

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



**DESARROLLO DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA DE *Aloe perfoliata* var.
Vera (SABILA) UTILIZANDO *Lactobacillus casei shirota*.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

JULIA PATRICIA GONZALEZ GUZMAN
MARTA SUSANA STEPHANY SOSA QUINTANILLA

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA**

ABRIL, 2016

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR INTERINO

LIC. LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIA GENERAL INTERINA

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

TRIBUNAL EVALUADOR

COORDINADORA DE AREA MICROBIOLOGIA

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

**COORDINADORA DE AREA DE GESTION DE CALIDAD:
CONTAMINACION AMBIENTAL**

MSC. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

DOCENTE ASESORA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

AGRADECIMIENTOS.

A mi madre Olinda.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre Mauricio.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por su amor, por el valor mostrado para salir adelante, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mis hermanos.

A Maury por ser el ejemplo de un hermano mayor y del cual aprendí aciertos y de momentos difíciles; A mi hermanita Vero por su soporte y compañía, por creer en mí y ser un ejemplo de dedicación y esfuerzo. Los amo mucho

A mi Familia

Que me brinda su apoyo y me conforta en todo momento, siendo un pilar importante para mi vida y de quienes estoy muy agradecida.

Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias!

Stephany Sosa

AGRADECIMIENTOS.

Son muchas las personas que debo agradecerles por su apoyo a lo largo de la carrera y especialmente en este trabajo:

A Dios por darme la oportunidad de estudiar esta carrera, por guiarme por darme una familia que me apoya, ponerme a personas especiales en mi camino.

A mi familia por ser mi sostén, en especial a mi amada madre Sara por siempre estar junto a mí incondicionalmente y brindarme todo lo que siempre he necesitado, por enseñarme tantas cosas que me han convertido en la persona que ahora soy, a mi padre por enseñarme los valores cristianos.

A mi docente director la maestra Coralia González por su apoyo y su dirección en este camino de investigación.

A Luis por su afecto, colaboración y apoyo en todo momento.

A mis amigos Vicky, Josué, Alex, Heber, Leo, Bea, Brenda, Marce por fiel amistad, cariño y ayuda brindada.

A mis profesores que me han compartido sus conocimientos a lo largo de mis años de estudio y con los cuales he compartido gratos momentos, en especial a Licda. Maribel Galdámez, Lic. Javier Guzmán, Licda. Aida Ramos, Lic. Salvador Castillo, Licda. Bety Hernández y Maestra Evelin de Ramos.

A todas a aquellas personas que hicieron su aporte de una u otra manera.

Julia González

DEDICATORIA

Al Creador por haberme permitido llegar a este momento de mi formación profesional, a mis padres que me brindaron su apoyo incondicional y me enseñaron a valorar las cosas importantes de la vida, a mis hermanos por ser una parte fundamental de mi vida, con quienes he aprendido a ser mejor persona, a mi familia que me ha dado fortaleza para salir adelante y a todas las personas me han apoyado y han creído en mi.

Stephany Sosa

DEDICATORIA

Quiero dedicar el esfuerzo puesto en la realización de este trabajo ante nada a DIOS que me ha dado su bendición en todos los campos de mi vida; a mis padres por siempre darme su apoyo y amor; A mi Abuelo Ignacio Palacios por ser un gran ejemplo a seguir y dejar una gran huella en mi, DIOS TODOPODEROSO lo tenga en su gloria.

Julia González

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
CAPTULO I	
1.0 INTRODUCCION	xvi
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GENERAL	
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEORICO	21
3.1 Alimentos funcionales.	21
3.1.1 Características de los alimentos funcionales.	22
3.2 Probióticos.	23
3.2.1 Probióticos como alimento funcional.	24
3.2.2 Mecanismo de acción de los Probióticos.	25
3.2.3 Efectos a la salud de los Probióticos.	30
3.2.4 Microorganismos Probióticos más empleados.	32
3.3 Género <i>Lactobacillus</i> .	32
3.3.1 Propiedades importantes del genero <i>Lactobacillus</i> .	33
3.4 <i>Lactobacillus casei shirota</i> .	34
3.4.1 Características.	34
3.4.2 Beneficios atribuidos a <i>Lactobacillus casei shirota</i> .	35
3.5 Sábila (<i>Aloe perfoliata</i> var. vera).	36

3.5.1 Taxonomía de la Sábila.	37
3.5.2 Composición Química de la planta <i>Aloe perfoliata</i> var. vera.	37
3.5.3 Beneficios de la utilización de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera.	40
3.6 Componentes de la formulación de la bebida.	42
3.7 Indicadores a determinar.	43
3.7.1 Determinación de pH.	43
3.7.2 Determinación de Grados Brix.	43
3.8 Determinaciones Microbiológicas.	44
3.8.1 Determinación de <i>Escherichia coli</i> .	44
3.9 Estabilidad de componente Probióticos.	45
3.10 Método de evaluación sensorial.	46
3.10.1 Prueba de Análisis Cualitativo Descriptivo.	47
3.10.2 Reclutamiento de Personal.	48
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLOGICO	50
4.1 Tipo de estudio.	50
4.2 Investigación Bibliográfica.	50
4.3 Investigación de campo.	51
4.4 Parte experimental.	51
4.4.1 Preparación del jugo de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera (Sábila).	51
4.4.2 Formulación de la bebida.	53
4.4.3 Preparación de la bebida.	54
4.4.4 Indicadores de la bebida.	54
4.4.4.1 Determinación de pH.	54
4.4.4.2 Determinación de Grados Brix.	55
4.5 Indicadores microbiológicos.	56
4.5.1 Preparación de diluciones.	56
4.5.2 Determinación de <i>Escherichia coli</i> .	57

4.6 Estabilidad de la cepa probiótica <i>Lactobacillus casei shirota</i>	58
4.7 Etapa final: Inoculación.	58
4.8 Estabilidad del componente probiótico.	59
4.9 Análisis sensorial.	60
CAPITULO V	
5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.	
5.1 Extracción del jugo de gel de las hojas de la planta de Sábila.	63
5.2 Estandarización de la sepa pro biótica <i>Lactobacillus casei shirota</i> .	64
5.3 Elaboración de bebida probiótica pasteurizada a partir de un extracto natural de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera y <i>Lactobacillus casei shirota</i> .	65
5.4 Determinación de pH, Grados Brix y análisis microbiológico.	67
5.4.1 Determinación de pH.	67
5.4.2 Determinación de Grados Brix.	69
5.4.3 Análisis microbiológico (Determinación de <i>Escherichia coli</i>)	71
5.5 Comprobación de la estabilidad de la cepa pro biótica en el jugo de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera (Sábila) durante un periodo de 1, 5, 8 y 15 días.	72
5.5.1 Resultados obtenidos del análisis de estabilidad de la Muestra 1 (10% de jugo de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera).	74
5.5.2 Resultados obtenidos del análisis de estabilidad de la Muestra 2 (15% de jugo de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera).	75
5.5.3 Resultados obtenidos del análisis de estabilidad de la Muestra 3 (20% de jugo de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera).	76
5.5.4 Comparación de estabilidad de las tres muestras evaluadas.	77
5.5.5 Realizar prueba sensorial de Análisis Descriptivo Cualitativo.	79

CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES.	85
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES.	89
BIBLIOGRAFIA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Pág.
1.	Efecto y Mecanismo de Acción sobre los Probióticos	28
2.	Componentes químicos de la planta <i>Aloe perfoliata</i> var. vera	39
3.	Propuesta de fórmula para la preparación de la bebida probiótica	53
4.	Cantidades utilizadas para la elaboración de las tres propuestas de la bebida probiótica	66
5.	Resultado del análisis microbiológico (<i>Escherichia coli</i>) para el jugo de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera sin pasteurizar.	71
6.	Cantidades utilizadas en la elaboración de la bebida de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera con <i>Lactobacillus casei</i> shirota para realizar el análisis sensorial.	79
7.	Calificación promedio de docentes en la prueba Sensorial	81
8.	Calificación promedio de la bebida probiótica de estudiantes en la prueba Sensorial.	83

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág.
1. Probióticos y los efectos en la barrera epitelial.	27
2. Funciones de los probióticos.	31
3. Clasificación de los métodos de evaluación sensorial	47
4. Esquematización del procedimiento de extracción del jugo a partir de las hojas de la planta de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera (Sábila)	63
5. Grafico de evaluación de pH de las muestras del jugo pasteurizado con probiótico Muestra 1 (10%), Muestra 2 (15%), Muestra 3 (20%)	68
6. Grafico de evaluación de Grados Brix de las muestras del jugo pasteurizado luego de incorporara el microorganismo probiótico Muestra 1 (10%), Muestra 2 (15%), Muestra 3 (20%)	70
7. Representación gráfica de resultados de resultados de estabilidad del microorganismo probiótico <i>Lactobacillus casei</i> shirota en Muestra 1 en un periodo de tiempo de 1, 2 ,5 ,8 y 15 días.	74
8. Representación gráfica de resultados de resultados de estabilidad del microorganismo probiótico <i>Lactobacillus casei</i> shirota en Muestra 2 en un periodo de tiempo de 1, 2 ,5 ,8 y 15 días.	75
9. Representación gráfica de resultados de resultados de estabilidad del microorganismo probiótico en Muestra 3 en un periodo de tiempo de 1, 2 ,5 ,8 y 15 días.	76

10. Representación gráfica de comparación de resultados de estabilidad del microorganismo probiótico *Lactobacillus casei* shirota en las tres muestras en la dilución 10^7 en un periodo de tiempo de 1, 2 ,5 ,8 y 15 días. 77
11. Docentes que se sometieron a la prueba de Análisis sensorial 80
12. Estudiantes que se sometieron a la prueba de Análisis sensorial 80
13. Calificación promedio de la característica Organoléptica de la bebida probiótica por Docentes. 81
14. Calificación promedio de las características Organolépticas de la bebida probiótica por Estudiantes. 84

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág.
1.	Resultados de la estandarización de la cepa probiótica <i>Lactobacillus casei shirota</i> .	64
2	Resultados de la determinación de pH.	68
3	Resultados obtenidos de Grados Brix para el jugo de <i>Aloe perfoliata</i> var. vera (Sábila).	70
4	Resultados de análisis de estabilidad de microorganismo probiótico de las muestras analizadas, en un periodo de 1, 2, 5,8 y 15 días.	73

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- 1 Esquema de formulación de la bebida probiótica.
- 2 Procedimiento de preparación de diluciones del jugo de *Aloe perfoliata* var. vera pasteurizado sin probióticos
- 3 Procedimiento para la determinación de *Escherichia Coli* por medio de la técnica de Numero Más Probable
- 4 Procedimiento para la realización de estabilidad del Componente Probiótico
- 5 Estandarización de sepa probiótica *Lactobacillus casei* shirota.
- 6 Criterios microbiológicos para vigilancia de los alimentos según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA)
- 7 Ejemplos de cepas probióticas en productos
- 8 Instrumento de evaluación de la prueba de análisis cualitativo descriptivo
- 9 Resultados de revisión taxonómica de la planta de Sábila
- 10 Monografías y hojas de Especificaciones de Materias Primas utilizadas en la formulación de la bebida Probiótica
- 11 Índice de NMP y límite de confianza de 95% para varias combinaciones de resultados positivos para cada serie de 3 tubos, cada uno con 10,1, 0.1, 0.01 g o mL de muestra
- 12 Fotografías de proceso de elaboración de bebida probiótica
- 13 Fotografías de medición de pH de las bebidas
- 14 Fotografías de determinación de *E. coli* mediante Técnica de Numero más probable

- 15 Fotografías de estandarización de *Lactobacillus casei shirota*
- 16 Fotografías de estabilidad de *Lactobacillus casei shirota*
- 17 Resultado de estabilidad de microorganismo Probióticos en las tres muestras elaboradas.
- 18 Fotografías de equipo utilizado para realizar las diferentes mediciones durante el proceso de elaboración de la bebida.

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló una bebida probiótica utilizando *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila) y una cepa liofilizada de *Lactobacillus casei shirota*. Se elaboró la bebida se partir de la obtención del jugo de las hojas de la planta *Aloe perfoliata* var. vera (sábila); el cual se utilizó en proporciones 10% (50 mL), 15% (75 mL), 20% (100 mL); a los cuales se le agregó Goma Xantan como estabilizante, Ácido Cítrico como regulador de la acidez, azúcar de caña sin refinar como edulcorante y agua purificada. Además se procedió a pasteurizar la bebida, para la posterior incorporación del microorganismo estandarizado *Lactobacillus casei shirota* a la concentración de 10^7 UFC/mL.

Se realizó la medición de los parámetros de pH y Grados Brix, y además la determinación de *Escherichia coli* al jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (sábila) sin pasteurizar y pasteurizado; Así mismo se evaluó la estabilidad del microorganismo estandarizado *Lactobacillus casei shirota* a la concentración de 10^7 UFC/mL en el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera, mediante recuento en placa en agar MRS, durante los periodos de 1, 2, 5, 8 y 15 días.

Finalmente, se realizó la prueba sensorial de Análisis Descriptivo Cualitativo que se llevó a cabo con dos grupos de catadores, un grupo conformado 25 docentes y el otro por 25 estudiantes, a los cuales se les dió una muestra de 30 mL de la bebida para valorar las características sensoriales y la aceptabilidad de la

bebida con relación al aspecto, color, olor, sabor (dulce, ácido, residual), fluidez, grumosidad y calidad general.

Tomando en cuenta del estudio estabilidad de *Lactobacillus casei* shirora en el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera pasteurizado, se concluyó que la muestra que brinda mejor estabilidad al componente probiótico es la muestra 2. (15% de jugo de sábila) cuya de una concentración inicial de $7.00E+07$ UFC/mL que se mantiene por espacio de 2 días con una concentración superior a $1.00E+06$ UFC/mL, finalizando a los 15 días con $6.00E+07$ UFC/mL, alcanzando el requerimiento mínimo 10^6 necesario para que la bebida sea considerada como probiótica; además en la prueba sensorial del análisis descriptivo cuantitativo la muestra 2 (15% de jugo de sábila), presento una buena aceptabilidad, tanto en estudiantes como en docentes, ambos géneros; logrando obtener un resultado de calidad general aceptable; el tiempo de vida útil de la bebida preparada fue de 8 días, considerando tanto los valores de pH y Grados Brix que presentaron una disminución luego de transcurrido el octavo día de análisis.

Es recomendable que para la elaboración de la bebida de Sábila contar con un cultivo establecido de *Aloe perfoliata* var. vera, y que durante todo el proceso de elaboración de la bebida se mantenga una cadena de frío. Así mismo, evaluar el efecto sinérgico que se desarrolla entre el jugo de sábila y el microorganismo probiótico; tanto in vitro, como in vivo.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Los alimentos funcionales se definen como “alimentos que se consumen como parte de una dieta normal y que contienen componentes biológicamente activos que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades”. ⁽¹⁾ A partir del interés que ha surgido por parte de la población de consumir estos alimentos funcionales, se plantea la elaboración de una bebida probiótica utilizando la planta *Aloe perfoliata* var. vera (sábila) y la cepa probiótica *Lactobacillus casei* shirota, ambos componentes actuando de manera sinérgica podrían brindar a la bebida probiótica una diversidad de beneficios que son de gran importancia para mejorar la calidad de vida de las personas, ya que podría mejorar de manera significativa el funcionamiento del sistema gastrointestinal, incluyendo la reducción del nivel de colesterol en sangre, minimizando los efectos perjudiciales de la terapia con antibióticos y favorecen el fortalecimiento del sistema inmunológico. ^{(1), (6), (13).}

El *Aloe perfoliata* var. vera (sábila) una de las especies más estudiadas por sus beneficios, se utilizará como un vehículo no lácteo, para que el probiótico llegue al consumidor, debido a que presenta todas las características para ser considerada una buena alternativa como medio de crecimiento del microorganismo probiótico *Lactobacillus casei* shirota, que es uno de los microorganismos ampliamente estudiados, seleccionado por su inocuidad, capacidad a sobrevivir en el tubo digestivo, así como también por presentar actividad inmunoestimulante, antibacteriana, antioxidante y por lograr alcanzar al final de su vida útil al menos 10^7 UFC/g. ^{(13),(9),(32).}

Para la elaboración de la bebida se partió de la obtención del jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (sábila); el cual se utilizó en proporciones 10% (50 mL), 15% (75 mL), 20% (100 mL); a los cuales se le agregó goma xantan como estabilizante, ácido cítrico como regulador de la acidez, azúcar de caña sin refinar como edulcorante y agua purificada; además se pasteurizó la bebida, para luego realizar la incorporación del microorganismo *Lactobacillus casei* shirota a la concentración de 1×10^7 UFC/mL.

Al producto elaborado se le realizaron análisis fisicoquímicos como la medición de pH según método 981.12/90 y Grados Brix según método 932.12/90 ambos de la Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.), además de análisis microbiológico de determinación de *Escherichia coli* según criterios microbiológicos para vigilancia de los alimentos, Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50.08); así mismo se verificó estabilidad del componente probiótico mediante el recuento en placa de agar MRS, esperando obtener una viabilidad de microorganismo de 10^7 UFC/g; finalmente se realizó un análisis sensorial para determinar la aceptación de la bebida según las características organolépticas evaluadas de aspecto, color, olor, sabor (dulce, ácido, residual), fluidez, grumosidad y calidad general; mediante la Prueba de Análisis Cuantitativo Descriptivo. (19), (25).

Mediante el estudio estabilidad de *Lactobacillus casei* shirora en el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera pasteurizado, se estableció que la concentración que brinda mejor estabilidad al componente probiótico es la muestra 2. (15% de jugo de sábila) cuya de una concentración inicial de 7.00×10^7 UFC/mL y finalizando a los 15 días con 6.00×10^7 UFC/mL, alcanzando el requerimiento mínimo 10^6 UFC/mL necesario para que la bebida sea

considerada como probiótica; además en la prueba sensorial del análisis descriptivo cuantitativo la muestra 2 presentó una buena aceptabilidad, tanto de estudiantes como de docentes, en ambos géneros; logrando obtener un resultado de calidad general aceptable.

El estudio experimental se realizó en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador (UES) en el transcurso de los meses de Julio a Septiembre del año 2015.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una bebida probiótica de *Aloe perfoliata* var. vera (sábila) utilizando *Lactobacillus casei shirota*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Extraer el jugo del gel de las hojas de la planta de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila).

2.2.2 Elaborar una bebida probiótica pasteurizada a partir de un extracto natural de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila) y *Lactobacillus casei shirota*.

2.2.3 Determinar en la bebida pH, grados Brix y la ausencia de *Escherichia coli*.

2.2.4 Comprobar la estabilidad de la cepa probiótica en el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila), durante los periodos de 1, 2, 5, 8 y 15 días.

2.2.5 Realizar la prueba sensorial para medir la aceptabilidad de la bebida elaborada.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Alimentos Funcionales. ^{(1), (26)}

Se consideran alimentos funcionales aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar. Estos alimentos, además, ejercen un papel preventivo ya que reducen los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades.

Entre los alimentos funcionales más importantes se encuentran los alimentos enriquecidos. Estos alimentos funcionales deben consumirse dentro de una dieta sana y equilibrada y en las mismas cantidades en las que habitualmente se consumen el resto de los alimentos. ⁽¹⁷⁾

En las últimas décadas, nuestros hábitos dietéticos han variado. Ya no se trata únicamente de que reduzcan los alimentos cuyo exceso puede ser perjudicial para la salud, sino de buscar aquellos que tengan beneficios saludables y ayuden a retrasar la aparición de algunas enfermedades.

Los ciudadanos japoneses llevan décadas consumiendo estos productos que gozan de gran popularidad. A mediados de la década de los 80, el incremento de la esperanza de vida de la población japonesa y el consiguiente aumento del gasto sanitario, provocaron que el gobierno nipón se planteara la necesidad de desarrollar productos alimenticios que mejorasen la salud de los ciudadanos para garantizar un mayor bienestar y

calidad de vida. En otros países, como Canadá y EEUU, el consumo de alimentos funcionales está muy extendido y aproximadamente un 40% de la población ya los ha incorporado a su dieta diaria. Esta incorporación de alimentos funcionales surge de la necesidad de compensar una alimentación desequilibrada, muy rica en grasas saturadas y pobre en determinadas grasas insaturadas, minerales, vitaminas y fibra.

3.1.2 Características de los alimentos funcionales. ⁽¹⁾⁽¹⁹⁾

Desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede tener las siguientes características:

- Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante condiciones especiales de cultivo.
- Un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios (por ejemplo, bacterias probióticas seleccionadas, de probados efectos beneficiosos sobre la salud intestinal).
- Un alimento del cual se ha eliminado un componente para que produzca menos efectos adversos sobre la salud (por ejemplo, la disminución de ácidos grasos saturados).
- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada químicamente para mejorar la salud (por ejemplo, los hidrolizados proteicos adicionado en los preparados para lactantes para reducir el riesgo de alergenicidad).
- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido aumentada para mejorar la asimilación de un componente beneficioso.

3.2. Probiótico. (7), (20)

Un alimento probiótico es, según la Organización Mundial para la Salud (OMS), un alimento que contiene microorganismos vivos que, suministrados en cantidad adecuada, confieren un efecto beneficioso sobre la salud del huésped. El término pro-biótico es una palabra relativamente nueva que proviene del griego (pro= a favor de; biótico=vida) “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales.

Una bebida probiótica es una preparación que contiene microorganismos bien definidos, viables y en número suficiente los cuales son capaces de alterar la composición de la micro flora en un compartimiento de huéspedes y que, por ello, son capaces de ejercer un efecto beneficioso para este. Logrando ser de gran beneficio para la salud y mejoramiento de calidad de vida.

Los probióticos son principalmente bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueki*) o *Bifidobacterium* (*B. lactis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*), que han sido seleccionadas específicamente por su inocuidad, su capacidad a sobrevivir en el tubo digestivo y por sus actividades inmuno estimulantes, anti-bacterianas, anti-oxidantes o nutricionales beneficiosas para la salud. Una vez consumida, estas bacterias exógenas alcanzan en forma viable el colon, donde contribuyen a mantener el equilibrio de la microbiota intestinal.

También son capaces de estimular la inmunidad local y sistémica del huésped. Por estas razones han sido utilizados en niños y adultos para el tratamiento de colonización gástrica por *H. pylori*, diarreas agudas, diarreas del viajero, infecciones por rotavirus y diarreas asociadas al uso de antibiótico. Los probióticos también pueden influir en la biodisponibilidad de nutrientes gracias a sus actividades enzimáticas que hidrolizan la lactosa y proteínas y participan en la síntesis de vitaminas.

La administración de las cepas probióticas de *Lactobacillus* sp., también inhibe las actividades enzimáticas pro-carcinogénicas (β -glucuronidasa, β -glucosidasa, ureasa, nitro-reductasa) expresadas por otras poblaciones bacterianas. Algunas cepas también ejercen actividades anti-inflamatorias y/o antioxidantes que pueden reducir procesos inflamatorios en el tubo digestivo.

3.2.1 Probióticos como alimento funcional. ^{(11), (22)}

Los probióticos son ingredientes funcionales de características físicas y químicas distintas, capaces de modificar la flora intestinal y producir un efecto beneficioso sobre el sistema inmune. Los microorganismos con estos efectos deberían cumplir con una serie de condiciones:

- Existencia natural en la flora microbiana intestinal.
- Pueden subsistir durante el tránsito por el intestino delgado y el colon.
- Tienen capacidad de adherencia al epitelio intestinal.

- No son patógenos. Los más comunes son los lactobacilos y las bifidobacterias.

Estudios realizados por el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA), indican que el consumo de probióticos contribuye a disminuir la colonización de la bacteria causante de acidez y, por dicha vía, la gastritis crónica o úlcera.

La viabilidad de los microorganismos en un producto probiótico durante toda la vida útil es imprescindible, porque condiciona su actividad, aun cuando no hay acuerdos generales en cuanto a la concentración mínima necesaria del probiótico para alcanzar ventajas terapéuticas. Algunos investigadores sugieren niveles de concentración mayores a 10^6 UFC/mL, otros estipulan concentraciones mayores a 10^7 UFC/mL y 10^8 UFC/mL como niveles satisfactorios.

3.2.2 Mecanismo de Acción de los Probióticos. (17)(19)

Aunque se sabe que ciertos probióticos pueden tener efectos beneficiosos, apenas se conocen los mecanismos moleculares de los beneficios notificados.

Esos mecanismos pueden variar de un probiótico a otro (para obtener el mismo beneficio por diferentes medios) y pueden consistir en una combinación de eventos, haciendo con ello que esta sea una esfera muy

problemática y compleja. Tales mecanismos pueden estar relacionados con la producción de uno o varios metabolitos o enzimas específicos que actúan directamente sobre uno o más microorganismos, pero también existe la probabilidad de que el probiótico sea la causa de que el organismo produzca la acción beneficiosa. A continuación se citan algunos ejemplos de posibles mecanismos probióticos que intervienen en el control de patógenos intestinales:

- Producción de sustancias antimicrobianas
- Exclusión competitiva de la fijación de patógenos
- Competencia por los nutrientes
- Modulación del sistema inmunitario

Se han realizado diversas pruebas con animales y estudios in vitro, que demuestran que las cepas probióticas ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción patógena de agentes enteropatógenos específicos, mediante distintos mecanismos de acción, que aún no han sido completamente esclarecidos. Los mecanismos de acción más significativos son los que representan en la Figura N° 1.

