (*Averrhoa carambola* L.) pomace. *International Journal of Food Science & Technology*. Pp. 1-10.
- Pérez-Leonard H., Bueno-García G., Brizuela- Herrada M.A., Tortoló-Cabañas K., Gastón-Peña C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *Revista ICIDCA. Instituto Cubano de Investigación sobre los derivados de la caña de azúcar*. Habana, Cuba. 47 (1): 14-25.
- Prashanth, H.K.V. & Tharanathan, R.N. (2007). Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview: a review. *Food Science & Technology*. 18:117-131.
- Rathore S., Mahendrakumar- Desai P., Liew C.V., Wah-Chan L., Sia Heng P.W. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*. 116: 369-381.
- Reyes-Ocampo, J.G. (2010). Protección de *Lactobacillus rhamnosus* en cápsulas de alginato de centro líquido. *Universidad Autónoma Metropolitana. Maestría en Biotecnología*.
- Rico-Rodríguez F. (2013). Estudio de la aplicación de recubrimientos comestibles de quitosano y su combinación con aceites esenciales sobre la



vida útil del mango (*Mangifera indica* L.) mínimamente preprocesado. *Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia*. Pp. 1-115.

- Rodríguez-Hamamura, N., Valderrama-Negrón, A., Alarcón-Cavero, H., López-Milla, A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista Soc. Química Perú*. 76 (4): 336-354.
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebalo, M. A., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. L., Bautista-Baños, S. (2009). Propiedades químico-estructurales y actividades biológicas de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Redalyc.Org. Revista Chapingo serie Horticultura*. 3 (15): 307-3017.
- Roque-Martinez, U. (2013). Elaboración de una bebida láctea probiótica enriquecida con fibra dietaria y vainilla. *Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtepec*.
- Saikia S., Mahnot, N.K., Mahanta, C. L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food Chemistry*. 171: 144-152.
- Schell D. & Beermann C. (2014). Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. *Food research International*. 62: 308-314.
- Victoria-León, T., Totosaús, A., Guerrero, I. & Pérez-Chabela, M. L. (2006). Thermoresistant lactic acid bacteria effect on cooked sausages. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(2):135-141.
- Vodnar D.C. & Socaciu C. (2014). Selenium enriched green tea increase stability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* in chitosan coated microcapsules during exposure to simulated gastrointestinal and refrigerated conditions. *LWT- Food Science and Technology*. 57: 406-411.



- Zamora-Vega, R. (2011). Elaboración de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boulardii* e inulina. Instituto Politécnico Nacional. *Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo integral regional*. Unidad Michoacán.
- Zhou, Y., Martins, E., Groboillot, A., Champagne, C.P. & Neufeld, R.J. (1998). Spectrophotometric quantification of lactic acid bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. *Journal of Applied Microbiology*. 84:342-348.