

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



**COMPROBACION DEL EFECTO PROBIOTICO DE *Bacillus coagulans*
INCORPORADO EN AZUCAR DE DIETA**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

**HARLEN IVETT CAMPOS CAMPOS
WILLIAMS ALEXANDER FLORES ORTIZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA**

DICIEMBRE 2019

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIO

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

**DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION
DIRECTORA GENERAL**

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

**ASESORAS DE AREA EN: CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

DOCENTES ASESORES

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darnos la sabiduría necesaria para culminar nuestros estudios y brindarnos la fortaleza necesaria para realizar nuestro trabajo de graduación. Los autores agradecen a las personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo de graduación en especial a:

Nuestras asesoras: MSc. Coralia de los Ángeles Gonzáles de Díaz y MSc. Cecilia Haydée Gallardo de Velásquez por todos los consejos, ayuda y orientación que nos brindaron durante el desarrollo de nuestra tesis. Gracias por su colaboración, paciencia, disponibilidad y por permitirnos realizar nuestra investigación en el área de Microbiología Aplicada a los Alimentos.

Nuestro jurado calificador: Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez y Licda. Rocío Ruano de Sandoval por darnos sugerencias oportunas para el desarrollo de la investigación, gracias por los comentarios oportunos, el aporte y enriquecimiento del de este trabajo.

A nuestra amiga Fátima Barrera por su apoyo incondicional en las diferentes actividades que llevamos a cabo para poder realizar la parte experimental, por siempre acompañarnos en los momentos de compras de materiales e impresiones de los diferentes documentos.

Harlen Ivett Campos Campos
Williams Alexander Flores Ortiz

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por ser mi guía en cada momento de la vida; por darme la sabiduría y la fortaleza necesaria en los momentos de flaqueza.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional; por enseñarme a esforzarme para alcanzar mis metas.

A mi hermano: Saúl Alexander Campos, por su cariño y palabras de aliento en los momentos difíciles.

A mi abuelita: Maura de Campos, por siempre cuidar de mí a lo largo de mi vida y ayudarme a alcanzar cada una de mis metas.

A mi familia por todas las palabras de ánimo y por todo el apoyo durante cada momento de mi carrera.

A mis compañeros de universidad y amigos especialmente a Fátima Barrera y Cecilia Romero por siempre estar en los momentos difíciles brindado todo su apoyo, consuelo, compañía y por aventurarnos juntos en esta carrera que nos prepara la vida.

A mi compañero de tesis: Williams Alexander Flores, por ser un apoyo en la realización de este trabajo de graduación.

A mis compañeras y amigas de trabajo (Martita, Dino, Norix, Jacqueline, Carmen Elena, Iliana) por siempre estar pendiente y brindar su apoyo y palabras de aliento en los momentos difíciles.

Harlen Ivett Campos Campos

DEDICATORIA

A Dios por darme la sabiduría necesaria para lograr terminar mis estudios, por darme la entrega y fortaleza necesaria para realizar el trabajo de investigación.

A mi madre, Marina Ortiz, que siempre me ha dado todo su amor y comprensión. Por siempre estar conmigo en cada paso que he dado a lo largo de la vida, por siempre apoyarme y darme los mejores consejos. Por desvelarse junto a mí y ayudarme en todo lo que estuvo a su alcance.

A mi padre, William Flores, porque siempre me dio consejos para tratar de ser una mejor persona día a día y orientarme en el camino correcto.

A mi hermana, Mayency Flores, por siempre estar a mi lado apoyándome, guiándome y aconsejándome, porque siempre me da fortaleza para sacar lo mejor de mí y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mis compañeros y amigos de la carrera (Verito, Fátima, Nancy, Isaac, Nery, Erika, Wilfredo y Cecilia) con quienes he compartido gran parte de este recorrido que conlleva esta carrera y todos los buenos momentos que hemos vivido y en especial a mi amiga y compañera de tesis Harlen Campos con quien hemos vivido muchos momentos difíciles pero siempre logramos salir a delante de la mejor manera posible.

Williams Alexander Flores Ortiz

INDICE

RESUMEN

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCION

xix

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS

CAPITULO III

3.0 MARCO TEORICO

24

3.1 Aditivos alimentarios

24

3.1.1 Historia de los aditivos alimentarios

24

3.1.2 Regulación de los aditivos

25

3.1.3 Seguridad de los aditivos y concepto de
Ingesta Diaria Admisible

26

3.1.4 Clasificación de los aditivos

28

3.2 Edulcorantes

29

3.2.1 Tipos de edulcorantes

29

3.3 Sucralosa

31

3.3.1 Beneficios de la Sucralosa

32

3.3.2 Usos de la Sucralosa

33

3.3.3 Aplicaciones de la Sucralosa

33

3.4 Alimentos funcionales

33

3.4.1 Probióticos

34

3.4.1.1 Características de los probióticos

35

3.4.1.2 Dosificación y calidad de los probióticos en
productos

38

3.4.1.3 Mecanismo de acción de los probióticos

39

3.4.1.4 Mejora de la función de la barrera intestinal

40

3.4.1.5 Producción de nutrientes para la función intestinal.	41
3.4.1.6 Efectos inmunomodulatorios.	42
3.4.1.6.1 Competición con bacterias patógenas.	42
3.4.1.7 Aplicaciones de los probióticos	43
3.4.2 Probióticos no pertenecientes al tracto gastrointestinal: formadores de esporas como probióticos.	44
3.4.2.1 El género <i>Bacillus</i> .	44
3.4.2.1.1 Elección del método de análisis.	45
3.4.2.1.2 Tipo de prueba según el tipo de comida	45
3.4.2.2 Aspectos generales para el análisis del género <i>Bacillus</i> .	46
3.4.2.2.1 Tamaño de la muestra	46
3.4.2.2.2 Calentamiento.	46
3.4.2.2.3 Incubación.	47
3.4.2.2.4 Termófilos formadores de esporas.	47
3.4.2.3 <i>Bacillus coagulans</i> .	48
3.4.2.3.1 Taxonomía.	48
3.4.2.3.2 Generalidades.	49
3.4.2.3.3 Glucosa (xilosa) isomerasa	49
3.4.2.3.4 Proceso de manufacturación de espora	50
3.4.2.3.5 Identificación de microorganismos termófilos formadores de esporas ácidas planas.	51
3.5 Fundamento de la identificación fenotípica.	51
3.5.1 Evaluación microscópica.	52
3.5.2 Evaluación macroscópica.	52
3.5.3 Pruebas bioquímicas.	52
3.6 Fundamento de la identificación confirmatoria.	53
3.6.1 Sistemas miniaturizados API®	53

3.6.2	API® 50 CHB/E	53
3.7	Fundamento para la Simulación de tolerancia a jugo gástrico y sales biliares.	54
3.7.1	Simulación de tolerancia a jugos gástricos.	54
3.7.2	Simulación de tolerancia a sales biliares.	55
3.8	Fundamento de determinación de azúcares reductores por espectrofotometría. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	56

CAPITULO IV

4.0	DISEÑO METODOLOGICO	59
4.1	Tipo de estudio	59
4.1.1	Estudio experimental	59
4.1.2	Estudio exploratorio	59
4.2	Investigación bibliográfica.	59
4.3	Investigación de Campo.	60
4.4	Parte experimental	61
4.4.1	Presencia del probiótico en azúcar de dieta.	61
4.4.1.1	Siembra del microorganismo en Agar Tripticasa Soya (TSA).	62
4.4.1.2	Tinción de GRAM.	62
4.4.1.3	Tinción de Wirtz.	63
4.4.2	Identificación de <i>Bacillus coagulans</i> utilizando pruebas bioquímicas.	64
4.4.2.1	Prueba de la catalasa	64
4.4.2.2	Prueba de la oxidasa	64
4.4.3	Identificación de <i>Bacillus coagulans</i> utilizando pruebas API.	64
4.4.3.1	Preparación de galería API	65
4.4.3.2	Preparación del inóculo.	65

4.4.3.3	Procedimiento general de estandarización de McFarland.	65
4.4.3.4	Preparación del microorganismo de prueba para la estandarización por medio de MCFarland	66
4.4.3.5	Inoculación de la galería.	66
4.4.3.6	Incubación de la galería.	66
4.4.3.7	Lectura de la galería.	67
4.4.3.8	Interpretación.	67
4.4.4	Recuento total de <i>Bacillus coagulans</i> presente en la azúcar de dieta.	67
4.5	Evaluación de la resistencia del probiótico <i>Bacillus coagulans</i> a las condiciones gastrointestinales in vitro.	67
4.5.1	Resistencia del <i>Bacillus coagulans</i> a pH ácido y básico.	69
4.5.2	Resistencia del <i>Bacillus coagulans</i> a sales biliares.	70
4.5.3	Resistencia del probiótico a cambios de pH y temperatura en bebidas.	71
4.5.3.1	Resistencia a bebidas calientes.	71
4.5.3.2	Resistencia a bebidas ácidas.	72
4.6	Cuantificación de mg de glucosa que degrada <i>Bacillus coagulans</i> .	72
4.6.1	Estandarización de <i>Bacillus coagulans</i> .	72
4.6.1.1	Siembra del microorganismo en medio glucosado.	73
4.6.2	Cuantificación de glucosa mediante determinación de azúcares reductores por espectrofotometría. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).	73
4.6.2.1	Curva de calibración.	74
4.6.2.2	Tratamiento de las muestras.	74
CAPITULO V		
5.0	RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.	77

5.1 Pruebas de identificación del microorganismo.	77
5.1.1 Aislamiento del microorganismo.	77
5.1.2 Tinción de Gram	78
5.1.3 Tinción de Wirtz	78
5.1.4 Prueba de la catalasa.	79
5.1.5 Prueba de la Oxidasa.	80
5.1.6 Identificación mediante sistema de galerías Analithycal Profile Index (API).	81
5.2 Recuento total del microorganismo presente en la azúcar de dieta	83
5.3 Evaluación de la resistencia del probiótico <i>Bacillus coagulans</i> a las condiciones gastrointestinales in vitro.	87
5.4 Cuantificación de mg de glucosa que es capaz de degradar el microorganismo presente en la azúcar de dieta marca NEVELLA.	89
5.4.1 Preparación de curva de calibración	89
5.4.2 Tratamiento de las muestras.	91
 CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	95
 CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	97
BIBLIOGRAFIA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	N° Pág.
1. Estructura molecular de la sucralosa.	31
2. Mecanismo de acción de los probióticos en mejora de la función de la barrera gastrointestinal.	41
3. Mecanismo de acción de los probióticos para la estimulación de la producción de Inmunoglobulinas A.	42
4. Mecanismo de acción de los probióticos por la competición con bacterias patógenas.	43
5. Lecturas de pruebas API® 50 CHB/E	53
6. Reacción de oxidación de azúcares reductores. Método DNS.	56
7. Morfología macroscópica de las colonias del microorganismo aislado de la azúcar de dieta de la marca NEVELLA.	77
8. Resultado del frotis bacteriano y tinción Gram.	78
9. A: Resultado del frotis bacteriano y tinción de Wirtz. B: tipos de esporas presentes al interior del cuerpo de la bacteria del género Bacillus, 1 espora central, 2 espora Terminal, 3 espora terminal con hinchazón de la célula madre, 4 espora central con hinchazón de célula madre, 5 espora terminal redonda con hinchazón de la célula madre y 6 espora lateral.	79
10. Resultados de la prueba de la catalasa al microorganismo aislado de la muestra de azúcar de dieta.	79
11. Resultados de la prueba de la Oxidasa. Resultado del microorganismo presente en azúcar de dieta versus control positivo (coloración violeta)	80
12. A: Incubación de galería API inoculadas con suspensión de microorganismos antes de incubar. Y el obtenido después de tiempo de incubación de galería API 50 CHB/E	81

13. Resultados obtenidos mediante uso de galería API 20E	82
14. Identificación del microorganismo presente en azúcar de dieta comercial marca NEVELLA mediante sistema de galerías API	83
15. Recuento obtenido en cada una de las muestras de azúcar de dieta.	83
16. Toma de muestras de estándares para la elaboración de la curva de calibración.	90
17. Gráfico de curva de calibración de los estándares de glucosa.	91
18. Toma de muestras para la cuantificación de gramos de glucosa presentes en cada una de las muestras de azúcar	92
19. Gramos de glucosa presente en cada muestra.	93

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° Pág.
1. Tipos de Ingesta Diaria Aceptable (IDA), fijadas por el Comité de Expertos sobre Aditivos Alimentarios de la Junta FAO/OMS, para la clasificación de las sustancias según criterios toxicológicos.	27
2. Índice de dulzor de edulcorantes.	28
3. Microorganismos utilizados como probióticos.	35
4. Asociación de <i>Bacillus</i> con alimentos y su naturaleza de descomposición	46
5. Procedimiento para la detección de la especie <i>Bacillus</i> en alimentos.	48
6. Preparación de curva de calibración de glucosa de estándar.	73
7. Toma de muestra para cuantificación de glucosa.	75
8. Resultado del número de colonias encontradas en las 50 muestras de azúcar de dieta	84
9. Promedio de UFC de cada muestra de azúcar de dieta donde se obtuvo crecimiento de colonias según recuento en placa.	85
10. Resultados obtenidos de porcentajes de las resistencias del microorganismo a las pruebas in vitro Gastrointestinales y de resistencia a bebidas.	88
11. Datos obtenidos en la lectura de los estándares para la elaboración de la curva de calibración.	90
12. Gramos de glucosa presente en cada una de las muestras.	92

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Procedimientos para comprobación de la presencia del probiótico en azúcar de dieta comercial.
2. Procedimientos para la identificación del probiótico presente en azúcar.
3. Procedimiento para el recuento total del probiótico presente en azúcar de dieta.
4. Procedimientos para verificar la resistencia del probiótico presente en azúcar de dieta a las condiciones gastrointestinales in vitro.
5. Procedimientos para determinar la resistencia del probiótico a cambios de pH y temperatura en bebidas acidas y calientes.
6. Procedimientos para cuantificar los mg de glucosa que es capaz de degradar el probiótico presente en azúcar de dieta.
7. Procedimiento para preparar limonada. (Bebida ácida)
8. Monografía de Glucosa isómeras de *Bacillus coagulans*
9. Lectura en API Web del microorganismo presente en la azúcar de dieta.
10. Tabla de valores Z.

RESUMEN

En la presente investigación se trabajó para verificar que un probiótico adicionado a un azúcar de dieta que se comercializa en los diferentes supermercados de San Salvador cumpliera con las condiciones necesarias (sobrevivir al tracto gastrointestinal, tolerancia a bilis) para ser catalogado como probiótico, para esto fue necesario corroborar lo rotulado por el fabricante.

Así mismo determinar la capacidad que tiene el microorganismo, presente en el azúcar de dieta, de funcionar como probiótico mediante estudios de resistencia a condiciones gastrointestinales, como la supervivencia a jugos gástricos (pH3 y pH8) y a sales biliares (0.3%p/v) y resistencia a la adición de diferentes bebidas, dichas bebidas fueron café y limonada. Se realizó la prueba de cuantificación de glucosa por el método del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico para determinar la cantidad de glucosa en sangre que es capaz de degradar el microorganismo mediante un estudio *in vitro*.

En el recuento total de microorganismo se encontró una cantidad inferior de microorganismos a la rotulada por el fabricante (125 millones de UFC/sobre) obteniendo un resultado de 1,400 UFC/sobre, también se encontró que el microorganismo presente difiere con el microorganismo que rotula el fabricante *Bacillus coagulans* obteniendo como resultado la presencia de *Bacillus circulans* que no es el especificado por el fabricante el cual no tiene la capacidad de supervivencia a pHs gástricos ni a sales biliares, tampoco sobrevive al ser adicionado a bebidas ácidas y bebidas calientes no tiene la capacidad de disminuir glucosa en sangre, debido a que en la prueba de cuantificación de glucosa por el método del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico, se determinó que el microorganismo la aumenta.

Se recomienda realizar más lotes de muestras para verificar la viabilidad del probiótico rotulado que se incorpora en el azúcar de dieta para definir posibles causas del hallazgo de este estudio.

Los análisis se realizaron en el periodo de octubre 2018 a febrero 2019, en los laboratorios de Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Una compañía encargada de elaborar endulzantes dietéticos ha desarrollado un endulzante sin calorías o azúcar de dieta el cual rotula el contenido del probiótico *Bacillus coagulans*. Han publicado que el producto es formulado con el probiótico, por lo tanto, cada sobre rotula que contiene 125 millones de UFC de *Bacillus coagulans* y cada cucharadita del producto granulado contiene 62,5 millones de UFC de *Bacillus coagulans*.

De acuerdo con investigaciones internacionales el probiótico *Bacillus coagulans* es capaz de producir la enzima glucosa isomerasa, la cual es capaz de degradar la glucosa; por lo cual se realizaron pruebas para cuantificar la cantidad de glucosa que es capaz de degradar esta enzima mediante la determinación de azúcares reductores por espectrofotometría método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

En El Salvador sólo esta azúcar de dieta rotula la presencia de probióticos, específicamente de *Bacillus coagulans*.

En la presente investigación se comprobó la presencia del probiótico *Bacillus coagulans* en la azúcar de dieta, utilizando 50 muestras del azúcar de dieta, se aisló el microorganismo mediante calentamiento de la muestra a 100 °C para eliminar cualquier célula vegetativa que pudiese estar presente e interferir con la identificación del microorganismo; para identificar el microorganismo se hizo uso de la galería API 50 CH/B y de la galería API 20 E para obtener un perfil completo del microorganismo. También se comprobó la concentración del microorganismo en el producto mediante uso de la Técnica de Recuento en Placa.

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe de ser capaz de resistir a las condiciones de ambiente gastrointestinal por lo cual se realizaron pruebas in vitro de acidez gástrica y de sales biliares, al mismo tiempo se determinó la supervivencia del microorganismo después de ser incorporado en alimentos, comprobando la resistencia a cambios de pH y temperatura en bebidas calientes (limonada y café).

Se determinó que el microorganismo presente en la azúcar de dieta es *Bacillus circulans*; microorganismo que se encuentra presente principalmente en el suelo. El recuento obtenido por cada sobre de azúcar de dieta fue de 1,400 UFC/ sobre.

La resistencia del microorganismo frente a acidez gástrica y sales biliares fue de 0% y 50% respectivamente; en cuanto a resistencia a bebidas con pH ácido y bebidas calientes fue de 0% en ambos casos.

Bacillus circulans no es productor de la enzima glucosa isomerasa la cual es capaz de degradar la glucosa, por la tanto al realizar la prueba de DNS (método del ácido 3,5-dinitrosalicílico) se obtuvo un gráfico con línea ascendente interpretándose como un aumento en los niveles de glucosa con respecto al tiempo, dicho resultado es consistente con la bibliografía consultada que dice que *Bacillus circulans* posee la capacidad de aumentar los niveles de glucosa.

Todas las pruebas fueron realizadas en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador en un periodo comprendido de Octubre de 2018 a Febrero de 2019.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Comprobar el efecto probiótico de *Bacillus coagulans* incorporado en azúcar de dieta.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Aislar el probiótico *Bacillus coagulans* presente en el azúcar de dieta comercial mediante la técnica de calentamiento para eliminar toda célula vegetativa que sea diferente a células del género *Bacillus*
- 2.2.2 Identificar el probiótico *Bacillus coagulans* por medio de descripción de morfología macroscópica, microscópica mediante tinciones Gram y Wirtz y pruebas rápidas confirmativas Analithycal Profile Index (API).
- 2.2.3 Cuantificar la presencia del probiótico *Bacillus coagulans* en la azúcar de dieta comercial mediante técnica de recuento en placa para la verificación del cumplimiento del etiquetado respecto a la cantidad rotulada del probiótico en el producto.
- 2.2.4 Determinar el efecto probiótico del *Bacillus coagulans* en el ambiente gastrointestinal mediante pruebas in vitro de acidez gástrica y sales biliares, así mismo la capacidad de resistencia del probiótico a cambios de pH y temperatura en bebidas acidas y calientes.
- 2.2.5 Calcular la cantidad de glucosa que es capaz de reducir la enzima Glucosa isomerasa producida por el probiótico *Bacillus coagulans* mediante la determinación de azúcares reductores por espectrofotometría Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Aditivos alimentarios

Hoy en día, el concepto de aditivo se refiere a cualquier sustancia que, independientemente de su valor nutricional, se añade intencionadamente a un alimento con fines tecnológicos en cantidades controladas. (16)

En un sentido más amplio tenemos la definición de aditivo según el “Codex alimentarius: “cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento por sí misma ni se usa 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, empaquetado, transporte o almacenamiento provoque o pueda esperarse razonablemente que provoque (directa o indirectamente), el que ella misma o sus subproductos lleguen a ser un complemento del alimento o afecten a sus características.”

Esta definición no incluye “contaminantes” o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales. (28)(12)

3.1.1 Historia de los aditivos alimentarios. (16)

La incorporación de sustancias a los productos alimenticios, aunque de forma accidental, posiblemente tenga sus orígenes en el paleolítico:

La exposición de los alimentos al humo procedente de un fuego favorecía su conservación. Posteriormente, en el Neolítico, cuando el hombre desarrolla la agricultura y la ganadería, se ve obligado a manipular los alimentos con el fin de que resulten más apetecibles o que se conserven mejor.

Con el primer objetivo se utilizaron, entre otros, el azafrán y la cochinilla y con el segundo, se recurrió a la sal y al vinagre.

El empleo de estas y otras muchas sustancias era empírico, pero con los avances experimentados por la química en el siglo XVIII y con las nuevas necesidades de la industria agroalimentaria del siglo XIX, la búsqueda de compuestos para añadir a los alimentos se hace sistemática.

No es hasta finales de este siglo cuando en el lenguaje alimentario se incluye el término “aditivo”.

Y se hace de un modo confuso, ya que bajo esta denominación también se agrupaban diversas sustancias con distintos efectos sobre la salud humana: las especias, los enriquecedores, los coadyuvantes tecnológicos, las impurezas y los contaminantes.

3.1.2 Regulación legal de los aditivos. ⁽¹⁶⁾

El uso generalizado que la industria alimentaria actualmente hace del uso de sustancias obliga a establecer unos mecanismos de control que regulen su correcta utilización y que verifiquen sus resultados. Para que una sustancia sea admitida como aditivo debe estar bien caracterizada químicamente y debe superar los controles toxicológicos establecidos por parte de los correspondientes organismos sanitarios.