Los probióticos afectan la barrera epitelial en numerosas y diversas maneras. Este enfoque multifactorial para mejorar la ayuda a la función de barrera intestinal en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis. Dependiendo de la cepa de bacterias o levaduras y el modelo utilizado, los probióticos se dirigen a la barrera epitelial en las siguientes tres áreas. (19)

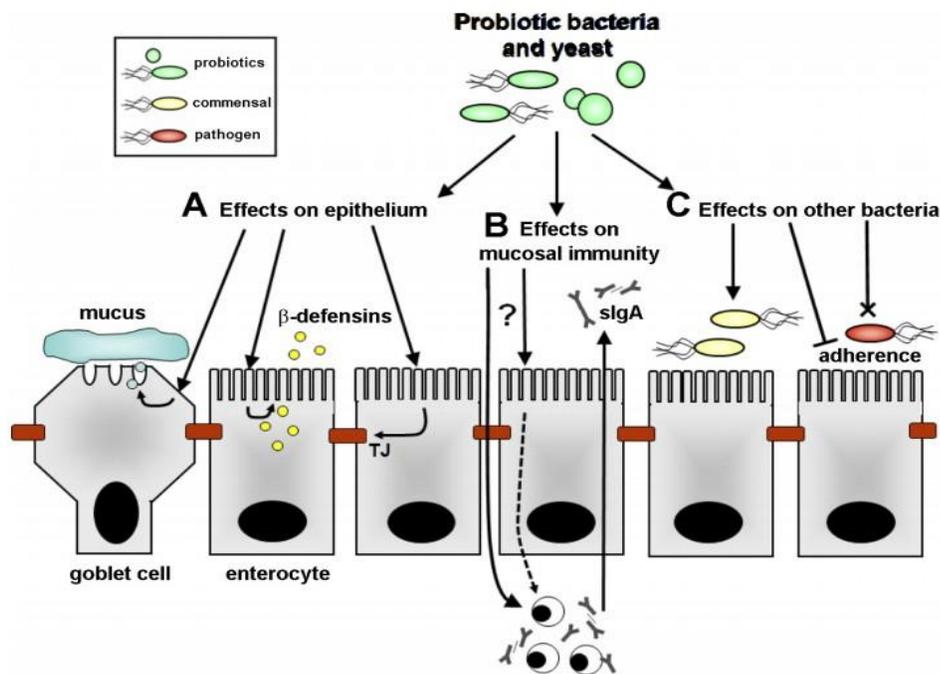


Figura N° 1. Probióticos y los efectos en la barrera epitelial. ⁽¹⁹⁾

A: Efectos Directos Sobre el Epitelio: Los probióticos pueden aumentar la expresión de mucina y la secreción por las células caliciformes, limitando así el movimiento de bacterias a través de la capa mucosa. Producen el aumento de las β -defensinas, por expresión y secreción de el moco por las células epiteliales para que pueden prevenir la proliferación de patógenos y comensales, contribuyendo así también a la integridad de la Barrera. Finalmente, los probióticos pueden mejorar la unión estrecha la estabilidad, lo que disminuye la permeabilidad epitelial a los patógenos y sus productos.

B: Efectos Sobre la Inmunidad de la Mucosa: Los probióticos pueden aumentar los niveles de Células productoras de IgA en la lámina propia y promover la secreción de IgA secretora (sIgA) en la capa mucosa

luminal. Estos anticuerpos limitan la colonización del epitelio por las bacterias y sus antígenos de unión, lo que contribuye a la buena homeostasis.

C: Efectos Sobre Otras Bacterias que Rodean o que Infectan: Los probióticos pueden alterar la composición de la microbiota y/o la expresión del gen, lo que conduce a la mejora de la barrera indirectamente a través de las bacterias comensales. Además, algunos probióticos pueden matar o inhibir el crecimiento de bacterias patógenas a través de la expresión de factores antimicrobianos tales como bacteriocinas directamente. Los probióticos también pueden competir con los patógenos o comensales para sitios en mucinas o células epiteliales de unión, de ese modo prevenir la colonización perjudicial y contribuyendo a la función de barrera.

Los efectos que los microorganismos probióticos ejercen sobre la salud humana, provienen de un mecanismo de acción específico para cada caso. Cuadro N° 1. Estos efectos y mecanismo de acción se pueden clasificar de la siguiente manera

Cuadro N° 1. Efecto y Mecanismo de Acción sobre los Probióticos. (22)

EFECTOS	MECANISMOS
<p style="text-align: center;">Acción hipocolesterolemica</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Producción de ácidos grasos de cadena corta que inhibe la enzima HMG-Co-A-reductasa -Inhibición de micelas de colesterol -Aumentan las sales biliares descongojada -Producción de sustancias antimicrobianas: ácidos orgánicos, H₂O₂.

Cuadro N° 1. Continuación.

EFFECTOS	MECANISMOS
Antimicrobiano	<ul style="list-style-type: none"> -Bacteriocinas -Competencia por nutrientes -Competencia por sitios de adhesión
Alteración de metabolismo microbiano y del hospedador	<ul style="list-style-type: none"> -Estimulación o producción de enzimas que intervienen en la digestión -Reduce la producción de sustancias toxicas -Sintetiza vitaminas y otros nutrientes deficientes en la dieta.
Protección de barrera mucoepitelial	<ul style="list-style-type: none"> -Modifican las uniones estrechas -Disminuyen la permeabilidad -Alteran el potencial eléctrico -Modifican las proteínas del citoesquelto -Producen nutrientes y factores de crecimiento -Aumenta producción de moco y defensinas
Desintoxicación	<ul style="list-style-type: none"> -Disminuye las bacteria pro-carcinógenas -Disminuye la actividad enzimática procarcinogenica
Producción de agentes antioxidantes	<ul style="list-style-type: none"> -Aumenta la producción de GST, GSH, GR, SOD,GPX -Produce moléculas antioxidants
Producción de moléculas protectoras Inmunoestimuldor	<ul style="list-style-type: none"> -Produce butirato, propionato y acetato -Activación de macrófagos -Modulan la función de los macrófagos y monocitos -Estimulación de células inmunes o competentes -Generan niveles elevados de inmunoglobulinas -Modulan la función de las células hepiteliales y dendritas -Modulación de la actividad antitumoral.
Estimulación de motilidad intestinal	Aumenta el peristaltismo

3.2.3 Efectos a la salud de los Probióticos. ⁽²⁰⁾⁽²¹⁾

Los efectos potenciales de las bacterias probióticas son resumidos como sigue:

- Producción de nutrientes de especial importancia para la mucosa intestinal, tales como ácidos grasos, particularmente los de cadena corta y aminoácidos como: arginina, glutamina y cisteína.
- Producción de micronutrientes, especialmente vitaminas (algunas vitaminas del complejo B), antioxidantes y aminos (histamina, 5-HT, piperidina, tiramina, cadaverina, pirrolidina, agmatina, espermidina y putrescina), muchos de los cuales son utilizadas por todo el organismo.
- Prevención del sobre crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos. Algunas de estas bacterias protectoras producen sustancias específicas con efecto antibiótico.
- Estimulación del sistema de defensa inmunointestinal, referido como sistema de tejido linfoide asociado al tracto.
- Eliminación de toxinas y sustancias innecesarias del lumen. Por ejemplo, los lactobacilos producen esteroides a partir del colesterol en el colon y esto ayuda a reducir los niveles circulantes de colesterol.
- Participación en la regulación de funciones intestinales, tales como: utilización de mucus, absorción de nutrientes, motilidad gastrointestinal y flujo de sangre, lo cual ocurre a través de producción de ácidos grasos de cadenas cortas, hormonas, enzimas, poliaminas y citoquinas y óxido nítrico.
- Previene la adhesión de los organismos patógenos a la superficie del tracto digestivo.

Así mismo podemos mencionar que la utilización de probióticos lleva aparejados diversos efectos en la salud. Figura N° 2. Hay datos que demuestran en diversos grados la verificación de tales efectos como en trastornos relacionados con el aparato digestivo:

- Prevención de la diarrea causada por ciertas bacterias patógenas y virus.
- Infección por *Helicobacter pylori* y complicaciones
- Enfermedades inflamatorias y síndromes intestinales
- Cáncer
- Estreñimiento
- Inmunidad mucosa
- Enfermedades inflamatorias y síndromes intestinales

La microflora intestinal desempeña probablemente una función decisiva en los estados inflamatorios del intestino, y es posible que los probióticos puedan corregir esas afecciones mediante una modulación de la microflora.⁽²²⁾



Figura N° 2. Funciones de los probióticos. ⁽²²⁾

3.2.4 Microorganismos probióticos mas empleados. ⁽¹⁷⁾.

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos, se encuentran las bacterias ácidos lácticas, que agrupan una gran cantidad de géneros y especies. Las cepas utilizadas generalmente pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, y levaduras como *Sacharomyces boulardii*, (Ver Anexo N° 8).

Se han identificado a 56 especies de lactobacilos y 29 especies de bifidobacterias, siendo los siguientes los principales microorganismos probióticos comercializados en el mundo: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus reuteri*, *bifidobacterium adolescentis*, *bifidobacterium longum*, *bifidobacterium breve*, *bifidobacterium bifidum*, *bifidobacterium essensis*, *bifidobacterium lactis*, *bifidobacterium infantis*, *bifidobacterium laterosporus* y *bifidobacterium subtilis*.

3.3 Genero *Lactobacillus*. ⁽¹²⁾

Presenta beneficios en la salud ocasionados, por su capacidad antagónica, se basan en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros.

El género *Lactobacillus* (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos; lo cual hace que se puedan confundir con géneros aislados habitualmente de materiales clínicos. Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no motiles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato.

3.3.1 Propiedades importantes del genero *Lactobacillus*. ⁽¹⁷⁾

Las bacterias ácido-lácticas y dentro de éstas, los lactobacilos, poseen un grupo de propiedades importantes:

- Rango muy amplio de habitats, desde los productos lácteos y sus derivados, las carnes, granos, frutas y vegetales fermentados, hasta la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales y del hombre.
- Requerimientos nutricionales y de crecimiento muy similares, por lo que, para su mejor caracterización, se ha propuesto el empleo de pruebas moleculares, entre las que se destaca el uso de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR.
- Utilización como probióticos, debido a su capacidad de control de la microbiota intestinal y a su acción para evitar la colonización y el crecimiento de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal.

- Producción de sustancias antimicrobianas (ácidos láctico y acético, metabolitos) y de numerosas bacteriocinas, en las cuales se fundamenta su potente acción probiótica, antimicrobiana y bioconservadora.
- Importante papel en los procesos de bioconservación de la industria alimentaria, función favorecida por su capacidad para la producción de bacteriocinas.
- Buenas características de inoculantes biológicos, ya que mejoran la calidad fermentativa del ensilaje y sus indicadores de consumo y digestibilidad de nutrientes, disminuyendo además la producción de metabolitos indeseables, lo cual repercute positivamente en el valor nutritivo del alimento animal.
- Amplias perspectivas de utilización en el incremento de calidad de los alimentos y en su conservación a largo plazo; así como en el mejoramiento de la salud animal y humana.

3.4 *Lactobacillus casei shirota*.

3.4.1 Características. ⁽¹³⁾⁽¹⁵⁾

Lactobacillus casei shirota es una bacteria Láctica, gram-positiva, no esporulada. El metabolismo de *L. casei shirota* es hetero-fermentativo gracias a que posee una enzima llamada fosfocetolasa, que le permite poder seguir la vía de las pentosas convirtiendo hexosas (principalmente glucosa) en pentosas.

Son bacilos cortos en cadenas cortas o largas con bordes enteros, su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C y la máxima varía entre 37 y 40°C, en algunos casos se desarrolla hasta los 45°C, y su mínima de sobrevivencia puede llegar hasta los 10°C.

Es una bacteria anaerobia facultativa; es decir crece de manera óptima en condiciones anóxicas, pero puede presentar crecimiento si la concentración de oxígeno es baja, debido a que posee enzimas como NADH oxidasa, NADH peroxidasa que minimizan la toxicidad de compuestos activados por el oxígeno.

En un estudio realizado por Tuohy (2007) se comprobó la habilidad de *L. casei* Shirota de sobrevivir el paso del tracto gastrointestinal humano, comprobando su presencia aún después de una semana sin consumir el producto probiótico. Además en otro estudio realizado por Maragkoudakis et al, (2006) este microorganismo sobrevivió a pH=3 durante 3 horas y pH=2 durante 1 h, es resistente a la pancreatina y a las sales biliares, no presenta actividad hemolítica.

3.4.2 Beneficios Atribuidos a *Lactobacillus casei shirota*. (15)(22)

- Se ha demostrado capacidad para eliminar microorganismos patógenos del intestino, como cepas enterotoxigénicas de *E. coli*, *Lysteria monocitogenes*, *Shigella sunnei* y *Salmonella typhimurium*, tanto en estudios in vitro como con animales de experimentación.
- Ha mostrado su eficacia frente a infecciones intestinales en niños producidas por rotavirus, y tienen efectos antitumorales en ratón. Estos efectos pueden ser debidos a las glicoproteínas secretadas por las propias bacterias.
- Las primeras experiencias indican que en niños tratados con *L. casei* la cantidad de Ig A circulante es más elevada que en los no tratados y que su respuesta ante infecciones del tracto digestivo es mucho mejor.

- Ya que estas bacterias están presentes en los intestinos, la boca y la vagina promueve entre otras cosas una buena digestión y fortalecer la asimilación de la lactosa en el cuerpo.
- En el organismo son capaces de sobrevivir a los jugos gástricos biliares y del duodeno llegando así al tracto intestinal donde desarrollan gran parte de sus beneficios como lo están la recuperación de la diarrea en los niños y problemas de intolerancia a la lactosa.

Por la secreción de enzimas se crea un proceso llamado inmunomodulador que estimulan el sistema inmunológico del huésped en este caso el cuerpo humano activando a los macrófagos y modulando la respuesta IgA que son anticuerpos que sirven como una barrera protectora secundaria. Con estos mecanismos de acción del *Lactobacillus casei shirota* el cuerpo humano se libra de algunas enfermedades como diarreas, control de enfermedades inflamatorias de colon, fortalecimiento del sistema inmune, y reducción de alergias.

3.5 Sábila (*Aloe perfoliata* var. *vera*.) ^{(11), (13), (6)}

Las primeras referencias del Aloe vera se encuentran en los Papiros de Ebers y existen numerosos documentos históricos de los egipcios, griegos, romanos, algerianos, árabes, tunecinos, indios y chinos, entre otros, que hablan de su empleo para uso medicinal.

Su nombre sábila viene del griego “aloe”; y en árabe se llama “alloeh”, que significa: “la sustancia amarga brillante”; la palabra vera viene del latín y

significa: “verdad”, así como en sanscrito *Aloe* su significado se refiere a diosa.

Existen más de 180 especies de sábila, sin embargo, son 15 los géneros con importancia en el sentido comercial y farmacológico, tales como *Aloe L.*, *Aloinilla*, *Aprica*, *Astroloba*, *Chortolirion*, *Gasteria*, *Goillauminia*, *Haworthi*, *Kniphofia*, *Lemeea*, *Leptaloe*, *Lomatophyllum*, *Poellnitzia*, *Pachidendron* y *Tritoma*, aunque, la más beneficiosa recibe la denominación de *Aloe vulgaris*, sinónimos: *barbadensis* también *perfoliata*.

3.5.1 Taxonomía de la Sábila.⁽³⁰⁾ (Ver Anexo N° 10).

- Nombre científico: *Aloe perfoliata* var. vera L.
- Clase : Equisetopsida C. Agardh
- Subclase : Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden : Lilianae Takht.
- Orden : Asparagales Link
- Familia : Xanthorrhoeaceae Dumort.
- Género : *Aloe*

3.5.2 Composición Química de la Planta de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila).^{(6), (11)}

La sábila tiene cuatro componentes principales: la cáscara, el látex, el gel y el mucílago que envuelve al parénquima o filete de la gelatina. La planta de *Aloe vera* está constituida por una mezcla compleja de

compuestos y que más de 20 de estas sustancias poseen actividades benéficas para la salud. Cuadro N° 2.

Químicamente el *Aloe perfoliata* var. vera se caracteriza por la presencia de constituyentes fenólicos; estos compuestos se encuentran en la capa interna de las células epidermales. La aloína es el principal componente del acíbar, que la planta secreta como defensa para alejar a posibles depredadores por su olor y sabor desagradable. También interviene en el proceso de control de la transpiración en condiciones de elevada insolación.

La aloína es un glicósido antraquinónico que le confiere propiedades laxantes al acíbar y se utiliza en preparados farmacéuticos produciendo en ocasiones alergias a personas sensibles. En la fabricación de productos alimenticios a base de Aloe vera, estos no deben contener aloína dado sus propiedades laxantes y alergénicas.

El gel envuelto por el mucílago, contiene de 0.3 - 4% de sólidos totales consistentes de aproximadamente 75 compuestos, y 96 – 99.7 % de agua. Este contenido puede variar según la edad de la planta, manejo del cultivo, método de extracción y partes de la planta usadas frecuentemente se hace énfasis sobre el contenido nutricional de la sábila, sin embargo éste no es significativo ya que, por ser una planta adaptada para el almacenamiento de agua, sus componentes sólidos se encuentran en cantidades bien pequeñas.

CUADRO N° 2. Componentes químicos de la planta *Aloe perfoliata* var. vera. (6)

COMPONENTES	COMPUESTOS
Antraquinonas	Ácido aloético, antranol, ácido cinámico, barbaloina, ácido crisofánico, emodina, aloe emodin, éster del ácido cinámico, aloína, isobarbaloina, antraceno, resistanol.
Vitaminas	Ácido fólico, vitamina B1, colina, vitamina B2, vitamina C, vitamina B6, betacaroteno.
Minerales	Calcio, magnesio, potasio, zinc, sodio, cobre, hierro, manganeso, fosforo, cromo.
Carbohidratos	Celulosa, galactosa, glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, aldopentosa, glucomanosa, fructosa, acemanano, L-ramnosa.
Enzimas	Amilasa, ciclooxidasa, carboxipeptidasa, lipasa, bradikinasa, catalasa, oxidasa, fosfatasa alcalina, ciclooxigenasa, superóxido dismutasa.
Lípidos y Compuestos Orgánicos	Esteroides (campesterol, colesterol, β -sitoesterol), ácido salicílico, sorbato de potasio, triglicéridos, lignina, ácido úrico, saponinas, giberelina, triterpenos.
Aminoácidos	Alanina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, tirosina, treonina, valina.
Saponinas, Taninos, Heteroxidos, Antracenicos, Sustancias pépticas.	

Su valor está en los fitoquímicos, sustancias estimulantes que contiene en una combinación única, proporcionando al organismo las condiciones para la reconstitución y optimización de las funciones metabólicas celulares y del sistema inmunológico, incrementando y regulando su funcionamiento de forma que controle y rechace las infecciones bacterianas y virales.

El *Aloe perfoliata var. vera* también contiene otros componentes tales como:

- Ácido salicílico. Es un compuesto parecido a la aspirina con propiedades anti-inflamatorias y anti-bacterianas.
- Ácidos grasos. Agentes anti-inflamatorios, campesterol, sitosterol β y lupeol a los que se les atribuyen propiedades antisépticas
- Amino Ácidos. Constituyen los bloques de construcción de los tejidos del cuerpo, en total contiene 17 de los 22 amino ácidos: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina, valina.
- Glucomanosas que tienen enlaces beta 1-4, lo que las hace resistentes a las enzimas normales de la digestión en el tracto gastrointestinal. Estas se incorporan al cuerpo por endocitosis es decir que la célula las absorbe por medio de sus membranas.

La mayoría de estos polisacáridos oralmente ingeridos no se pierden, ya que estas cadenas de moléculas se unen a la mucosa intestinal por medio de los receptores de la manosa, donde permanecen de 40 a 45 horas y ejercen una función de barrera protectora de la mucosa gástrica, por ejemplo contrarrestando los efectos de la gastritis, enteritis, colitis. Se mencionan también acciones inmunomoduladoras a través del incremento en el número de anticuerpos.

3.5.3 Beneficios de la utilización de *Aloe perfoliata var. vera* (Sábila).⁽⁶⁾

- Actividad gastro-protectora en enfermedades gastrointestinales como la ulcera gástrica, enfermedad de Crohn, gastritis, Síndrome del Intestino Irritable e incluso infecciones debido a bacterias como

Helicobacter pylori se consideran un factor en el desarrollo de lesiones crónicas agudas de la mucosa gástrica. La preparación de sábila inhibe la producción de ácido gástrico, estimula pepsina y secreciones mucosas.

- Contribuye a la metabolización de grasas, disminuyendo los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre; debido a que favorece la eliminación de las grasas y evita su acumulación.
- Alivia infecciones que se producen por diferentes microorganismos como en caso de los estafilococos. Ayudando de esta manera a combatir afecciones como: Gastroenteritis, colitis, enterocolitis. Cervicitis, disentería, etc.
- Reduce los efectos de indigestión, acidez estomacal, úlcera estomacal, así como afecciones del aparato digestivo descongestionando el estómago y el intestino delgado.
- Apoya al sistema inmune: Contiene polisacáridos de cadena larga que nos ayudan a defender del ataque de bacterias.
- Mejora la absorción significa mejor nutrición, mayor aporte de proteínas y mejor metabolización de grasas. ^{(22), (27)}

Debido a sus propiedades nutricionales y composición química, el *Aloe vera* tiene un alto potencial para promover el desarrollo de bacterias probióticas. Se ha comprobado que tanto el jugo como la pulpa de *Aloe perfoliata var. vera* son buenos sustratos que permite el crecimiento de bacterias lácticas y la consecuente producción de ácido láctico. ⁽³¹⁾

Investigadores han informado que el jugo de *Aloe perfoliata var. vera* como sustrato vegetal puede ser utilizado como medio de propagación in

vitro para las especies probióticas *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, sus resultados son muy prometedores con viabilidades en el orden de 10^7 a 10^{11} UFC/mL, por lo que el jugo de sábila pudiera ser utilizado en la elaboración de bebidas con bacterias lácticas.^{(8), (21)}.

3.6 Componentes para la formulación de la bebida.

a) Azúcar. ⁽¹⁰⁾

El azúcar de caña (sacarosa) ofrece un gran número de beneficios nutricionales cuando no pasa por el proceso de refinamiento, lo que la hace una alternativa saludable a la azúcar refinada común. Es recomendable utilizar azúcar sin refinar ya que si se utiliza otros edulcorantes como miel de abeja o artificiales no se obtiene una bebida de óptima calidad.

b) Estabilizantes. ⁽¹⁰⁾

Es un aditivo alimentario que no se consume normalmente como alimento por sí misma ni se usa normalmente como ingrediente típico del alimento, tenga o no valor nutritivo, cuya adición intencional al alimento para un fin tecnológico (inclusive organoléptico) en la fabricación, elaboración, tratamiento, envasado, empaque, transporte o almacenamiento, que pueda esperarse razonablemente que provoque directa o indirectamente que afecten sus características. Esta definición no incluye los contaminantes, ni las sustancias añadidas al alimento para

mantener o mejorar las cualidades nutricionales. Aditivos alimentarios posibilitan el mantenimiento de una dispersión uniforme de dos o más sustancias no miscibles en un alimento.

- Goma Xantan. ⁽¹³⁾

Polvo blanco o de color crema, insípido, con suave olor orgánico; el polvo o las soluciones son estables a 25° C. Es una goma polisacárida de elevado peso molecular producida por la fermentación de un cultivo puro de un carbohidrato con *Xanthomonas campestris*. Por la estructura química que presenta forma geles reversibles en presencia de alcoholes o sales, altamente resistente a la degradación enzimática por lo que es utilizado como estabilizante.

3.7 Indicadores a determinar.

3.7.1 Determinación de pH. ⁽¹³⁾

pH es el indicativo de acidez o alcalinidad de una solución acuosa. Se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en moles por litro. El valor de pH es de 1 a 14, que indica la concentración de iones hidrógeno presentes en una solución acuosa.

3.7.2 Determinación de Grados Brix. ⁽⁸⁾

Es la cantidad de sólidos disueltos en la bebida, expresada en grados Brix porcentaje de masa. Los grados Brix (símbolo °Bx) miden el

cociente total de sacarosa disuelta en un líquido. Una solución de 25 °Bx tiene 25 g de azúcar (sacarosa) por 100 g de líquido o, dicho de otro modo, hay 25 g de sacarosa y 75 g de agua en los 100 g de la solución. Los grados Brix se miden con un refractómetro, que mide la gravedad específica de un líquido, o, más fácilmente,

3.8 Determinaciones microbiológicas

3.8.1 Determinación de *Escherichia coli*. (25), (29)

La *Escherichia coli*, también conocida como *E. coli*, es una bacteria que se encuentra comúnmente en el sistema digestivo de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a su alta presencia en el intestino, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y de los alimentos.

La *E. coli* es casi exclusivamente de origen fecal y se transmite a través de la contaminación fecal de los alimentos y del agua, así como también a través de la contaminación cruzada o por contacto humano directo durante la preparación de los alimentos. A pesar de la gravedad o ausencia de los síntomas de la enfermedad, las personas y animales infectados pueden liberar entre 10^6 a 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces y la liberación de la *E. coli* también se puede producir a través de portadores asintomáticos.

Características morfológicas:

- Bacilo Gram negativo.

- No forma esporas
- Móviles (flagelos peritricos).
- Miden 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo.
- Catalasa positiva.
- Oxidasa negativos.
- Reducen nitratos a nitritos.
- Producen vitamina B y K.
- Fermenta glucosa y lactosa con producción de gas.
- Es anaerobio facultativo.