Asimismo, ha de demostrarse su necesidad de tal modo que su uso suponga ventajas tecnológicas y beneficios para el consumidor.

Los motivos por los que deberá establecerse dicha necesidad son:

- Conservar la calidad nutritiva de un alimento.
- Proporcionar alimentos con destino a un grupo de consumidores con necesidades dietéticas especiales.

- Aumentar la estabilidad de un alimento o mejorar sus propiedades organolépticas.
- Favorecer los procesos de fabricación, transformación o almacenado de un alimento, siempre que no se enmascare materias primas defectuosas o prácticas de fabricación inadecuadas.

Son varios los organismos con competencias en materia de aditivos alimentarios. Así, la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), creó un conjunto de comités que evalúan diversos aspectos de los aditivos.

3.1.3 Seguridad de los aditivos y concepto de ingesta diaria admisible.

Para regular la incorporación de una sustancia a los alimentos son necesarias unas pruebas que aseguren su inocuidad a las dosis idóneas para su uso. Se puede definir la toxicidad de una sustancia como su capacidad para producir efectos nocivos en un organismo vivo.

Esta toxicidad depende de factores tales como: dosis (cantidad de sustancia absorbida), frecuencia de administración (única o repetida), grado de toxicidad de la sustancia y tiempo para que se manifiesten los efectos. (16)

Los Comités de Expertos en Aditivos FAO/OMS caracterizan el riesgo de un aditivo o contaminante de una de las dos siguientes maneras:

- Por medio de la cuantificación de la dosis en la cual o por debajo de aquella que es juzgada como no tener un riesgo apreciable.
- Por la descripción de las relaciones entre la ingesta y la probabilidad de una respuesta adversa del organismo humano.

El proceso anterior, también denominado de “valoración de seguridad”, es utilizado por el Comité de Expertos cuando se asigna la “Ingesta Diaria Aceptable” (IDA).

A un aditivo alimentario y las ingestas tolerables o admitidas para contaminantes, que debe entenderse como aquel nivel de ingesta (expresada en mg/K de peso corporal) frente al cual no hay una apreciación de riesgo, que son usadas como medida de seguridad de una sustancia a dicho nivel de ingesta. (28)

Para su cálculo se toma la dosis que no haya causado ningún efecto toxicológico en la especie animal más sensible y se reduce mediante un factor de seguridad para aplicarlo al uso humano. Normalmente se admite un factor de seguridad de 100, aunque en algunos casos también puede usarse un factor de 1000. (15)

Tabla N°1. Tipos de Ingesta Diaria Aceptable (IDA), fijadas por el Comité de Expertos sobre Aditivos Alimentarios de la Junta FAO/OMS, para la clasificación de las sustancias según criterios toxicológicos.

IDA	Observaciones sobre la sustancia
No especificada	La toxicidad es tan baja que no representa ningún peligro para la salud.
Temporal	El uso de la sustancia es seguro a corto plazo, pero se necesita más información a largo plazo.
Sin asignar	Cuando no hay datos disponibles o cuando la toxicidad es tal que hace desaconsejable su uso.

El Comité Conjunto de Expertos sobre Aditivos Alimentarios de OMS y la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO), ha establecido la siguiente Ingesta Diaria Admisible. (30)(2)

- Acesulfame de potasio: 15 mg/kg de peso corporal por día
- Aspartame: 40 mg/kg de peso corporal por día

- Ciclamato: 11 mg/kg de peso corporal por día
- Sacarina: 5 mg/kg de peso corporal por día
- Sucralosa: 15 mg/kg de peso corporal por día

Por otra parte, el EFSA (Agencia de Seguridad Alimentaria Europea) ha establecido los siguientes (IDA) ⁽³⁰⁾ ⁽²⁾

- Acesulfame de potasio: 9 mg/kg de peso corporal por día
- Aspartame: 40 mg/kg de peso corporal por día
- Ciclamato: 7 mg/kg de peso corporal por día
- Sacarina: 5 mg/kg de peso corporal por día
- Sucralosa: 15 mg/kg de peso corporal por día.

Tabla N°2. Índice de dulzor de edulcorantes. ⁽²⁾

Sustancia	Dulzor	Sabor	Disolución	Termoestabilidad
Sacarina	300	Amargo	Rápida	Termoestable
Ciclamato	50	Metálico	Rápida	Termoestable
Aspartame	180	Sui generis	Lenta	Termolábil
Acesulfame	200	Muy amargo	Rápida	Termoestable
Sucralosa	600	Indetectable	Lenta	Termoestable

3.1.4 Clasificación de los aditivos.

Dentro de la clasificación de los aditivos encontramos:

- Colorantes
- Conservantes
- Antioxidantes
- Gelificantes, Espesantes y Estabilizantes
- Potenciadores del sabor

- Edulcorantes
- Aromatizantes

3.2 Edulcorantes. (7)

La historia del uso del azúcar demuestra que el hombre, desde tiempos ancestrales, ha tenido una marcada preferencia hacia los alimentos dulces.

En el siglo IV D.C. el hombre solía ingerir alimentos azucarados, a fines del siglo XVII D.C. una nueva idea se apoderó de la comunidad médica, se decía que el azúcar era causante del escorbuto y como resultado, surgieron diversas organizaciones que estaban en contra de su consumo debido a los efectos que producía en el cuerpo humano y al mismo tiempo querían que su consumo fuera prohibido. Ante estas situaciones surgió la necesidad de buscar un aditivo que pudiera sustituir el azúcar de los alimentos, proporcionado de las mismas cualidades y sensaciones que producía el azúcar. "Es así como nacen los edulcorantes, aditivos alimentarios que son capaces de simular la presencia del azúcar en los alimentos".

Estos compuestos son universalmente consumidos debido a las respuestas positivas que ejercen en los humanos, no solo en cuanto al sabor, sino a las sensaciones que son capaces de producir.

Un sustituto del azúcar o edulcorante es un aditivo para los alimentos que tiene mayor efecto en el dulzor que del azúcar, pero que usualmente tiene menos energía. (30)

6.2.1 Tipos de edulcorantes

Existen dos categorías básicas de edulcorantes: los nutritivos y los no nutritivos, con relación a su aporte energético. (30)(9)

– **Edulcorantes nutritivos:**

Son aquellos que al consumirse producen 4 kilocalorías por gramo. Dentro de este grupo se encuentran la sacarosa o azúcar, la glucosa, la fructosa, la miel, los polialcoholes como el sorbitol, manitol y el xilitol. Los polialcoholes aportan 2.4 kcal por gramo.

– **Edulcorantes no nutritivos:**

Son sustancias que endulzan pero que no aportan kilocalorías, o por la poca cantidad que se utiliza el aporte calórico es mínimo. Se destacan por su sabor intensamente dulce. Dentro de este grupo encontramos Sacarina, aspartame, ciclamato, sucralosa, manitol, acesulfamo-K, neohesperidina.

Algunos edulcorantes no nutritivos tienen límite máximo de uso en determinados alimentos, como por ejemplo en alimentos con valor energético reducido o en bebidas reducidas en calorías. Pero también se los puede clasificar en naturales o artificiales en función de su procedencia. (1)

– **Edulcorantes naturales o calóricos:**

Son aquellos que provienen de los alimentos o de otras sustancias de la naturaleza.

– **Edulcorantes artificiales o no calóricos:**

Son sustancias que tienen un alto poder edulcorante, aunque no aportan calorías. Suelen combinarse dos tipos de edulcorantes diferentes, ello hace que aumente su poder endulzante.

3.3 Sucralosa

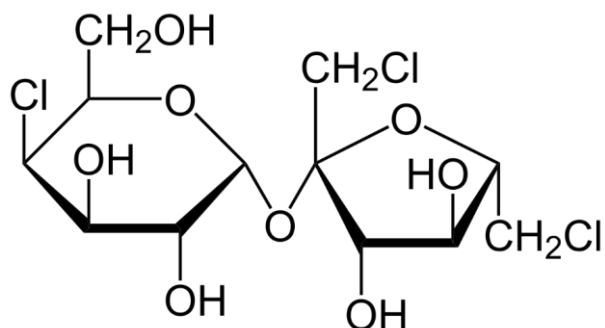


Figura N°1 Estructura molecular de la sucralosa.

Es el nombre corriente para un nuevo edulcorante de alta intensidad derivado del azúcar común. Fue descubierta en 1976 y es conocida como Splenda (R). En la Unión Europea es también conocido bajo el código de aditivo E955. Es 600 veces más dulce que el azúcar, casi el doble de la sacarina y cuatro veces más dulce que el Aspartame. (30) (7)

Se fabrica por halogenación selectiva del azúcar, donde los tres grupos hidroxilos de la sacarosa se reemplazan por Cloro dando 1,6-dicloro-1,6-dideoxi-β-Dfructofurasonil-4-deoxi-α-D-galactopiranosido o (C₁₂H₁₉Cl₃O₈), obtenido por la halogenación selectiva de la molécula de sacarosa. (30) (7) (9)

A diferencia del Aspartame es termoestable y resiste variedad de pH, por esta razón es utilizado por productos de larga vida, es muy soluble en agua y estable bajo condiciones normales de proceso y almacenamiento de bebidas de fantasía. Es pobremente absorbida a través del tracto gastrointestinal, más de cien estudios científicos aseguran que puede ser consumida por cualquier persona, no se transforma en el organismo; es no calórico. Además, en 1990 fue aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de Estados Unidos (30) (7) (9)

3.3.1 Beneficios de la sucralosa.

La sucralosa posee una alta calidad de dulzura, buena solubilidad en agua y excelente estabilidad en una amplia gama de alimentos procesados y bebidas. En combinación con otros edulcorantes de dieta tiene un efecto edulcorante sinérgico. Con el azúcar, la sucralosa se hidroliza en solución, pero sólo a lo largo de un extendido lapso bajo condiciones extremas de acidez y temperatura. No provoca caries dentales. (30)

3.3.2 Usos de la sucralosa. (7)

La Sucralosa es el único edulcorante de bajas calorías que se fabrica a partir del azúcar y se utiliza en su reemplazo para bebidas dietéticas, la molécula de sucralosa tiene la particularidad de ser inerte y de pasar por el cuerpo sin alterarse ni metabolizarse y es eliminada después de consumida.

Más de cien estudios realizados en 18 años demuestran su seguridad y presentan los siguientes beneficios:

- No es toxica
- No causa cambios genéticos
- No afecta la reproducción masculina o femenina
- No causa defectos congénitos
- No afecta el sistema nervioso central
- No afecta la secreción normal de insulina ni el metabolismo de los hidratos de carbono en personas con diabetes.
- Se absorbe en pequeñas cantidades y se excreta rápidamente sin causar efectos secundarios gastrointestinales indeseables.
- No fomenta el desarrollo de caries dentales.
- No se hidroliza ni pierde moléculas de cloro durante el metabolismo.

3.3.3 Aplicaciones de la sucralosa. (30)

La sucralosa puede ser usada en una amplia gama de productos:

- Edulcorantes de mesa
- Frutas procesadas
- Bebidas carbonatadas
- Bebidas no carbonatadas
- Goma de mascar
- Productos horneados
- Productos de mezcla seca
- Untables de fruta
- Productos lácteos
- Postres congelados
- Aderezos para ensaladas

3.4 Alimentos funcionales. (19)

Son productos nutritivos y no nutritivos que, no sólo alimentan, sino que actúan sobre determinadas funciones del organismo, producen un efecto beneficioso nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de algunas enfermedades.

En diversas investigaciones, se ha visto que la adición de probióticos a los alimentos genera beneficios en la salud, entre otros, mejora las funciones gastrointestinales, fortalece el sistema inmunológico y disminuye el riesgo del cáncer de colon.

3.4.1 Probióticos. (19) (4)

El término probiótico, como tal, fue empleado por primera vez por Vergio en 1954, cuando comparaba los efectos adversos que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal, con las acciones beneficiosas ejercidas por otros factores que no pudo determinar. Una década más tarde, Lilly y Stillwell se referían a los probióticos como microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Fuller redefinió a los probióticos como “aquellos suplementos alimenticios integrados por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al hospedador que los consume mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal”. (4)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define los probióticos como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud en el huésped.” Los tipos más comunes de estas bacterias beneficiosas son los lactobacilos y las bifidobacterias.

La palabra probiótico significa en pro de la vida. Son cultivos activos (tales como las bacterias lácticas y las sustancias) que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal, para restituir la población del medio interno y proteger la integridad intestinal, debido a que son capaces de sobrevivir la digestión llegando vivas al colon.

Los probióticos proporcionan muchos beneficios, sobre la microbiota intestinal y las funciones inmunitarias; también intervienen en la mejora de las funciones respiratorias y en el balance microbiológico. Es decir, desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades, por lo que alimentos adicionados con estos probióticos deben formar parte de la dieta diaria de personas sanas.

Se ha comprobado que los probióticos contribuyen a disminuir la concentración de sustancias potencialmente cancerígenas, del intestino.

En el mercado podemos encontrar diferentes productos que contienen probióticos en su composición: especialidades farmacéuticas (medicamentos), complementos alimenticios, soluciones de rehidratación oral, fórmulas de continuación, alimentos. Muchos de ellos no presentan una única cepa, sino que son combinaciones de varias especies de microorganismos, en ocasiones asociadas también con vitaminas, sustancias prebióticas, etc. (27)

Las principales especies de probióticos que se integran en alimentos (ver Tabla N°3) son bacterias capaces de producir ácido láctico y que pertenecen a dos géneros principalmente: *Lactobacillus*, utilizados en la fermentación de alimentos y *Bifidobacterium*, gérmenes anaerobios estrictos. También se emplean microorganismos no bacterianos, como *Saccharomyces boulardii* (levadura no patógena), y bacterias no patógenas como *Streptococcus thermophilus* y *Escherichia coli* nissle 1917. (27)

Tabla N°3: Microorganismos utilizados como probióticos.

Lactobacillus spp.	Bifidobacterium spp.	Bacteria ácido láctica	Bacteria no ácido láctica
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	

Si bien es cierto que el principal sector asociado al uso de probióticos sigue siendo el de los productos lácteos, especialmente yogur, los progresos de la microbiología y de la tecnología de alimentos (y en particular de los procesos de microencapsulación), están permitiendo la incorporación de estos microorganismos a productos tan variados como jugos, helados, cereales, barras nutritivas, soya, queso, mantequilla, leche en polvo, mayonesa, chocolate y galletas. (27)

Los factores que deben ser abordados en la evaluación de la eficacia de la incorporación de las cepas probióticas en este tipo de productos son, además de la seguridad, la compatibilidad del producto con el microorganismo y el mantenimiento de su viabilidad a través de la elaboración de alimentos, embalaje, y las condiciones de almacenamiento. El pH del producto, por ejemplo, es un factor significativo para determinar la supervivencia y el crecimiento del probiótico incorporado, y esta es una de las razones por las que los quesos blandos parecen tener un número de ventajas sobre el yogur como sistemas de liberación para los probióticos viables al tracto gastrointestinal. (27)

3.4.1.1 Características de los probióticos. (27) (4)

Para que un microorganismo pueda considerarse como probiótico debe cumplir con una serie de características de seguridad, funcionales y tecnológicas:

1. Requerimientos de seguridad que una cepa debe cumplir durante el proceso de selección de un probiótico:

- Las cepas para uso humano deben de ser preferentemente de origen humano, ya que, en teoría, las cepas aisladas de seres humanos sanos presentan una mayor facilidad para colonizar el intestino humano, y probablemente, no sean

patógenas. Para referirse a esta característica, es muy utilizado el acrónimo en inglés “Generally Recognized As Safe” (GRAS) o sustancias seguras

- No obstante, se han utilizado probióticos de origen no humano, como *Saccharomyces cerevisiae*, demostrándose su seguridad tras el consumo regular por el hombre.
- No patógenos ni tóxicos
- No portar genes transmisibles de resistencia a antibióticos.

2. Características funcionales que es conveniente que presente el probiótico:

- Sobrevivir a las condiciones del ambiente gastrointestinal, ya que, si los microorganismos probióticos han de llegar viables al intestino, es preciso que resista el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares.
- Adherencia a las superficies epiteliales y persistencia en el tracto gastrointestinal, ya que, si los microorganismos probióticos han de llegar viables al intestino, es preciso que resista el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares.
- Inmunoestimulación, pero sin efecto proinflamatorio.
- Actividad antagonista contra patógenos.
- Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas.

3. Aspectos tecnológicos a considerar del probiótico

- Contener un número adecuado de cepas viables que conduzcan al efecto beneficioso demostrado. La dosis necesaria de probióticos varía mucho dependiendo de la cepa y el producto. Si bien muchos productos de venta libre administran un rango de 1–10 miles de millones de ufc por dosis, algunos

productos han demostrado ser eficaces a niveles inferiores, mientras que otros requieren muchísimas más. (23)

- Resistencia a fagos.
- Viabilidad durante el procesado.
- Estabilidad en el producto y durante el almacenamiento.
- Evidencia científica: estudios controlados de eficacia en seres humanos.
- Almacenamiento: sustancias de vehículo o relleno que no afecten a la viabilidad de la cepa.
- Nomenclatura específica: una cepa probiótica se identifica por su género, especie, y una designación alfa numérica. La comunidad científica ha acordado una nomenclatura para los microorganismos, por ejemplo, *Lactobacillus casei* DN-114 001 o *Lactobacillus rhamnosus* GG. La comercialización y los nombres comerciales no están regulados, y las compañías pueden ponerle el nombre que quieran a sus productos probióticos, por ejemplo, LGG.
- Etiqueta adjunta: donde especifique estas características de forma clara y veraz.

Los productos que contienen probióticos han tenido un enorme éxito en Europa, Asia, y más recientemente, en otras regiones del mundo. Este éxito en la comercialización promueve el consumo, el desarrollo de nuevos productos y la investigación.

3.4.1.2 Dosificación y calidad de los probióticos en productos. (23)

Las formas más comunes en que se presentan los probióticos son productos lácteos y alimentos fortificados con probióticos. Sin embargo, también hay comprimidos, cápsulas, y sachets que contienen las bacterias liofilizadas.

La dosis necesaria de probióticos varía mucho dependiendo de la cepa y el producto. Si bien muchos productos de venta libre administran un rango de 1–10 miles de millones de ufc por dosis, algunos productos han demostrado ser eficaces a niveles inferiores, mientras que otros requieren muchísimas más.

Por ejemplo, *Bifidobacterium infantis* 35624 mostró su eficacia en aliviar los síntomas de SII (Síndrome de Intestino Irritable) a dosis de 100 mil millones de ufc/día, mientras que los estudios con VSL#3 (mezcla de una cepa de *Streptococcus thermophilus*, cuatro *Lactobacillus spp.*, y tres cepas *Bifidobacterium spp.*) utilizaron sachets con 300–450 miles de millones ufc tres veces por día; por lo cual no es posible establecer una dosis general necesaria para probióticos; la dosificación debe basarse en estudios en humanos que muestren un beneficio a la salud.

Si bien hay un consenso científico, no existe una definición legal del término “probiótico.” Los criterios mínimos que se debe cumplir para los productos probióticos son que los probióticos deben:

- Especificarse por género y cepa la investigación sobre determinadas cepas específicas de probióticos no se puede aplicar a cualquier producto comercializado como probiótico.
- Estar vivos en el producto.
- Administrarse en dosis adecuadas hasta el final de la vida útil (con variabilidad mínima de un lote a otro).
- Haber demostrado ser eficaces en estudios controlados en humanos.
- Ser inocuos para el uso para el que estarían destinados.

3.4.1.3 Mecanismo de acción de los probióticos

El estudio de los mecanismos de acción que permitan explicar los posibles efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud es uno de los aspectos más

dinámicos en la investigación sobre estos microorganismos. Sin embargo, debe subrayarse el carácter multifactorial de estos mecanismos de acción ya que no todos los probióticos emplean los mismos mecanismos para ejercer un beneficio en el hospedador, lo que acentúa la importancia de documentar científicamente los beneficios que se propongan para cada cepa probiótica. (21)

Los probióticos pueden actuar en el huésped a distintos niveles:

- El lumen intestinal, mediante interacción con la microbiota intestinal o ejerciendo un efecto metabólico directo.
- La mucosa y el epitelio intestinales, incluyendo los efectos de barrera, los procesos digestivos y el sistema inmunológico asociado a la mucosa.
- Otros órganos como el sistema inmune sistémico y el cerebro.

Los mecanismos que se conocen son los siguientes: (4)

3.4.1.4 Mejora de la función de la barrera intestinal. (23) (27)

El tracto gastrointestinal, cuenta con diferentes mecanismos que impiden la inserción de compuestos o agentes potencialmente lesivos, dentro de ellos se encuentra la formación de una barrera física por la unión estrecha entre los enterocitos y la formación de moco; otro mecanismo, consiste en la producción de Inmunoglobulinas “A”, que son capaces de bloquear la unión de microorganismos patógenos al epitelio intestinal, y forman también grandes aglomerados de virus y bacterias que son atrapadas en el moco intestinal.

Las bacterias probióticas, se unen al epitelio intestinal y forman una barrera con la que impiden la unión de microorganismos patógenos (ver figura N°2) y compiten con ellos por los sitios de unión, así como por los sustratos disponibles,

por lo tanto, favorece la eliminación de los patógenos en las excreciones y evitando su replicación.

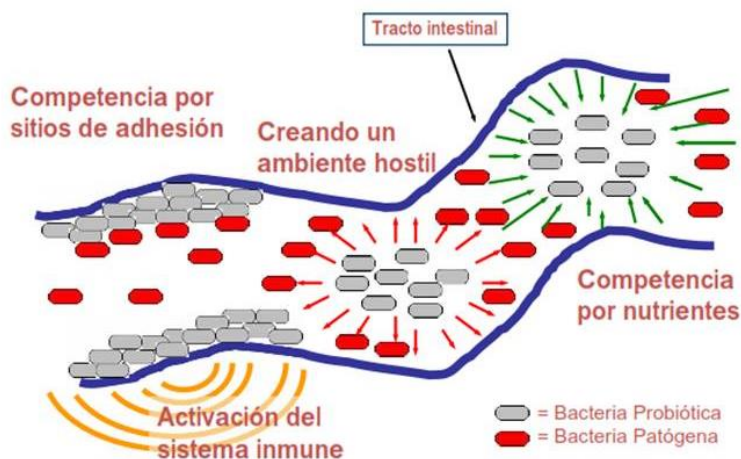


Figura N°2. Mecanismo de acción de los probióticos en mejora de la función de La barrera gastrointestinal.