Las colonias de esta bacteria varían según el medio de cultivo donde crezcan, en este caso el medio de cultivo es Agar Eosina Azul de Metileno abreviado EMB, podemos observar que las colonias tienen en demasía una coloración verde-metalico, lo cual es característico de *E. coli*, aunque hay otras bacterias que logran producir este color es muy tenue y escaso. Se logran ver colonias aisladas, son colonias medianas, circulares, convexas, contorno verde-metálico, bordes redondeados.

3.9 Estabilidad del Componente Probiótico. ^{(2), (13)}

El medio MRS está basado en la formulación De Man, Rogosa and Sharpe con una ligera modificación, es compatible con el crecimiento cuantioso de todos los *Lactobacillus* de la cavidad oral, productos lácteos, alimentos, heces y otras fuentes. La Proteasa peptona y el extracto de carne aportan nitrógeno y compuestos del carbono. El extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B. La dextrosa es el carbohidrato fermentable como fuente de energía. El Polisorbato 80 suministra los ácidos grasos requeridos para el metabolismo de los *Lactobacillus*. El acetato de

sodio y citrato de amonio inhiben estreptococos, mohos y muchas otros microorganismos. El sulfato de magnesio y sulfato de manganeso proporcionan iones esenciales para la multiplicación de los *Lactobacillus*.

3.10 Métodos de Evaluación Sensorial. ⁽³⁴⁾

El análisis sensorial es una ciencia multidisciplinaria en la que se utilizan panelistas humanos que utilizan los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído para medir las características sensoriales y la aceptabilidad de los productos alimenticios, y de muchos otros materiales. No existe ningún otro instrumento que pueda reproducir o reemplazar la respuesta humana; por lo tanto, la evaluación sensorial resulta un factor esencial en cualquier estudio sobre alimentos. El análisis sensorial es aplicable en muchos sectores, tales como desarrollo y mejoramiento de productos, control de calidad, estudios sobre almacenamiento y desarrollo de procesos.

Las pruebas sensoriales empleadas en la industria de alimentos, se dividen en dos grupos las Pruebas Analíticas y Pruebas Afectivas. (Figura N° 3).

Cualquiera que sea la prueba que se va a emplear, es necesario que los jueces entiendan la necesidad de efectuar la misma de la manera más objetiva posible, demuestren su capacidad para seguir las instrucciones y la ejecuten de la manera correcta.

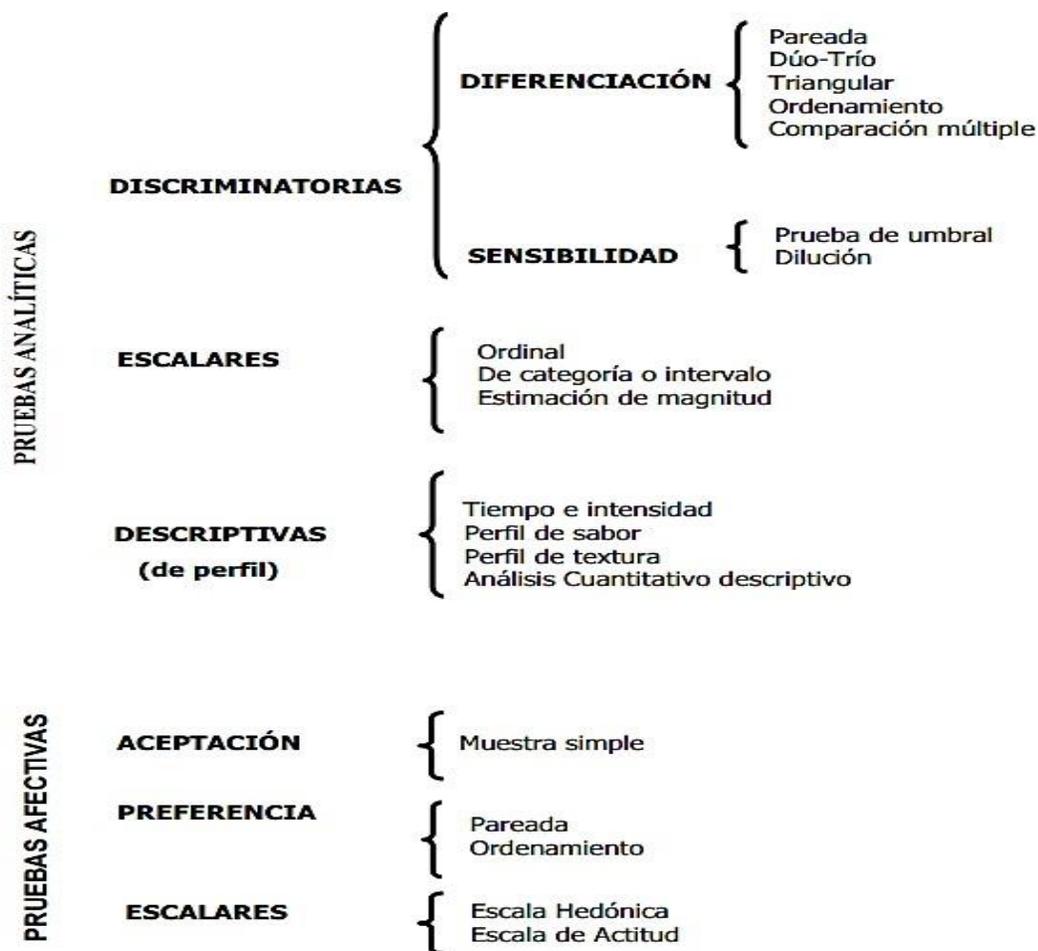


Figura N° 3. Clasificación de los métodos de evaluación sensorial. ⁽³⁴⁾

3.10.1 Prueba de Análisis Cuantitativo Descriptivo. ⁽³⁴⁾

El método tiene como objetivo identificar y cuantificar todas las características sensoriales de un producto y la información generada sirve para construir un modelo multidimensional que describe los parámetros que definen a uno o varios productos.

El método es ampliamente utilizado, ofreciendo un perfil sensorial completo del alimento, permite establecer gráficamente patrones que pueden utilizarse en cualquier momento para describir y analizar un producto. Para procesar los resultados y obtener los valores dados para cada atributo se mide con una regla la distancia que existe entre el extremo izquierdo de la escala (cero) hasta la marca vertical asignada por el juez.

3.10.2 Reclutamiento de personal. ⁽³⁴⁾

Por lo general, el reclutamiento de panelistas, tanto para paneles entrenados como para paneles no entrenados, puede iniciarse con el personal que trabaja en la institución u organización en que se lleve a cabo la investigación. La mayoría de personas que trabajan en una organización son panelistas potenciales y usualmente estarán interesados en participar si sienten que su contribución es importante.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0. DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

Prospectivo: Los resultados obtenidos en este trabajo son útiles para continuar el estudio sobre el alimento funcional formulado con esta cepa prebiótica *Lactobacillus casei shirota* y realizarle posteriores estudios para su comercialización.

De campo: Se realizó la recolección de las plantas en una finca ubicada en el departamento de Santa Ana de la zona occidental del país, ya que dentro de los objetivos planteados se encuentra elaborar un jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (sábila).

Experimental: Se desarrollaron los análisis microbiológicos y fisicoquímicos en los laboratorios de Microbiología de Alimentos en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

4.2 Investigación Bibliográfica.

La investigación bibliográfica se realizó en las siguientes fuentes:

- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco”. Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de Ciencias Agronómicas, de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Internet

4.3 Investigación de campo.

La recolección de plantas se llevó a cabo en una finca ubicada en Ataco, Santa Ana (zona occidental del país), donde se obtuvo el *Aloe perfolian* var. vera (sábila) que cumple con las características siguientes: Se encuentra en un área geográfica con poca contaminación, en buen estado, libre de insecto y/o hongos, la tierra donde se encuentra ha sido abonada y cuenta con los nutrientes necesarios.

4.4 Parte Experimental

Se elaboró una bebida probiótica, empleando las siguientes materias primas: gel de las pencas de sábila (*Aloe perfoliata* var. vera), la cepa probiótica *Lactobacillus casei* shirota, estabilizante, azúcar y agua. Se realizaron los siguientes análisis: pH (según método 981.12/90 de la A.O.A.C), Grados Brix (según método 932.12/90 de la A.O.A.C), al jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (sábila) sin pasteurizar y ya pasteurizado y al jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (sábila) con el probiótico, y determinación de *Escherichia coli* al jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (sábila) pasteurizado sin el probiótico, de acuerdo al Manual de Métodos Analíticos Microbiológicos y Bacteriológicos (BAM) para los Alimentos.

4.4.1 Preparación del jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (sábila) ⁽¹¹⁾

- a) **Recolección de sábila.** Se colectaron las hojas basales de la planta, con mayor grado de turgencia y de color verde. Removiendo la tierra adherida a la hoja y envolver en papel

periódico, este sirve como absorbente de la aloína (látex) al drenarse. El transporte de las hojas del lugar de cosecha se hará en canastas hacia el laboratorio, para reducir los daños físicos

b) **Almacenamiento.** Las hojas enteras de sábila se almacenaron por 3 días envueltas en papel periódico, colocadas verticalmente en canastas, a una temperatura de 4°C, antes de procesarlas. La posición vertical de las hojas contribuyó a promover un mayor drenaje de aloína. Las hojas con daños físicos a causa del transporte se ablandaron y perdieron una cantidad significativa de agua, por lo que no se utilizaron.

c) **Extracción del jugo de sábila.**

- Limpiar y desinfectar el área de trabajo y utensilios utilizando una solución de cloro al 0.1%.
- Lavar las hojas con abundante agua, detergente, remover físicamente la suciedad adherida a la superficie
- Desinfectar introduciendo las hojas en una solución de agua con cloro a 10 ppm por 10 minutos.
- Pesar las hojas maduras de plantas.
- Cortar las puntas y las espinas laterales de las hojas y cortar las hojas transversalmente en trozos aproximadamente de 8 cm., colocar en un recipiente previamente desinfectado.
- Remover el gel, cortando la tapa superior del trozo y luego la inferior sin raspar la superficie interna de la hoja, para reducir contaminación con aloína. La mayoría de los procesos recomiendan procesar la sábila lo más rápido posible una vez

que se ha extraído el gel para evitar una disminución en su actividad biológico.

- Licuar el gel y se llena el recipiente dejando $\frac{1}{4}$ de espacio en el recipiente para la espuma que se produce por agitación.
- Colocar el jugo en un vaso desinfectado. Pesar el jugo obtenido.
- Proteger de la luz el jugo extraído de la sábila.
- Pasteurizar el jugo de la sábila obtenido bajo el régimen tiempo- temperatura de 65°C por 15 min.
- Medir la cantidad de 225 mL y colocarlos en 3 erlenmeyer en las siguientes proporciones 50 mL, 75 mL, 100 mL.
- Almacenar en refrigeración.

4.4.2 Formulación de la Bebida

Cuadro N° 3. Propuesta de fórmula para la preparación de la bebida probiótica.

COMPONENTES	CANTIDAD	VARIABLES
Sacarosa (Azúcar de caña) sin refinar	8%	- pH - Grados Brix
Sábila (<i>Aloe perfoliata</i> var. vera)	10% (50 mL)	
	15% (75 mL)	
	20% (100 mL)	
Concentración de Inoculo	1x10 ⁷ UFC/mL	
Estabilizante (Goma xantan)	0.05 % - 0.1 %	
Regulador de la acidez (Ácido cítrico)	A determinar	
Agua purificada	Cantidad suficiente para 500 mL	

La fórmula propuesta se ha descrito con base en el análisis de productos en el mercado ya que no existe datos exactos de la formula cualitativa y cuantitativa en investigaciones previas.

4.4.3 Preparación de la bebida. (Ver Anexo N° 1)

Primera etapa

- Limpieza de área de preparación.
- Sanitización de área de preparación.
- Pesado del material vegetal (Jugo de *Aloe perfoliata* var. vera) en bolsas plásticas estériles de capacidad adecuada.
- Colocar en tres Erlenmeyer esterilizados el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera en proporciones 50, 75 y 100 mL, agua purificada hasta llegar a un volumen de 500 mL.
- Agregar a cada uno de los Erlenmeyer 40 gramos de Azúcar, 0.5 g de Goma Xantan y 0.15 g de Ácido cítrico.
- Mezclar manualmente durante 3 minutos y dejar reposar por pocos minutos.
- Pasteurizar el jugo de la *Aloe perfoliata* var. vera obtenida bajo las condiciones de temperatura-tiempo a 65 °C por 15 min.
- Guardar en refrigeración a temperatura de - 4 °C y protegido de la luz.

4.4.4 Indicadores del Jugo de Sábila.

4.4.4.1 Determinación de pH. ⁽¹³⁾

Procedimiento Calibración del Equipo.

- Mantener los electrodos en solución de almacenamiento siempre que no se esté utilizando (las soluciones pueden ser pH 4 y pH 7 y solución de KCl 3M).

- Encender el equipo pulsando el botón on/off
- Sacar el electrodo de la solución de almacenamiento, lavar con agua destilada, secar con papel suave.
- Introducir el electrodo en la solución, iniciar con buffer pH 7, leer y anotar, sacar lavar y secar
- Introducir el electrodo en la solución buffer pH 4 leer y anotar, lavar y secar.
- Introducir el electrodo en la solución buffer pH 10 leer y anotar, lavar y secar.
- Enjuagar con agua destilada el electrodo y secar con un paño suave para eliminar el exceso de agua

Procedimiento para la medición de la muestra.

- Colocar 30 mL de la muestra a analizar en vasos de precipitados de 50 ml
- Introducir el electrodo en la muestra, y tomar la lectura.
- Sacar los electrodos de la muestra, lavar con agua destilada y secar con un paño suave, repetir cada vez que se haga una medición. ⁽¹⁴⁾

4.4.4.2 Determinación de Grados Brix. ⁽⁸⁾

Preparación de la Muestra: Transferir varias veces la muestra de un vaso a otro vaso de precipitación, para eliminar el anhídrido carbónico existente. La determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.

Procedimiento para la medición de los Grados Brix.

- Limpiar el lente del brixómetro con una torunda de algodón impregnada de alcohol.
- Verificar si está calibrado colocando una gota de agua destilada sobre el lente del brixómetro, realizar la lectura observando en dirección a la luz.
- Con la ayuda de una micropipeta colocar 1 gota de muestra en el lente del brixómetro y realizar la lectura observando en dirección a la luz.
- Anotar el valor leído en el campo del lente del brixómetro.

4.4.5 Indicadores Microbiológicos.

Previo a realizar el análisis microbiológico, fue necesario realizar diluciones a cada una de las tres muestras preparadas en la primera etapa (diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) (Ver Anexo N° 7).

4.4.5.1 Preparación de Diluciones

- Medir 10 mL de muestra y colocarlos en un frasco conteniendo 90 mL de agua peptonada al 0.1%, agitar, esta será la dilución 10^{-1}
- Pipetear 10 mL de la dilución anterior y añadirlos a un frasco conteniendo 90 mL de agua peptonada al 0.1%, agitar, esta será la dilución 10^{-2}

- Pipetear 10 mL de la dilución anterior y añadirlos a un frasco conteniendo 90 mL de agua peptonada al 0.1%, agitar, esta será la dilución 10^{-3}
- Realizar este procedimiento para cada uno de los tres erlenmeyer preparados en la primera etapa de la preparación de la bebida, conservando a una temperatura 4°C en un refrigerador. (Ver Anexo N° 2)

4.4.5.2 Determinación de *Escherichia coli*. (21), (29).

Técnica número más probable (NMP) (Ver Anexo N°3)

- Preparar la cantidad de 3 tubos de concentración doble conteniendo caldo LMX
- Inocular 1mL de la muestra de cada dilución en los 3 tubos de concentración doble
- Homogenizar cada serie de 3 tubos con una agitación manual, luego incubar los tubos por 24-48 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Observar si hay cambio de color en el medio. Se considera positiva la prueba para coliformes totales si los tubos presentan una coloración azul y presencia de gas.
- De los tubos positivos tomar una asada y sembrar en agar EMB.
- Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas.
- El desarrollo de colonias con un brillo metálico es confirmación de la presencia de *E. coli*
- Como confirmación de la prueba de los tubos con caldo LMX positivos observar con luz UV, la presencia de fluorescencia y la formación de un anillo violáceo con el reactivo de indol son prueba presuntiva de *Escherichia coli*. (Ver Anexo N° 7).

4.4.6 Estandarización de la cepa probiótica *Lactobacillus casei shirota*.^{(13),(2)}.

Reanimación de la cepa: (Ver Anexo N° 6)

- Colocar 0.1 g del liofilizado (*Lactobacillus casei shirota*) en 100 mL caldo MRS
- Incubar en medio de anaerobiosis 5% CO₂ a 35°C± 2°C, durante 48 horas.
- Colocar 1 mL de la suspensión del microorganismo en una celda espectrofotométrica y estandarizar en el Espectrofotómetro a 630nm.
- Tomar 1 mL de la suspensión del microorganismo estandarizada y colocarla en 9 mL de solución salina.
- Hacer diluciones seriadas hasta llegar a la concentración requerida 10⁻⁷ UFC/mL.
- Tomar 1 mL para la siembra utilizando la técnica de placa vertida en 20mL de agar MRS, de las tres últimas diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ sembrando en duplicado.
- Incubar en medio de anaerobiosis 5% CO₂ a 35°C± 2°C, durante 48 horas.
- Realizar las lecturas.

4.4.7 Etapa Final: Inoculación. ⁽¹³⁾.

Inoculación: A las tres muestras preparadas en la primera etapa y que dieron negativos para *E.coli*, inocular con un 0.1 g de la cepa probiótica de *Lactobacillus casei shirota* 1x10⁷ UFC/mL (previamente pasteurizados), mezclar para homogenizar el contenido en los frascos erlenmeyer y guardar los frascos alejados de la luz. (Ver Anexo N° 1).

4.4.8 Estabilidad del componente probiótico. (2), (13).

Para el análisis de la estabilidad del producto, se estudiara la viabilidad del componente probiótico (UFC/mL) mediante recuento en placa en Agar MRS. El estudio se realizara sobre muestras conservadas a temperatura de 4°C en un congelado. (Ver anexo N° 5).

Procedimiento

- Para la realización de las siembras se inicia con la toma de las tres muestras (50, 75 y 100 mL del Jugo de Sábila (*Aloe perfoliata* var. vera) e inoculadas con el *Lactobacillus casei* shirota) realizando una primera dilución (10^{-1}), esta se hará tomando 1 mL con una pipeta diluyéndola en 9 mL de agua peptonada estéril y agitar enérgicamente utilizando un agitador de vidrio durante 30 segundos.
- A partir de esta preparación transferir 1 mL a cada tubo que contenga 9 ml de solución salina estéril, realizar el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-7} .
- En el día 0 del análisis de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , tomar 1 mL para la siembra utilizando la técnica de placa vertida en 20 mL de agar MRS, sembrando en duplicado. Obtener así las siembras 10^5 , 10^6 y 10^7 respectivamente.
- Incubar en medio de anaerobiosis 5% CO_2 a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 48 horas.
- Realizar las lecturas.
- Realizar todo lo anterior a los 1,2, 5, 8 y 15 días.

4.4.9 Análisis Sensorial. (34).

La prueba sensorial de Análisis Descriptivo Cuantitativo se realizó para definir los descriptores sensoriales de la formula pasteurizada, por una cantidad significativa de 25 docentes y 25 estudiantes de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. La evaluación se realizó proporcionando 30 mL de la bebida elaborada, a una temperatura entre 10 °C y 12 °C. Las características organolépticas mediante la Prueba de Análisis Cuantitativo Descriptivo en la cual se evaluara: Aspecto, Color, Olor, Sabor (dulce, acido, residual), Fluidez, Grumosidad, y Calidad general. (Ver Anexo N° 9).

- Para realizar el análisis se brindó las siguientes indicaciones, según los parámetros establecidos:
- En el caso de Aspecto, color y olor: Realizar estas determinaciones se antes de ingerir la bebida.
- En el caso de Fluidez indicar la textura, relacionada con la viscosidad.
- Retener la muestra en la boca por un tiempo de 2 segundos.
- En el caso de Sabor: Evaluar si se tiene un sabor dulce, acido o sabor residual.
- En el caso de Grumosidad: Tomar en cuenta el tamaño de las partículas en la solución.
- En el caso de Calidad general: Establecer según la totalidad de los parámetros evaluados

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Extracción del jugo del gel de las hojas de la planta de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila).

La extracción del jugo del gel de las hojas de la planta de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila), fue un punto crítico en la investigación, ya que a partir de este se desarrollaron los diferentes ensayos. La extracción se realizó de acuerdo a lo descrito en el numeral 2.4.1.Preparación del jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (sábila). En la Figura N° 4 se observa el procedimiento que se empleó para la extracción del jugo del gel de las hojas de la planta de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila).



Figura N° 4. Esquematización de procedimiento para la extracción del jugo a partir de las hojas de la planta de *Aloe perfoliata* var. vera.

5.2 Estandarización de la cepa probiótica *Lactobacillus casei* shirota.

La estandarización del *Lactobacillus casei* shirota se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología en el numeral 2.6, en el cual se describe el procedimiento realizado para obtener una concentración de 10^7 UFC/mL. Los resultados obtenidos con esta estandarización se desarrollaron utilizando 0.1 gramo de cepa liofilizada de *Lactobacillus casei* shirota, representados en Tabla N°1.

Tabla N° 1: Resultados de la estandarización de la cepa probiótica *Lactobacillus casei* shirota.

5.00E+05 es equivalente a decir 1.0×10^5 ufc/mL.	Longitud de onda (l)	Tramitancia Obtenida	Absorbancia Obtenida
		630 nm	70.10%
Cuento de diluciones			
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
UFC/ML	5.00E+05	4.10E+06	3.00E+07
UFC/mL	8.00E+05	3.00E+06	1.90E+07
Σ UFC/mL	1.30E+06	7.10E+06	4.90E+07
P UFC/mL	6.50E+05	3.55E+06	2.50E+07

Se puede apreciar que con un valor de 0.151 de absorbancia y 70.10% tramitancia, se obtienen valores semejantes de *Lactobacillus casei* shirota de 10^7 ufc/mL. Los datos obtenidos pueden ser utilizados como referencia para la realización de un análisis posterior en el que se desee conocer la concentración de la bacteria a una determinada tramitancia. El

resultado obtenido de la estandarización de la cepa de *Lactobacillus casei shirota* fue efectivo ya que presentó buen crecimiento al sembrarlo en Agar MRS y empleando la técnica de las diluciones seriadas, que fue lo más indicado; tomando en cuenta que los conteos de la cepa probiótica fueron viables. (Ver Anexo N° 16).

5.3 Elaboración de bebida probiótica pasteurizada a partir de un extracto natural de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila) y *Lactobacillus casei shirota*.

Para la elaboración de la bebida a base de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila) y con el microorganismo probiótico *Lactobacillus casei shirota*, se partió de un extracto del jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila) el cual se distribuyó en tres proporciones diferentes, de la siguiente manera: Utilizando 10% (50 mL), 15% (75 mL) y 20% (100 mL) del jugo, a los cuales fueron incorporados cada uno los siguientes componentes: 8% de azúcar, 0.1 % goma xantán, 1 % ácido cítrico (cabe destacar que las cantidades de estos últimos surgieron de experimentos previos) y agua purificada para una bebida de 500 mL (Según numeral 4.4.4 Preparación de la bebida probiótica). (Ver Anexo N° 13).

Posteriormente las diferentes mezclas se sometieron a un régimen de temperatura-tiempo de 65°C por 15 min para su respectiva pasteurización; una vez listo el jugo, se colocó en refrigeración a una temperatura de 4°C para enfriar y finalmente se incorporó la bacteria

Lactobacillus casei shirota, (Siguiendo lo descrito en el numeral 4.4.7 Etapa final: Inoculación) que es el responsable de impartir la calidad probiótica a la bebida. La cantidad de probiótico utilizada para obtener una concentración de 10^7 UFC/mL, fue tomada a partir de las recomendaciones del proveedor de dicha cepa. Las cantidades de materias utilizadas para el desarrollo de la bebida de detallan en el cuadro N°4.

Cuadro N° 4. Cantidades utilizadas para la elaboración de las tres propuestas de bebida probiótica.

COMPONENTES	CANTIDADES		
	Muestra 1 10% de jugo de sábila	Muestra 2 15% de jugo de sábila	Muestra 3 20% de jugo de sábila
Sacarosa (Azúcar de caña) sin refinar	40 g (8 %)	40 g (8 %)	40 g (8 %)
Sábila (<i>Aloe perfoliata</i> var. vera)	50 mL (10%)	75 mL (15%)	100 mL (20%)
Concentración de Inoculo	0.1g	0.1 g	0.1 g
Estabilizante (Goma xantan)	0.5 g (0.1%)	0.5 g (0.1%)	0.5 g (0.1%)
Concentración de Ácido Cítrico	0.15 g	0.15 g	0.15 g
Agua purificada	450 mL	425 mL	400 mL

Las características obtenidas son las siguientes: poco sabor y olor a sábila, con pequeños residuos grumosos, consistencia fluida, color levemente verde y con apariencia poco transparente adecuado para una

bebida como son los néctares. Las imágenes del proceso de elaboración de las bebidas formuladas se encuentran en el Anexo N°1.

5.4 Determinación de pH, Grados Brix y análisis microbiológico.

Para verificar si la cepa bacteriana de *Lactobacillus casei* shirota utilizada en la formulación de la bebida cumplen los requisitos de sobrevivencia para realizar su efecto probiótico, se determinó al jugo fresco de sábila, jugo pasteurizado sin probiótico y jugo pasteurizado con probiótico (Según el procedimiento detallado en el numeral 4.4.2. Indicadores del Jugo de Sábila). Así mismo se realizó el análisis microbiológico del jugo pasteurizado sin probiótico de acuerdo a lo descrito en la metodología en el numeral 4.5 Indicadores Microbiológicos.

5.4.1 Determinación pH.

Se determinó con el equipo pHmetro modelo Consort c-830, tomando una cantidad de 30 mL de cada una de las muestras de jugo de sábila (50 mL, 75 mL, 100mL).

El resultado de pH obtenido del jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila) fresco fue de 4.52 y luego al someterse a tratamiento térmico el resultado obteniendo fue un valor de 5.50 para la muestra de 50 mL, 5.47 para la muestra de 75 mL y 5.33 para la muestra de 100 mL. Ver Tabla N° 2. (Ver Anexo N° 14).

Tabla N° 2. Resultados de la determinación de pH.

Valores de pH				
TIEMPO	Jugo sin pasteurizar	Jugo pasteurizado sin probiótico		
Inicio	4.52	Muestra 1 50 mL (10%)	Muestra 2 75 mL (15%)	Muestra 3 100 mL (20%)
		5.50	5.47	5.33
Jugo pasteurizado con probiótico				
		5.50	5.47	5.21
1 día		5.59	5.65	4.87
2 días		5.59	5.63	4.85
5 días		5.61	5.63	4.56
8 días		5.65	5.60	4.45
15 días		5.67	4.58	4.20

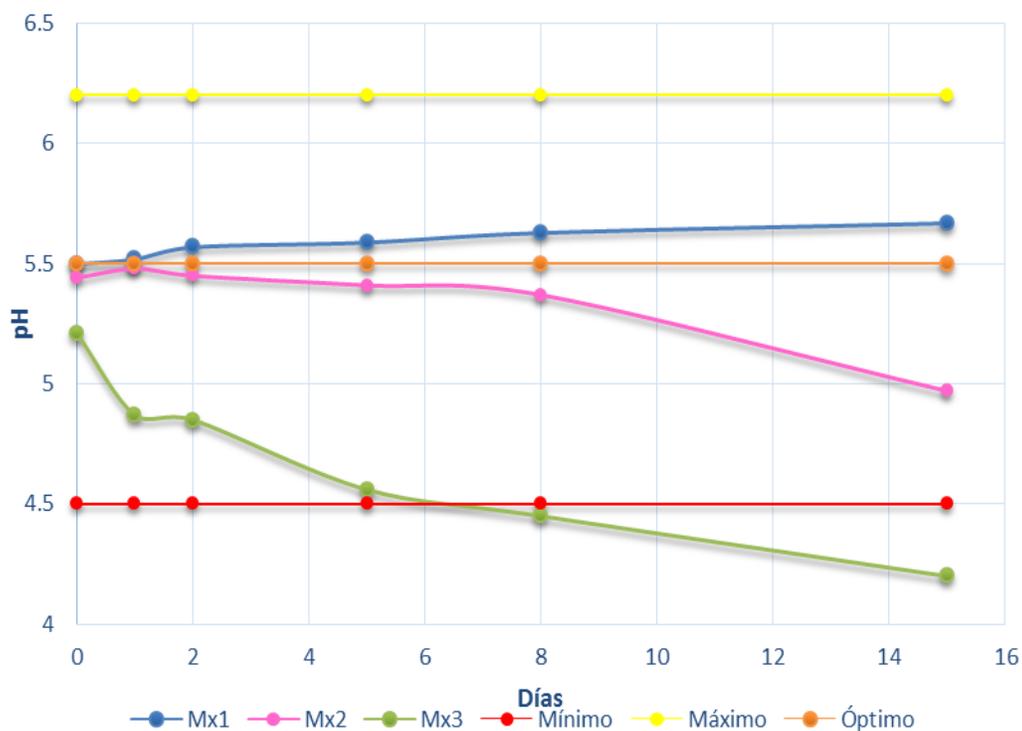


Figura N°5. Gráfico de la evaluación de pH de las muestras del jugo pasteurizado con probiótico. Muestra 1 (10%), Muestra 2 (15%), Muestra 3 (20%).

Se puede apreciar que existen diferencias la sobrevivencia de la cepa probiótica, *Lactobacillus casei* shirota a medida que transcurre el tiempo de experimentación, en las diferentes muestras (Figura N° 5).

Las muestras del jugo de sábila pasteurizado con probiótico, tuvieron el siguiente comportamiento: En cuanto a la Muestra 1 (10%) se puede observar que el valor de pH aumenta con respecto al tiempo durante los 15 días en que se realizó en análisis, es decir se mantuvo estable; con respecto a la Muestra 2 (15%) se observa un aumento en el valor de pH del día 1 al día 8 y luego en el día 15 presenta una disminución y en cuanto a Muestra 3 (20%), se dio una disminución en el pH durante los 15 días, hasta llegar a un valor de pH de 4.20, siendo la muestra menos estable con respecto al tiempo.

Se pudo evidenciar mediante los datos obtenidos a través del periodo de experimentación de las tres muestras elaboradas, que conforme se aumenta la concentración de jugo del gel de las hojas de la planta de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila); el pH tiende a disminuir. Esta disminución del pH puede estar influida por el tiempo de almacenamiento, debido a que a medida transcurre el tiempo, el jugo extraído de la planta puede variar sus propiedades debido a la posible oxidación por lo cual producir un incremento de la acidez.

5.4.2 Determinación de Grados Brix

Grados brix (Sólidos solubles totales): se determinaron con un refractómetro digital modelo RFM 330. En cuanto a los valores obtenidos en la determinación de grados brix, se observa un aumento de un 5% a un 60% en cada una de las muestras, luego de ser sometidas a tratamiento térmico. (Ver Tabla N°3).

Tabla N° 3. Resultados obtenidos de grados Brix para el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila).

TIEMPO	Jugo sin pasteurizar	Jugo pasteurizado sin probiótico		
		Muestra 1 50 ml (10%)	Muestra 2 75 ml (15%)	Muestra 3 100 ml (20%)
Inicio	5	60	60	60
		Jugo pasteurizado con probiótico		
		60	60	60
1 día		64	62	64
2 días		68	62	64
5 días		70	60	62
8 días		70	58	60
15 días		74	52	58

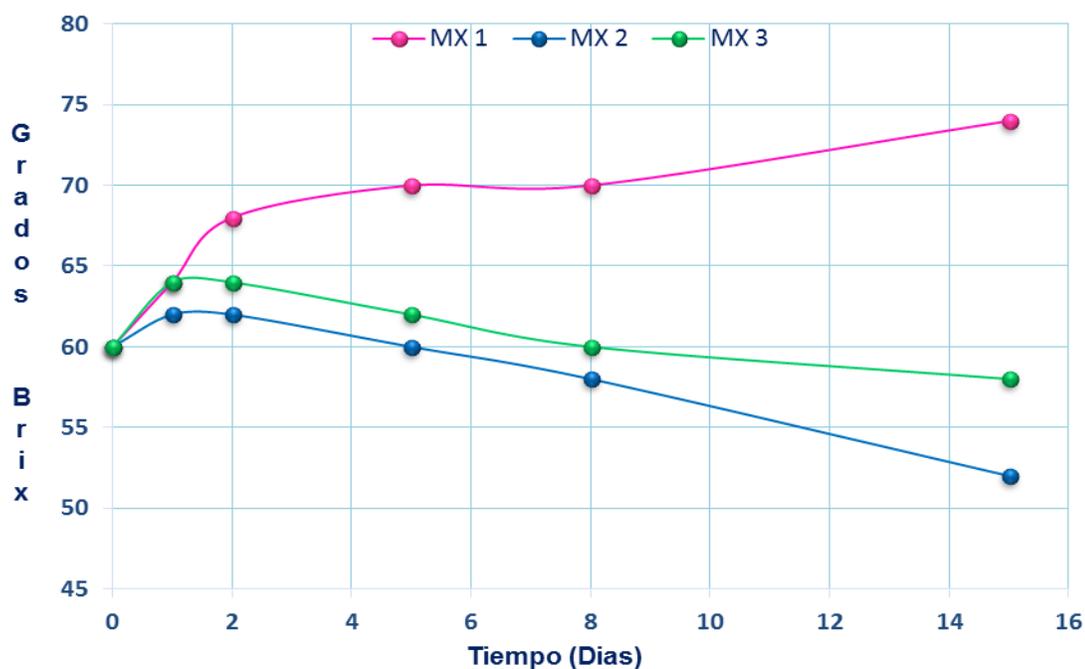


Figura N°6. Grafico de la evaluación de grados Brix de las muestras del jugo pasteurizado luego de incorporar el microorganismo probiótico Muestra 1 (10%), Muestra 2 (15%), Muestra 3 (20%).

Los resultados en cuanto a Grados Brix (sólidos solubles). Figura N 6, se puede observar lo siguiente: en la Muestra 1(10%) los valores de sólidos disueltos aumenta con respecto al tiempo, en el caso de la Muestra 2 (15%) y las Muestra 3 (20%) existe una tendencia a disminuir conforme el tiempo, siendo la muestra 2, la que presenta una mayor disminución. Esta disminución del valor de grados brix podría atribuirse a que el microorganismos probiótico *L. casei* shirota consume los azúcares solubles en las muestras que contienen jugo de sábila durante el periodo de supervivencia y los metaboliza presuntamente produciendo ácido láctico.

5.4.3 Análisis microbiológico (Determinación de *Escherichia coli*).

Cuadro N° 5. Resultados del análisis microbiológico (*Escherichia coli*) para el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila) sin pasteurizar.

Jugo sin pasteurizar	Resultado obtenido	Especificación de <i>Escherichia coli</i> en Néctares
		Límite permitido por el RTCA < 3 NMP/mL
Muestra 1 (10%)	< 3 NMP/mL	CUMPLE
Muestra 2 (15%)	< 3 NMP/mL	CUMPLE
Muestra 3 (20%)	< 3 NMP/mL	CUMPLE

Fueron analizadas las 3 muestras de jugo de sábila sin pasteurizar y sin microorganismo probiótico (5%, 10% y 15% de jugo de *Aloe perfoliata* var. vera) las cuales cumplen el límite establecido (<3 NMP/mL) por el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50.08, en lo referente a “Bebidas: Néctares”. En el análisis de los resultados microbiológicos se hace constar que tanto las materias primas utilizadas en la elaboración como el jugo elaborado de *Aloe perfoliata* var. vera sin probiótico está ausente de *Escherichia coli*, detallado en el Anexo N° 15 y Cuadro N°5. Lo cual indica que es apto para el consumo humano.

5.5 Comprobación de la estabilidad de la cepa probiótica en el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila), durante un periodo de 1, 2,5, 8 y 15 días.

Para el análisis de la estabilidad del producto, se estudió la viabilidad del componente probiótico en UFC/mL mediante recuento en placa en agar MRS. Con la finalidad de analizar la estabilidad del componente probiótico en el tiempo y por lo tanto el limitante de la vida útil del producto se analizó su evolución en conservación a una temperatura de refrigeración de 4°C durante los tiempos de 1, 2, 5,8 y 15 días, para determinar las cantidad del probiótico en el jugo de sábila al final del tiempo de prueba, como se muestra en Tabla N° 4. Mediante las curvas de crecimiento vemos el desarrollo de las cepas de *Lactobacillus casi shirota*. (Ver Anexo N° 17 y 18).

Tabla N° 4. Resultados de análisis de estabilidad de microorganismo probiótico de las muestras, en un periodo de 1, 2, 5,8 y 15 días.

Muestra 1. (50mL)			
Tiempo (Días)	Dilución 10⁻⁵	Dilución 10⁻⁶	Dilución 10⁻⁷
1	6.00E+05	5.00E+06	4.00E+07
2	6.00E+05	5.00E+06	4.00E+07
5	5.00E+05	3.00E+06	3.00E+07
8	3.00E+05	2.50E+06	3.00E+06
15	1.00E+01	1.00E+01	1.00E+01
Muestra 2. (75 mL)			
Tiempo (Días)	Dilución 10⁻⁵	Dilución 10⁻⁶	Dilución 10⁻⁷
1	8.50E+05	8.00E+06	7.00E+07
2	8.00E+05	7.00E+06	7.00E+07
5	8.00E+05	7.00E+06	6.00E+07
8	7.00E+05	6.50E+06	6.00E+07
15	7.00E+05	6.00E+06	6.00E+07
Muestra 3. (100mL)			
Tiempo (Días)	Dilución 10⁻⁵	Dilución 10⁻⁶	Dilución 10⁻⁷
1	9.50E+05	7.50E+06	6.00E+07
2	8.00E+05	6.00E+06	6.00E+07
5	5.50E+05	5.50E+06	5.00E+07
8	4.00E+05	4.00E+06	4.00E+07
15	4.00E+05	3.00E+06	6.50E+06

5.5.1 Resultados obtenidos del análisis de estabilidad de la muestra 1 (10% de jugo de *Aloe perfoliata* var. *Vera*)

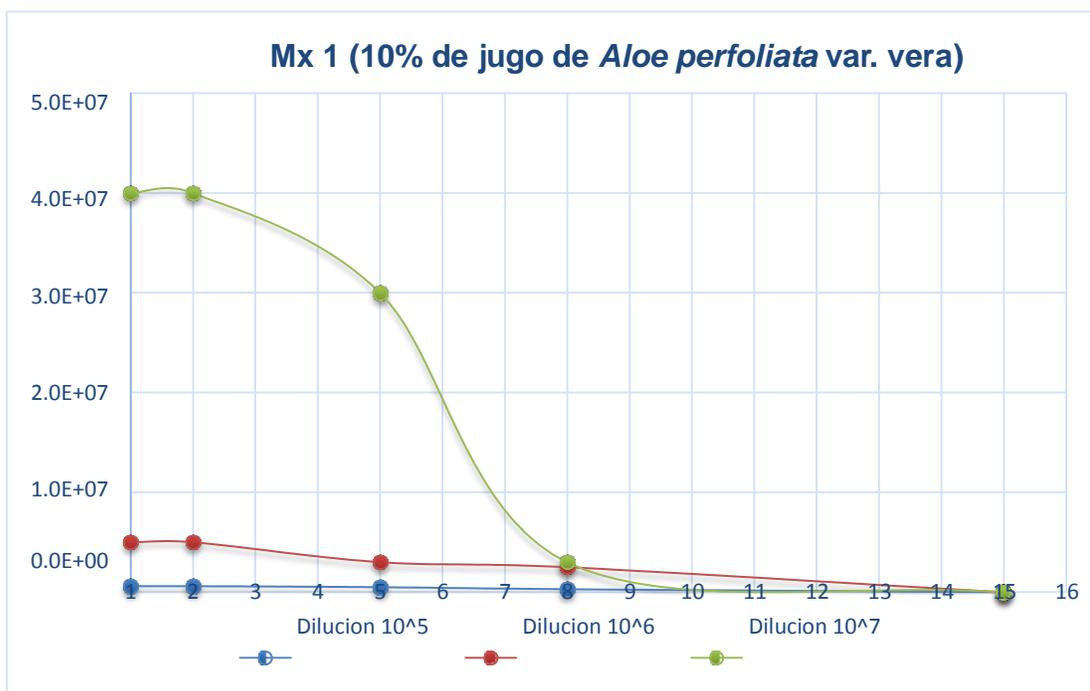


Figura N° 7. Representación gráfica de resultados de estabilidad de microorganismo probiótico *Lactobacillus casei* shirota en Muestra 1 en un periodo de 1, 2, 5,8 y 15 días.

Al realizar análisis de la estabilidad en un periodo de tiempo en la concentración de *Lactobacillus casei* shirota se muestra que en la dilución 10⁻⁵ y 10⁻⁶ el valor se mantiene constante hasta el día 8 y luego en el día 15 el valor de microorganismo probióticos viables es de 1.00E+01 (Figura N° 7), sin embargo en la dilución 10⁻⁷ se observó que la cantidad de células viables fue disminuyendo paulatinamente en el transcurso del tiempos (día 5, 8 y 15), presentando una mayor variación en el último día de prueba (día 15) , en el que se muestra crecimiento de la cepa probiótica de 1.00E+01 (Tabla N° 4).

5.5.2 Resultados obtenidos del análisis de estabilidad de la Muestra 2 (15% de jugo de *Aloe perfoliata* var. vera)

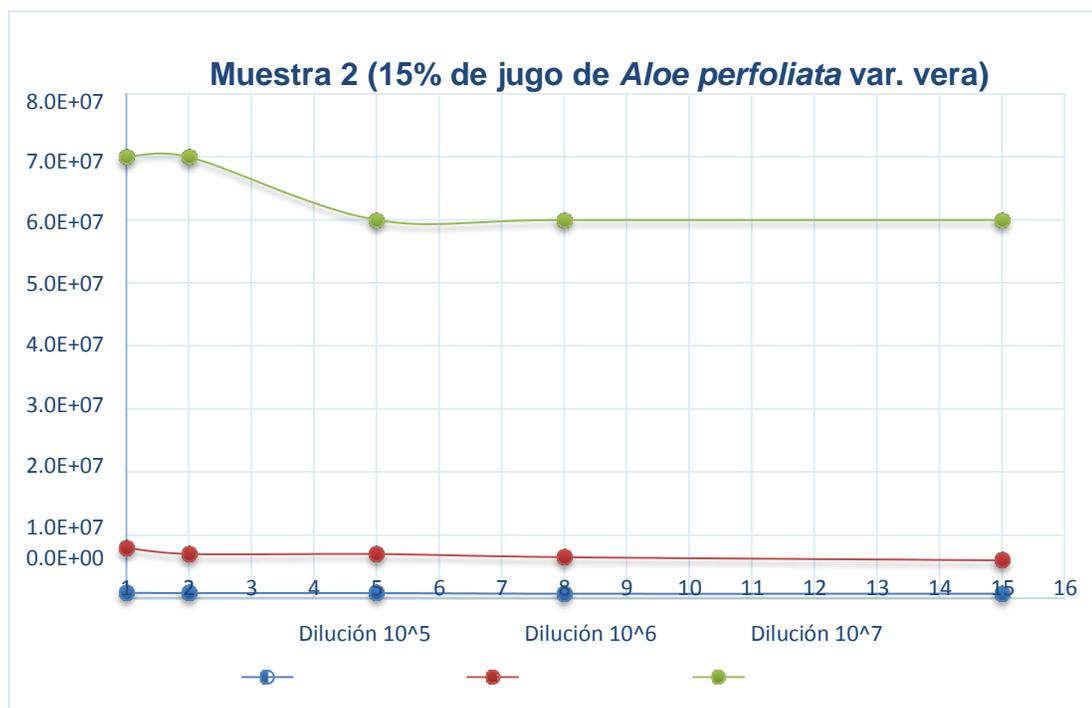


Figura N°8. Representación gráfica de resultados de estabilidad de microorganismo probiótico en muestra 2 en un periodo de tiempo de 1, 2, 5,8 y 15 días.

De acuerdo a la Figura N°8, se observa en la Muestra 2 en las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , que el valor de microorganismos viables se mantuvo constante durante los 15 días de estudio sin embargo en el caso de la dilución 10^{-7} presento una disminución en el día 5 y luego mantuvo su valor constante hasta el día 15, por lo que puede decirse que las tres diluciones tuvieron resistencia la cepa probiótica a través del transcurso del tiempo.

5.5.3 Resultados obtenidos del análisis de estabilidad de la Muestra 3 (20% de jugo de *Aloe perfoliata* var. vera)

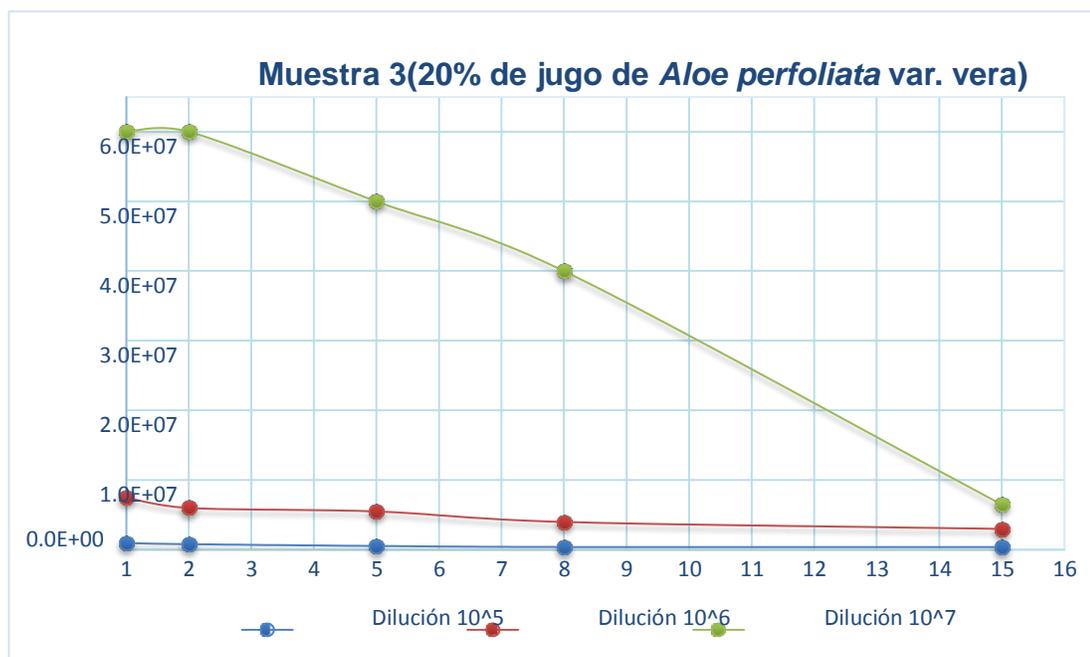


Figura N°9. Representación gráfica de resultados de estabilidad de microorganismo probiótico en Muestra 3 en un periodo de 1, 2, 5, 8 y 15 días.

Según el análisis estadístico del conteo de las células viables de la cepa probiótica *Lactobacillus casei shirota* (Figura N°6), muestra que entre el tiempo 1 y tiempo 2, no hay una diferencia en cuanto a la dilución 10^{-5} , sin embargo en las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} existen cambios relevantes en la cantidad de células viables; ya que hay una disminución en el transcurso del tiempo (día 5, 8 y 15). Existe una diferencia notoria de la interacción de la cepa probiótica entre las tres diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , pudiendo observar que al realizar las diluciones disminuye el recuento de las células viables.

5.5.4 Comparación de estabilidad obtenida de las tres muestras evaluadas.

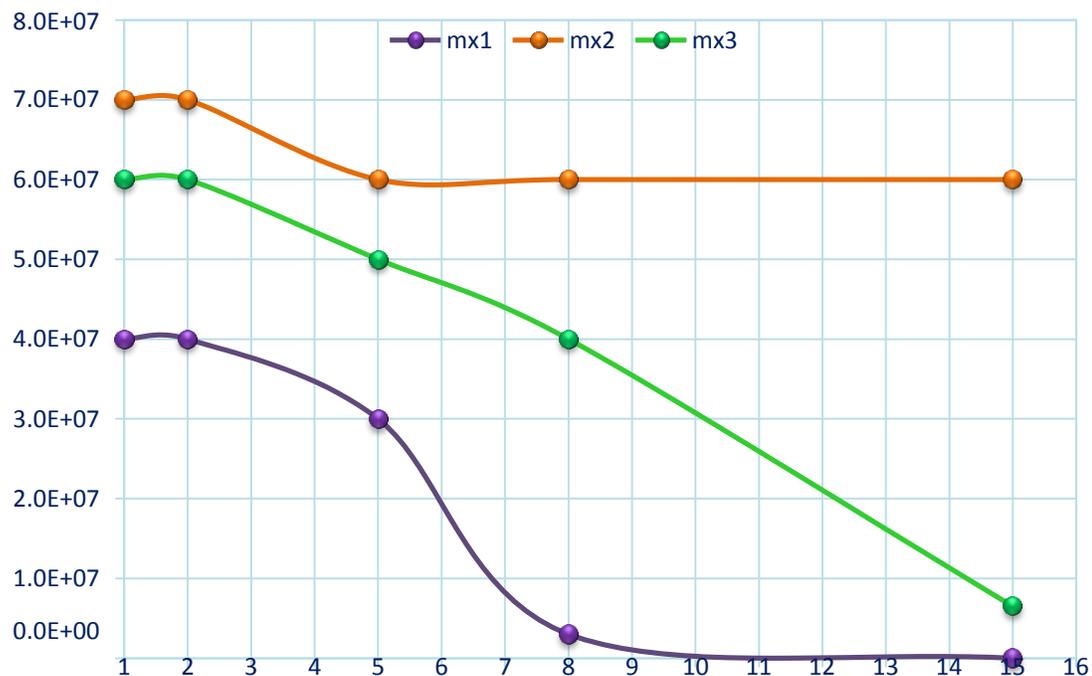


Figura N° 10. Representación gráfica de comparación de resultados de estabilidad de microorganismo probiótico *L. casei shirota* en las tres muestras en la última dilución 10^{-7} en un periodo de 1, 2, 5, 8 y 15 días.