3.4.1.5 Producción de nutrientes para la función intestinal. (23) (27)

Los ácidos grasos de cadena corta principalmente el acetato, propionato y butirato, generados principalmente en el intestino grueso, son productos de la fermentación realizada por las bacterias de la flora bacteriana comensal de los carbohidratos ingeridos en la dieta humana, que no son digeridos en el intestino delgado.

Estos productos son la principal fuente de energía de los colonocitos además, poseen efectos tróficos sobre el epitelio intestinal, que ayudan a la recuperación de la integridad del epitelio en casos de alteraciones de la función de barrera, como es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal.

Un ejemplo concreto de este tipo de mecanismo es la producción de transglutaminasas por acción del butirato. Dichas enzimas tienen un papel fundamental en la restauración de la mucosa dañada.

3.4.1.6 Efectos inmunomoduladores. (23) (27)

Se ha propuesto que los probióticos tienen un efecto inmunomodulador al actuar sobre el Tejido Linfoide Asociado al Intestino (GALT); y aunque, se desconoce cómo actúan específicamente, se sugiere que estimulan la producción de Inmunoglobulinas “A” y la activación de las células “K” (ver figura N°3).

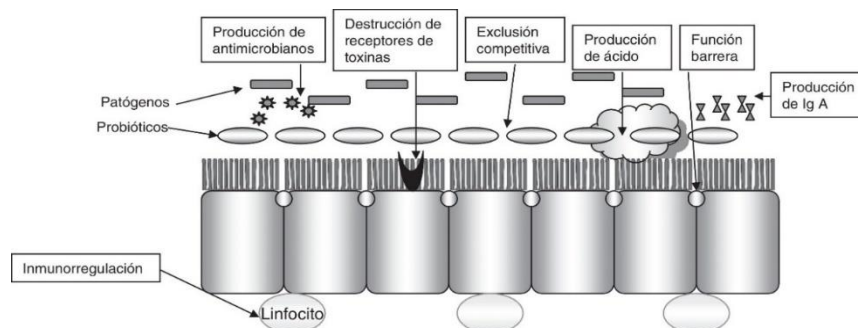


Figura N°3. Mecanismo de acción de los probióticos para la estimulación de la producción de Inmunoglobulinas A.

También, se ha propuesto la capacidad que tienen los probióticos en la actividad fagocítica de los linfocitos intestinales y promover la proliferación de linfocitos tipo “B”.

3.4.1.6.1 Competición con bacterias patógenas. (23) (27)

Uno de los mecanismos de acción implica la disminución del pH del lumen intestinal por la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, como el lactato, butirato, acetato y propionato, que son resultado del metabolismo bacteriano que

se origina de la fermentación de los azúcares consumidos en la dieta humana y que no son digeridos en el intestino delgado, azúcares mejor conocidos como fibra dietética.

Sin embargo, el mecanismo principal con el cual disminuyen la colonización de las bacterias patógenas (ver figura N°4), es por la producción de bacteriocinas, que son sustancias producidas durante la fase estacionaria del crecimiento microbiano y que son responsables de inhibir el crecimiento de otras bacterias que compiten por el sitio de unión al intestino.

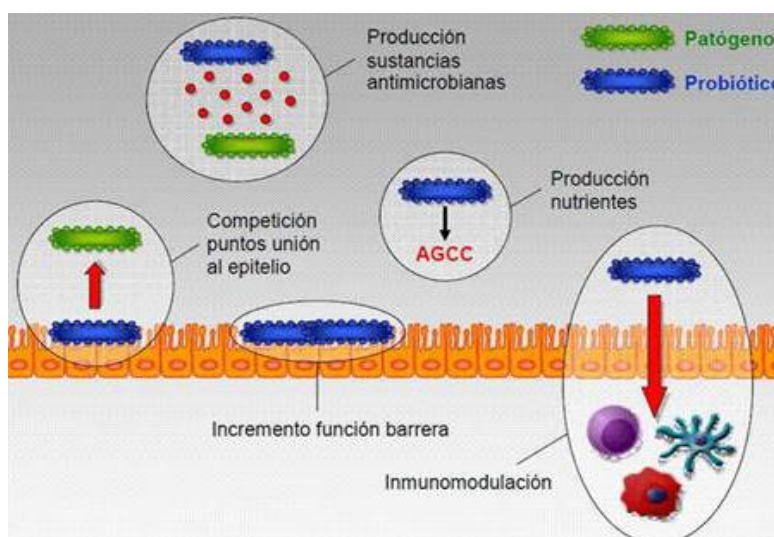


Figura N°4. Mecanismo de acción de los probióticos por la competición con bacterias patógenas.

3.4.1.7 Aplicaciones de los probióticos.

El efecto beneficioso para la salud es dependiente de las cepas administradas, dosis-dependiente, forma de administración y características inherentes al huésped. (5) A continuación, se resume la visión actual de las aplicaciones clínicas para diversos probióticos o prebióticos. (22)

– Enfermedad cardiovascular:

- Cáncer de colon
- Tratamiento y prevención de la diarrea
- Erradicación de *Helicobacter pylori*
- Alergias
- Respuesta inmunológica.
- Enfermedad Intestinal Inflamatoria (EII)
- Síndrome de Intestino Irritable (SII)

3.4.2 Probióticos no pertenecientes al tracto gastrointestinal: formadores de esporas como probióticos. ⁽⁴⁾

Previamente se mencionó que idealmente una bacteria probiótica, debe ser parte de la flora normal del intestino humano, ya que, al ingerirse la colonización del intestino es mucho más fácil y descarta posibles interacciones perjudiciales con el huésped. Sin embargo, un acercamiento más pragmático del concepto de probiótico reconoce que la actividad probiótica deriva la acción que realiza la bacteria en diferentes sitios (incluyendo sitios no intestinales como la boca, el estómago o el tracto vaginal) y una variedad de mecanismos, algunos de los cuáles no requieren de los atributos de la flora nativa, como lo es la habilidad de adherirse a las células epiteliales o la colonización del tracto gastrointestinal. Dentro de estos probióticos no pertenecientes al tracto gastrointestinal, tenemos a las bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus*.

3.4.2.1 El género *Bacillus*.

El género *Bacillus* a través de la historia de las bacterias, ha sido considerado como un grupo bastante heterogéneo de bacterias Gram-positivas productoras de catalasa. Con la llegada de la taxonomía molecular ha resultado que el género se vuelva menos heterogéneo a medida que las especies se han trasladado a

nuevos géneros. Las especies de interés para los microbiólogos de alimentos son ahora encontradas en varios géneros y en más de una familia. (16)

Los *Bacillus* son detectados fácilmente utilizando una amplia gama de medios. Las especies que mayor probabilidad tienen de ser encontradas en alimentos generalmente tienen un requerimiento nutricional simple y pueden crecer en medios como un agar nutritivo. Todas las especies crecen aeróbicamente y algunos son anaerobios facultativos. La morfología de las colonias a menudo es distintiva, con una considerable variación observada. (16)

3.4.2.1.1 Elección del método de análisis. (16)

El método de análisis puede ser seleccionado de acuerdo al propósito de la investigación, el tipo de alimento que será examinado, la forma del organismo (espora o células vegetativas) y el nivel de sensibilidad requerida.

En cuanto al propósito de la investigación, la prueba puede ser dirigida para determinar causas de deterioro de alimentos, en este caso la prueba seleccionada debe ser capaz de detectar un amplio rango de microorganismos.

La prueba puede estar dirigida a la búsqueda de un microorganismo específico como un patógeno, en el cual se deberán utilizar medios de cultivo selectivos y diferenciales. Los métodos más realizados para *Bacillus* son pruebas para microorganismos mesófilos aerobios formadores de esporas y microorganismos termófilos anaerobios formadores de esporas.

3.4.2.1.2 Tipo de prueba según el tipo de comida.

El tipo de comida, el empaque y las condiciones de almacenamiento pueden ayudar a seleccionar el método de análisis adecuado. Productos secos, en los

que interfiere el pH e incluso los productos enlatados pueden ser afectados por los *Bacillus*.

Tabla N°4. Asociación de *Bacillus* con alimentos y su naturaleza de descomposición.

Especies/ grupo funcional.	Alimentos
<i>Bacillus cereus</i>	Cereales, productos lácteos, especias, legumbres y alimentos asociados a enfermedades características.
Mesofílicos aerobios formadores de esporas	Harinas, pan, ingredientes relacionados con panadería, almidón, frutos secos, vegetales, leche en polvo, especias, cereales y productos enlatados de pH bajo (pH>4.6)
Esporas anaerobias termofílicas	Azúcar, almidón, harina y especias.

3.4.2.2 Aspectos generales para el análisis del género *Bacillus*. (20)

3.4.2.2.1 Tamaño de la muestra.

Se toma un mínimo de 10 g en un intento de asegurar que la muestra sea representativa, sin embargo, algunos autores sugieren que para asegurar que una muestra sea representativa se debe probar una muestra superior a los 50g. La cantidad de muestra que debe inocularse en el medio debe ser de 1 g de producto, deben realizarse diluciones cuando se espera un número grande de microorganismos en el alimento.

3.4.2.2.2 Calentamiento. (18)

Las muestras que son examinadas para la presencia de esporas son calentadas para destruir organismos vegetativos y así promover la germinación de esporas. Generalmente es aceptado que a 80 °C por 10 minutos es suficiente para

inactivar las células vegetativas. La geminación de esporas es necesaria para obtener un adecuado conteo de esporas.

Algunas esporas son más resistentes al calor que otras lo que genera que el calentamiento sea más selectivo. Cuando la muestra es sometida a calor, muchos factores hay que tomar en cuenta, como que las esporas pueden germinar de manera muy rápida, por lo que se recomienda que el proceso de preparación de la primera dilución y el calentamiento dure menos de 10 minutos a la menor temperatura posible.

Algunos métodos sugieren que la muestra sea adicionada al agar antes de someter a calentamiento, en estos casos el agar se debe mantener alrededor de los 50 °C antes de adicionar la muestra, una vez adicionada la muestra el agar es calentado rápidamente. Después de haber calentado el tiempo requerido, el agar es enfriado tan rápido como sea posible, teniendo el cuidado de no provocar que el agar gelifique.

3.4.2.2.3 Incubación. (18)

Una temperatura de 30-37°C es utilizada para mesófilas y de 50-55°C para termófilas. Cuando se incuba a altas temperaturas las placas deben ser selladas en bolsas de plástico o en contenedores con agua para que el contenido de las placas no se deshidrate. Es habitual examinar las placas durante el período de incubación requerido, para garantizar que las placas no se cubran de colonias grandes o dispersas y que las reacciones ácidas no vuelvan alcalinas mediante la incubación continua.

3.4.2.2.4 Termofílicos formadores de esporas.

El método para azúcar permite que sea tanto para productos sólidos como líquidos, si el producto es sólido se pesan 20 g de azúcar seca (ver Tabla N°5).

Luego se calienta a 100 °C, 2 mL de la solución de azúcar calentada se agrega a cada una de las cinco placas de Petri antes de agregar el medio agar MRS. (18)

Las colonias típicas están alrededor de 1 a 5 mm de diámetro, con una mancha opaca en el centro y un halo amarillo en el agar (puede que presente o no este halo). Se obtienen colonias con superficies compactas que puede localizar en tamaño.

Tabla N°5. Cuadro resumen del procedimiento para la detección de la especie *Bacillus* en alimentos.

	Muestra	Dilución	Calentamiento	Plaqueo	Incubación
Esporas Mesófilicas	50 g de alimento	Dilución 10 ⁻¹ en agua peptonada al 0.1%	80 °C por 30 minutos	5 Placas	35°C, 48h
Esporas termófilicas	20 g de azúcar	Agua a 100 mL	100 °C por 5 minutos	2 mL en cada 5 placas	50-55°C, 48-72 h
Esporas termófilicas	20 g de almidón	Agua a 100 mL	100 °C por 3 minutos luego 108°C por 10 minutos	5 placas con 2% agua	50-55°C, 48-72 h
Esporas Acidúricas	20 mL o g de producto	Hidroxido de sodio al 0.02N hasta 100 mL	108°C por 5 minutos.	1 ml en cada dos placas DTA	50-55°C, 48h

3.4.2.3 *Bacillus coagulans*.

3.4.2.3.1 Taxonomía. (19)

Dominio: *Bacteria*.
 Filo: *Firmicutes*.
 Clase: *Bacilli*.
 Orden: *Bacillales*.
 Familia: *Bacillaceae*.
 Género: *Bacillus*.
 Especie: *coagulans*

3.4.2.3.2 Generalidades.

Aislado por primera vez de la malta verde *Bacillus coagulans* es un microorganismo que sobrevive a temperatura ambiente, en su forma esporulada sobreviven y proliferan el tracto gastrointestinal, es una bacteria Gram-positiva formadora de esporas y productora de glucosa isomerasa. (6)

Por su capacidad de producir esporas, son extremadamente resistentes a factores adversos como la radiación ultravioleta, la desecación, la temperatura alta, la congelación y productos químicos. Es un microorganismo aprobado por la FDA como aditivo para alimentos por ser una sustancia GRAS. Es un microorganismo no patógeno y no produce sustancias tóxicas. Es capaz de producir una enzima insoluble de glucosa isomerasa (Xilosa isomerasa) (ver Anexo N°8); La glucosa isomerasa es una enzima que ha ganado recientemente mucho interés debido a su aplicación de catalizar la isomerización reversible de glucosa a fructosa y la de xilosa a xilulosa. (6)

3.4.2.3.3 Glucosa (xilosa) isomerasa

Producida por la fermentación controlada de *Bacillus coagulans*. Es una enzima que ha ganado recientemente mucho interés debido a su aplicación de catalizar la isomerización reversible de glucosa a fructosa y la de xilosa a xilulosa. Se utiliza en la preparación de jarabe de maíz con alto contenido de fructosa y otros jarabes de almidón de fructosa. (6)

Se presenta como gránulos de color entre blanco y marrón (preparación inmovilizada) o líquidos, insolubles en agua (gránulos), etanol, cloroformo y éter. Las preparaciones inmovilizadas se vuelven insolubles en agua mediante tratamiento con gelatina (vehículo) y glutaraldehído (agente de inmovilización). (6)

Las preparaciones enzimáticas de glucosa isomerasa insoluble se derivan de especies reconocidas de microorganismos clasificados, no patógenos y no tóxicos, incluidos *Streptomyces rubiginosus*, *Actinoplanes missouriensis*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces olivochromogenes* y *Bacillus coagulans* cultivados en una fermentación de cultivo puro que no produce antibióticos. (13)

3.4.2.3.4 Proceso de manufacturación de esporas. (13)

La preparación de esporas de *Bacillus coagulans* (LactoSpore®) se fabrica de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación actuales (BPM). En resumen, la fabricación de esporas de *B. coagulans* implica tres pasos: (1) preparación del inóculo, (2) fermentación y (3) procesamiento de la corriente abajo.

En el primer paso, se inocula el cultivo puro de *Bacillus coagulans* en medio de siembra estéril que se incuba con agitación a 37-39 ° C durante 22-24 horas.

El cultivo de siembra se transfiere al fermentador que contiene el medio de fermentación para la incubación a 37-39 ° C durante 35-37 horas. El caldo de incubación se cosecha y se procesa más.

En la etapa de procesamiento posterior, la cosecha de caldo se centrifuga y las células bacterianas se separan. La torta húmeda de células bacterianas esporuladas se mezcla con agua desmineralizada (DM) esterilizada y se filtra a través de malla (tamaño 100 #).

La suspensión filtrada se seca por pulverización y se concentra. El polvo secado por pulverización se mezcla con maltodextrina hasta la concentración final deseada de las esporas de *Bacillus coagulans*. El procedimiento de fabricación garantiza un producto consistente y de alta calidad que cumple con las especificaciones. Las ayudas para el procesamiento, el medio de fermentación y

los diluyentes utilizados en la fabricación de LactoSpore® están aprobados como aditivos alimentarios o como sustancias GRAS.

3.4.2.3.5 Identificación de microorganismos formadores de esporas ácidas planas termófilas ⁽¹⁸⁾

Este método es el de la National food Processors Association de EE. UU.; los métodos para la adición del azúcar tienen la aprobación como un método oficial para la Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

El método para análisis de azúcar permite tener muestras de azúcar sólida o líquida. Si se analiza el producto líquido, la cantidad añadida a la dilución inicial se ajusta para que contenga un equivalente a 20 g de azúcar en seco. Después de calentar a 100 ° C, se añaden 2 ml de la solución de azúcar calentada a cada una de las cinco placas de Petri antes de agregar Man Rogosa Sharpe Agar (MRS). En el procedimiento de la AOAC las placas son incubadas a 55°C de 35 a 48 horas. Las colonias típicas son redondas, de 1-5 mm de diámetro, con un punto opaco en el centro, halo amarillo en el agar. Este halo puede desaparecer.

3.5 Fundamento de la identificación fenotípica.

Se basa en la identificación de características conocidas del microorganismo que se desea identificar, la confiabilidad de la identificación se basa en el número de características similares que presente. Primero se busca realizar las pruebas que son rápidas de realizar que llevan poco tiempo para ver los resultados como evaluación macro y microscópica, la tinción al Gram, oxidasa y catalasa. Luego de ver la similitud con estas pruebas se busca especificar el género del microorganismo en estudio estas pruebas pueden ser de fermentación de glucosa, producción de esporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad. Por último, se busca determinar la especie en investigación, para lo cual es muy útil la realización de pruebas bioquímicas, las cuales aportan un alto

grado de precisión de las características individuales de los microorganismos, permitiendo de esta manera concluir con certeza la especie del microorganismo analizado.

3.5.1 Evaluación microscópica.

Las tinciones son el primer paso de la identificación, las cuales permiten ver la forma, manera de agruparse, estructura de las células y el tamaño. La tinción más utilizada e imprescindible es la tinción al Gram, esta es la herramienta que nos permite hacer un diagnóstico provisional. En las tinciones se puede observar: la forma de teñirse, si posee cápsulas, endosporas, la disposición, el tamaño, los bordes.

3.5.2 Evaluación macroscópica.

Para poder observar la morfología macroscópica y dar un diagnóstico preliminar es necesario que sean colonias frescas y que provengan de medios no selectivos, ni diferenciales, deben utilizarse colonias aisladas de cultivos puros para asegurar las colonias son producto de células únicas. Los medios selectivos contienen aditivos específicos que permiten la proliferación de un cierto grupo de microorganismos e inhiben el crecimiento de otros. Los medios diferenciales se utilizan para que los microorganismos manifiesten características específicas y generalmente son en base al color de las colonias.

3.5.3 Pruebas bioquímicas. ⁽²⁶⁾

Permiten observar las características metabólicas de los microorganismos, existen dos tipos de pruebas; una de corta duración que evalúa enzimas preformadas y tienen una duración de entre unos pocos segundos a unos

minutos, la de larga duración necesita de la formación de colonias por lo que requiere un periodo más largo de horas a días de incubación.

Al grupo de pruebas de larga duración pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras ser cultivado en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar.

3.6 Fundamento de la identificación confirmatoria.

3.6.1 Sistemas miniaturizados API®⁽³⁾

Los sistemas miniaturizados API® son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas.

Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar.

Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras.

3.6.2 API® 50 CHB/E

Permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de *Bacillus* y Enterobacterias, es una galería formada por 62 microtubos.

Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos

(ver Figura N°5). La lectura de estas reacciones se realiza con la ayuda del manual de interpretación y la interpretación se realiza tras consultar la lista de perfiles numéricos o con la ayuda de un software de identificación.

Cuando se utiliza esta galería las cartas de colores correspondientes a las pruebas negativas y positivas son las siguientes:

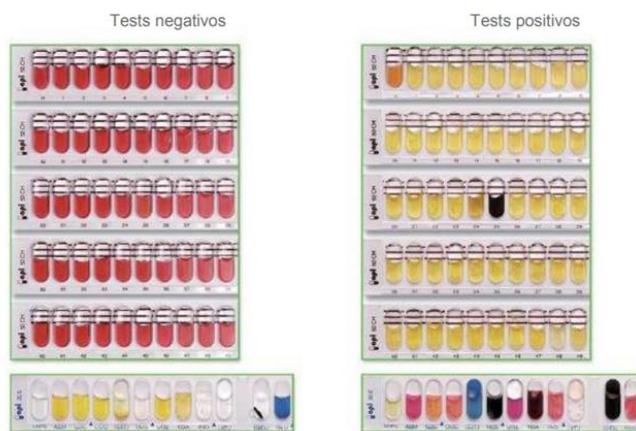


Figura N° 5: Lecturas de pruebas API® 50 CHB/E

3.7 Fundamento para la Simulación de tolerancia a jugo gástrico y sales biliares.^{(29) (8)}

3.7.1 Simulación de tolerancia a jugos gástricos.

El ensayo de tolerancia a jugos gástricos se realiza a diferentes bacterias que intentan ser probióticos ya que estos deben tener la capacidad de sobrevivir al tracto gastrointestinal.

Para llevar a cabo la simulación de la tolerancia a los jugos gástricos es necesario preparar una suspensión que este entre 10^7 y 10^8 la cual se someterá a diferentes pHs. Los pHs deben ser pH 3 y pH 8 para simular los diferentes pHs gástricos, debe simularse condiciones reales por lo cual se tiene que incubar a temperatura

corporal durante no más de 2 horas, debe hacerse un recuento a tiempo cero y después del tiempo de incubación, luego calcular el porcentaje de supervivencia de células viables de la siguiente manera (8):

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\text{Log UFC } N_1}{\text{Log UFC } N_0} \times 100$$

Donde:

N_1 : Total de células viables a las 4 horas.

N_0 : Total de células viables a las cero horas.

UFC: unidad formadora de colonias.

Log: logaritmo base 10.

3.7.2 Simulación de tolerancia a sales biliares.

Para la evaluación de tolerancia a sales biliares es necesario preparar una suspensión del microorganismo en estudio que este entre 10^7 y 10^8 la cual será expuesta a contacto con sales biliares que puede variar la concentración desde 0.05% hasta 1% p/v. Debe simularse condiciones reales por lo cual se tiene que incubar a temperatura corporal durante no más de 2 horas, debe hacerse un recuento a tiempo cero y después del tiempo de incubación y calcular el porcentaje de supervivencia de células viables de la siguiente manera (8):

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\text{Log UFC } N_1}{\text{Log UFC } N_0} \times 100$$

Donde:

N_1 : Total de células viables a las 4 horas.

N_0 : Total de células viables a las cero horas.

UFC: unidad formadora de colonias.

Log: logaritmo base 10.

El porcentaje de supervivencia de células viables reportada es del 20% por 2 horas para *Bacillus coagulans*.

3.8 Fundamento de determinación de azúcares reductores por espectrofotometría. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)⁽¹¹⁾

Es importante determinar la concentración de azúcares reductores totales en una muestra, y con esta cuantificación se obtiene una curva de calibración siguiendo el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). El método DNS determina la presencia de grupos carbónicos libres (C=O) de los azúcares reductores. El procedimiento se basa en una reacción redox que ocurre en la utilización de ácido 3,5 dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares y al mismo tiempo su propia reducción endotérmica. Un mol de azúcar reacciona con un mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico, dando lugar a una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra.

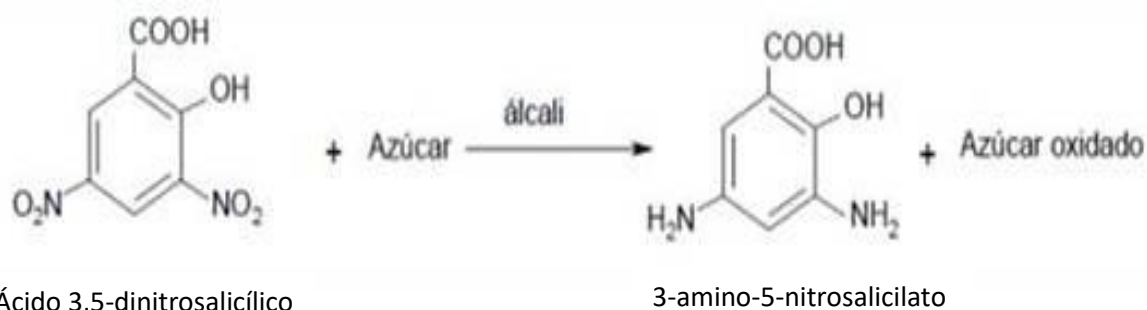


Figura N°6: Reacción de oxidación de azúcares reductores. Método DNS.

Se continúa con la determinación, haciendo lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm.

La reacción es colorimétrica, el ácido 3.5 dinitrosalicílico es de color amarillo, mientras que la aparición de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico provoca un viraje a pardo oscuro, cuya intensidad será proporcional a la cantidad de azúcares reductores. Por esta razón, el método no es recomendable para muestras coloreadas, ya que pueden afectar en la lectura que se realice en el espectrofotómetro.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

4.1.1 Estudio experimental

Se realizó el aislamiento e identificación del microorganismo presente en el azúcar de dieta, realizando pruebas de resistencia al microorganismo aislado, la parte práctica se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

4.1.2 Estudio exploratorio

Este estudio sirve para determinar el efecto probiótico del *Bacillus coagulans* en azúcar de dieta, específicamente al producir la enzima: Glucosa isomerasa; la cual tiene la capacidad de disminuir la concentración de glucosa. Se cuantificará la cantidad de glucosa que es capaz de disminuir la enzima mediante el método de determinación de azúcares reductores por espectrofotometría (Método DNS). También se determinó la capacidad del probiótico de adicionarse y sobrevivir a diferentes alimentos, sometiéndolos a diferentes parámetros como temperatura y pH.

4.2 Investigación bibliográfica.

Se consultaron las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamin Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Universidad Centroamericana José Simeón Cañas
- SSSSRepositorio institucional Universidad de El Salvador.
- Repositorio Centroamericano SIIDCA-CSUCA.

- ScienceDirect.com | Science, health and medical journals, full text articles and books.
- Internet.

4.3 Investigación de Campo.

Se realizó en los diferentes supermercados de la cadena de supermercados súper selectos cercanos a la Universidad de El Salvador; la cual consistió en investigar cuales son las marcas de azúcar de dieta que se comercializan en los supermercados y rotulan la presencia de probióticos.

- Universo: Azúcar de dieta comercializada en los supermercados
- Muestra: Azúcar de dieta comercial que rotula la presencia del probiótico *Bacillus coagulans*.
- Tamaño de muestra: 50 cajas de azúcar de dieta que rotulan la presencia de probióticos; las 50 cajas de azúcar de dieta se tomaron de 5 lotes diferentes de la marca Nevella, de cada lote se tomaron 10 cajas de azúcar de dieta. De cada caja se tomaron 20 sobres de azúcar de dieta que rotulan 1g de azúcar por sobre. Se tomó una muestra de 50 cajas de la azúcar de diferentes lotes, rotulándolas con números correlativos del 1 a 50 en orden de compra, esta muestra se determinó a conveniencia de los investigadores, debido que sólo existe una marca de azúcar de dieta comercializada en el país que rotula la presencia del probiótico.

Tratamiento de la muestra

Las muestras se recolectaron en una bolsa de plástico con su respectiva etiqueta y código de identificación; luego se transportaron al Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), para su almacenamiento y análisis.

Hipótesis

¿Existe la presencia de probióticos en azúcar de dieta comercializada en El Salvador?

Hipótesis nula.

H_0 = El promedio del número de colonias en la dilución 10^{-1} es mayor a 10, con un 95% de confiabilidad.

Hipótesis alternativa

H_1 = El promedio del número de colonias en la dilución 10^{-1} es menor a 10, con un 95% de confiabilidad.

4.4 Parte experimental

Para realizar el análisis microbiológico del azúcar de dieta se utilizó el procedimiento para la detección de la especie *Bacillus* en alimentos, específicamente el método para esporas termofílicas en azúcar, se estudiaron los siguientes parámetros:

- Presencia del probiótico en el azúcar de dieta.
- Identificación de microorganismos termófilos anaerobios
- Recuento total de microorganismos termófilos anaerobios.
- Resistencia del probiótico a cambios de temperatura y pH.
- Cuantificación de reducción de glucosa.

4.4.1 Presencia del probiótico en azúcar de dieta. ⁽¹⁸⁾

Realizar el siguiente procedimiento para cada una de las 50 muestras (ver Anexo N°1):

- Retirar el azúcar de dieta de los sobres contenidos en una caja en un beacker de 200 mL.
- Pesar 20 g de azúcar de dieta de los sobres de cada una de las muestras.
- Disolver el azúcar en un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de agua (dilución inicial).

- Tomar una alícuota de 10 mL y adicionarla en un Erlenmeyer de 150 mL conteniendo 65 mL de Man Rogosa Sharpe Agar (MRS) (previamente calentado a 50 °C).
- Calentar rápidamente hasta 100 °C durante 5 minutos.
- Enfriar hasta 45 °C.
- Verter aproximadamente 15 mL en cada una de 5 placas estériles.
- Incubar a una temperatura de 50°C a 55°C de 48 a 72 horas en una jarra de anaerobiosis.
- Las colonias típicas observadas deben de ser redondas de 1- 5 mm de color crema a blanco.

4.4.1.1 Siembra del microorganismo en Agar Tripticasa Soya (TSA). (14)

Antes de realizar las tinciones fue necesario sembrar las colonias obtenidas en el medio MRS en medio TSA debido a que este es un medio incoloro y no interferirá en la interpretación de las tinciones.

Realizamos el siguiente procedimiento por duplicado para cada una de las 50 muestras:

- Tomar una colonia del microorganismo obtenida en el paso 4.4.1 con ayuda de un asa de siembra.
- Sembrar en superficie por el método de estriado en cuadrante en placas Petri conteniendo medio TSA
- Incubar a una temperatura de 50°C a 55°C de 48 a 72 horas en una jarra de anaerobiosis. (Ver Anexo N°1)

4.4.1.2 Tinción de GRAM. (21)

Esta tinción permite ver si las bacterias en estudio pertenecen a bacterias Gram positivas o negativas.

Realizamos el procedimiento para cada una de las muestras:

- Tomar una colonia presuntiva de *Bacillus coagulans* en TSA con ayuda de un asa de siembra.
- Extender la colonia en una gota de solución salina en un portaobjeto.
- Fijar muestra con la flama del mechero.
- Colocar el portaobjetos en una horquilla de alambre.
- Adicionar de 2 a 3 gotas de cristal violeta y dejar reposar por 1 minuto
- Lavar con abundante agua.
- Adicionar de 2 a 3 gotas de Lugol y dejar por 1 minuto
- Lavar con abundante agua
- Agregar de 2 a 3 gotas de alcohol cetona y dejar por 30 segundos
- Lavar con abundante agua
- Agregar de 2 a 3 gotas de fucsina Gram, dejar por 30 segundos
- Lavar con abundante agua y secar con cuidado con papel toalla
- Observar al microscopio con un aumento de 100X
- Anotar morfología observada. (Ver Anexo N°1)

4.4.1.3 Tinción de Wirtz. (21)

Esta tinción permite observar la presencia de endosporas bacterianas.

- Tomar una colonia presuntiva de *Bacillus coagulans* del medio TSA con ayuda de un asa de siembra.
- Extender la colonia en una gota de solución salina en un portaobjeto.
- Fijar muestra con la flama del mechero.
- Teñir con verde de malaquita al 7.6%, dejar por 8 minutos.
- Lavar con agua por 15 segundos
- Agregar de 2 a 3 gotas de safranina al 0.25%, dejar por 30 segundos
- Lavar con abundante agua y secar con cuidado con papel toalla
- Observar al microscopio con un aumento de 100X

- Anotar forma y posición de la endospora dentro de la célula madre bacteriana. (Ver Anexo N°1)

4.4.2 Identificación del probiótico utilizando pruebas bioquímicas. (21)

Se realizó el siguiente procedimiento para cada una de las muestras:

4.4.2.1 Prueba de la catalasa

- Tomar una colonia presuntiva de *Bacillus coagulans* en medio MRS con ayuda de un asa de siembra y colocarla en un portaobjetos.
- Agregar una gota de peróxido de Hidrogeno al 3%
- Observar el aparecimiento o no de liberación de burbujas. (Ver Anexo N°2)

La reacción es positiva si existe liberación de burbujas a los pocos segundos.

4.4.2.2 Prueba de la oxidasa

- Cortar tiras de papel filtro Whatman N°1 de 6-8 cm de ancho
- Saturar las tiras añadiendo gotas de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% (Reactivo de Kovacs)
- Secar rápidamente las tiras
- Colocar en cada tira con reactivo de Kovacs una colonia presuntiva de *Bacillus coagulans* utilizando un palillo de madera estéril. (Ver Anexo N°2)

Si hay aparición de una coloración azul oscura en el sitio de inoculación a los 10 segundos la prueba es positiva, la ausencia de coloración o la decoloración de la tira saturada es prueba negativa.

Como control positivo de la prueba utilizar una colonia de la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802.

4.4.3 Identificación del probiótico utilizando pruebas API. (3)

Se empleó el sistema de API 50 CHB/E utilizado para caracterizar el metabolismo de los carbohidratos de *Bacillus*.

La identificación completa del probiótico *Bacillus coagulans* se realizará mediante utilización de la base de datos APIWEB.

4.4.3.1 Preparación de galería API (Ver Anexo N°2)

Ver las instrucciones API 50 CH (uso opcional).

Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 3 mL de agua desmineralizada estéril en los alvéolos, para crear la atmósfera húmeda, escribir el nombre de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara y sacar la galería de su envase individual.

4.4.3.2 Preparación del inóculo.

Se deben usar soluciones preparadas extemporáneas.

- Abrir una ampolla de API 50 CHB de Suspension Medium
- Tomar con un asa estéril varias colonias de la suspensión
- Realizar una suspensión de turbidez de 2 McFarland.
Debe usarse inmediatamente después de su preparación.

4.4.3.3 Procedimiento general de estandarización de McFarland

- Preparar el estándar de concentración deseada, agregando la cantidad de los reactivos: cloruro de bario dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.048M; 1.175% P/V) 2.0 mL; y de ácido sulfúrico (H_2SO_4 0.18 M, 0.36 N, 1% V/V) 98.0 mL.
- Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro
- Distribuir de 4 – 6 mL en cada uno de los tubos similares para preparar el inóculo
- Mantener los estándares guardados a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- Agitar vigorosamente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.

4.4.3.4 Preparación del microorganismo de prueba para la estandarización por medio de McFarland

- Tomar con asa bacteriológica estéril, 4 ó 5 colonias aisladas del microorganismo de un cultivo en medio TDA.
- Suspender las colonias en un tubo que contiene 4 mL de solución salina.
- Por comparación visual, llegar a la concentración de 2 McFarland, diluyendo la suspensión del microorganismo o agregando más microorganismos.
- Agitar en vortex.
- La suspensión estandarizada del inóculo debe de ser utilizada en los siguientes 15 minutos de su preparación.

4.4.3.5 Inoculación de la galería.

- Repartir la suspensión bacteriana precedente en los tubos, evitando la formación de burbujas (para ello) inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la pipeta en un lado de la cúpula.
- Llenar el tubo y la cúpula del ensayo DIM (100µL aprox.), cuidando que no se produzca un menisco convexo.

Nota: La calidad de llenado es muy importante: los tubos con cantidad excesiva o insuficientemente llenos originan resultados falsos positivos o negativos.

La adición de aceite de parafina es opcional; sin embargo, se desaconseja para las bacterias aerobias estrictas.

4.4.3.6 Incubación de la galería.

Para las especies termófilas, incubar a $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas – 3:30 horas, 6 horas – 6:30 horas y 24 horas (± 2 horas) mantener ligeramente elevada la base de los tubos (para conservar cualquier producción de gas).

Cerrar la cámara de incubación.

4.4.3.7 Lectura de la galería

(Consultar fichas técnicas API 50 CH para realizar una lectura adecuada de los resultados obtenidos)

Revelar los resultados y anotar los resultados en la hoja de resultados.

En cada tubo se investiga la acidificación producida, que se traduce por el cambio de color rojo a AMARILLO por el fenol contenido en el medio.

El ensayo de esculina (tubo N°25) se observa un cambio de color del rojo al NEGRO.

NOTA: Si, durante la siguiente lectura, un ensayo inicialmente positivo se hiciera negativo, sólo se tendrá en cuenta el resultado positivo (se trata de una alcalinización debida a la producción de amoniaco a partir de la peptona).

4.4.3.8 Interpretación.

El perfil bioquímico obtenido puede ser identificado a partir de la base de datos (V4.0), con la ayuda del sistema ATB TM, mini API, o el programa de identificación apiweb TM.

NOTA: El perfil bioquímico puede igualmente: utilizarse con otros resultados para un estudio taxonómico y registrar tal cual.

4.4.4 Recuento total del probiótico presente en la azúcar de dieta. (25)

Se realizó recuento en placa para comprobar el número de microorganismos presente en el producto de acuerdo con lo rotulado por el fabricante.

El producto rotula que contiene 1.25×10^8 UFC de probiótico en cada sobre por lo que se realizaron diluciones seriadas para obtener un conteo preciso del contenido en el producto.

- Tomar sobres de una caja de azúcar de dieta hasta obtener 20 g de azúcar.
- Disolver el azúcar en un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 180 mL de agua (Concentración 10^7). Esta será la dilución 10^{-1}

- Tomar una alícuota de 10 mL y adicionar a un frasco con 90 mL de agua (Concentración 10^6)
- Tomar una alícuota de 1 mL adicionar a un tubo con 9 mL de agua (Concentración 10^4)
- Tomar una alícuota de 1 mL adicionar a un tubo que contiene 9 mL de agua (Concentración 10^3), y así sucesivamente hasta llegar a una concentración de Concentración 10^1
- Tomar una alícuota de 1 mL de las concentraciones 10^1 , 10^2 y 10^3 y se colocaran sobre placas de Petri por duplicado
- Adicionar a cada una de las placas de Petri aproximadamente 20 mL de Agar MRS
- Homogenizar la muestra haciendo movimientos circulares (técnica de 8) sobre la superficie de la mesa y dejar gelificar
- Incubar a una temperatura de 50 - 55°C durante 48 - 72 horas en una jarra de anaerobiosis.
- Realizar el conteo de las colonias y calcular el número de Unidades Formadoras de Colonias por cada gramo. (Ver Anexo N°3)

NOTA: los 20 g de azúcar se obtendrán de 20 sobres del producto a analizar.

El recuento de las Unidades Formadoras de Colonia se realizará mediante la siguiente fórmula:

$$UFC = \frac{\sum \text{Promedio de número de colonias por dilución}}{\sum \text{de la dilución}}$$

$$UFC/g = \frac{UFC}{\text{sobre}}$$

4.5 Evaluación de la resistencia del probiótico a las condiciones gastrointestinales *in vitro*. (31) (8)

Para evaluar la resistencia del probiótico al ambiente gastrointestinal se realizaron ensayos específicos para comprobar la supervivencia del microorganismo a estas condiciones.

4.5.1 Resistencia del probiótico a pH ácido y básico

Se evaluó tanto la resistencia a pH3 como a pH8.

Siguiendo el procedimiento para ambos pH. Cada prueba se realizó por duplicado.

- Se ajustan 9 mL de cada uno de los 2 tubos conteniendo caldo MRS al pH requerido; adicionando ya sea HCL o NaOH.
- Medir el pH de cada uno de los tubos con el pHmetro.
- Inocular los tubos con 1 mL de la dilución 10^{-1} (Concentración de microorganismo de 10^7 UFC/mL).
- Se realizará recuento en tiempo inicial, tomando una alícuota de 0.1 mL de cada tubo inoculando en placas Petri con agar MRS por técnica de siembra en superficie.
- Incubar las placas a temperatura de 37°C por 48 horas en jarra de anaerobiosis. (Ver Anexo N°4)
- Incubar los tubos con el probiótico a temperatura de 37°C por 4 horas en jarra de anaerobiosis.
- Tomar una alícuota de 0.1 mL de cada tubo y sembrar en superficie en placas con MRS.
- Incubar las placas a temperatura de 37°C por 48 horas en jarra de anaerobiosis.
- Realizar conteo de colonias en las placas Petri utilizando un contador de colonias. (Ver Anexo N°4)
- Calcular el porcentaje de supervivencia con la siguiente formula:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\text{Log UFC } N_1}{\text{Log UFC } N_0} \times 100$$

Donde:

N_0 : recuento de colonias al tiempo cero.

N_1 : recuento de colonias después de haber incubado por 4 horas.

Log: logaritmo base 10

4.5.2 Resistencia del probiótico a sales biliares.

- Ajustar a pH 3 cada uno de los 2 tubos de ensayo conteniendo caldo MRS enriquecidos con 0.3% p/v de sales biliares.
- Inocular el tubo con 1 mL de la dilución 10^{-1} (Concentración de microorganismo de 10^7 UFC/mL) obtenida en el procedimiento 2.4.4
- Se realizará recuento en tiempo inicial, tomando una alícuota de 0.1 mL de cada tubo inoculando en placas Petri con agar MRS por técnica de siembra en superficie.
- Incubar las placas a temperatura de 37°C por 48 horas en jarra de anaerobiosis. (Ver Anexo N°4)
- Incubar los tubos a temperatura de 37°C por 4 horas en jarra de anaerobiosis
- Tomar una alícuota de 0.1 mL de cada tubo y sembrar en superficie en placas con MRS.
- Incubar las placas a temperatura de 37°C por 48 horas en jarra de anaerobiosis.
- Realizar conteo de colonias en las placas Petri utilizando un contado de colonias. (Ver Anexo N°4)
- Calcular el porcentaje de supervivencia con la siguiente formula:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\text{Log UFC } N_1}{\text{Log UFC } N_0} \times 100$$

Donde:

N_0 : recuento de colonias al tiempo cero.

N_1 : recuento de colonias después de haber incubado por 4 horas.

Log: logaritmo base 10

4.5.3 Resistencia del probiótico a cambios de pH y temperatura en bebidas. (26)

Se realizaron pruebas in vitro para comprobar la resistencia del probiótico frente a cambios de pH y de temperatura en bebidas, comprobando la viabilidad del probiótico al ser incorporado en bebidas calientes y de pH ácido.

4.5.3.1 Resistencia a bebidas calientes.

En esta parte se trabajó con una bebida caliente: café; para ambas muestras se siguió el procedimiento que se detalla a continuación:

- Tomar sobres de una caja del azúcar de dieta hasta obtener la cantidad de 40 g de azúcar.
- Disolver en 200 mL de la bebida caliente (Café)
- Tomar una alícuota de 10 mL de la muestra y adicionar en 65 mL de MRS (previamente calentado a 50 °C).
- Enfriar hasta 45 °C.
- Verter aproximadamente 20 mL en cada una de las 5 Placas estériles por técnica de vertido en placa.
- Incubar a una temperatura de 50°C a 55 °C de 48 horas a 72 horas en jarra de anaerobiosis.

- Observar morfología macroscópica de las colonias.
- Realizar tinción de Gram. (Ver Anexo N°1)

4.5.3.2 Resistencia a bebidas ácidas.

En esta parte se trabajó con una bebida de pH ácido: limonada; se realizó el siguiente procedimiento:

- Tomar sobres de una caja de azúcar de dieta hasta obtener la cantidad de 40 g de azúcar.
- Disolver muestra en 200 mL de limonada previamente preparada. (Ver Anexo N°7)
- Tomar un alícuota de 10 mL y adicionar a 90 mL de agua peptonada buferada.
- Adicionar 10 mL de la muestra en 65 mL de Agar MRS (previamente calentado a 50 °C).
- Enfriar hasta 45 °C. Verter en 5 Placas estériles.
- Incubar a una temperatura de 50°C a 55 °C de 48 horas a 72 horas en jarra de anaerobiosis
- Observar morfología macroscópica de las colonias.
- Realizar tinción de Gram. (Ver Anexo N°1)

4.6 Cuantificación de glucosa mediante determinación de azúcares reductores por espectrofotometría. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). ⁽¹¹⁾

4.6.1 Curva de calibración.

La curva de calibración de glucosa se utilizó para poder determinar la concentración de glucosa presente en las muestras.