De acuerdo a la Figura N°10, los resultados de la estabilidad de *Lactobacillus casei shirota* en el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera pasteurizado, para la Muestra 1 se observa inicialmente un concentración de $4.00E+07$ UFC/mL, que se mantiene por espacio de 48 horas, finalizando a los 15 días con una concentración $1.00E+01$ UFC/mL, por lo cual se ve exhibido que dicha muestra *no* es viable para mantener la sobrevivencia de la cepa probiótica; en cambio para la Muestra 2 que se partió de una concentración inicial de $7.00E+07$ UFC/mL se mantiene por espacio de 2 días con una concentración

superior a $1.00E+06$ UFC/mL (necesaria para considerar un alimento como probiótico), finalizando a los 15 días con $6.00E+07$ UFC/mL, por lo cual demuestra que la muestra 2 es viable para mantener la sobrevivencia de la cepa probiótica en el transcurso del tiempo de prueba; en cuanto a la Muestra 3 se partió de una concentración inicial de $6.00E+07$ UFC/mL se mantiene por espacio de 48 horas, con una concentración superior a $1.00E+06$ UFC/mL (necesaria para considerar un alimento como probiótico), finalizando a los 15 días con $6.50E+06$ UFC/mL, por lo cual se observa que dicha muestra si es viable para mantener la sobrevivencia de la cepa probiótica; sin embargo con un menor recuento de células viables que la muestra 2.

Al realizar análisis los datos, se puede apreciar que existen diferencias claras en lo que se refiere a los efectos principales de sobrevivencia del *Lactobacillus casei shirota*. Esto quiere decir, que cada uno de estos factores (tiempo y temperatura, pH, grados Brix y sustrato), si ejercen un efecto sobre la sobrevivencia de la cepa probiótica en el jugo de sábila.

El número de organismos producidos por cepa probiótica *Lactobacillus* está relacionado con la concentración de sustrato utilizado en el medio, ya que en la muestra con menor cantidad de *Aloe vera* (10 % v/v) se registraron crecimientos menores que en las muestras que contenían cantidades mayores de este sustrato (15 y 20 %). Las cuentas viables más elevadas fueron las de la muestra 2 (15 % de jugo de *Aloe perfoliata* var. vera), lo cual sugiere que se utilice esta muestra para la elaboración de la bebida probiótica por ser un sustrato adecuado para el desarrollo de la cepa probiótica.

5.5.5 Realizar prueba sensorial de Análisis Descriptivo Cuantitativo para medir las características sensoriales y la aceptabilidad de la bebida pasteurizada.

Para realizar la prueba sensorial se elaboró una bebida que replicara las características que tenía la bebida de prueba Muestra 2 que contenía 75 mL de Sábila la cual se comprobó, mediante el estudio de estabilidad que poseía las mejores condiciones en cuanto a componentes para mantener la sobrevivencia de la cepa probiótica. Se preparó un volumen de 1.5 Litros de la bebida de *Aloe perfoliata* var. vera con *Lactobacillus casei* shirota, la cual se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología en el numeral 4.4.9 Análisis sensorial. En el Cuadro N° 3 se presentan los componentes y cantidades para la elaboración de la bebida, la cual obtuvo un pH de 5.4 y 52 Grados Brix.

Cuadro N° 6. Cantidades utilizadas en la elaboración de la bebida de *Aloe perfoliata* var. vera con *Lactobacillus casei* shirota para realizar el análisis sensorial.

Componentes	Cantidades
Sacarosa (Azúcar de caña) sin refinar pulverizada	120 g
Sábila (<i>Aloe perfoliata</i> var. vera)	225 mL
Concentración de Inoculo	0.3 g
Goma xantan (Estabilizante)	1.5 g
Ácido cítrico (Acentuador de sabor)	3.0 g
Agua purificada	1,275 mL

El análisis sensorial se llevó a cabo realizando 2 catas de la bebida, una a 25 docentes y la otra a 25 estudiantes, a los cuales se les dio una muestra de 30 mL de la bebida para calificar las características de aspecto, color, olor, fluidez, grumosidad, sabor (dulce, ácido y residual) y calidad general, en una escala del 1 al 10. De los 25 docentes, 10 fueron de sexo masculino y 15 de sexo femenino y de los 25 estudiantes fueron 9 de sexo masculino y 16 de sexo femenino, como se presenta en la Figura N° 11 y 12.



Figura N°11. Docentes que se sometieron a la prueba sensorial.



Figura N°12. Estudiantes que se sometieron a la prueba sensorial.

Se presentan los resultados obtenidos de la prueba sensorial en el Cuadro N° 4 y 5, realizada para conocer las preferencias de la bebida probiótica de los docentes y estudiantes de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, donde se realizó dicho

experimento, se presenta el resumen de la calificación del total de 50 muestras de la bebida probiótica.

Cuadro N° 7. Calificación promedio de docentes en la prueba de sensorial.

CALIFICACIÓN PROMEDIO DE DOCENTES			
CARACTERÍSTICAS	SEXO		
	MASCULINO	FEMENINO	Promedio
ASPECTO	8	8	8
COLOR	7	8	8
OLOR	5	5	5
FLUIDEZ	5	5	5
GRUMOSIDAD	3	4	4
SABOR DULCE	4	5	5
SABOR ACIDO	2	2	2
SABOR RESIDUAL	4	4	4
CALIDAD GENERAL	7	8	8

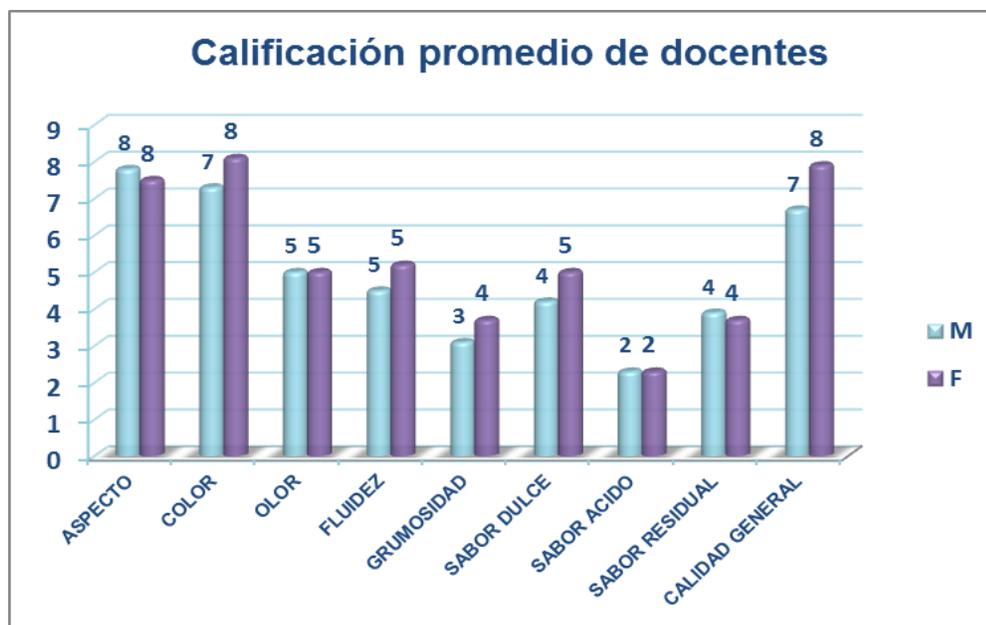


Figura N°13. Calificación promedio de las características organolépticas de la bebida probiótica por docentes.

Para el caso de los docentes, en parámetros como la calidad general se observa un valor de 8 en cuanto a género femenino y un valor de 7 en cuanto a género masculino,. Estos resultados nos indican que la aceptabilidad por parte de los docentes es bastante alta, aunque se puede mejorar para obtener un valor mayor. Así mismo la bebida fue considerada, con un olor y una fluidez bastante adecuada y con sabor poco ácido. La aceptabilidad varía debido a gustos de cada individuo que poseen formas diferentes de percibir cada parámetro evaluado.

Cuadro N° 8. Calificación promedio de la bebida probiótica de estudiantes en la prueba de sensorial.

CALIFICACIÓN PROMEDIO DE ESTUDIANTES			
CARACTERÍSTICAS	SEXO		
	MASCULINO	FEMENINO	PROMEDIO
ASPECTO	8	7	8
COLOR	8	7	8
OLOR	4	5	5
FLUIDEZ	6	4	5
GRUMOSIDAD	3	3	3
SABOR DULCE	4	3	4
SABOR ACIDO	2	3	3
SABOR RESIDUAL	4	4	4
CALIDAD GENERAL	8	7	8

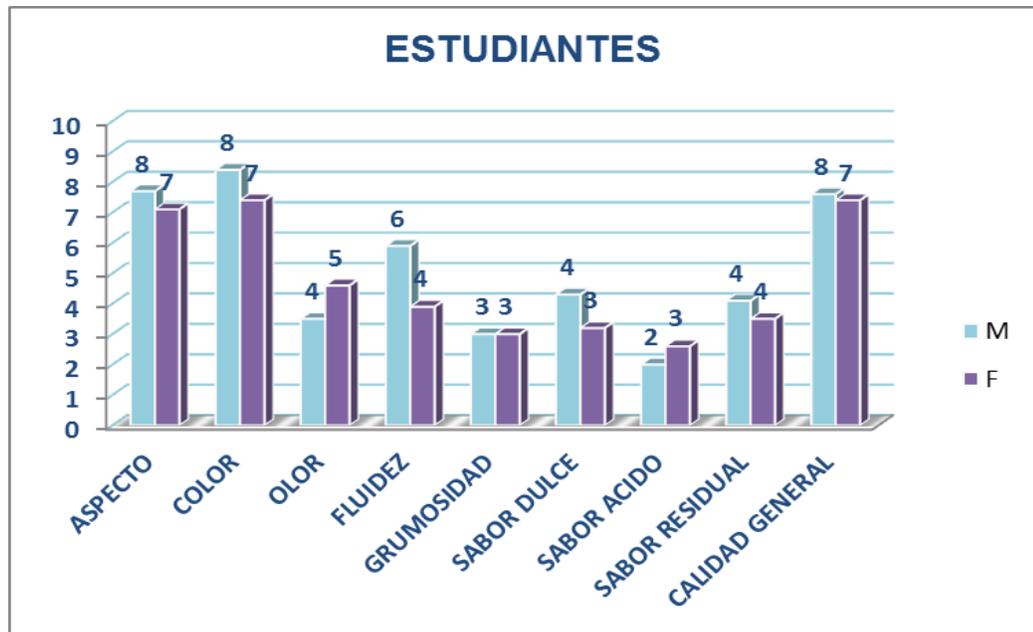


Figura N°14. Calificación promedio de las características organolépticas de la bebida probiótica por estudiantes.

Para el caso de los estudiantes, los resultados son similares a los obtenidos en el análisis sensorial realizado a los docentes,. Se logra apreciar que los resultados obtenidos en cuanto al sabor, muestran que la bebida probiótica presenta un sabor dulce, con un poco de acidez, y que los parámetros de color, olor, fluidez, son bastante aceptables. La bebida respecto a calidad general es bien aceptada por la mayoría, a pesar de no ser muy conocidos estos productos como lo son las bebidas funcionales, pero esto varía entre los individuos debido a la manera que es percibida las características de la bebida, ya sea por género, edad y particularidades de cada persona.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. El jugo extraído del gel de las hojas de la planta de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila), fue un medio adecuado para el desarrollo del microorganismo probiótico *Lactobacillus casei* shirota, y constituyó un medio adecuado para elaborar una bebida que tenga la concentración necesaria para ser una bebida probiótica (10^6 UFC/mL).
2. El descenso de pH con respecto al tiempo en la muestra 2 y muestra 3, puede relacionarse con un aumento en la concentración de ácido láctico; obteniendo así mismo valores de Grados Brix en los que se presume que el *L. casei* shirota consume los azúcares solubles en las muestras que contienen jugo de sábila durante su supervivencia y los metaboliza posiblemente produciendo ácido láctico.
4. En la determinación de *Escherichia coli*, se probó que el proceso de elaboración de la bebida no afecta la calidad del producto, logrando obtener una bebida que cumplió el límite exigido para este microorganismo de acuerdo a la normativa.
5. Durante el periodo de desarrollo de estabilidad de la cepa probiótica *Lactobacillus casei* shirota en el jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila), se comprobó que la concentración de sustrato vegetal es la adecuada para obtener resultados óptimos de crecimiento.
6. El jugo de *Aloe perfoliata* var. vera puede ser utilizado como medio de crecimiento in vitro para la especies probióticas de *L. casei* shirota,

alcanzando el requerimiento mínimo 10^6 UFC/mL necesario para que la bebida sea considerada como probiótica; bajo este criterio se eligió la muestra 2 (15% de jugo de sábila) como formulación óptima para la elaboración de la bebida probiótica, tomando en cuenta que fue la fórmula más estable en los diferentes parámetros determinados.

7. El tiempo de vida útil de la formulación seleccionada (15% de jugo de Sábila) es de 8 días, considerando tanto los valores de pH (que presentaron una disminución al realizar la medición en el día 15); y de Grados Brix (que presentaron una disminución luego de transcurrido el octavo día de análisis).
8. La prueba sensorial del análisis descriptivo cuantitativo, demostró que la bebida presenta una buena aceptabilidad, tanto de estudiantes como de docentes, de ambos géneros. Presentando un olor y sabor residual intermedio, que se mantiene en valores aceptables; con una fluidez y grumosidad adecuada.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Mantener durante todo el proceso de elaboración de la bebida, una cadena de frío para lograr conservar las propiedades tanto de la cepa probiótica *Lactobacillus casei* shirota, como del jugo de *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila).
2. Para la elaboración de la bebida probiótica es necesario contar con un cultivo establecido de *Aloe perfoliata* var. vera, ya que, las características de un cultivo vegetal se ve influenciado por los aspectos ambientales y agroecológicos del sitio de siembra.
3. Realizar un estudio amplio de estabilidad, en donde se tome en cuenta el envase primario para poder determinar el tiempo de vida útil de la bebida envasada y proporcionar así la información necesaria para su comercialización.
4. Evaluar el efecto sinérgico que se desarrolla entre el jugo de sábila y el microorganismo probiótico in vitro.
5. Realizar identificación y cuantificación de los componentes presentes en la planta *Aloe perfoliata* var. vera, con la cual dará óptimos resultados de sobrevivencia de la cepa *Lactobacillus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aranceta, J. Alimentos funcionales y salud en la etapa infantil y juvenil. [Artículo en internet] 2010. Madrid, España: Editorial médica panamericana. [Consulta: 17 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://books.google.com.ec/books?id=9O03337S6B0C&pg=PA37&dq=caracter%C3%ADsticas+de+los+alimentos+funcionales&hl=es&sa=X&ei=OYuLUsP1OubmsATa3IHIAw&ved=0CDEQ6AEwAQ#v=onepage&q=caracter%C3%ADsticas%20de%20los%20alimentos%20funcionales&f=false>.
2. Arteaga Castro, H.Y y De León Ruiz, F.M. Formulación de un alimento para nutrición infantil libre de lactosa a base de caseína con mezcla de probióticos *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* y su efecto sobre la cinética de muerte de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria. [Tesis de pregrado] 2014. El Salvador: Universidad de El Salvador.
3. Cartes Torini, P.A. Viabilidad de las Cepas de *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* en un Postre de Leche con Salsa de Cranberry. [Tesis de pregrado] 2005. Chile: Universidad Austral de Chile. [Consulta: 5 de marzo de 2015] Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fac244v/doc/fac244v.pdf>
4. Cocio J. Elaboración de Quesillo de Leche de Soya (*Glycine max*) con Adición de Bacterias Probióticas (*Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* Bb12) [Artículo en internet] 2006 [Consulta: 17 de junio de 2015]; Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fac663e/sources/fac663e.pdf>

5. Cornejo, K. A. y Esquivel, I.R. Determinación de la contaminación microbiológica del agua del manantial El Paterno ubicado en el municipio de Sensuntepeque. Departamento de Cabañas [Tesis de pregrado] 2008. El Salvador: Universidad de El Salvador. [Consulta: 1 de marzo de 2015]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/2952/1/16100221.pdf>

6. Dominguez-Fernandez A. El Gel de *Aloe vera*: Estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia farmacia y alimentaria (Vol. 11, No. 1). [Revista] 2011 [consulta: 1 de marzo de 2015]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v11n1/v11n1a3.pdf?origin=publication_detail

7. Federal Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995. Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometido a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. 1997. [Acceso el 5 de julio de 2015]. Disponible en: <http://info4.juridicas.unam.mx/ijure/nrm/1/287/4.htm?s=iste>

8. Gallardo, F. El Refractómetro [artículo en internet] 2007 [consulta: 17 de febrero de 2015]. Disponible en: http://ufro.cl/~explora/index_archivos/refractometro.pdf

9. Gamiño-Arroyo, A.E; Barrios-Ceballos, M.P; Cárdenas de la Peña, L.P. Flora Normal, Probióticos y Salud Humana; Acta Universitaria, vol. 15, núm. 3, [Recurso de internet] 2005. Universidad de Guanajuato

Guanajuato, México. [Consulta el 1 de julio de 2015]. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/416/41615305.pdf>

10. García Zaragoza, E., Pagan, M. y García Segovia, M. Diseño de una bebida en polvo pre y probiótica a base de lulo (*Solanum quitoense*). España: Universidad Politécnica de Valencia. [Tesis pregrado] 2000 [consulta: 1 de marzo de 2015]. Disponible en:
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/27942/DISE%C3%91O%20DE%20UNA%20BEBIDA%20EN%20POLVO%20PRE%20Y%20PROBI%C3%93TICA.pdf?sequence=1>

11. González, B.A., Domínguez, R. y Alcocer, B.R. *Aloe vera* como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*. [Recurso de internet] 2009 [consulta: 5 de marzo de 2015]. Volumen 6. México: Universidad Autónoma de Yucatán. Disponible en:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11358120809487640#.VSYFn2iG-WM>

12. González Rodríguez, M. Aislamiento y selección de cepas del genero *Lactobacillus* con capacidad prebiótica e inmunoreguladora. [Tesis pregrado] 2009. España: Universidad autónoma de Barcelona consulta: 13 de mayo de 2015]. Disponible en:
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3931/mrg1de1.pdf;jsessionid=ADB1F5E2AFA9F07BC471BDF48454D3D4.tdx1?sequence=1>

13. Hernández-Monzón, A. y MSc. Romagosa S. Desarrollo de una leche fermentada probiótica con jugo de Aloe vera (Vol. XXXV, No. 1). [Revista] 2014 [consulta: 1 de marzo de 2015]. Disponible en: <http://ajpgi.physiology.org/content/ajpgi/298/6/G807.full.pdf>

14. HYPATIA. 2014. Cambios en las membranas bacterianas como respuesta a estrés. Revista de divulgación Científico-Tecnológica del Gobierno del Estado de Morelos. [Acceso el 1 julio de 2015]. Disponible en: <http://revistahypatia.org/microbiologia-medica.html>

15. Lozano, M. Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei* shirota en una gelatina de pitaya (*Stenocereus griseu*). [Artículo en internet] 1997 [Acceso: 17 de junio de 2015]; Disponible en: http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8891/V_FINAL%20TESIS%20MLOZANO.pdf?sequence=1

16. Mac Faddin W. Media for isolation-cultivation-identification maintenance of medical bacteria, volume 1. [Recurso de internet] 1985 [Acceso el 5 de julio de 2015]. Disponible en: http://www.britanialab.com/productos/274_hoja_tecnica_es.pdf

17. Marquina, D. y Santos, A. Probióticos, Prebióticos y Salud. Dpto. de Microbiología III, Facultad de Biología Universidad Complutense. Madrid. 2002 [Artículo en internet] 2002 [consulta: 3 de julio de 2015]; Disponible en: http://www.hablemosclaro.org/repositorio/biblioteca/b_379_probioticos_p_rebioticos_y_salud.pdf

18. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC. 1990 [Consulta: 13 de mayo de 2015]; Disponible en: <http://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>

19. Ohland, C.L. y Mac Naughton, W.K.. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function [Recurso de internet] 2009 [Consulta: 5 de marzo de 2015]. (2009). Canada: Universidad de Calgary. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57924376002>

20. Palacio Delgado, S.M. Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. [Tesis pregrado] 2005. España: Universidad de Oviedo. [Consulta: 1 de marzo de 2015]. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/5220/1/TESIS%20Susana%20Delgado.pdf>

21. Pérez-Álvarez, J., Aquino-Triana, S. Flores-Espinoza, A., Ramírez-Baca, P., Candelas M., Aguilera-Ortiz, M., Chew, M. Descripción de la calidad fisicoquímica, microbiológica y nutrimental de jugo de sábila *Aloe vera* var *barbadensis*. [Artículo en internet] 2008. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. 2008 [Consulta: 5 de marzo de 2015]; Disponible en: www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee-08-2008/.../A056.pdf

22. Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación [sitio web] 2006. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Probióticos. Alimentación y nutrición. [Consulta: 13 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/es/>

23. Ramírez Amaya, W.J. Propuesta de un manual de técnicas microbiológicas para los diferentes grupos alimenticios, referenciados en las metodologías normalizadas de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA). [Tesis de pregrado] 2012. El salvador: Universidad de El Salvador.

24. Raymond C. R., Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press, sexta edición, Pag. 181-183, 782-784 consultada en: biblioteca Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

25. Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50.08), Alimentos. Criterios Microbiológicos Para La Inocuidad De Alimentos, [Recurso de internet] 2009. [Consulta: 9 de marzo de 2015]. Disponible en: www.mific.gob.ni/LinkClick.aspx?fileticket=259dOFUqMtabid

26. Reyes, J.A. y Rodríguez, L. Los probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hacen un gran trabajo? [Revista] 2012. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, (volumen 43, No 1). Distrito Federal México. [Consulta: 1 de marzo de 2015]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57924376002>

27. Sierra, A.S. Desarrollo de un prototipo de bebida de sábila (*Aloe vera* barbadensis Miller) y naranja. [Recurso de internet] 2002. Honduras. [Consulta: 1 de marzo de 2015]. Disponible en: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1522/1/T1425.pdf>
28. Sistema Único de Información en Salud. Informe de Labores 2013-2014 MINSAL. El Salvador. [Consulta el 3 de julio de 2015]. Disponible en https://www.salud.gob.sv/archivos/pdf/MINSAL_Informe_de_Labores_2013_2014.pdf
29. Torrico, E. y Trigoso C. Manual de procedimiento y control de calidad interno método Bauer-Kirby. 1ª ed. La Paz: OPS/OMS, 2003. [consulta el 3 de julio de 2015]. Disponible en: <http://enfermeria.bvsp.org.bo/textocompleto/bvsp/boxp79/tcd/nacional/nman13.pdf>
30. Trópicos Missouri Botanical Garden (MBG) [Base de datos en internet] 2015 [Consulta: 10 de julio de 2015]; Disponible en: <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=18403421&langid=66>
31. Vega, A., Nevenka, C., Díaz, L. y Lemus, R. El *Aloe Vera* (*Aloe Barbadensis Miller*) como componentes de alimentos funcionales. (Vol. 32 No 3). Chile: Universidad de la Serena. [Recurso de internet] 2005 [Consulta: 1 de marzo de 2015]. Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071775182005000300005&script=sci_arttext&tlng=en

32. Wallace, A. y Hammack, T. Bacteriological Analytical Manual for Foods [Manual en línea] 2009 [Acceso el 1 de julio de 2015]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>

33. Whyte, J. Los Probióticos. Asociaciones Mundiales Para un Mundo Saludable (ILSI). [Recurso de internet] 2013 [consulta: 5 de marzo de 2015]. Disponible en: http://www.ilsi.org/Europe/Pages/TF_Probiotics.aspx

34. Zanfugas. Evaluación Sensorial de los alimentos. [Recurso de internet] 2007. La Habana, Cuba. [Consulta: 17 de febrero de 2015]. Disponible en: https://www.academia.edu/4360436/gusto_pdf

GLOSARIO (9), (12), (17),(19)

-Acíbar: (Sinónimo: *Aloe*)

Planta tropical de hojas perennes, largas y carnosas de las cuales se extrae un jugo resinoso y una fibra muy resistente a la humedad.

-Actividad hemolítica:

Fenómeno de ruptura o lisis de la membrana del eritrocito que provoca la liberación de la hemoglobina. Como consecuencia se produce anemia y hemoglobinuria, posteriormente ictericia por exceso de hemoglobina transformada en pigmentos biliares.

-Agar EMB:

Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.

-Agentes enteropatógenos:

Microorganismo que bajo ciertas circunstancias puede producir enfermedad en el ser humano a nivel del sistema digestivo, se transmite vía oral-fecal.

-Anóxica:

Carente de Oxígeno.

-Comensales:

Organismo o animal que obtiene alimento a expensas de otro sin producirle daño ni beneficio.

-Flagelación peritica:

Tipo de flagelación la que estos se encuentran por todo el cuerpo de la bacteria.

-Flora microbiana:

La flora microbiana normal, también denominada microflora o microbiota, se refiere a los diferentes microorganismos que habitan en las superficies internas y externas de los seres humanos convencionalmente sanos.

-Gram positivo:

Microorganismo que se caracteriza por medio de la tinción y es identificacado principalmente por poseer una pared gruesa envuelta con múltiples capas de peptidoglicano.

-Heterotoxigenicas:

Organismo capaz de producir diferentes toxinas.

-Homeostasis:

Proceso por el cual un organismo o un sistema mantiene constantes sus propios parámetros independientemente de las condiciones del medio externo mediante mecanismos fisiológicos

-IgA: (Inmunoglobulina A)

Es la clase predominante de anticuerpo en las secreciones seromucosas del organismo.

-Lumen:

Usualmente denominado luz, es el espacio interior de una estructura tubular, como en una arteria o intestino.

-Medio de cultivo MRS:

El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos.

-Microorganismo viable:

Es aquel con la capacidad de manifestar actividad biológica al encontrarse en condiciones favorables de desarrollo.

-Microorganismo patógeno:

Bacteria, virus u otros organismos de tamaño microscópico que causan enfermedades.