Se realiza una curva de calibración de glucosa (Tabla N°6), para poder cuantificar la cantidad de glucosa presente en las muestras obtenidas del medio glucosado. En 6 tubos vacíos se adicionarán mL con diferencia de 0.2 mL por cada tubo de estándar de glucosa de concentración 1 g/L, se adiciona agua para completar un mL, se adiciona 1 mL de reactivo DNS y 8 mL de agua destilada.

Leer absorbancia de cada uno de los tubos a 540 nm. Realizar grafico en Excell con los datos obtenidos en las lecturas de absorbancias.

Tabla N° 6. Preparación de curva de calibración de glucosa de estándar.

Tubo	Volumen de solución estándar de glucosa 1 g/l (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Concentración de glucosa en el tubo (mg/mL)	Reactivo de DNS	Agua destilada
0	0.0	1.0	0.0	1 mL	8 mL
1	0.2	0.8	0.2	1 mL	8 mL
2	0.4	0.6	0.4	1 mL	8 mL
3	0.6	0.4	0.6	1 mL	8 mL
4	0.8	0.2	0.8	1 mL	8 mL
5	1.0	0.0	1.0	1 mL	8 mL

4.7 Cuantificación de mg de glucosa que degrada por el probiótico.

4.7.1 Estandarización del probiótico.

- Adicionar 3 mL de solución salina a las placas de las que se haya obtenido crecimiento en el paso 2.4.1 para arrastrar los microorganismos
- Reunir las suspensiones obtenidas en un solo tubo.
- Estandarizar la suspensión obtenida a 1 unidad de absorbancia.

(Ver Anexo N°6)

4.6.1.1 Siembra del microorganismo en medio glucosado.

- Tomar 5 mL de la suspensión obtenida en el paso anterior
- Adicionar los 5 mL a dos Erlenmeyer que contengan 45 mL de caldo nutritivo.
- Incubar a temperatura ambiente por 24 a 48 horas con una agitación de 200 rpm.
- Al final de la incubación corroborar la morfología microscópica de este microorganismo en el caldo nutritivo, realizando tinción de Gram para confirmar la presencia del probiótico.
- Transferir el contenido de estos dos caldos a un Erlenmeyer conteniendo 900 mL de Medio Glucosado.
- Incubar a temperatura de 30 °C por 96 h. sin agitación.
- Tomar muestras de acuerdo con lo indicado en la tabla N°7. Realizar recolección de muestras por duplicado. (Ver Anexo N°6)

Nota: el medio glucosado se prepara adicionando 10.0 g de glucosa, 8.0 g de extracto de levadura, fosfato disódico 1.18 g y agua destilada para llevar a volumen de 1 L.

4.6.1.2 Toma de la muestra para la cuantificación de glucosa.

Se toman 5 mL de medio glucosado como muestra, tomando la primera a las cero horas de incubación, luego se tomaron las siguientes con una diferencia de 24 horas hasta completar las 96 horas, las muestras se codificaron como M#-bc (ver Tabla N°7).

M= muestra

#= número de muestra

bc= Bacillus coagulans

Tabla N°7. Toma de muestra para cuantificación de glucosa.

Tiempo de recolección de muestra (Horas)	Código de muestra	Alícuotas
0	M1-bc	5 mL
24	M2-bc	5 mL
48	M3-bc	5 mL
72	M4-bc	5 mL
96	M5-bc	5mL

4.7.1.1 Toma y tratamiento de muestra para cuantificación de glucosa.

Se realizó el siguiente procedimiento para cada una de las muestras:

- Tomar una alícuota de 1mL de la muestra colocar en un tubo de ensayo
- Adicionar 20 μ L de HCL, agitar en vórtex,
- Permitir hidrolisis a 90 °C durante 5 minutos
- Adicionar 50 μ L KOH 5 N (neutralizar) y agitar en el vórtex
- Adicionar 1 mL de reactivo DNS y agitar en vórtex
- Llevar a ebullición durante 5 minutos
- Enfriar en baño de hielo
- Agregar 8 mL de agua destilada, agitar en vórtex
- Leer la absorbancia a 540 nm.
- Realizar cálculos mediante interpolación lineal. (Ver Anexo N°6)

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Se realizó la identificación del microorganismo presente en la azúcar de dieta de la marca NEVELLA de acuerdo con la metodología detallada en el numeral 4.4.1.

5.1 PRUEBAS DE IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO.

5.1.1 Aislamiento del microorganismo.

En primer lugar, se procedió al aislamiento de las esporas de células vegetativas que pudiesen estar presentes en la muestra, para ello se calentó la dilución con la muestra en medio MRS a 100°C durante 5 minutos destruyendo los organismos vegetativos y promoviendo la germinación de esporas. Posteriormente se procedió a inocular las placas conteniendo medio MRS, luego se incubaron en condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 53°C durante 41 horas para poder observar el crecimiento de colonias y la morfología macroscópica en las muestras; observándose colonias de color blanco a color crema, circulares, de 1 a 1.5 mm de diámetro, de borde ondulado, convexa, de aspecto liso (ver figura N°7)



Figura N°7. Morfología macroscópica de las colonias del microorganismo aislado de la azúcar de dieta.

5.1.2 Tinción de Gram

Posteriormente se procedió a realizar el frotis bacteriano y tinción Gram (ver anexo N°1), en donde se determinó que el microorganismo pertenece al grupo de bacterias Gram Positivas observándose colonias con coloración moradas, cuya morfología microscópica observada son de bacilos largos Gram positivos. (Ver figura N°8)

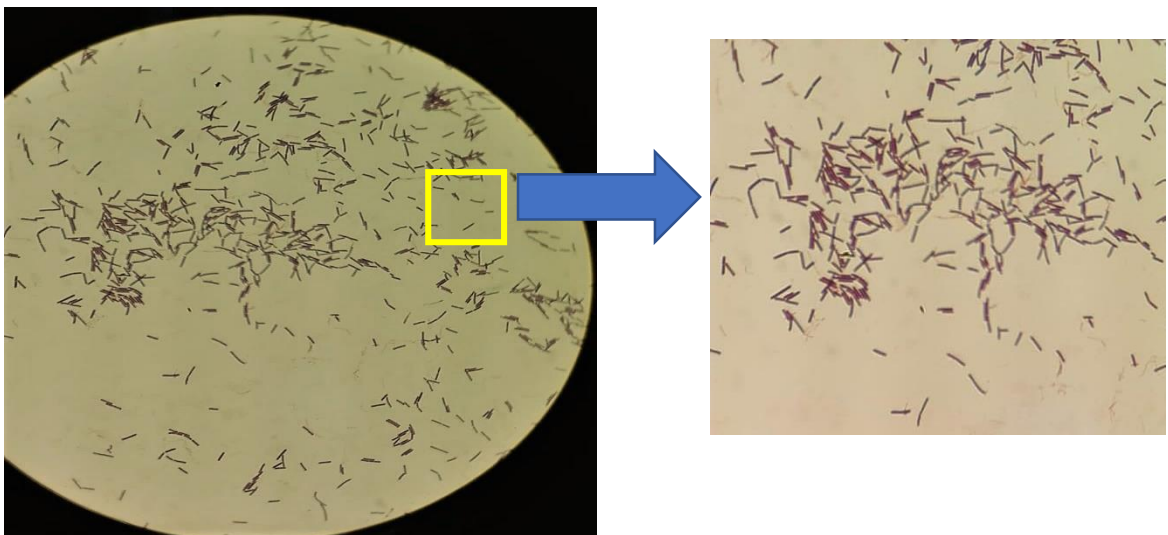


Figura N°8. Resultado del frotis bacteriano y tinción Gram.

5.1.3 Tinción de Wirtz

Esta tinción es utilizada para poder observar e identificar la presencia de endosporas. El procedimiento se realizó de acuerdo con el numeral 4.4.1.3 en donde se coloca una colonia de la muestra en un portaobjeto y se extiende en una gota de solución salina, se fija la muestra con la llama del mechero, posteriormente se tiñe con verde de malaquita. Se deja en reposa, se lava con agua y se agregan de 2 a 3 gotas de safranina al 0.25% se deja por 15 segundos,

después se lavaron con agua y se procedió a secar la muestra teñida. Las preparaciones teñidas y fijadas permitieron ver la presencia de endosporas de color verde en un aumento de 100X en el microscopio identificase la presencia de espora del tipo 3 figura B que corresponde a una espora central con hinchazón de célula madre. (Ver figura N°9)

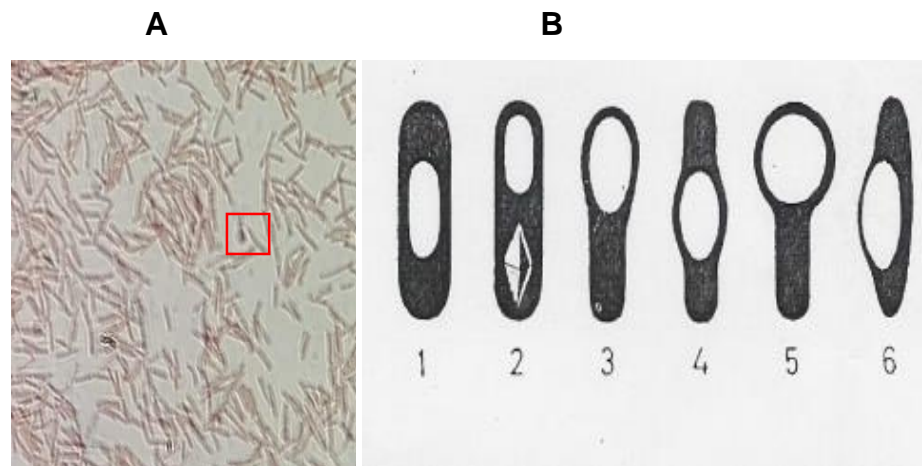


Figura N°9. **A** Resultado del frotis bacteriano y tinción de Wirtz. **B** tipos de esporas presentes al interior del cuerpo de la bacteria del género *Bacillus*, 1: espora central, 2: espora Terminal, 3: espora terminal con hinchazón de la célula madre, 4: espora central con hinchazón de célula madre, 5: espora terminal redonda con hinchazón de la célula madre y 6: espora lateral.

5.1.4 Prueba de la catalasa.

En la muestra analizada se observa burbujeo, lo que indica catalasa positiva.

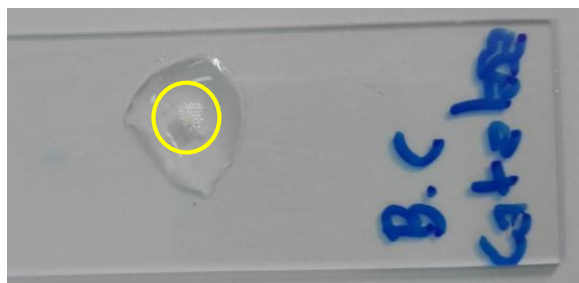


Figura N°10. Resultado de la prueba de la catalasa al microorganismo aislado de la muestra de azúcar de dieta

Se determinó que el microorganismo encontrado en la azúcar de dieta comercial de la marca NEVELLA es catalasa positiva, debido a que se observó burbujeo al colocar una colonia de la muestra en una gota de peróxido de hidrogeno al 3%. Por lo que el microorganismo presente en la azúcar de dieta posee la enzima catalasa.

5.1.5 Prueba de la Oxidasa.

Se determinó que el microorganismo presente en la azúcar de dieta es oxidasa negativa; debido que al inocular una colonia del microorganismo aislado de la azúcar en una tira con reactivo de la oxidasa se observó una coloración café; lo que supone que el microorganismo no posee la enzima citocromo oxidasa o indofenol oxidasa; es decir el microorganismo no puede usar el oxígeno en la cadena de transferencia de electrones o aplican un citocromo diferente para transferir electrones al oxígeno.

Como control positivo a la prueba de la oxidasa se realizó la prueba con el microorganismo *P. aeruginosa* observándose una coloración morada característica de una prueba oxidasa positiva.

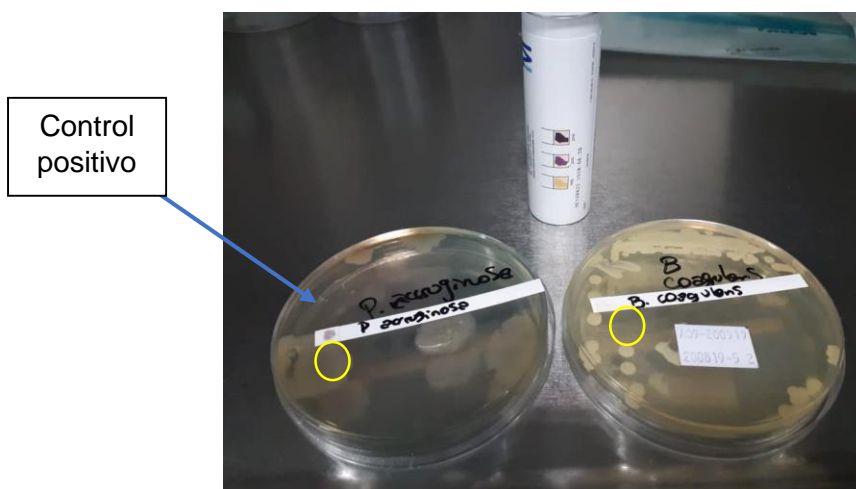


Figura N°11. Resultado del microorganismo presente en azúcar de dieta versus control positivo (coloración violeta)

5.1.6 Identificación mediante sistema de galerías Analytical Profile Index (API).

Se realizó la identificación del microorganismo presente en la azúcar de dieta mediante el sistema de identificación de galerías API (ver Figura N°12), el cual es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos.

Para la identificación del microorganismo presente en el azúcar de dieta se utilizó el API 50 CHB/E específica para la identificación de los *Bacillus* y microorganismos próximos y de las *Enterobacteriaceae* y las *Vibrionaceae*.

El procedimiento para la identificación del microorganismo de galerías API se realizó empleando las indicaciones del fabricante.

Obteniéndose los resultados que se muestran a continuación:

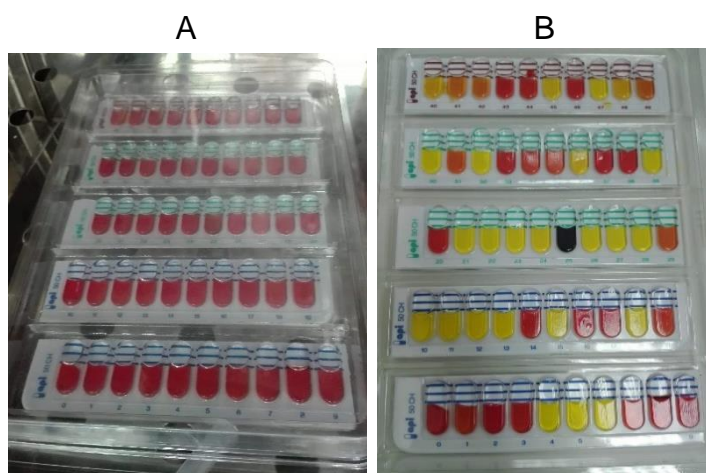


Figura N°12. **A:** Galería API inoculadas con suspensión de microorganismo antes de incubar. **B:** Resultado obtenido después de tiempo de incubación de galería API 50 CHB/E

Para completar el perfil de identificación del microorganismo en estudio, se hizo uso de la galería API 20 E que es utilizado para la identificación de las *Enterobacteriaceae*, se inoculo la galería con el microorganismo presente en el azúcar de dieta obteniéndose el siguiente resultado:



Figura N°13. Resultados obtenidos mediante uso de galería API 20E

Una vez se obtuvieron los resultados de las galerías API, se procedió a introducir los perfiles numéricos obtenidos de las 2 API en el Software de identificación API Web.

Obteniendo la identificación del microorganismo incorporado en la azúcar de dieta comercial la cual rotula la presencia del probiótico *Bacillus coagulans*.

(Ver figura N°14)

REFERENCIA	FECHA
NEVELLA	1/11/18
COMENTARIO	
BUENA IDENTIFICACION	
Galería	API 50 CHB V4.1
Perfil	- + - + + + - - + + + + - - - + + + + + + + + + + + + + + + - - - + + + - - - - - + + -
Nota	
Taxón significativo	% ID
Bacillus circulans	94.0
Taxón siguiente	% ID
Paenibacillus macerans	5.9

T	Pruebas en contra					
0.45	LYX	1%	TAG	1%	5KG	8%
					GEL	15%

T	Pruebas en contra					
0.29	MDX	82%	INU	88%	LYX	1%
	5KG	3%			TAG	0%

Cerrar

Figura N°14. Identificación del microorganismo presente en azúcar de dieta comercial mediante sistema de galerías API

5.2 Recuento total del microorganismo presente en la azúcar de dieta.

La concentración del microorganismo presente en la azúcar se determinó mediante la técnica de vertido en placa (Figura N°15). Los resultados obtenidos pueden observarse en la tabla N°8.

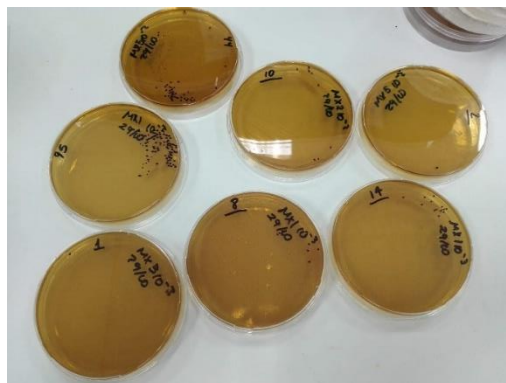


Figura N°15. Recuento obtenido en las muestras de azúcar de dieta.

Tabla N°8. Resultado del número de colonias encontradas en las 50 muestras de azúcar de dieta por dilución.

N° de muestra donde hubo crecimiento	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³
1	298	95	8
	250	117	14
11	10	<10 ufc	<10 ufc
	<10 ufc	<10 ufc	<10 ufc
41	44	2	<10 ufc
	30	2	<10 ufc
Promedio	6.32	2.16	0.22
Desviación estándar	38.96	14.99	1.61

En la tabla N°8 se muestran los resultados de las muestras en donde se obtuvo crecimiento de colonias, muestra 1, 11 y 41; en las demás muestras no hubo crecimiento de colonias. Las muestras donde se obtuvo crecimiento pertenecen al mismo lote codificado como lote número 1.

Se toma como ejemplo el número de colonias obtenido en la muestra número 1 y dilución 10⁻¹

Se calcularon los promedios mediante la siguiente formula:

$$Promedio = \frac{\sum \text{Crecimiento en las placas}}{\text{número de placas}} = \frac{298 + 250}{2} = 274$$

Obteniéndose los resultados que se presentan en la tabla N°9

Tabla N°9. Promedio de UFC de cada muestra de azúcar de dieta donde se obtuvo crecimiento de colonias según recuento en placa.

Dilución	Promedio UFC muestra 1	Promedio UFC muestra 11	Promedio UFC muestra 41
10^{-1}	274	5	37
10^{-2}	106	-	2
10^{-3}	11	-	-

Finalmente se determinó el número de Unidades formadoras de colonias por sobre UFC/sobre mediante la siguiente formula:

$$UFC = \frac{\sum \text{promedio de número de colonias por dilución}}{\sum \text{de la dilución}}$$

$$\text{Muestra 1} \quad UFC/Sobre = \frac{274+106+11}{0.1+0.01+0.001} = 3523 \text{ UFC/Sobre}$$

$$\text{Muestra 11} \quad UFC/Sobre = \frac{5}{0.1} = 50 \text{ UFC/Sobre}$$

$$\text{Muestra 41} \quad UFC/Sobre = \frac{37+2}{0.1+0.01} = 354 \text{ UFC/Sobre}$$

Recuento Total

$$UFC/Sobre = \frac{3,523 + 50 + 354}{3} = 1,309 \approx 1,400 \text{ UFC/Sobre}$$

Los resultados obtenidos demuestran que la concentración de probióticos presentes por sobre no cumple con lo rotulado por el fabricante, obteniéndose 1,400 UFC/Sobre con respecto a 125 millones de UFC/sobre declarado por el fabricante.

Para dar respuesta a nuestra hipótesis utilizaremos el número de colonias obtenido, sabiendo que para hacer un conteo correcto se necesita un mínimo de 10 colonias por cada una de las placas.

¿Existe la presencia de probióticos en azúcar de dieta comercializada en El Salvador?

Hipótesis nula.

$$H_0 = \mu \geq 10 \text{ colonias}$$

Hipótesis alternativa

$$H_1 = \mu < 10 \text{ colonias}$$

Nivel de confianza del 95% por lo que $\alpha = 5\%$

Valor crítico: como la muestra es superior a 30, se utiliza un valor de Z utilizando la tabla del Anexo N°10

Obteniendo un valor de: $Z_c = -1.645$

Para obtener el valor se prueba se utiliza la siguiente formula: $Z_p = \frac{\tilde{x} - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}$

Donde:

\tilde{x} : Promedio

μ : Valor teórico esperado

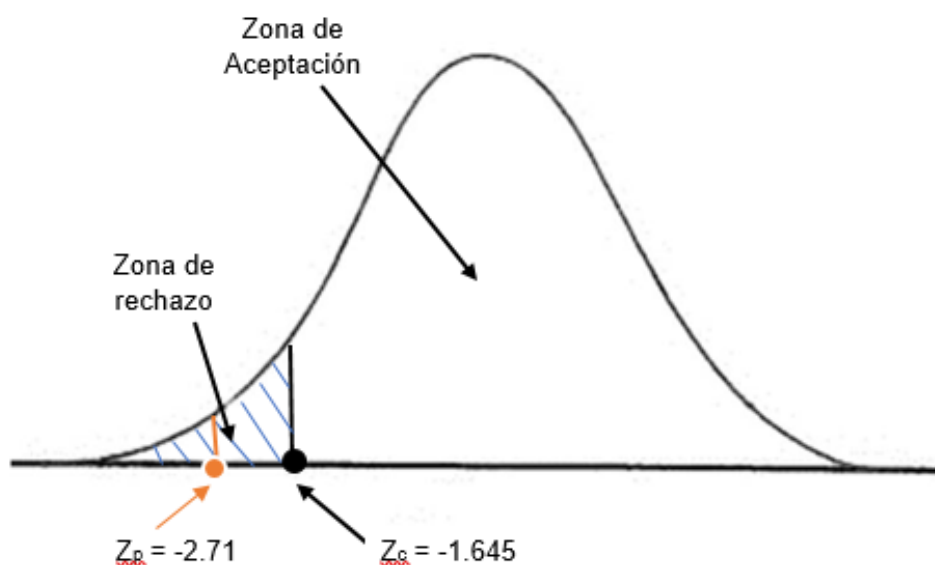
σ : Desviación estándar

n : Numero de muestras

Sustituyendo valores:

$$Z_p = \frac{2.90 - 10}{\frac{18.52}{\sqrt{50}}} = -2.71$$

Como el valor Z de prueba da como resultado $Z_p = -2.71$ cae en la zona de rechazo, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, aceptando la hipótesis alternativa que demuestra que la media es menor a 10 colonias por sobre. Por lo que podemos decir que el microorganismo está ausente en la azúcar de dieta.



5.3 Evaluación de la resistencia del probiótico a las condiciones gastrointestinales in vitro.

Para determinar si el microorganismo presente en la azúcar de dieta cumple con los requisitos establecidos por la OMS/FAO para ser considerado como probiótico se evaluó la resistencia in vitro de la cepa al tracto gastrointestinal, así como la resistencia a bebidas con pH ácido y bebidas calientes. El porcentaje de sobrevivencia de las células a las condiciones gástricas y sales biliares se determinó mediante la fórmula que se detalla a continuación:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\text{Log UFC } N_1}{\text{Log UFC } N_0} \times 100$$

Donde:

N_0 : recuento de colonias al tiempo cero.

N_1 : recuento de colonias después de haber incubado por 4 horas.

Obteniéndose el resultado que se presenta en la tabla N°10

Para determinar el porcentaje de sobrevivencia de las células en bebidas de pH ácido y bebidas calientes se hizo directamente contando las colonias presentes en cada placa Petri por el método de recuento en placa, obteniéndose el resultado que se presenta en la tabla N°10

Nota: estas pruebas se realizaron con sobres de azúcar de dieta con el lote número 1 que fue el lote en donde se obtuvo el crecimiento.

Tabla N°10. Resultados obtenidos de % de resistencia del microorganismo a las pruebas in vitro Gastrointestinales y de resistencia a bebidas.

	Acidez gástrica				Sales biliares		Resistencia en bebidas	
	pH 3		pH 8		T_0	T_1	pH= 3	Calientes
	T_0	T_1	T_0	T_1			pH acido	100°C
N° de colonias	-	-	-	-	4	2	-	-
% de supervivencia	0		0		50%		0	0

Donde:

-: Sin crecimiento de colonias

Se observa que no hubo supervivencia del microorganismo a las condiciones in vitro de acidez gástrica tanto a pH=3 y pH=8 en ambos tiempos obteniéndose 0 colonias; en la prueba de resistencia a sales biliares. El microorganismo

después de haber estado en contacto con bilis al 0.3% p/v hubo supervivencia de 4 colonias para un tiempo inicial y de 2 colonias para un tiempo final (4horas), siendo un porcentaje de supervivencia muy bajo.

Estos resultados demuestran que el microorganismo presente en la azúcar de dieta no cumple con las condiciones para ser considerado como probiótico.

En cuanto a los resultados obtenidos en resistencia del microorganismo a bebidas con pH ácido (pH=3) y bebidas calientes (100°C) se puede observar que no hubo resistencia a estas condiciones, debido a que en ambas condiciones no se obtuvieron crecimiento de colonias; por lo tanto, el microorganismo no presenta resistencia a estas condiciones en alimentos.

5.4 Cuantificación de mg de glucosa que es capaz de degradar el microorganismo presente en la azúcar de dieta.

5.4.1 Preparación de curva de calibración.

Se realiza una curva de calibración de glucosa para poder cuantificar la cantidad de glucosa presente en las muestras obtenidas del medio glucosado.

En 6 tubos vacíos se adicionarán mL con diferencia de 0.2 mL por cada tubo de estándar de glucosa de concentración 1 g/L, se adiciona agua para completar un mL, se adiciona 1 mL de reactivo DNS y 8 mL de agua destilada. (Ver tabla N°10)

Se preparó la curva de calibración de estándar de glucosa, esto con el fin de poder determinar la concentración de glucosa presente en las muestras.

Tabla N°11. Datos obtenidos en la lectura de los estándares para la elaboración de la curva de calibración.

Tubo	Concentración de glucosa en el tubo (g/L)	Absorbancia
St 0	0.0	0.000
St 1	0.2	0.017
St 2	0.4	0.031
St 3	0.6	0.053
St 4	0.8	0.069
St 5	1.0	0.099

Se preparó la curva de calibración de estándar de glucosa (ver Figura N|16), esto con el fin de poder determinar la concentración de glucosa presente en las muestras.

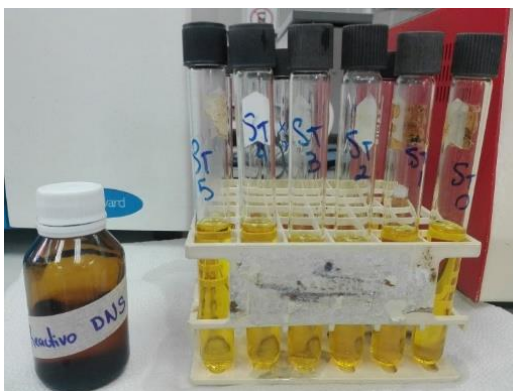


Figura N°16. Toma de muestras de estándares para la elaboración de la curva de calibración.

Una vez obtenidos los datos de absorbancia de los estándares se procedió a la tabulación de los datos en Excell para obtener la gráfica que se muestra en la Figura N° 17

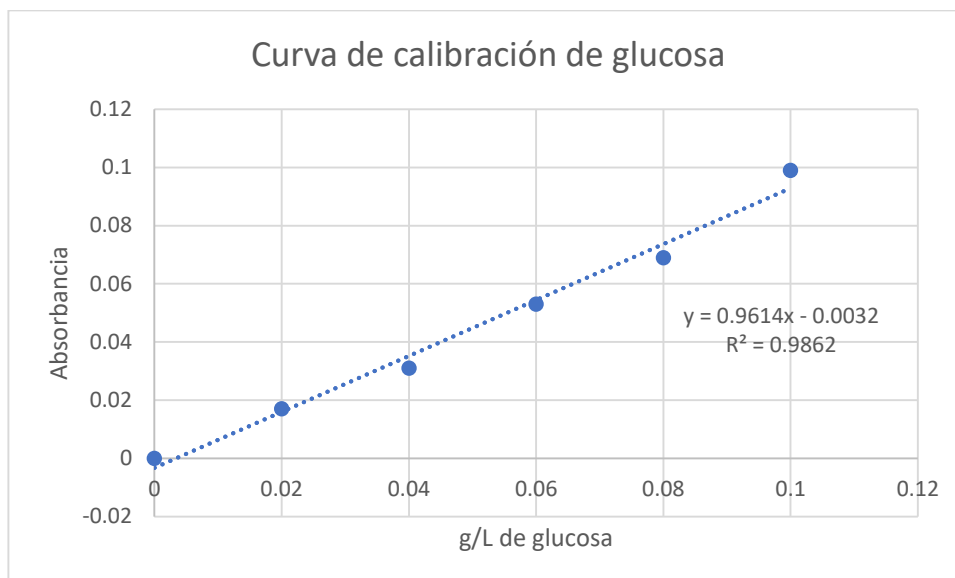


Figura N°17. Gráfico de curva de calibración de los estándares de glucosa.

5.4.2 Tratamiento de las muestras.

En primer lugar, se estandarizó el microorganismo a 1 unidad de absorbancia a 540 nm utilizando las placas con crecimiento de colonias: muestra número 1, 11 y 41.

Posteriormente se sembró el microorganismo estandarizado en medio glucosado esto con el fin de controlar los valores de glucosa en el medio y ser capaz de calcular los cambios de glucosa por el microorganismo.

A partir del microorganismo en el medio glucosado se procedió a tomar cada una de las muestras, Se tomaron 6 muestras a las 0, 24, 48,72 y 96 horas, esto con el fin de poder cuantificar la variación de miligramos de glucosa con respecto al tiempo.

Una vez obtenidas todas las muestras (ver Figura N°18), de acuerdo a la tabla N°6 se realizó la lectura de cada una de ellas en el espectrofotómetro ultravioleta a una longitud de onda de 540 nm.



Figura N°18. Toma de muestras para la cuantificación de gramos de glucosa presentes en cada una de las muestras de azúcar.

Con los valores de absorbancia de cada una de las muestras se procedió a calcular la cantidad de glucosa presente en cada muestra según las siguientes formula:

Ecuación de la curva de calibración.

$$y = 0.9614x - 0.0032$$

Ecuación para el cálculo de gramos de glucosa presente en las muestras.

$$x = \frac{y + 0.0032}{0.9614}$$

Tabla N°12. Gramos de glucosa presente en cada una de las muestras

Muestras	Absorbancia	g/L de glucosa
1	0.104	0.1115
2	0.108	0.1157
3	0.129	0.1375
4	0.155	0.1646
5	0.164	0.1739
6	0.176	0.1864

Con los datos obtenidos en la tabla N°12 se procedió a la elaboración de la gráfica en Excell, dicha grafica se muestra en la Figura N°19

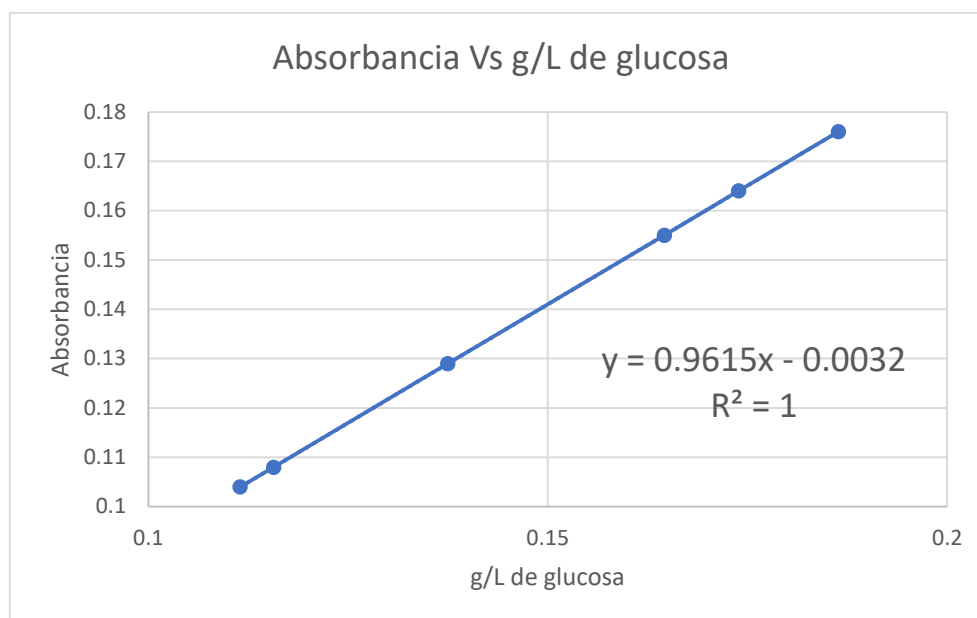


Figura N°19. Gramos de glucosa presente en cada muestra.

Según los datos obtenidos en la Figura N°19 se puede apreciar que hay un aumento en los niveles de glucosa con respecto al tiempo ya que los valores de absorbancia de las muestras dependen del tiempo; esto demuestra que el microorganismo presente en la azúcar de dieta comercial no es capaz de disminuir los niveles de glucosa, por el contrario, el microorganismo presente *Bacillus circulans* que es el que se identificó en la azúcar tiene la capacidad de aumentar los niveles de glucosa según lo observado en la gráfica.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La concentración del probiótico en la azúcar de dieta comercial rotula la presencia de 125 millones de UFC/sobre de *Bacillus coagulans*, sin embargo, se determinó que la concentración del microorganismo fue de 1,400 UFC/sobre de microorganismo; por lo tanto, no cumple con lo rotulado por el fabricante.
2. El microorganismo presente en el azúcar de dieta comercial, es el microorganismo *Bacillus circulans*, de acuerdo a las pruebas de identificación realizadas; por lo que *Bacillus coagulans* no está presente en lo que rotula el producto.
3. *Bacillus circulans* no cumple con los requisitos determinados por la OMS/FAO para ser considerado un probiótico, debido que al realizarse las pruebas in vitro de resistencia gástrica pH3 y pH8, y bilis al 0.3% p/v este microorganismo no es capaz de sobrevivir al tracto gastrointestinal y ejercer un efecto beneficioso en el ser humano, por lo que no puede ser catalogado como probiótico.
4. El microorganismo *Bacillus circulans* no es capaz de sobrevivir a las condiciones de pH ácido y de temperatura (100°C) en alimentos, específicamente en bebidas ácidas y calientes, obteniéndose un porcentaje de 0% de supervivencia en ambos casos.
5. De acuerdo a los resultados obtenidos se determina que el microorganismo *Bacillus circulans* no tiene la capacidad de disminuir los niveles de glucosa, ya que los datos obtenidos mediante el método DNS al ser graficados muestran una gráfica con línea ascendente, por lo cual el microorganismo *Bacillus circulans* tiene la capacidad de aumentar los niveles de glucosa.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Para las autoridades reguladoras de alimentos verificar la presencia y concentración de productos que rotulen la presencia de probióticos en alimentos a los fabricantes que adicionan un valor agregado.
2. Realizar análisis de estabilidad del microorganismo *Bacillus coagulans* en futuras investigaciones para comprobar si este se mantiene viable al ser incorporado en la azúcar de dieta y su posterior uso en alimentos.
3. Hacer en futuras investigaciones análisis microbianos durante el proceso de extracción de la caña de azúcar que es utilizada para la elaboración del edulcorante; debido a que el microorganismo *Bacillus circulans* se encuentra principalmente en el suelo y es probable que sea el medio de contaminación por el que se encuentre presente en la azúcar de dieta.
4. Realizar pruebas adicionales de supervivencia para determinar los diferentes alimentos y bebidas en los cuales *Bacillus coagulans* pueda sobrevivir incluyendo pruebas de temperaturas y de pHs como los realizados en esta investigación.
5. Determinar en futuras investigaciones cuáles son los metabolitos capaces de producir *Bacillus circulans* como productos de fermentación al aumentar los niveles de glucosa en sangre.

BIBLIOGRAFIA

1. Alimentos Argentinos (2014), Nutrición y educación alimentaria. Recuperado el 28 de Mayo de 2018, de https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/escuelagro/_archivos/000010_Alimentos/000000_Educacion%20Alimentaria/000000_Ficha%20Edulcorantes.pdf
2. Alonso, J. R. (2010). Edulcorantes naturales. LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida, 12(2). Recuperado el 30 de Mayo de 2018 a partir de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=476047396002>
3. BioMérieux, INC (2005). API 50 CHB/E médium. Recuperado el 28 de Mayo de 2018, de http://www.biologiemarine.com/_fiches/APIpdf/api50%20CHBE%20Medium-_07964_-_F_-_50430.pdf
4. Castillo Grande, S. E., & Segura Figueroa, L. E. (2015). Evaluación in vitro de un suplemento alimenticio comercial que contiene *Bacillus coagulans* como probiótico para el tratamiento preventivo de listeriosis (bachelor). Universidad de El Salvador. Recuperado el 19 de Mayo de 2018 a partir de <http://ri.ues.edu.sv/9330/>
5. Castro, L. A.; Rovetto C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. Colombia Médica, 37(4). Recuperado el 07 de junio de 2018, de <http://www.bioline.org.br/pdf/rc06060>
6. Chanitnun, K., & Pinphanichakarn, P. (2012). Glucose(xylose) isomerase production by *Streptomyces* sp. CH7 grown on agricultural residues. Brazilian Journal of Microbiology, 43(3), 1084-1093. Recuperado el 22 de Mayo de <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000035>

7. Cuellar, L. I. & Funes, M. A. (2013). Determinación de aspartame, acesulfame k y sucralosa por espectrofotometría ultravioleta visible e infrarrojo en jugos dietéticos comercializados en el municipio de Soyapango. Universidad de El Salvador.
8. Cueto, M. (2010), Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Actual Biol 32, 130-131.
9. Durán A, S., Cordón A, K., & Rodríguez N, M. del P. (2013). Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. Revista chilena de nutrición. Recuperado de <http://doi.org/10.4067/S0717-751820130003000>
10. ELIKA, (2017). Aditivos. Recuperado el 30 de Mayo de 2018 a partir de http://www.elika.eus/datos/guias_documentos/Archivo14/folleto_aditivos.pdf
11. Enzineti cupiig (2010). Bradford y DNS. Recuperado el 07 de Junio de 2018, a partir de <https://sites.google.com/site/enzineti cupiig/bradford-y-dns>
12. FAO y OMS (2016), Norma general para los aditivos alimentarios. Recuperado el 07 de Junio de 2018, de http://www.fao.org/gsfonline/docs/CXS_192s.pdf
13. FDA, (2018). Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). Recuperado 22 de abril de 2018, a partir de <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm>

14. Fernández A.; García C.; Saéz J.; Valdezate S., (2010), "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología", España, 4-6.
15. Ferrer B.; Dalmau J. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Acta pediátrica española*, 59(3), 150-153.
16. Ibáñez, F. C.; Torres, P.; Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios. Universidad pública de Navarra. Recuperado el 28 de Mayo de 2018, de <https://doi.org/10.22490/25394088.1096>
17. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (2018). Riesgos y beneficios de los sustitutos de azúcar (edulcorantes). Recuperado el 05 de junio de 2018, de [http://www.innsz.mx/documentos / diabetes/7.%20Sustitutos%20de%20azucar.pdf](http://www.innsz.mx/documentos/diabetes/7.%20Sustitutos%20de%20azucar.pdf)
18. Jenson I. (2014), "Detection by Classical Cultural Techniques", *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 1, North Sydney, Australia. 135-138.
19. Krausse, A., Gould, F. y Forty, J. (1999), Prosthetic Heart Valve Endocarditis Caused by *Bacillus circulans*, *Journal of Infection*, 39(2), 102-162.
20. Libreros López, M. L., & Porrás Marino, J. (2012). Adición de *Bacillus Coagulans* (*Lactobacillus Sporogenes*) a una Mezcla en Polvo a Base de Cereales Instantáneos. *Publicaciones e Investigación*. Recuperado el 15 de Junio de <https://doi.org/10.22490/25394088.1096>

21. Márquez, F. J. (2007). Aislamiento y taxonomía de bacterias del género bacillus recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Recuperado el 05 de Junio de 2018, de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcm357a/doc/fcm357a.pdf>
22. Martínez-Cuesta, M. C., Peláez, C., & Requena, T. (2012). PROBIÓTICOS EN LA SALUD HUMANA, 13.
23. Nevella Probiotics Spanish. (s. f.). Nevella con probióticos. Recuperado 13 de mayo de 2018, a partir de http://www.nevella.com/probiotics/spanish/about_sp.html
24. Organización Mundial de Gastroenterología (2011). Probióticos y prebióticos. Recuperado el 28 de Mayo de 2018, de <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-spanish-2011.pdf>
25. Organización Mundial para la Salud (2018), Aditivos alimentarios. Recuperado el 05 de Junio de 2018, de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-additives>
26. Organización Mundial para la Salud, (2017). Diabetes. Recuperado el 05 de Junio de 2018, de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
27. Pascual, M.R. y Calderón, V. (2ª. Ed.). (2000). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. (pp. 9-10). Madrid, España: Díaz de Santos.

28. Rondon, L., Añez Zavala, M., Salvatierra Hidalgo, A., Barrios, M., Teresa, R., Rodriguez, H., & Teresa, M. (2015). Probióticos: generalidades. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría, 78(4), 123-128. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-06492015000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
29. Sahoo, D., Kar, R. y Das, R. (1992), Bioaccumulation of Heavy Metals Ions by *Bacillus circulans*, Bioresource Technology, 41(2), 177-179.
30. SERNAC (2004), Aditivos alimentarios: Definiciones básicas e información para uso responsable. Recuperado el 20 de Mayo de 2018, de <http://www.administracion.usmp.edu.pe/institutoconsumo/wp-content/uploads/2013/08/Aditivos-alimentarios.-2004-SERNAC.pdf>
31. Soni, M. (2015), GRAS Notification for *Bacillus coagulans* SNZ1969 spore preparation. Recuperado el 05 de Agosto del 2018, de <https://www.fda.gov/downloads/food/ingredientpackaginglabeling/gras/noticeinventory/ucm475920.pdf>
32. Universidad Tecnológica Nacional, Cátedras (2015), Edulcorante. Recuperado el 07 de Junio de 2018, de https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/alimentos/ckfinder/files/consumo%20Edulcorantes.pdf
33. Vidhyalashmi, R., Valli, N. y Narendra, G. (2016). *Bacillus circulans* exopolysaccharide: Production, characterization and bioactivities, International Journal of Biological Macromolecules, 87, 405-414.