-Mucina:

Mucopolisacárido, ingrediente principal del moco. La mucina se encuentra en la mayoría de las glándulas secretoras de moco y es el lubricante que protege las superficies corporales de la fricción o erosión.

-Néctar de fruta:

Producto pulposo sin fermentar, pero fermentable, destinado al consumo directo, obtenido mezclando toda la parte comestible de la fruta finamente dividida y tamizada, en buen estado y madura, concentrado o sin concentrar, con adición de agua y con o sin adición de azúcares o miel y los aditivos alimentarios permitidos.

-Pancreatina

Extracto pancreático de mamífero compuesto por enzimas con actividades de proteasa, amilasa y lipasa.

-Técnica de número más probable: (NMP)

La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia (pos o neg) en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes.

-UFC: (Unidad formadora de colonias)

Célula viva y aislada que se encuentra en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un breve lapso de tiempo.

ANEXOS

ANEXO N°1

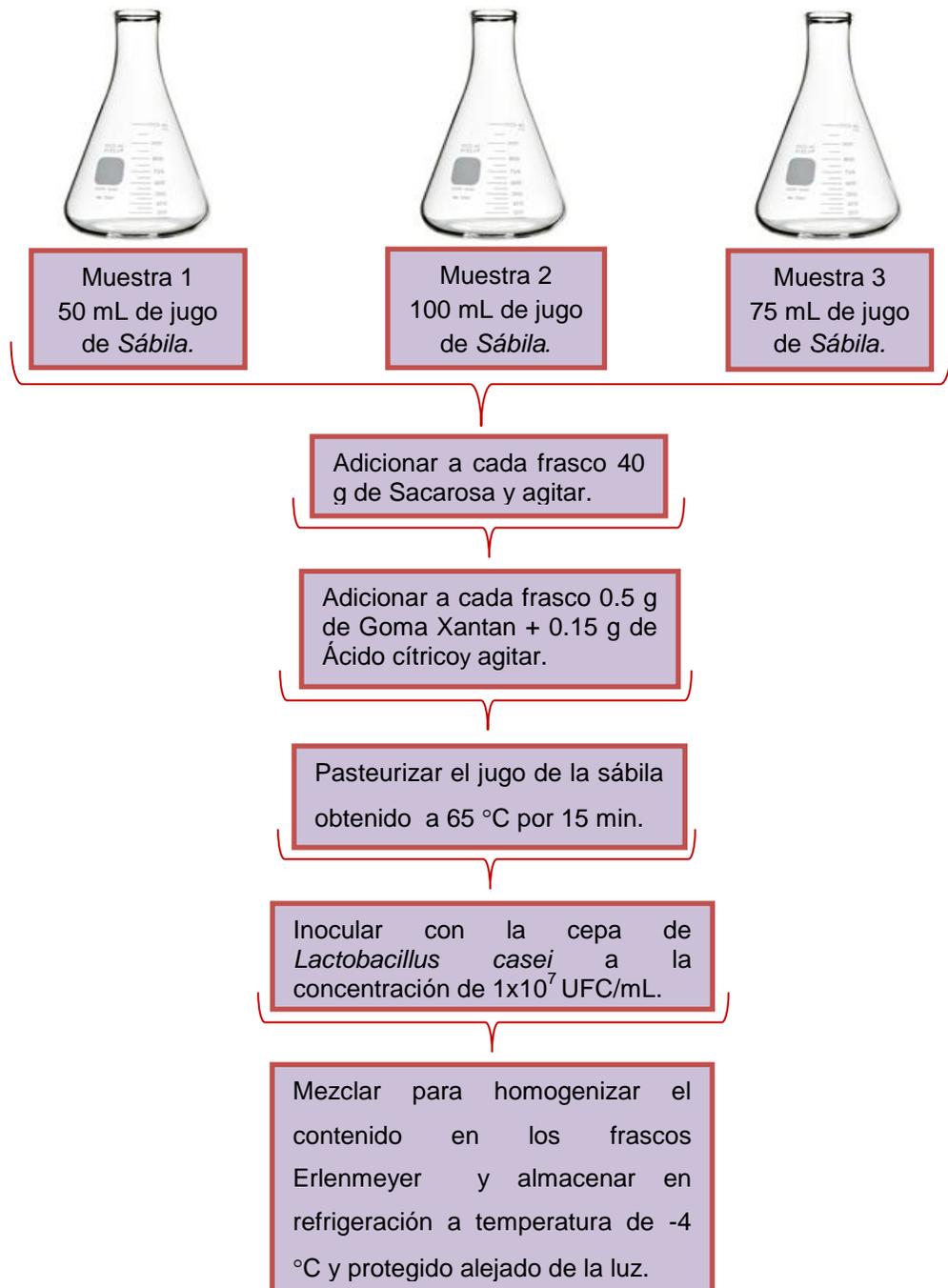


Figura N° 4: Esquema de formulación de la bebida probiótica.

ANEXO N°2

Procedimiento de preparación de diluciones del jugo de *Aloe perfoliata*
var. verapasteurizado sin probiótico.

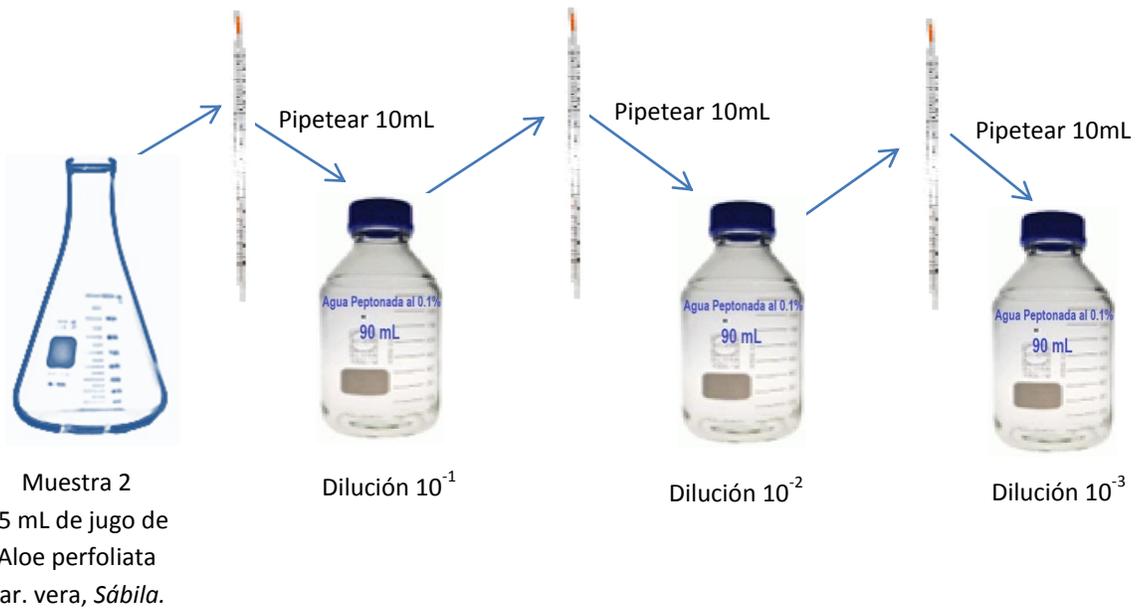
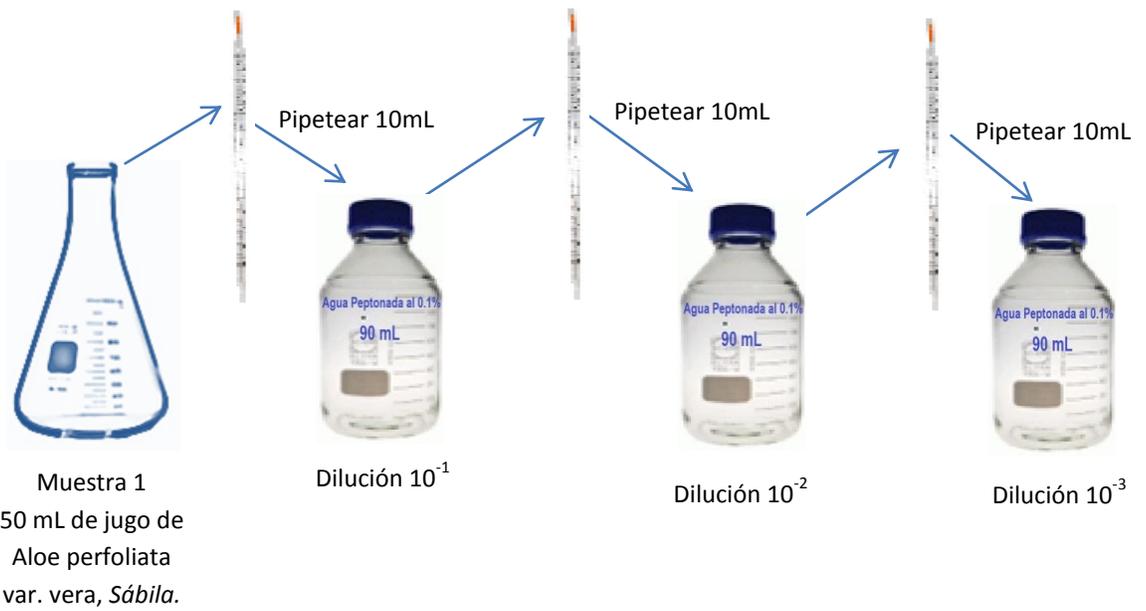


Figura N° 5: Procedimiento de preparación de diluciones.

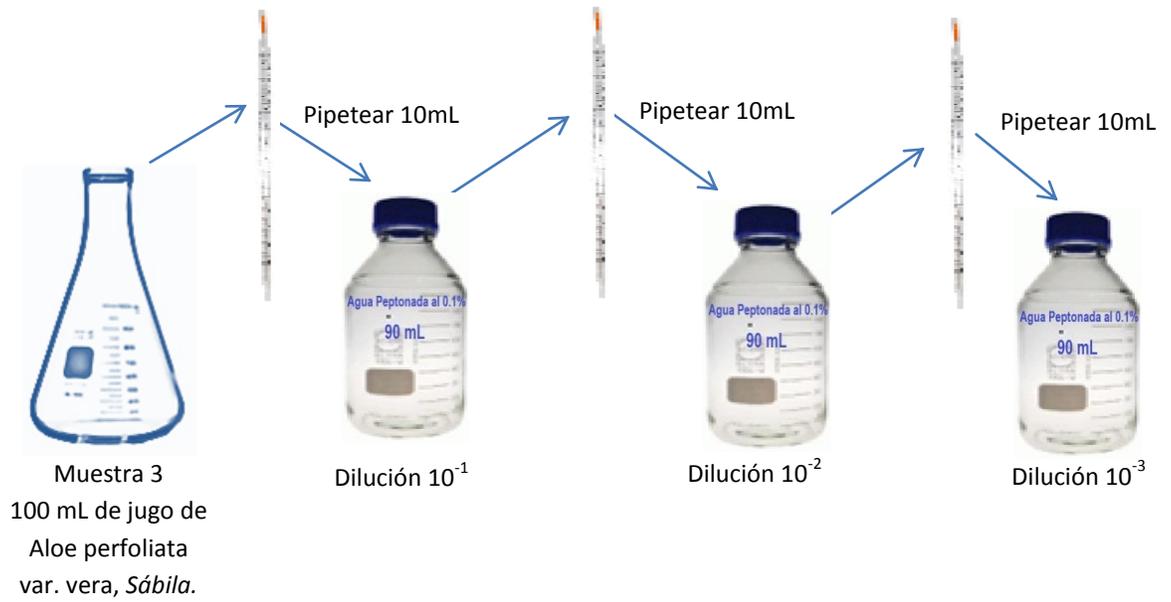


Figura N° 5: Continuación.

ANEXO N°3

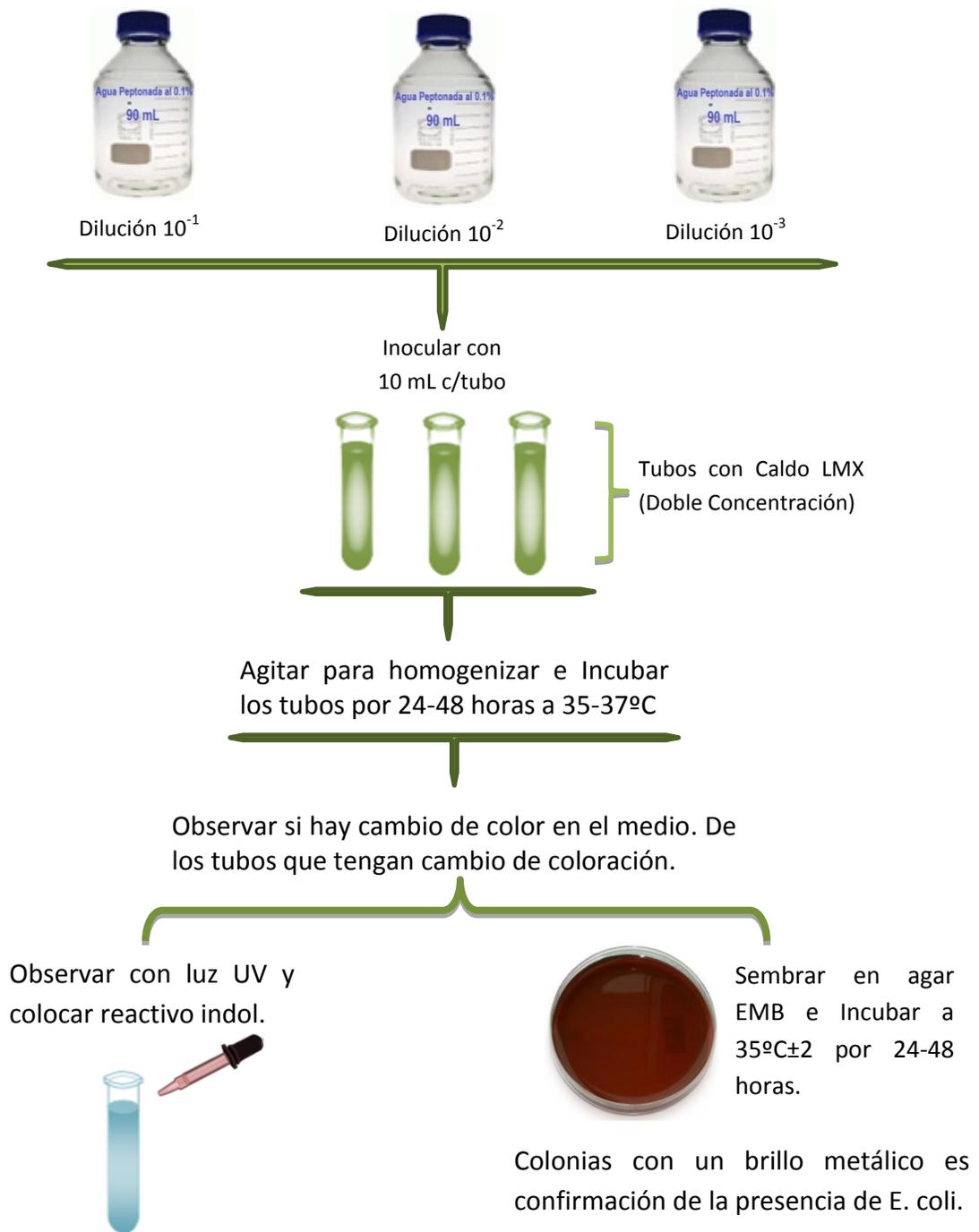


Figura 6: Procedimiento para la determinación de *Escherichia coli* por medio de la técnica de Numero Más Probable. (24), (31)

ANEXO N°4

Procedimiento para la Realización de la Estabilidad del Componente Probiótico.

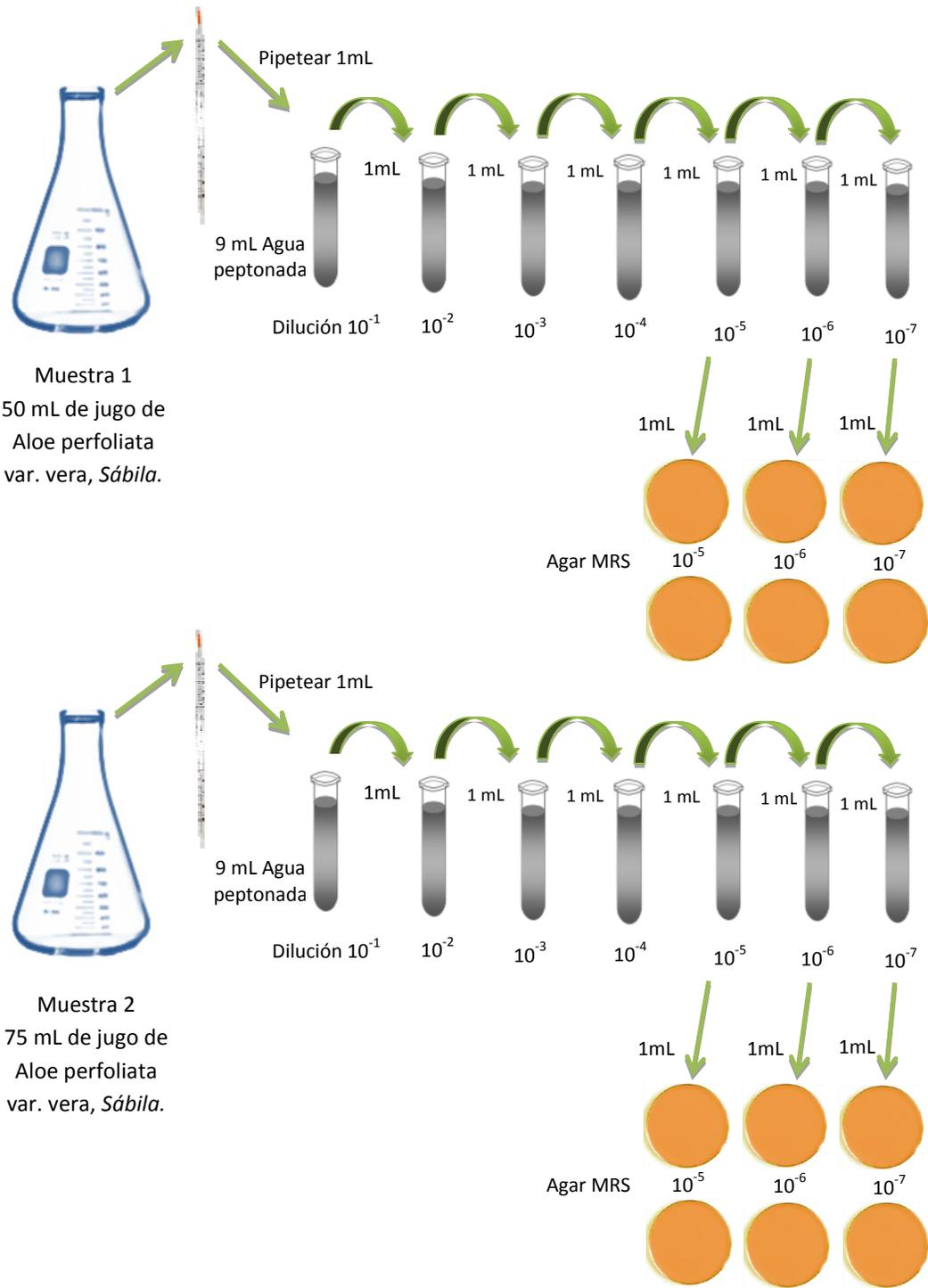
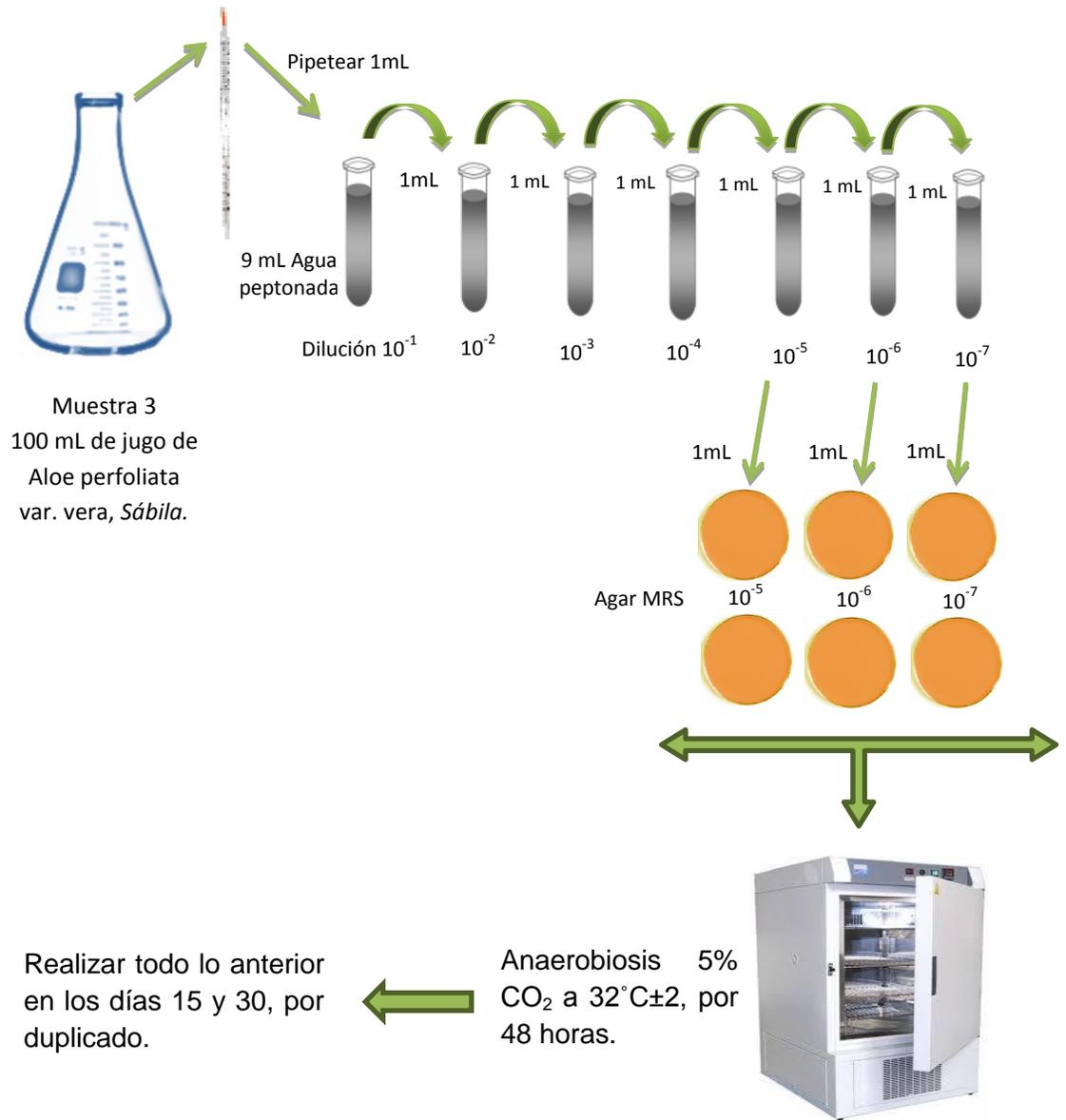


Figura N° 7: Procedimiento para la Realización de la Estabilidad del Componente Probiótico.⁽²⁸⁾



FiguraN°7: Continuación.

ANEXO N°5

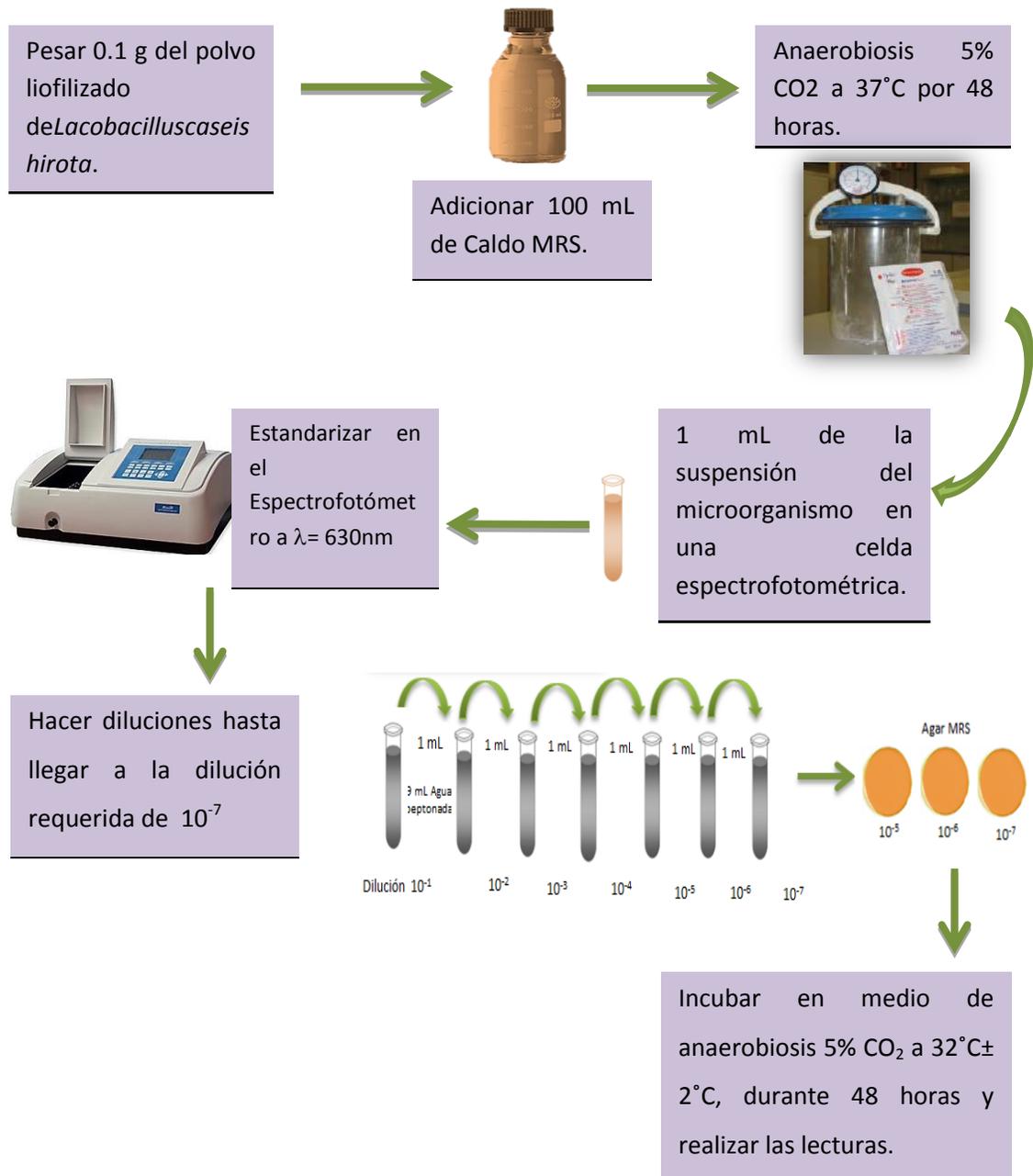


Figura N°8: Estandarización de la cepa probiótica *Lactobacillus casei shirota*.