34. Zea, J.M.V. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calastro de cerdas de granjas del Aburrá sur. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 05 el Agosto de 2018. De <http://bdigital.unal.edu.co/45835/1/32255433.2014.pdf>

GLOSARIO

Aditivo alimentario: se refiere a cualquier sustancia que, independientemente de su valor nutricional, se añade intencionadamente a un alimento con fines tecnológicos en cantidades controladas. (12)

Alimento funcional: Son productos nutritivos y no nutritivos que, no sólo alimentan, sino que actúan sobre determinadas funciones del organismo, producen un efecto beneficioso nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de algunas enfermedades. (12)

Cepa: Unidad taxonómica. La cepa o clon puede considerarse como una población de características idénticas. (20)

Edulcorante: Los Edulcorantes son sustancias que se emplean como sustituto del azúcar, ya que tienen la capacidad de endulzar y mejorar el sabor de algunos alimentos y bebidas sin aportar calorías. (13)

Enzima: Proteína soluble producida por las células del organismo, que favorece y regula las reacciones químicas en los seres vivos. (20)

Generalmente reconocido como seguro: GRAS (por sus siglas en inglés “Generally Recognized As Safe.”) es un aditivo alimentario, que se agrega intencionalmente a los alimentos que está sujeto a la revisión y aprobación previa a la comercialización por la FDA, a menos que la sustancia generalmente se reconoce, entre expertos cualificados, como si hubieran sido demostrado adecuadamente para ser seguro en las condiciones de su uso previsto, o que el uso de la sustancia se estén excluidas de la definición de un aditivo alimentario. (13)

Ingesta Diaria Aceptable: debe entenderse como aquel nivel de ingesta (expresada en mg/K de peso corporal) frente al cual no hay una apreciación de riesgo, que son usadas como medida de seguridad de una sustancia a dicho nivel de ingesta. (12)

Microbiota intestinal: conjunto de bacterias que viven en el intestino, en una relación de simbiosis tanto de tipo comensal como de mutualismo. Este conjunto forma parte de la microbiota normal. (28)

Patógeno: aquel elemento o medio capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en el cuerpo de un animal, un ser humano o un vegetal, cuyas condiciones estén predispuestas a las ocasiones mencionadas. (28)

Probiótico: Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo huésped. (13)

ANEXOS

ANEXO N°1

**PROCEDIMIENTOS PARA COMPROBACION DE LA PRESENCIA DEL
PROBIOTICO EN AZUCAR DE DIETA COMERCIAL**

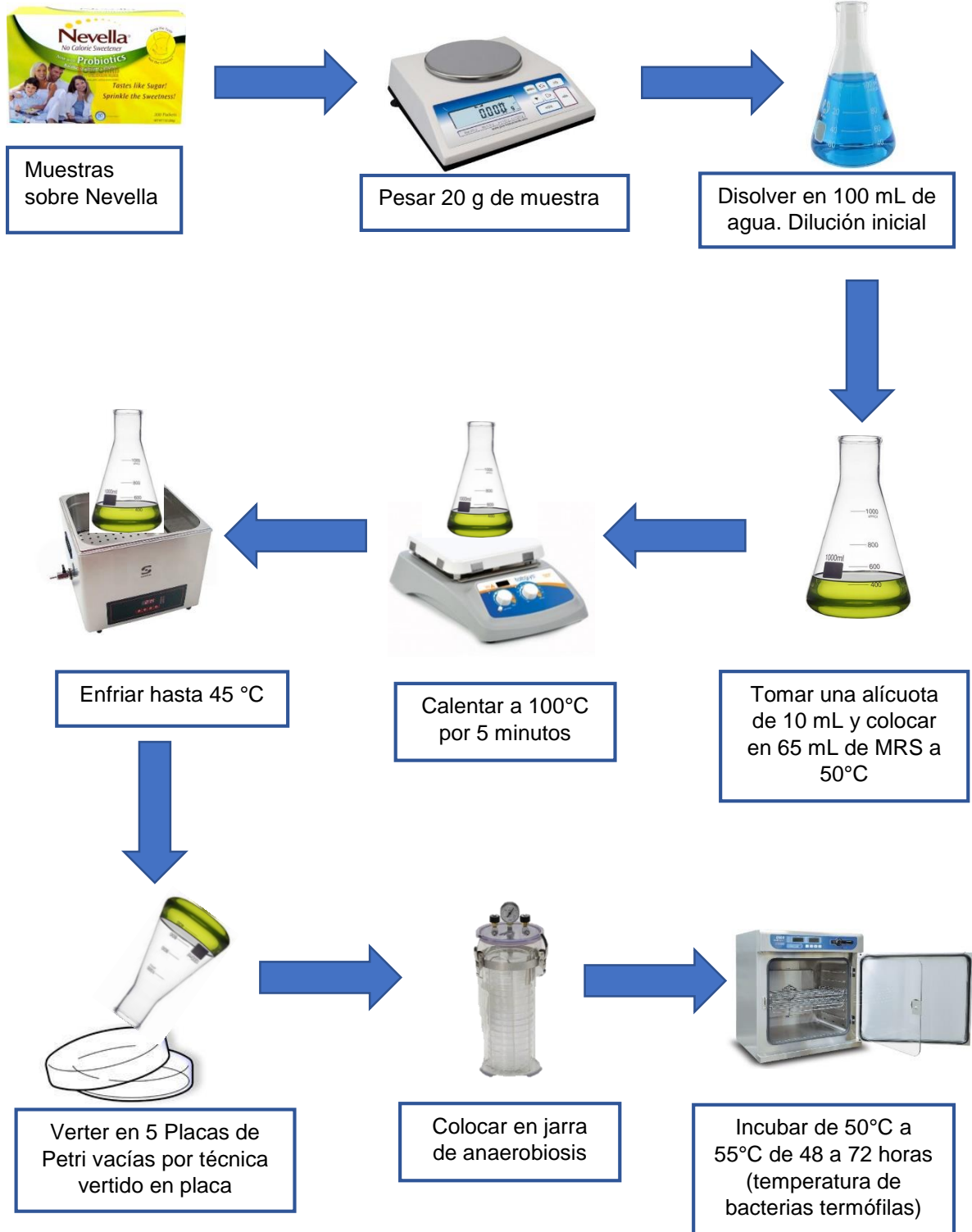


Figura N°20. Comprobación de la presencia del probiótico presente en azúcar de dieta comercial.

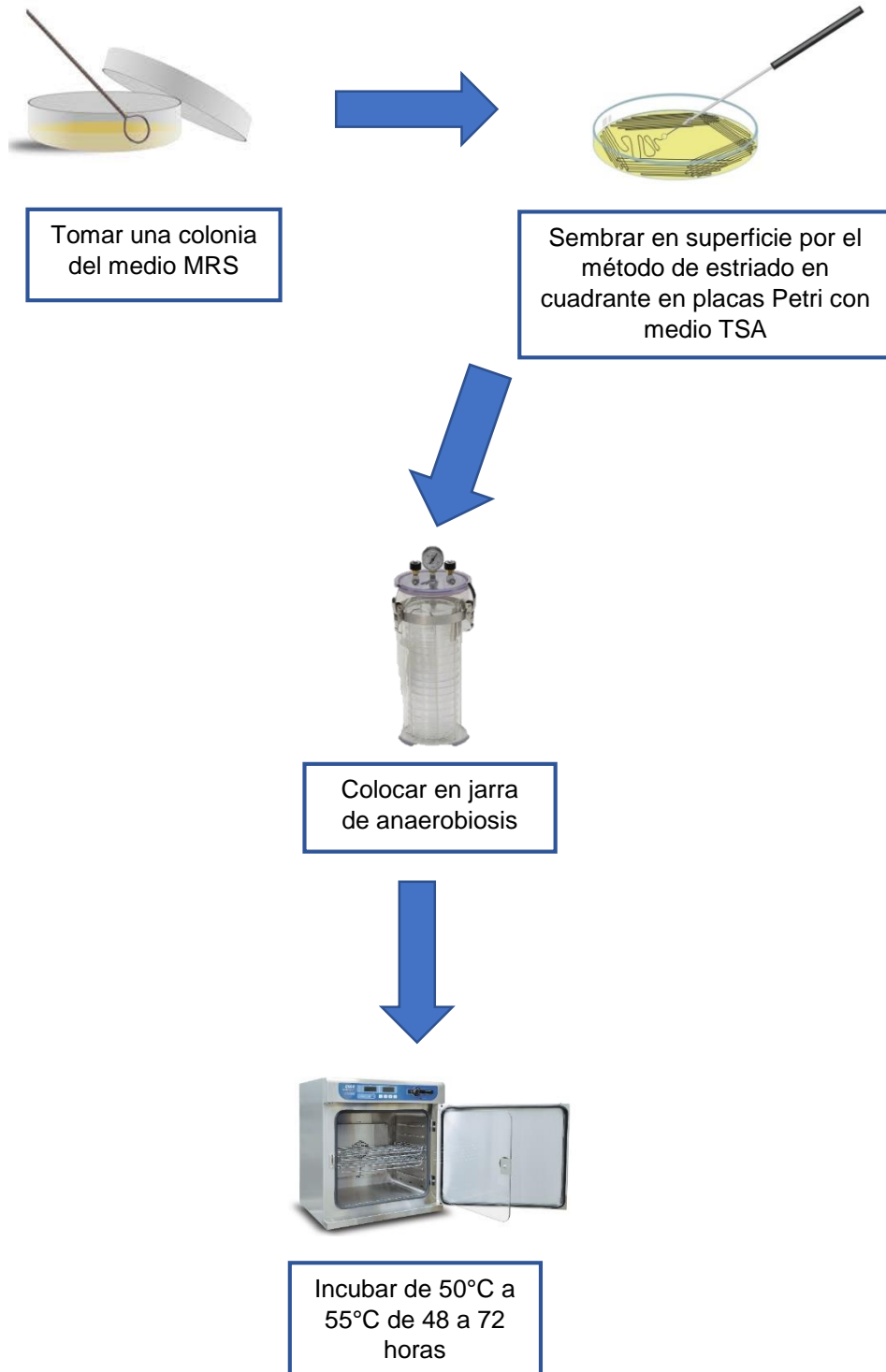


Figura N°21. Siembra del microorganismo en medio de Agar Tripticasa Soya (TSA)

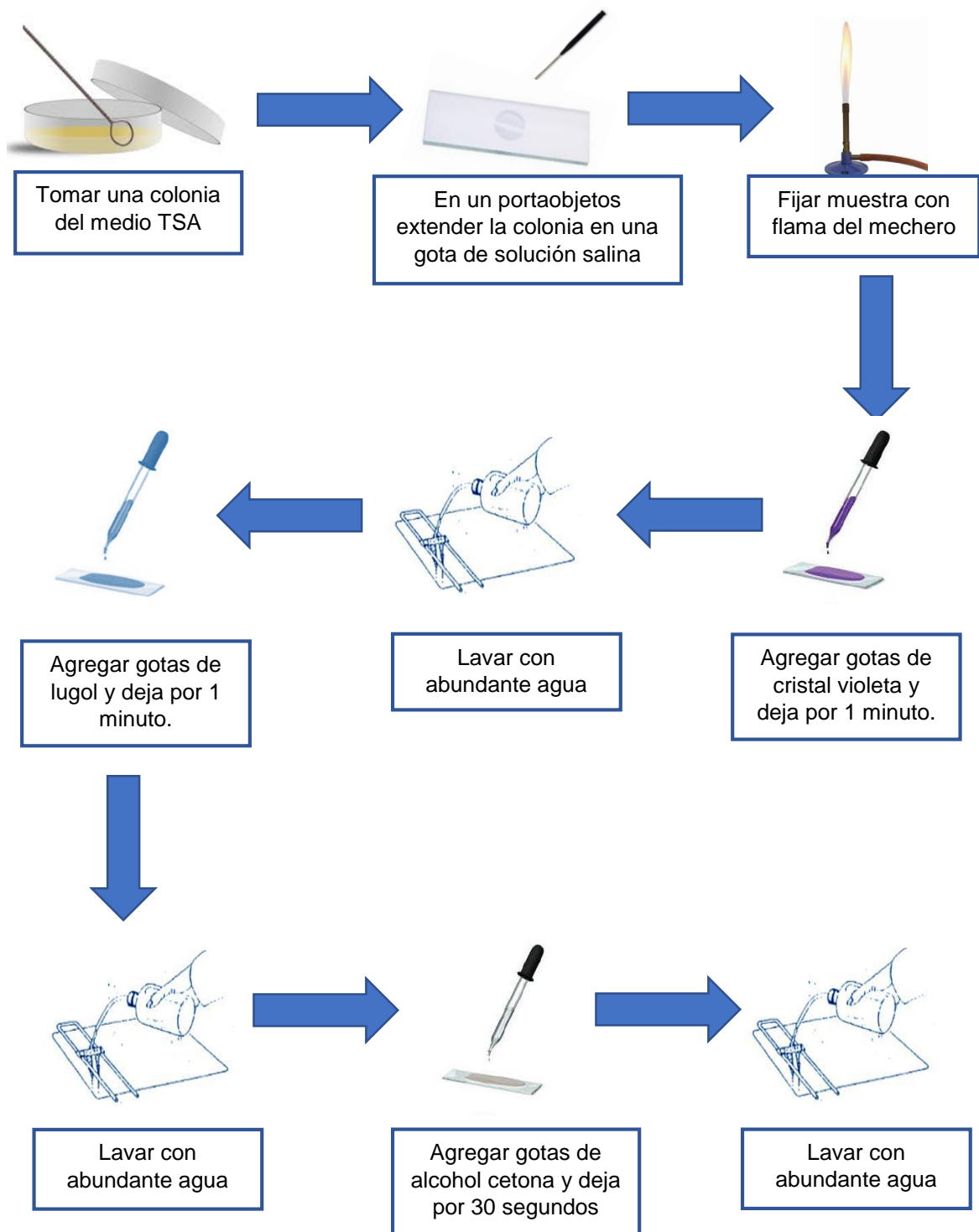


Figura N°22. Frotis bacteriano y Tinción Gram

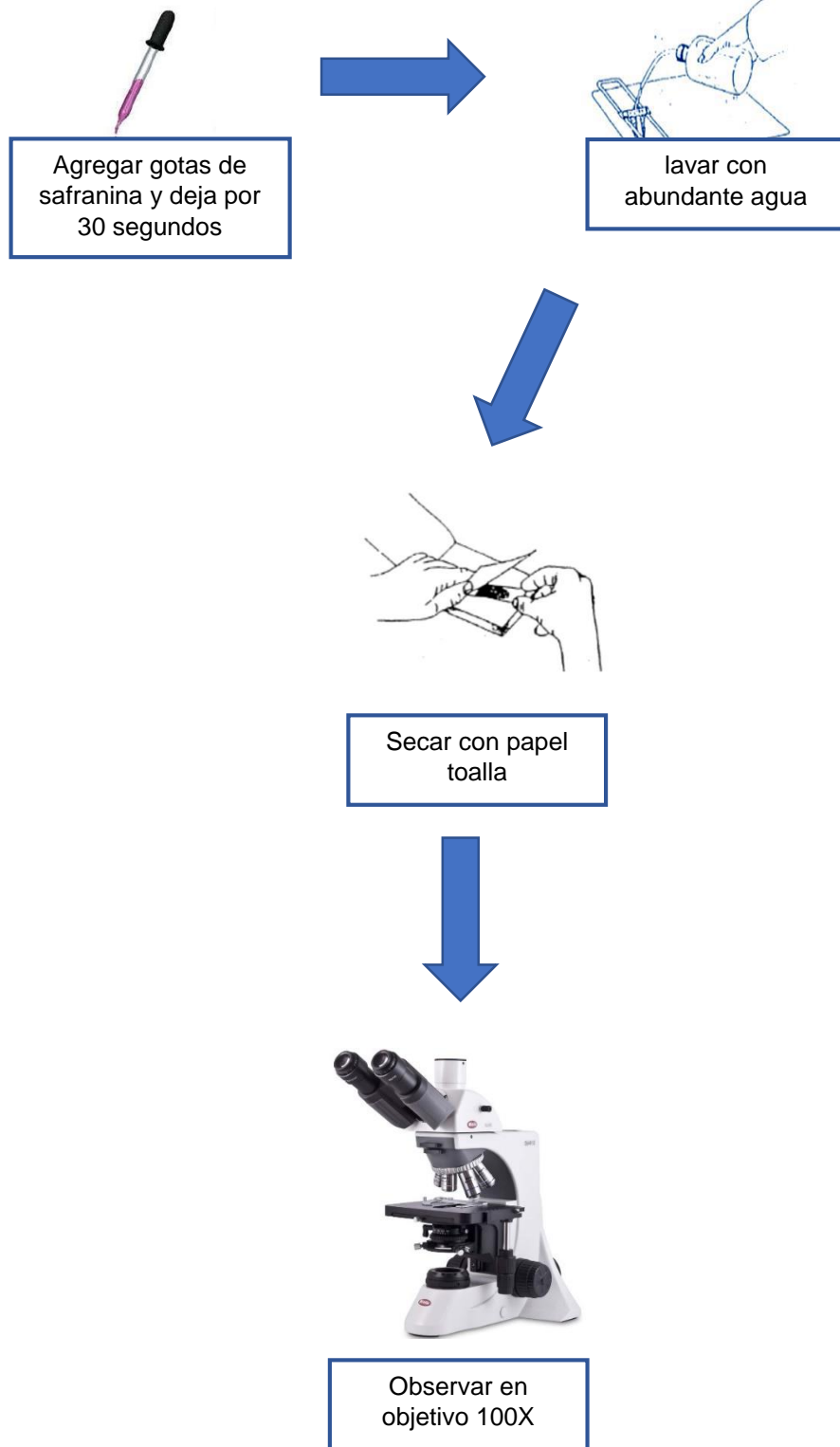


Figura N°22. Continuación.

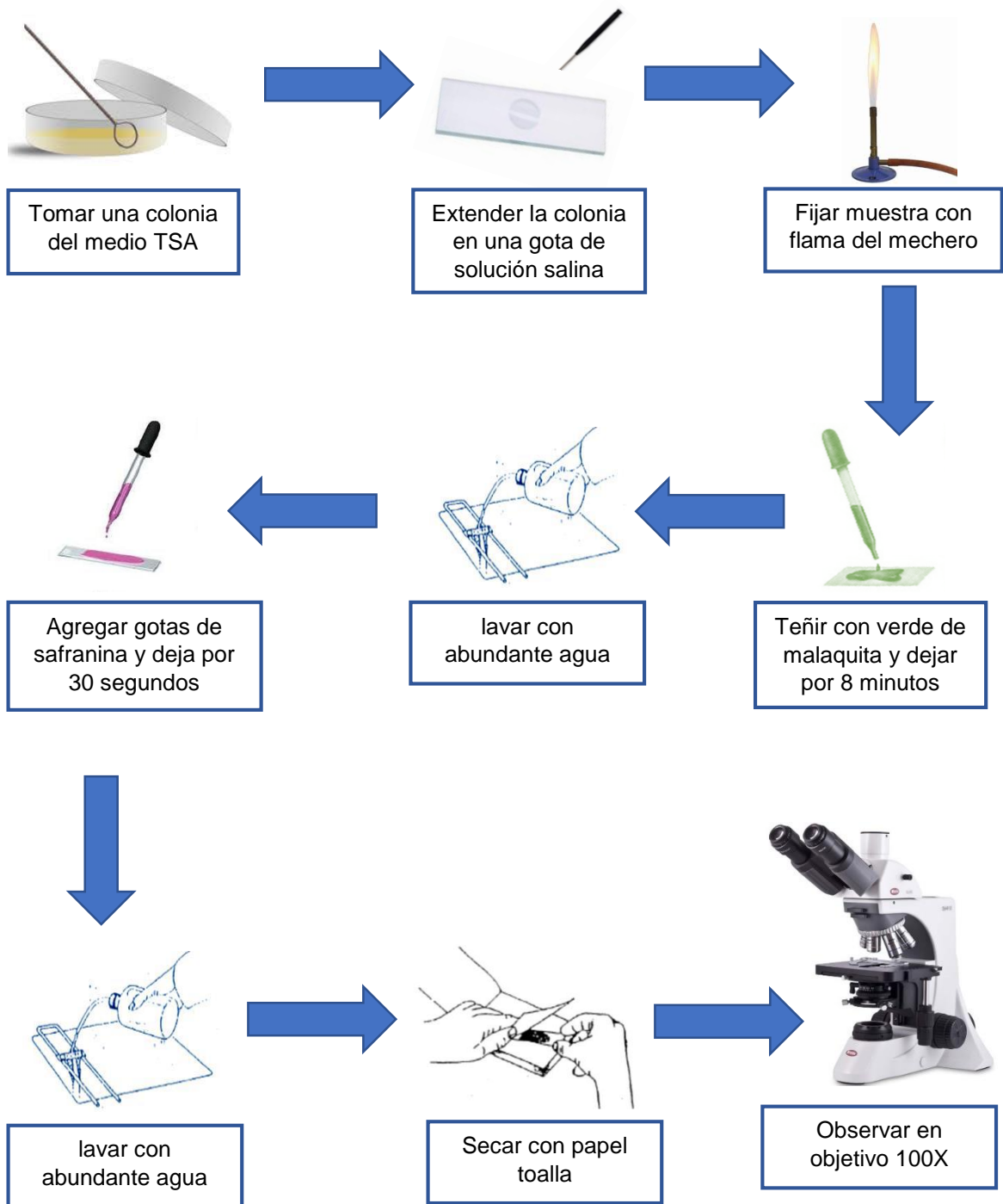


Figura N°23. Frotis bacteriano y tinción de Wirts para observar presencia de endosporas.

ANEXO N°2

**PROCEDIMIENTOS PARA LA IDENTIFICACION DEL PROBIOTICO
PRESENTE EN AZUCAR.**

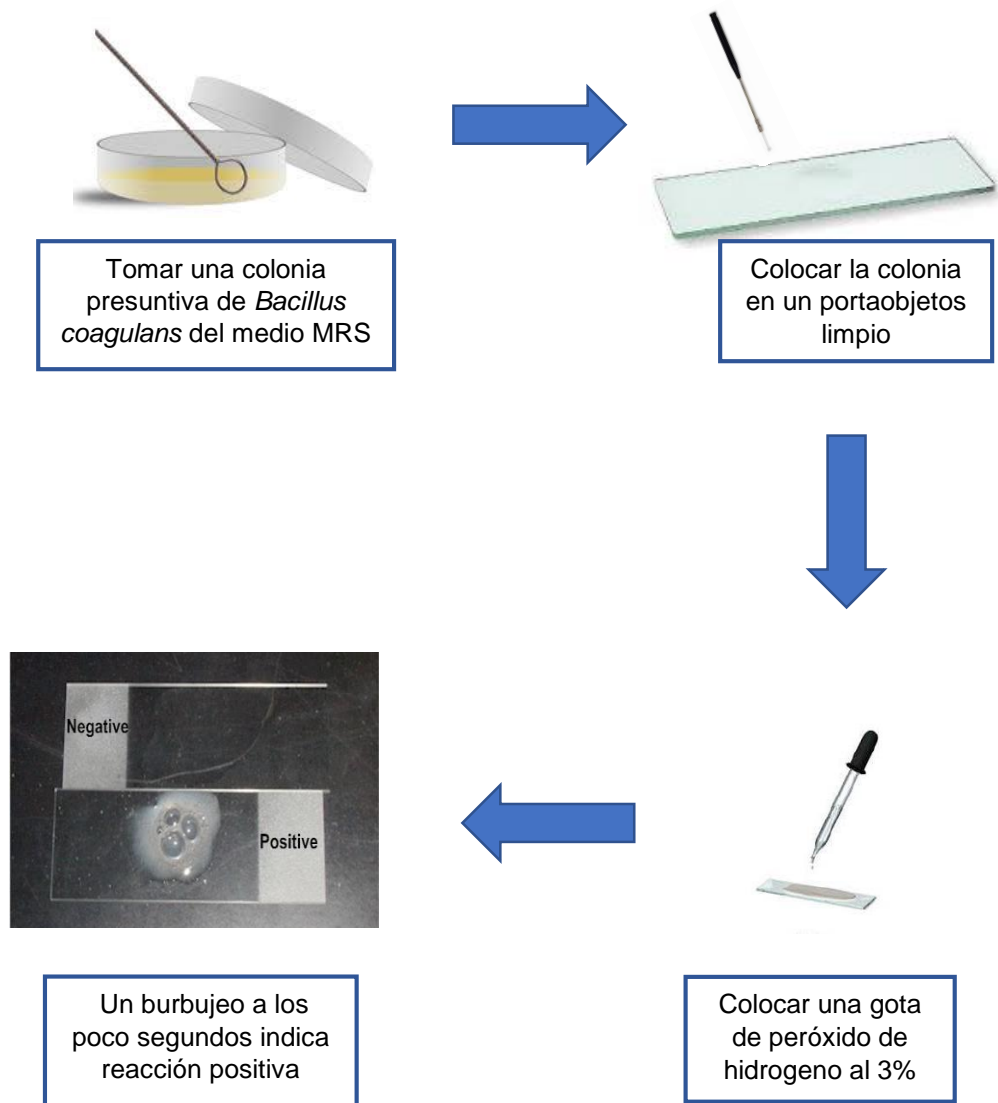


Figura N°24. Procedimiento de prueba de la catalasa.