ANEXO N°6

Tabla N°1. Criterios Microbiológicos para Vigilancia de los alimentos, según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50.08). ⁽²⁵⁾

14.0 Grupo de alimentos: Bebidas. Esta categoría incluye las bebidas envasadas no carbonatadas (14.1), néctares (14.2), jugos no pasteurizados (14.3), agua envasada (14.4), te y hierbas para infusión (14.5). Las bebidas lácteas figuran en la categoría 1.1.						
14.1 Subgrupo del alimento: Bebidas envasadas no carbonatadas (jugos pasteurizados, productos concentrados).						
Parámetro	Plan de muestreo				Limite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	< 3NMP/mL	-----

ANEXO N°7

Cuadro N°4: Ejemplo de Cepas de Probióticos en Productos Alimenticios.

Cepa (Designaciones alternativas)	Nombre de marca	Fabricante
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activa	Dananone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis subsp. Lactis</i> BB-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter y Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru™ Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Moringa Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus lactis</i> L1A	Norrmejerier	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	Reuteri	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit y otros	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae (boulardii)</i> lio	DiarSafe, Ultralevure y otros	Wren Laboratories, Biocodex y otros
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 y <i>Lactobacillus casei</i> L bc80r	Bio K+	Bio K+ International
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansen
Analizado como mezcla: VSL#3 (mezcla de 1 cepa de <i>Streptococcus thermophilus</i> , cuatro <i>Lactobacillus spp</i> y tres cepas de <i>Bifidobacterium spp</i>)	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 y <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20		
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011	A' Biotica y otros	Institut Rosell
Analizado como mezcla: <i>Bacillus clausii</i> cepas O/C, NR, SIN y T	Enterogermina	Sanofi-Aventis

ANEXO N°8



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
 FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
 TRABAJO DE GRADUACION: DESARROLLO DE UNA BEBIDA PROBIOTICA DE
Aloe perfoliata var. vera (SABILA) UTILIZANDO *Lactobacillus casei shirota*.
 Responsables: Julia P. González, Marta Susana Sosa.

Evalué las características relacionadas y que describen el producto analizado a continuación marque con una "X" el valor que le parezca conveniente.

Estudiante	<input type="checkbox"/>		SEXO: F	<input type="checkbox"/>						
Docente	<input type="checkbox"/>		M	<input type="checkbox"/>						
Aspecto	<input type="checkbox"/>									
	No uniforme		Poco uniforme		Uniforme		Muy uniforme			
Color	<input type="checkbox"/>									
	No uniforme		Poco uniforme		Uniforme		Muy uniforme			
Olor	<input type="checkbox"/>									
	Muy débil		Débil		Fuerte		Muy fuerte			
Fluidez	<input type="checkbox"/>									
	Muy fluido		Fluido		Espeso		Muy espeso			
Grumosidad	<input type="checkbox"/>									
	Sin grumos		Pocos grumos		Grumoso		Muy grumoso			
Sabor dulce	<input type="checkbox"/>									
	Muy débil		Débil		Fuerte		Muy fuerte			
Sabor ácido	<input type="checkbox"/>									
	Muy débil		Débil		Intenso		Muy Intenso			
Sabor residual	<input type="checkbox"/>									
	Muy débil		Débil		Intenso		Muy Intenso			
Calidad general	<input type="checkbox"/>									
	Mala		Regular		Buena		Muy buena			

Figura N°9: Instrumento para evaluación de la prueba de análisis cuantitativo descriptivo.⁽³¹⁾

ANEXO N° 9



Asociación Jardín Botánico La Laguna

Antiguo Cuscatlán, 10 de Julio de 2015

A quien corresponda.
Presente.

Hago del conocimiento a los interesados, que las Sritas. Julia Patricia González Guzmán y Marta Susana Stephany Sosa Quintanilla, estudiante de la carrera de Lic. en Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, con carnet de estudiante GG0506 y SQ06002, se hicieron presentes a nuestro herbario con una planta conocida comúnmente como "sábila".

La especie se sometió a revisión taxonómica, para determinarle de la siguiente manera:

Clase: Equisetopsida C. Agardh
Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
Super-orden: Liliales Takht.
Orden: Asparagales Link
Familia: Xanthorrhoeaceae Dumort.
Género: *Aloe* L.
Especie: *Aloe vera* (L.) Burm. f.

Espero que el apoyo sea de mucha importancia para el desarrollo de tan importante investigación.

Atte.


Dagoberto Rodríguez Delcid
Asociación Jardín Botánico La Laguna
Cuidador
Herbario LAGU



Urbanización Industrial Plan de La Laguna, Antiguo Cuscatlán La Libertad, Tel. (503) 2243 - 7970 / 2243 - 7968
Email: jardinbotanico@jardinbotanico.org.sv Sitio Web: www.jardinbotanico.org.sv

Figura N°10: Resultado de la revisión taxonómica de la planta *Aloeperfoliatavar.vera* (sábila).

ANEXO N° 10

Monografías y hojas de Especificaciones de Materias primas
utilizadas en la formulación de la bebida probiótica.

Xanthan Gum

1 Nonproprietary Names

BP: Xanthan Gum
PhEur: Xanthan Gum
USP-NF: Xanthan Gum

2 Synonyms

Corn sugar gum; E415; *Gründsted*; *Keldent*; *Keltrol*; polysaccharide B-1459; *Rhodicare S*; *Rhodigel*; *Vanzan NF*; xanthani gumm; *Xantanal*.

3 Chemical Name and CAS Registry Number

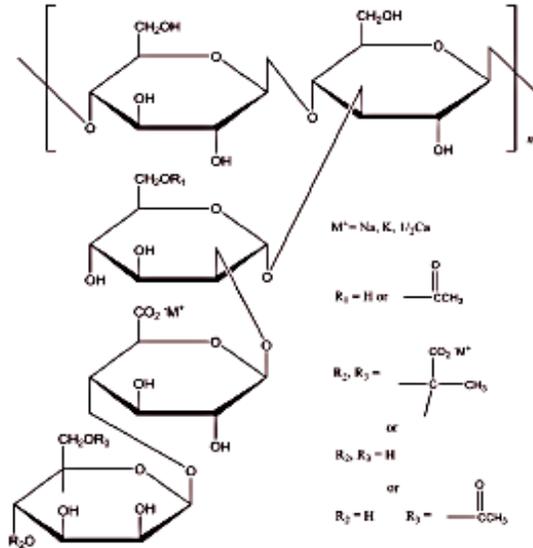
Xanthan gum [11138-66-2]

4 Empirical Formula and Molecular Weight

$(C_{35}H_{49}O_{29})_n$ approximately 1×10^6

The USP32-NF27 describes xanthan gum as a high molecular weight polysaccharide gum. It contains D-glucose and D-mannose as the dominant hexose units, along with D-gluconic acid, and is prepared as the sodium, potassium, or calcium salt.

5 Structural Formula



Each xanthan gum repeat unit contains five sugar residues: two glucose, two mannose, and one gluconic acid. The polymer backbone consists of four β-D-glucose units linked at the 1 and 4 positions, and is therefore identical in structure to cellulose. Trisaccharide side chains on alternating anhydroglucose units distinguish xanthan from cellulose. Each side chain comprises a gluconic acid residue between two mannose units. At most of the terminal mannose units is a pyruvate moiety; the mannose nearest the main chain carries a single group at C-6. The resulting stiff polymer chain may exist in solution as a single, double, or triple

helix that interacts with other xanthan gum molecules to form complex, loosely bound networks.^(1,2)

6 Functional Category

Gelling agent; stabilizing agent; suspending agent; sustained-release agent; viscosity-increasing agent.

7 Applications in Pharmaceutical Formulation or Technology

Xanthan gum is widely used in oral and topical pharmaceutical formulations, cosmetics, and foods as a suspending and stabilizing agent.⁽³⁻⁵⁾ It is also used as a thickening and emulsifying agent. It is nontoxic, compatible with most other pharmaceutical ingredients, and has good stability and viscosity properties over a wide pH and temperature range; see Section 11. Xanthan gum gels show pseudoplastic behavior, the shear thinning being directly proportional to the shear rate. The viscosity returns to normal immediately on release of shear stress.

Xanthan gum has been used as a suspending agent for conventional,⁽⁶⁾ dry⁽⁷⁾ and sustained-release⁽⁸⁾ suspensions. When xanthan gum is mixed with certain inorganic suspending agents, such as magnesium aluminum silicate, or organic gums, synergistic rheological effects occur.⁽⁹⁾ In general, mixtures of xanthan gum and magnesium aluminum silicate in ratios between 1:2 and 1:9 produce the optimum properties. Similarly, optimum synergistic effects are obtained with xanthan gum : guar gum ratios between 3:7 and 1:9.

Although primarily used as a suspending agent, xanthan gum has also been used to prepare sustained-release matrix tablets.⁽¹⁰⁻¹³⁾ Controlled-release tablets of diltiazem hydrochloride prepared using xanthan gum have been reported to sustain the drug release in a predictable manner, and the drug release profiles of these tablets were not affected by pH and agitation rate.⁽¹⁴⁾ Xanthan gum has also been used to produce directly compressed matrices that display a high degree of swelling due to water uptake, and a small amount of erosion due to polymer relaxation.⁽¹⁵⁾ It has also been used in combination with chitosan,^(16,17) guar gum,^(18,19) galactomannan,⁽²⁰⁾ and sodium alginate⁽²¹⁾ to prepare sustained-release matrix tablets. Xanthan gum has been used as a binder,⁽²²⁾ and in combination with Konjac glucomannan^(23,24) is used as an excipient for controlled colonic drug delivery. Xanthan gum with boswellia (3:1)⁽²⁵⁾ and guar gum (10:20)⁽²⁶⁾ have shown the best release profiles for the colon-specific compression coated systems of 5-fluorouracil for the treatment of colorectal cancer. Xanthan gum has also been used with guar gum for the development of a floating drug delivery system.⁽²⁷⁾ It has also been derivatized to sodium carboxymethyl xanthan gum and crosslinked with aluminum ions to prepare microparticles, as a carrier for protein delivery.⁽²⁸⁾

Xanthan gum has been incorporated in an ophthalmic liquid dosage form, which interacts with mucin, thereby helping in the prolonged retention of the dosage form in the precorneal area.⁽²⁹⁾ When added to liquid ophthalmics, xanthan gum delays the release of active substances, increasing the therapeutic activity of the pharmaceutical formulations.⁽³⁰⁾

Xanthan gum can be used to increase the bioadhesive strength in vaginal formulations.⁽³¹⁾ Xanthan gum alone or with carbopol 974P has been used as a mucoadhesive controlled-release excipient for buccal drug delivery.^(32,33) Modified xanthan films have been used as a matrix system for transdermal delivery of atenolol.⁽³⁴⁾ Xanthan gum has also been used as a gelling agent for topical formulations incorporating solid lipid nanoparticles of vitamin A⁽³⁵⁾ or microemulsion of ibuprofen.⁽³⁶⁾ A combined polymer

Figura N°11: Monografía de Goma Xantan.

system consisting of xanthan gum, carboxy methylcellulose and a polyvinyl pyrrolidone backbone polymer has been used for relieving the symptoms of xerostomia.⁽³⁷⁾ Xanthan gum can also be used as an excipient for spray-drying and freeze-drying processes for better results.^(38,39) It has been successfully used alone or in combination with agar for microbial culture media.⁽⁴⁰⁾

Xanthan gum is also used as a hydrocolloid in the food industry, and in cosmetics it has been used as a thickening agent in shampoo.⁽⁴¹⁾ Polyphosphate with xanthan gum in soft drinks is suggested to be effective at reducing erosion of enamel.^(42,43)

8 Description

Xanthan gum occurs as a cream- or white-colored, odorless, free-flowing, fine powder.

9 Pharmacopeial Specifications

See Table I.

Table I: Pharmacopeial specifications for xanthan gum.

Test	PhEur 6.4	USP32-NF27
Identification	+	+
Characters	+	—
pH	6.0–8.0	—
Viscosity	≥600 mPa s	≥600 mPa s
Propan-2-ol	≤750 ppm	≤0.075%
Other polysaccharides	+	—
Loss on drying	≤15.0%	≤15.0%
Total ash	6.5–16.0%	6.5–16.0%
Microbial contamination	+	+
Bacteria	≤10 ² cfu/g	—
Fungi	≤10 ² cfu/g	—
Pyruvic acid	—	≤1.5%
Arsenic	—	≤3 μg/g
Lead	—	≤5 μg/g
Heavy metals	—	≤0.003%
Assay	—	91.0–108.0%

10 Typical Properties

Acidity/alkalinity pH = 6.0–8.0 for a 1% w/v aqueous solution.

Freezing point 0°C for a 1% w/v aqueous solution.

Heat of combustion 14.6 J/g (3.5 cal/g)

Melting point Chars at 270°C.

NIR spectra see Figure 1.

Particle size distribution Various grades with different particle sizes are available; see Table II.

Refractive index $n_D^{20} = 1.333$ (1% w/v aqueous solution).

Solubility Practically insoluble in ethanol and ether; soluble in cold or warm water.

Specific gravity 1.600 at 25°C.

Viscosity (dynamic) 1200–1600 mPa s (1200–1600 cP) for a 1% w/v aqueous solution at 25°C.

11 Stability and Storage Conditions

Xanthan gum is a stable material. Aqueous solutions are stable over a wide pH range (pH 3–12), although they demonstrate maximum stability at pH 4–10 and temperatures of 10–60°C. Xanthan gum solutions of less than 1% w/v concentration may be adversely affected by higher than ambient temperatures; for example, viscosity is reduced. Xanthan gum provides the same thickening, stabilizing, and suspending properties during long-term storage at elevated temperatures as it does at ambient conditions. In addition, it ensures excellent freeze–thaw stability. Solutions are also stable in the presence of enzymes, salts, acids, and bases. *Vanzan NF-ST* is especially designed for use in systems containing high salt concentrations as it dissolves directly in salt solutions, and its

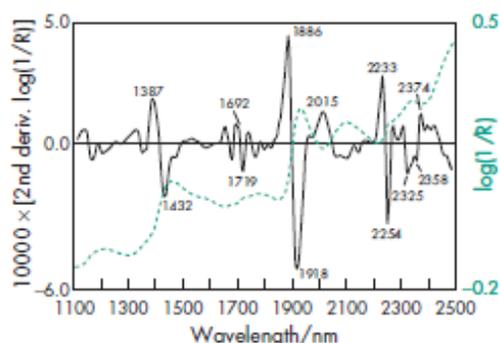


Figure 1: Near-infrared spectrum of xanthan gum measured by reflectance.

Table II: Particle size distribution of selected commercially available grades of xanthan gum.

Grade	Particle size (μm)
Keltrol CG	100% <180
Grindsted Xanthan 80	180
Grindsted Xanthan 200	75
Grindsted Xanthan Easy	850
Grindsted Xanthan Supra	1180
Grindsted Xanthan Ultra	180
Grindsted Xanthan TSC	250
Grindsted Xanthan Clear 80	180
Grindsted Xanthan Clear 200	75
Grindsted Xanthan Clear Easy	850
Grindsted Xanthan Clear Supra	1180
Vanzan NF	180
Vanzan NF-F	75
Vanzan NF-C	180
Vanzan NF-ED	1180
Vanzan NF-ST	75

viscosity is relatively unaffected by high salt levels as compared with general purpose grades.

The bulk material should be stored in a well-closed container in a cool, dry place.

12 Incompatibilities

Xanthan gum is an anionic material and is not usually compatible with cationic surfactants, polymers, or preservatives, as precipitation occurs. Anionic and amphoteric surfactants at concentrations above 15% w/v cause precipitation of xanthan gum from a solution.

Under highly alkaline conditions, polyvalent metal ions such as calcium cause gelation or precipitation; this may be inhibited by the addition of a glucoheptonate sequesterant. The presence of low levels of borates (<300 ppm) can also cause gelation. This may be avoided by increasing the boron ion concentration or by lowering the pH of a formulation to less than pH 5. The addition of ethylene glycol, sorbitol, or mannitol may also prevent this gelation.

Xanthan gum is compatible with most synthetic and natural viscosity-increasing agents, many strong mineral acids, and up to 30% inorganic salts. If it is to be combined with cellulose derivatives, then xanthan gum free of cellulase should be used to prevent depolymerization of the cellulose derivative. Xanthan gum solutions are stable in the presence of up to 60% water-miscible organic solvents such as acetone, methanol, ethanol, or propan-2-ol. However, above this concentration precipitation or gelation occurs.

Citric Acid Monohydrate

1 Nonproprietary Names

BP: Citric Acid Monohydrate
 JP: Citric Acid Hydrate
 PhEur: Citric Acid Monohydrate
 USP: Citric Acid Monohydrate

2 Synonyms

Acidum citricum monohydricum; E330; 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid monohydrate.

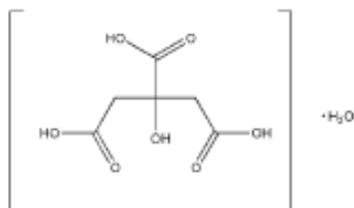
3 Chemical Name and CAS Registry Number

2-Hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid monohydrate [5949-29-1]

4 Empirical Formula and Molecular Weight

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 210.14

5 Structural Formula



6 Functional Category

Acidifying agent; antioxidant; buffering agent; chelating agent; flavor enhancer; preservative.

7 Applications in Pharmaceutical Formulation or Technology

Citric acid (as either the monohydrate or anhydrous material) is widely used in pharmaceutical formulations and food products, primarily to adjust the pH of solutions. It has also been used experimentally to adjust the pH of tablet matrices in enteric-coated formulations for colon-specific drug delivery.⁽¹⁾ Citric acid monohydrate is used in the preparation of effervescent granules, while anhydrous citric acid is widely used in the preparation of effervescent tablets.⁽²⁻⁴⁾ Citric acid has also been shown to improve the stability of spray-dried insulin powder in inhalation formulations.⁽⁵⁾

In food products, citric acid is used as a flavor enhancer for its tart, acidic taste. Citric acid monohydrate is used as a sequestering agent and antioxidant synergist; see Table I. It is also a component of anticoagulant citrate solutions. Therapeutically, preparations containing citric acid have been used to dissolve renal calculi.

Table I: Uses of citric acid monohydrate.

Use	Concentration (%)
Buffer solutions	0.1–2.0
Flavor enhancer for liquid formulations	0.3–2.0
Sequestering agent	0.3–2.0

8 Description

Citric acid monohydrate occurs as colorless or translucent crystals, or as a white crystalline, efflorescent powder. It is odorless and has a strong acidic taste. The crystal structure is orthorhombic.

9 Pharmacopeial Specifications

See Table II. See also Sections 17 and 18.

Table II: Pharmacopeial specifications for citric acid monohydrate (and anhydrous).

Test	JP XV	PhEur 6.0	USP 32
Identification	+	+	+
Character	—	+	—
Appearance of solution	+	+	+
Water			
(hydrous form)	7.5–9.0%	7.5–9.0%	7.5–9.0%
(anhydrous form)	≤1.0%	≤1.0%	≤1.0%
Sterility	—	—	+
Bacterial endotoxins	—	+	+
Residue on ignition	≤0.1%	—	≤0.1%
Sulfated ash	—	≤0.1%	—
Calcium	+	—	—
Aluminum	—	≤0.2 ppm	≤0.2 µg/g ^(a)
Oxalic acid	+	≤360 ppm	≤0.036%
Sulfate	+	≤150 ppm	≤0.015%
Heavy metals	≤10 ppm	≤10 ppm	≤0.001%
Readily carbonizable substances	+	+	+
Assay (anhydrous basis)			
99.5–100.5%			
99.5–101.0%			
99.5–100.5%			

(a) Where it is labeled as intended for use in dialysis.

Note that the JP XV, PhEur 6.0 and USP 32 have separate monographs for the monohydrate and anhydrous material.

10 Typical Properties

Acidity/alkalinity pH = 2.2 (1% w/v aqueous solution)

Dissociation constant

pK_{a1} : 3.128 at 25°C;

pK_{a2} : 4.761 at 25°C;

pK_{a3} : 6.396 at 25°C.

Density 1.542 g/cm³

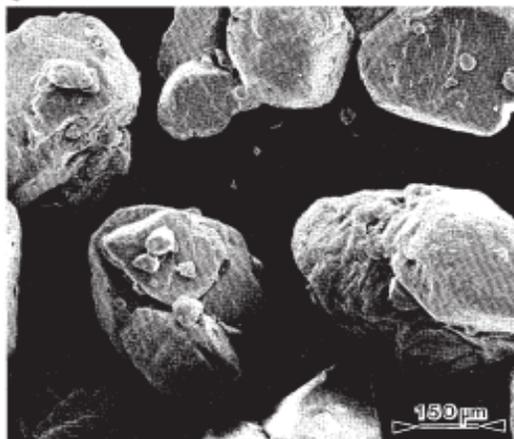
Heat of combustion –1972 kJ/mol (–471.4 kcal/mol)

Heat of solution –16.3 kJ/mol (–3.9 kcal/mol) at 25°C

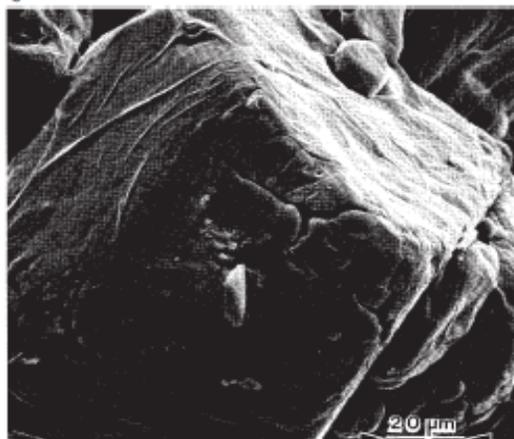
Hygroscopicity At relative humidities less than about 65%, citric acid monohydrate effloresces at 25°C, the anhydrous acid being formed at relative humidities less than about 40%. At relative humidities between about 65% and 75%, citric acid monohydrate absorbs insignificant amounts of moisture, but under

Figura N°12: Monografía de Ácido Cítrico.

SEM 1: Excipient citric acid monohydrate; manufacturer: Pfizer Ltd; magnification: 600x.



SEM 2: Excipient citric acid monohydrate; manufacturer: Pfizer Ltd; magnification: 600x.



more humid conditions substantial amounts of water are absorbed.

Melting point $\approx 100^{\circ}\text{C}$ (softens at 75°C .)

NIR spectra see Figure 1.

Particle size distribution Various grades of citric acid monohydrate with different particle sizes are commercially available.

Solubility Soluble 1 in 1.5 parts of ethanol (95%) and 1 in less than 1 part of water; sparingly soluble in ether.

Viscosity (dynamic)

6.5 mPa s (6.5 cP) for a 50% w/v aqueous solution at 25°C .

See also Section 17.

11 Stability and Storage Conditions

Citric acid monohydrate loses water of crystallization in dry air or when heated to about 40°C . It is slightly deliquescent in moist air. Dilute aqueous solutions of citric acid may ferment on standing.

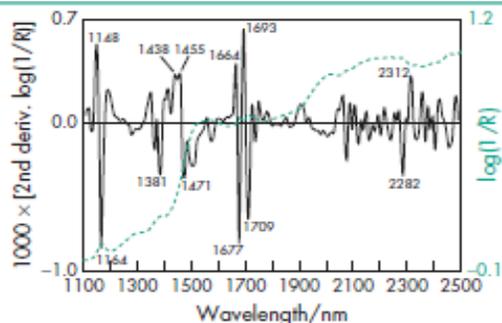


Figure 1: Near-infrared spectrum of citric acid monohydrate measured by reflectance.

The bulk monohydrate or anhydrous material should be stored in airtight containers in a cool, dry place.

12 Incompatibilities

Citric acid is incompatible with potassium tartrate, alkali and alkaline earth carbonates and bicarbonates, acetates, and sulfides. Incompatibilities also include oxidizing agents, bases, reducing agents, and nitrates. It is potentially explosive in combination with metal nitrates. On storage, sucrose may crystallize from syrups in the presence of citric acid.

13 Method of Manufacture

Citric acid occurs naturally in a number of plant species and may be extracted from lemon juice, which contains 5–8% citric acid, or pineapple waste. Anhydrous citric acid may also be produced industrially by mycological fermentation of crude sugar solutions such as molasses, using strains of *Aspergillus niger*. Citric acid is purified by recrystallization; the anhydrous form is obtained from a hot concentrated aqueous solution and the monohydrate from a cold concentrated aqueous solution.

14 Safety

Citric acid is found naturally in the body, mainly in the bones, and is commonly consumed as part of a normal diet. Orally ingested citric acid is absorbed and is generally regarded as a nontoxic material when used as an excipient. However, excessive or frequent consumption of citric acid has been associated with erosion of the teeth.⁽⁶⁾

Citric acid and citrates also enhance intestinal aluminum absorption in renal patients, which may lead to increased, harmful serum aluminum levels. It has therefore been suggested that patients with renal failure taking aluminum compounds to control phosphate absorption should not be prescribed citric acid or citrate-containing products.⁽⁷⁾

See Section 17 for anhydrous citric acid animal toxicity data.

15 Handling Precautions

Observe normal precautions appropriate to the circumstances and quantity of material handled. Eye protection and gloves are recommended. Direct contact with eyes can cause serious damage. Citric acid should be handled in a well-ventilated environment or a dust mask should be worn. It is combustible.

16 Regulatory Status

GRAS listed. The anhydrous form is accepted for use as a food additive in Europe. Included in the FDA Inactive Ingredients

FiguraN°12: Continuación.

ANEXO N° 11

Tabla N°2. Índice de NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones de resultados positivos para una serie de 3 tubos cada uno con 10, 1, 0.1, 0.01 g o mL de muestra.⁽⁵⁾

Combinación de tubos positivos	NMP/g ó mL	Límites de confianza del 95%		Combinación de tubos positivos	NMP/g ó mL	Límites de confianza del 95%	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
0-0-0	<3	-	-	3-0-0	23	4	120
0-0-1	3	< 0,5	9	3-0-1	39	7	130
0-1-0	3	< 0,5	13	3-0-2	64	15	380
1-0-0	4	< 0,5	20	3-1-0	43	7	210
1-0-1	7	1	21	3-1-1	75	14	230
1-1-0	7	1	23	3-1-2	120	30	380
1-1-1	11	3	36	3-2-0	93	15	380
1-2-0	11	3	36	3-2-1	150	30	440
2-0-0	9	1	36	3-2-2	210	35	470
2-0-1	14	3	37	3-3-0	240	36	1300
2-1-0	15	3	44	3-3-1	460	71	2400
2-1-1	20	7	89	3-3-2	1100	150	4800
2-2-0	21	4	47	3-3-3	≥2400	-	-
2-2-1	28	10	150				

ANEXO N° 12

PESADO DE MATERIA PRIMAS



MEZCLA DE LOS COMPONENTES



INCORPORACION DEL PROBIOTICO



Figura N° 20. Fotografías de proceso de elaboración de la bebida probiótica

ANEXO N°13

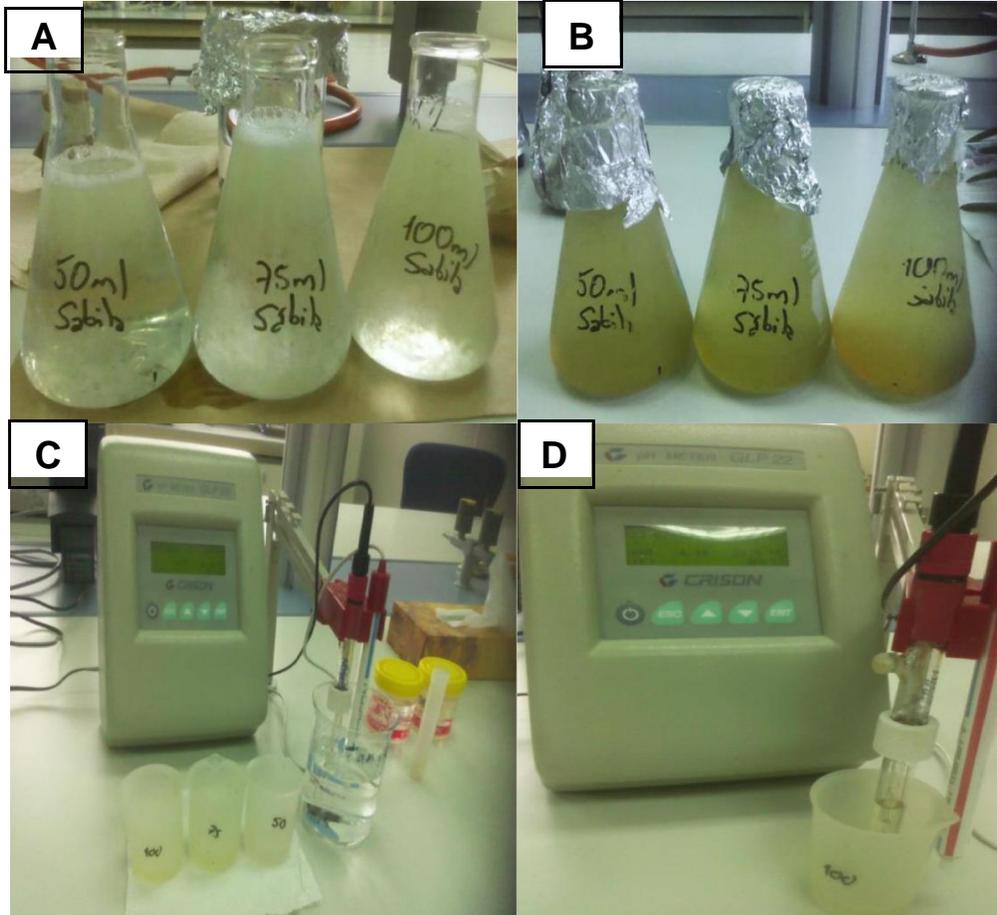


Figura N° 21. Fotografías de medición de pH de las bebidas A. Bebidas sin probiótico, B. Bebidas con probiótico C. Medición de pH, D. Lecturas de pH.

ANEXO N° 14

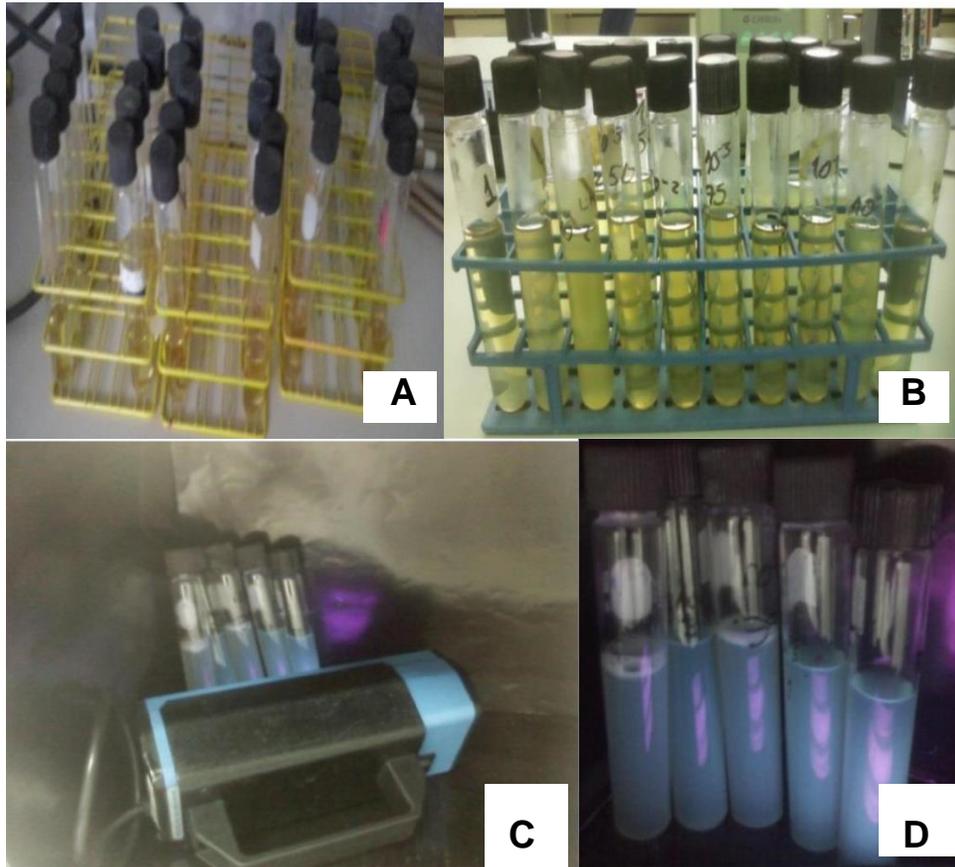


Figura N° 22. Fotografías de determinación de *E. coli* mediante técnica del Numero más probable .A. Tubos con caldo LMX Florocult, B. Tubos inoculados con las bebidas sin probitocos, C y D tubos después del tiempo de incubación visto con lámpara UV.

ANEXO N° 15

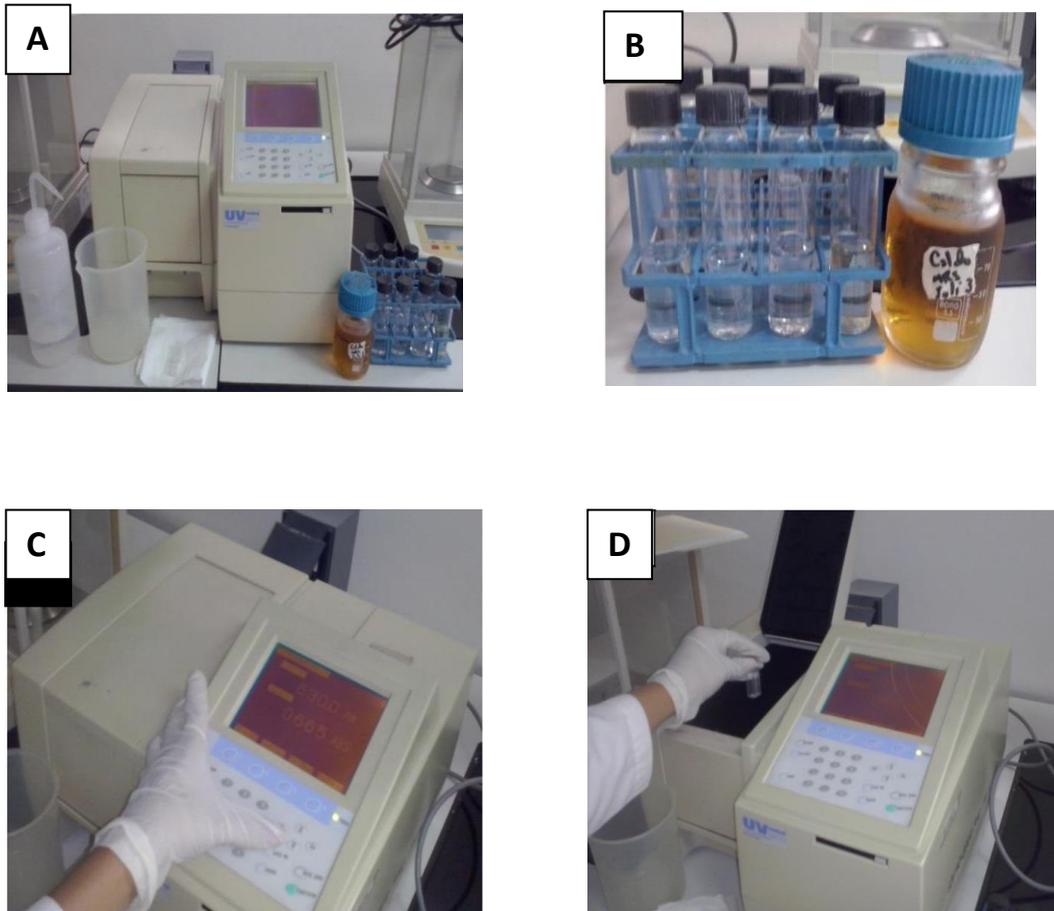


Figura N° 23. Fotografías de estandarización de *Lactobacillus casei shirota*. A. Materiales y equipo, B. Tubo con solución salina estéril y caldo MRS con la cepa probiótica, C y D Estandarización en espectrofotómetro.

ANEXO N° 16



Figura N° 24. Fotografías de estabilidad de microorganismo probióticos *Lactobacillus casei shirota*.

ANEXO N° 17

Resultado de la Estabilidad de microorganismo probiótico en las tres muestras elaboradas.

MUESTRA 1 (Dilución 10^{-7})

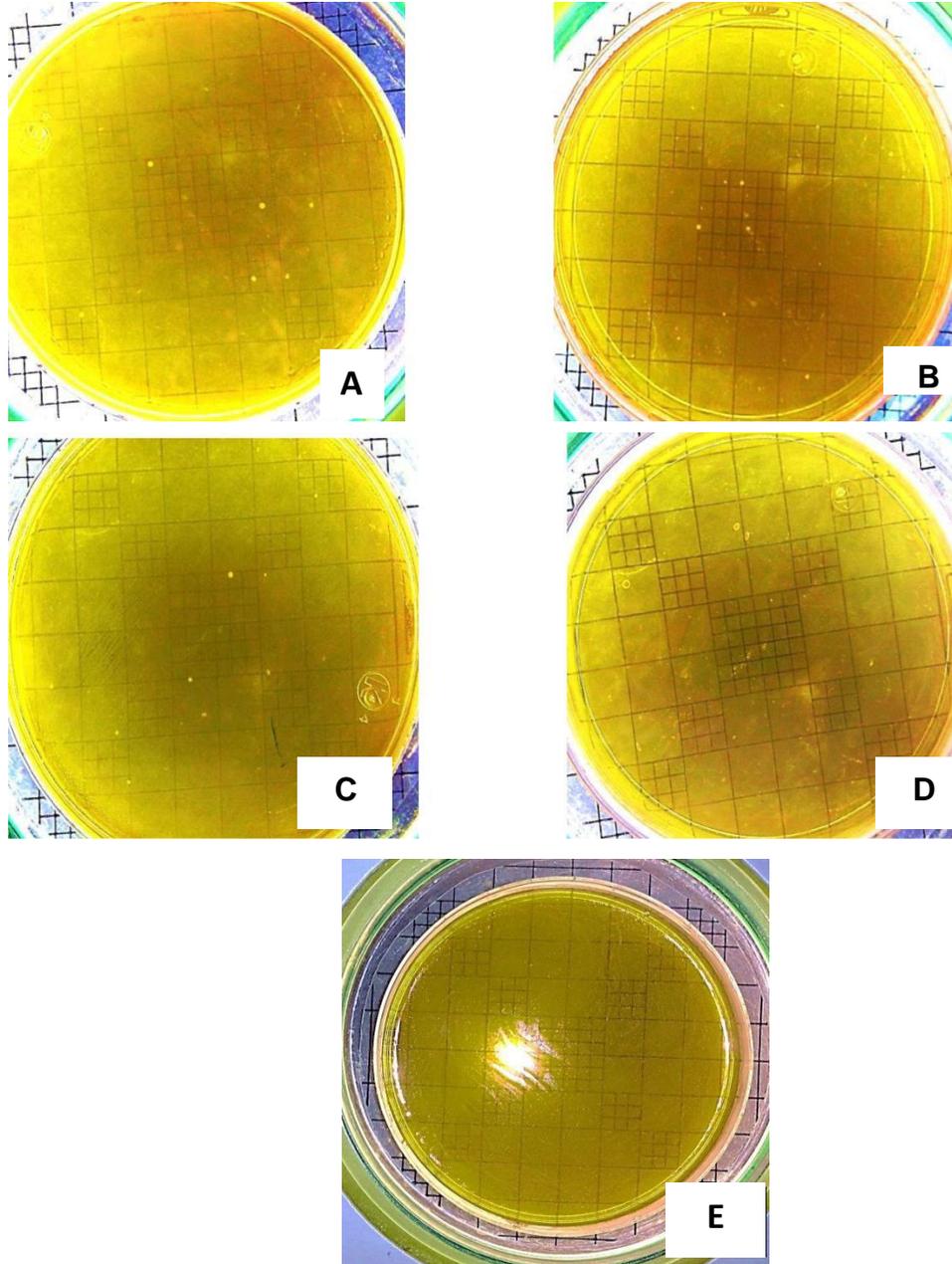


Figura N° 25. Recuento de *Lactobacillus casei shirota* en la Muestra 1 (10% de jugo de Aloe perfoliata var. vera) en la dilución 10^{-7} . A. 1 día, B. 2 días, C. 5 días, D. 8 días, E. 15 días,

MUESTRA 2 (Dilución 10^{-7})

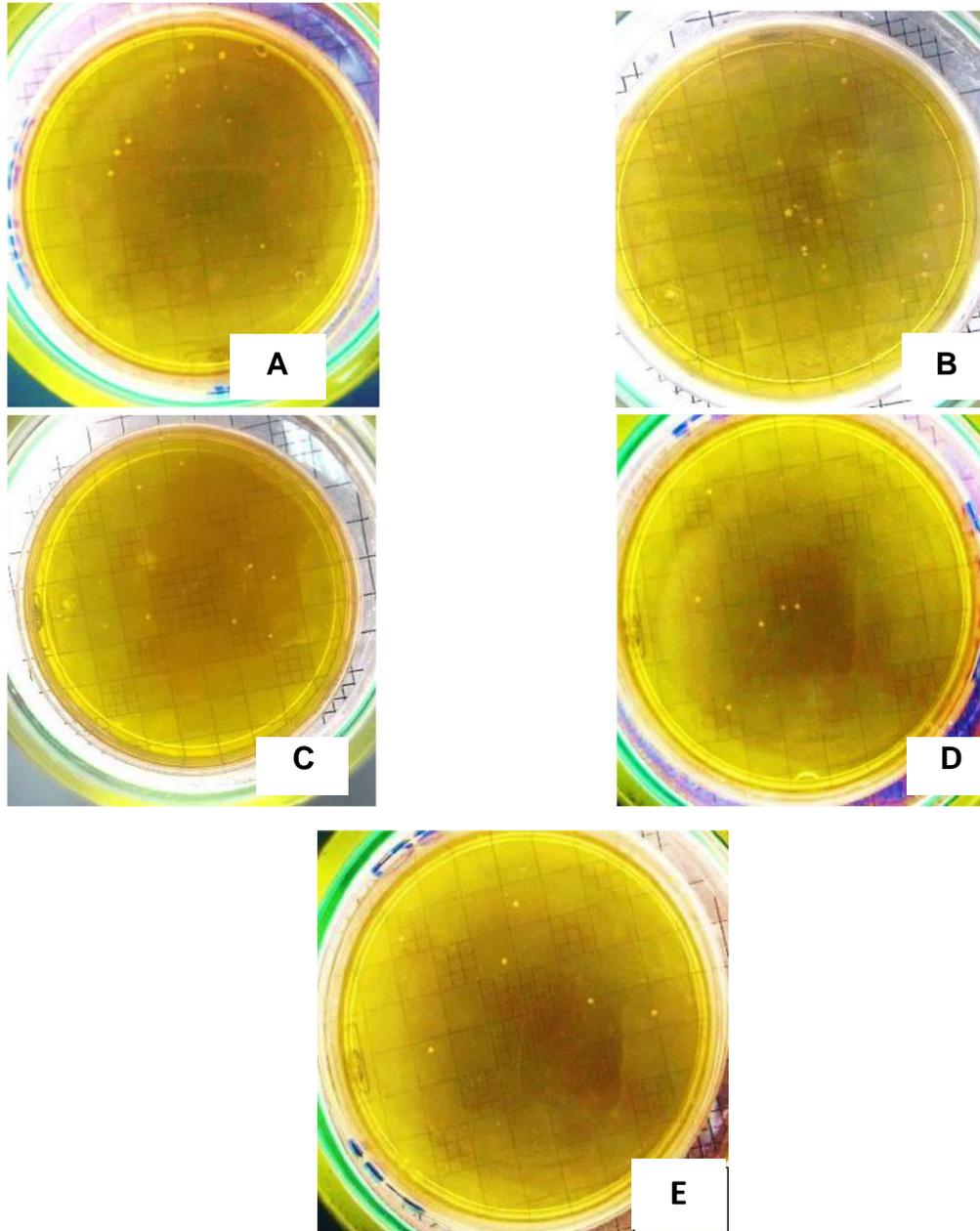


Figura N° 26. Recuento de *Lactobacillus casei shirota* en la muestra 2 (15% de jugo de *Aloe perfoliata* var. vera) en la dilución 10^{-7} . A. 1 día, B. 2 días, C. 5 días, D. 8 días, E. 15 días,

MUESTRA 3 (Dilución 10^{-7})

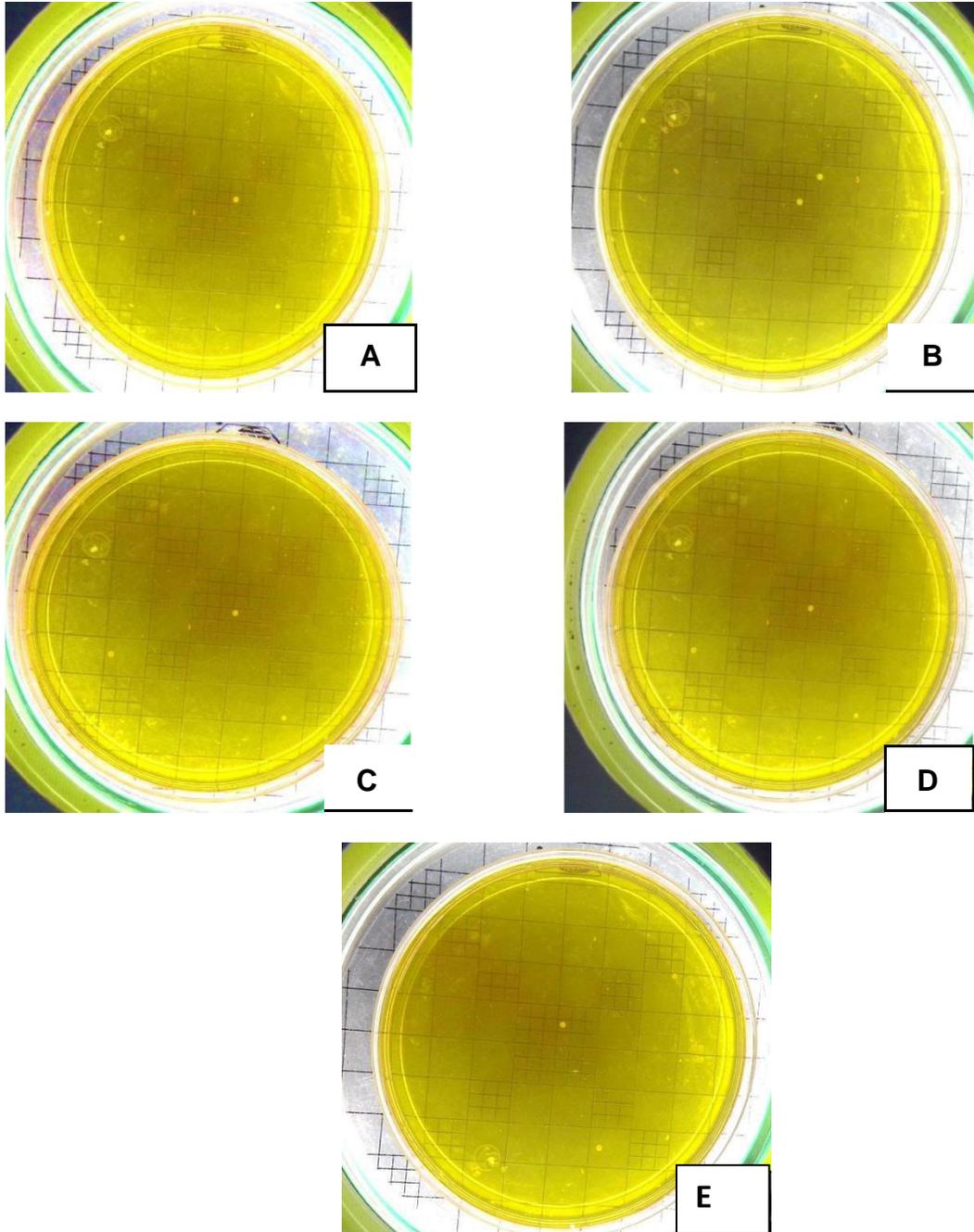


Figura N° 27. Recuento de *Lactobacillus casei* shirota en la muestra 3 (20% de jugo de *Aloe perfoliata* var. vera) en la dilución 10^{-7} .

ANEXO N° 18

Fotografías de equipo utilizado para realizar las diferentes mediciones durante el proceso de elaboración de la bebida.



Figura N° 28. pH-metro. Equipo utilizado para la determinación de pH



Figura N° 29. Refractómetro. Equipo utilizado para la determinación de grados Brix (sólidos solubles).



Figura N° 30. Lámpara de luz UV. Equipo utilizado para la determinación de la presencia de fluorescencia en caldo LMX.



Figura N° 31. Baño maría eléctrico. Equipo utilizado para la pasteurización.



Figura N° 32. Cámara de flujo laminar. Equipo utilizado para la inoculación del *Lactobacillus casei shirota*.



Figura N° 33. Espectrofotómetro. Equipo utilizado para la estandarización del *Lactobacillus casei shirota*.



Figura N° 34. Incubadora.



Figura N° 35. Cuenta colonias.