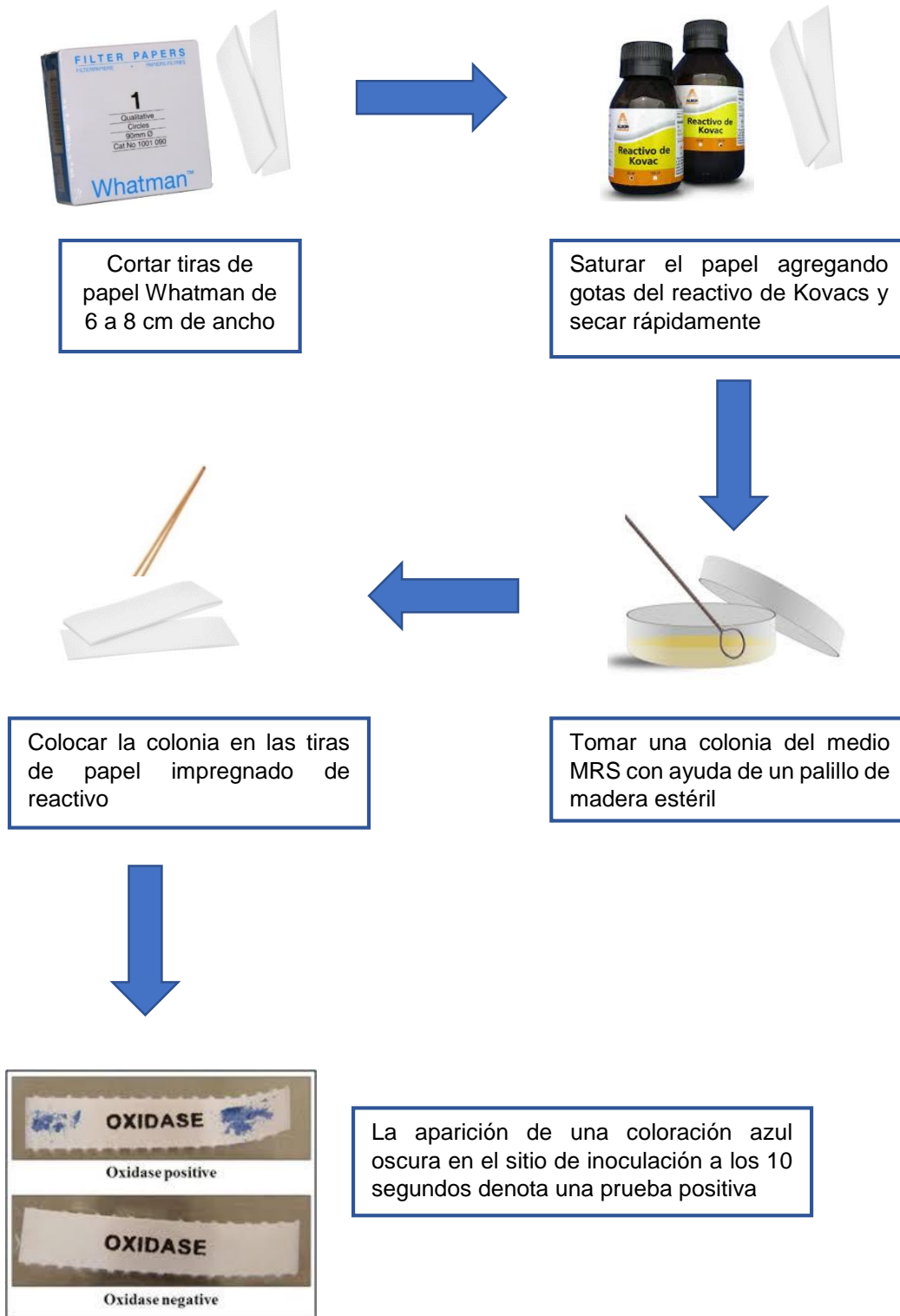
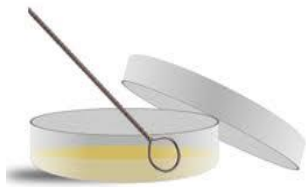


Figura N°25. Esquema de realización de prueba de la oxidasa.



Tomar colonias del microorganismo en estudio y adicionarlos a una apolla de medio API CHB/E



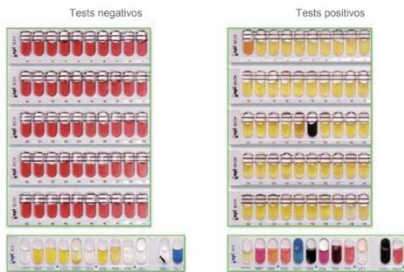
Comparar turbidez con McFarland 2.0



Incubar de 50°C a 55°C de 24 a 48 horas



Llenar los tubos con el medio con el cuidado de no dejar burbujas



Realizar lecturas

Figura N°26. Procedimiento para la identificación de *Bacillus coagulans* mediante galería API® 50CHB.

ANEXO N°3
PROCEDIMIENTO PARA EL RECuento TOTAL DEL PROBIÓTICO
PRESENTE EN AZUCAR DE DIETA

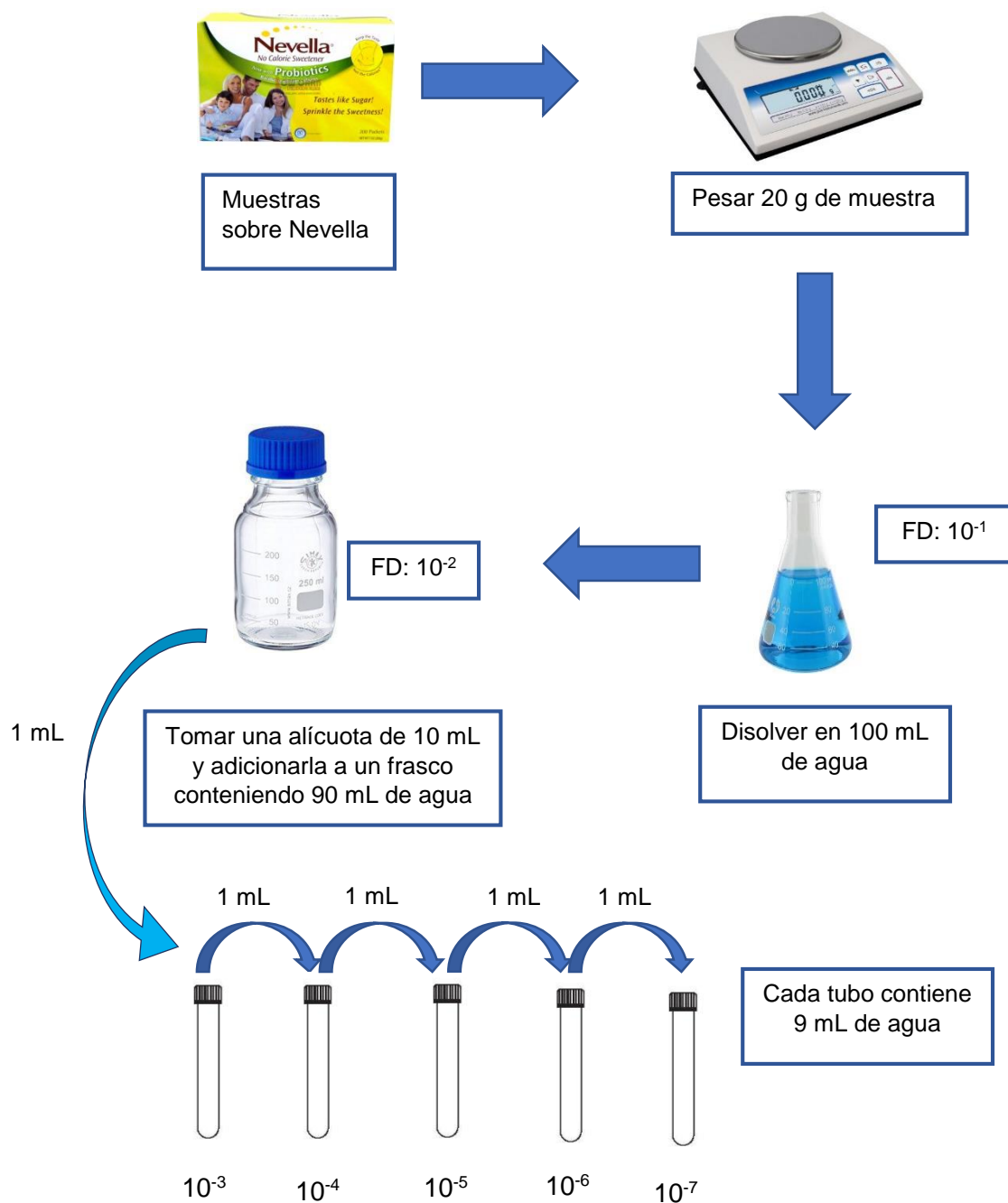


Figura N°27. Esquema para la comprobación de la concentración del probiótico presente en la azúcar de dieta.

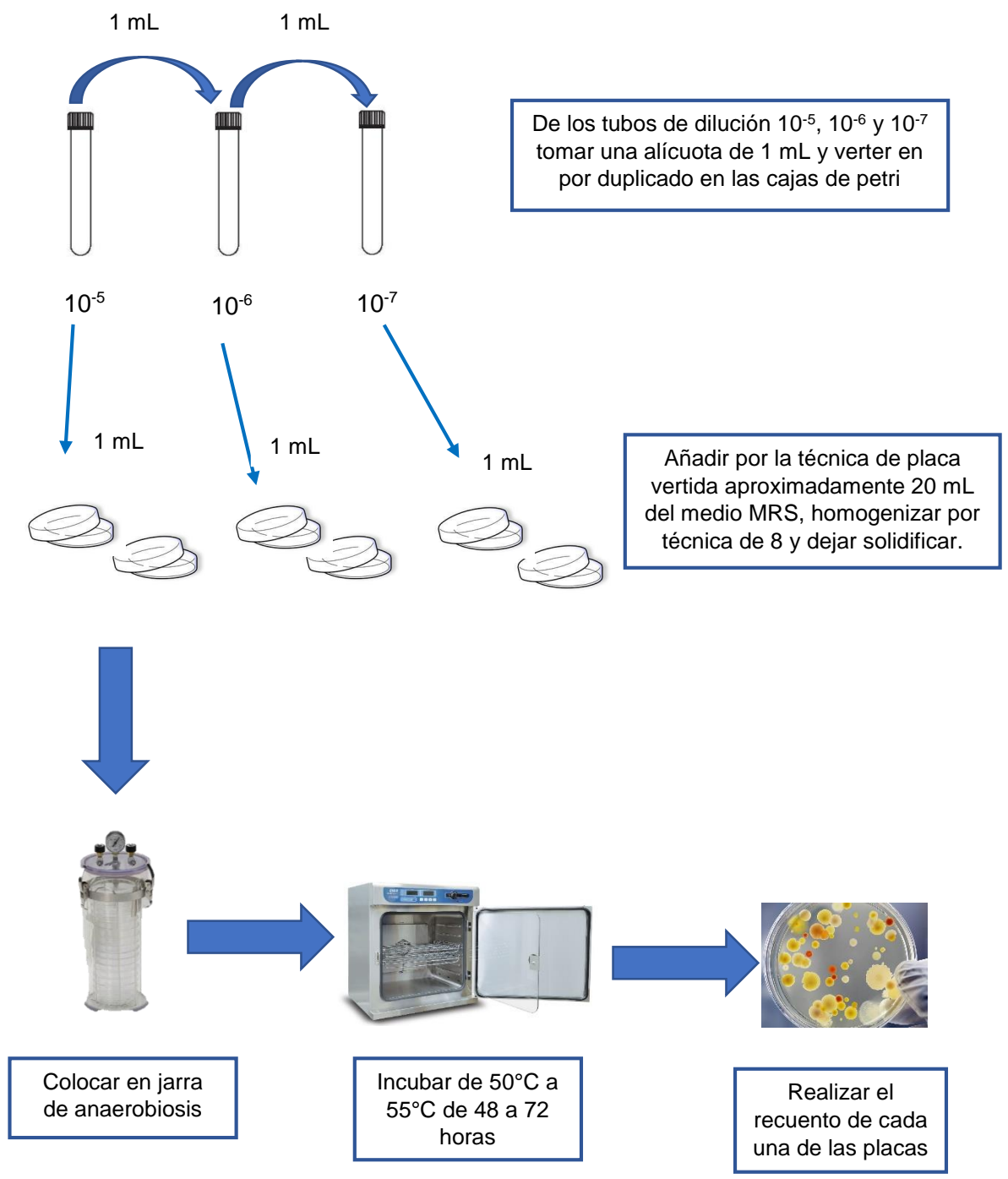


Figura N°27. Continuación.

ANEXO N°4

**PROCEDIMIENTOS PARA VERIFICAR LA RESISTENCIA DEL PROBIOTICO
PRESENTE EN AZÚCAR DE DIETA A LAS CONDICIONES
GASTROINTESTINALES *in vitro***

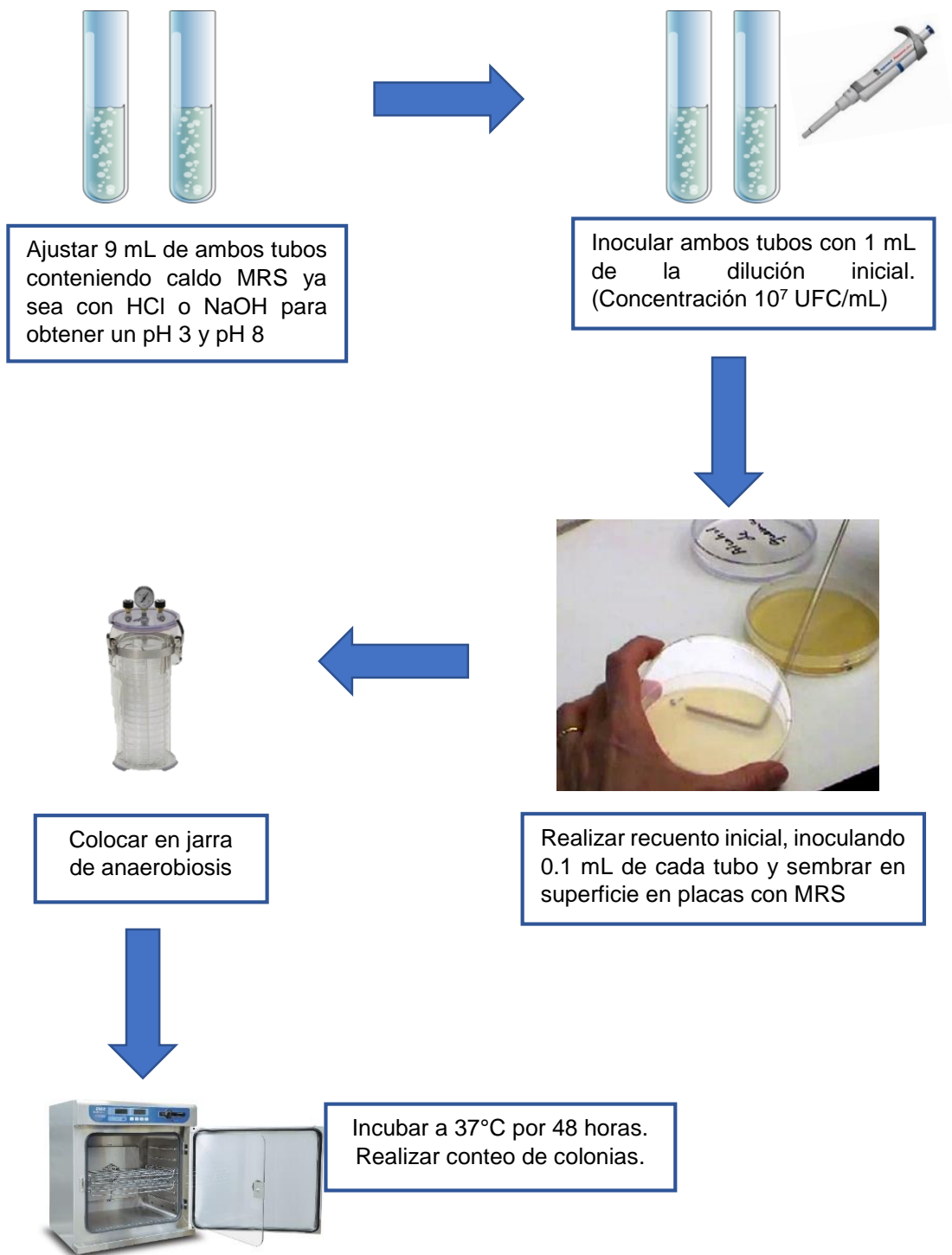


Figura N°28. Procedimiento para calcular recuento del probiótico presente en azúcar de dieta a tiempo inicial para variaciones de pH

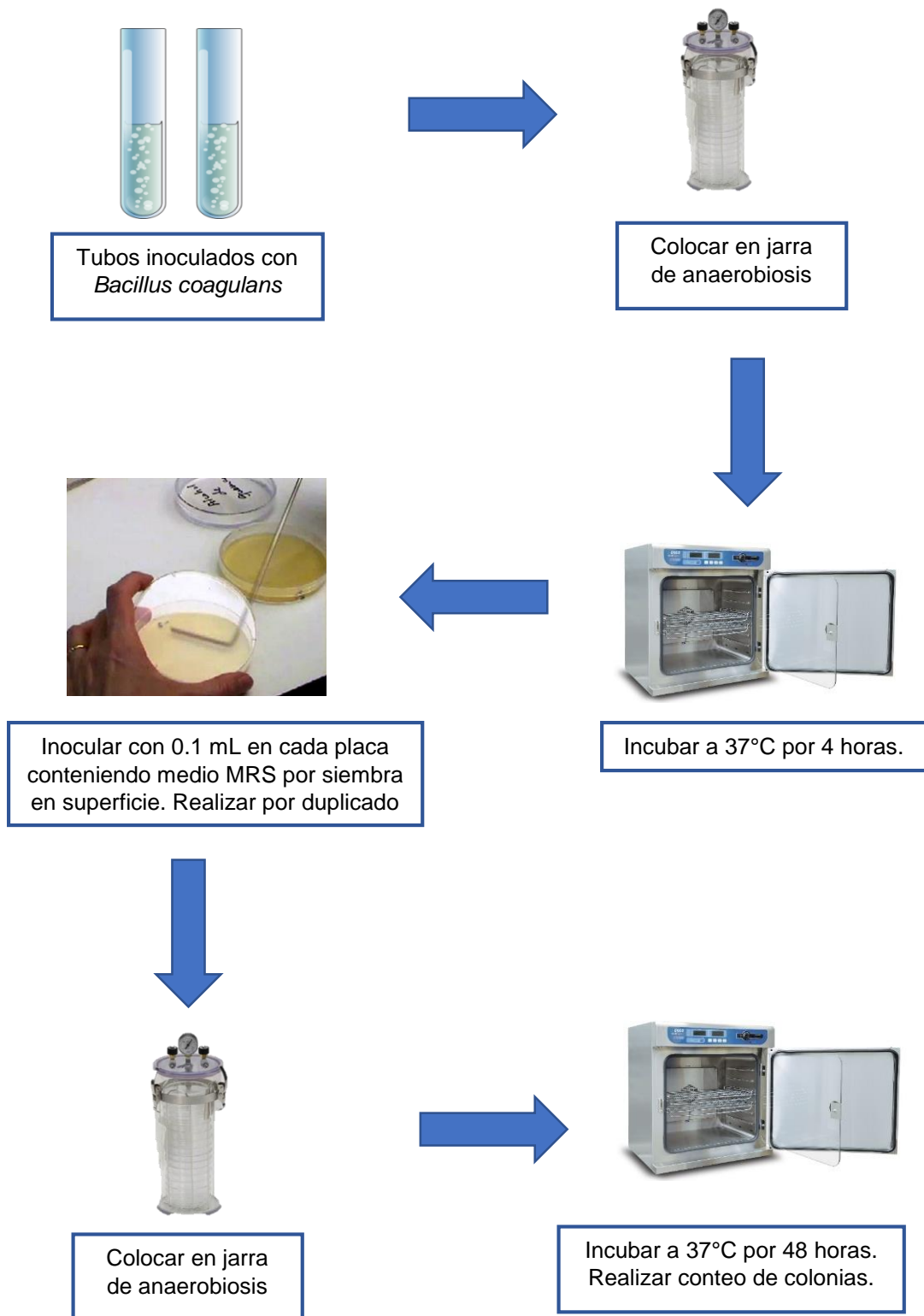


Figura N°29. Procedimiento verificar supervivencia del probiótico presente en azúcar de dieta a variaciones de pH

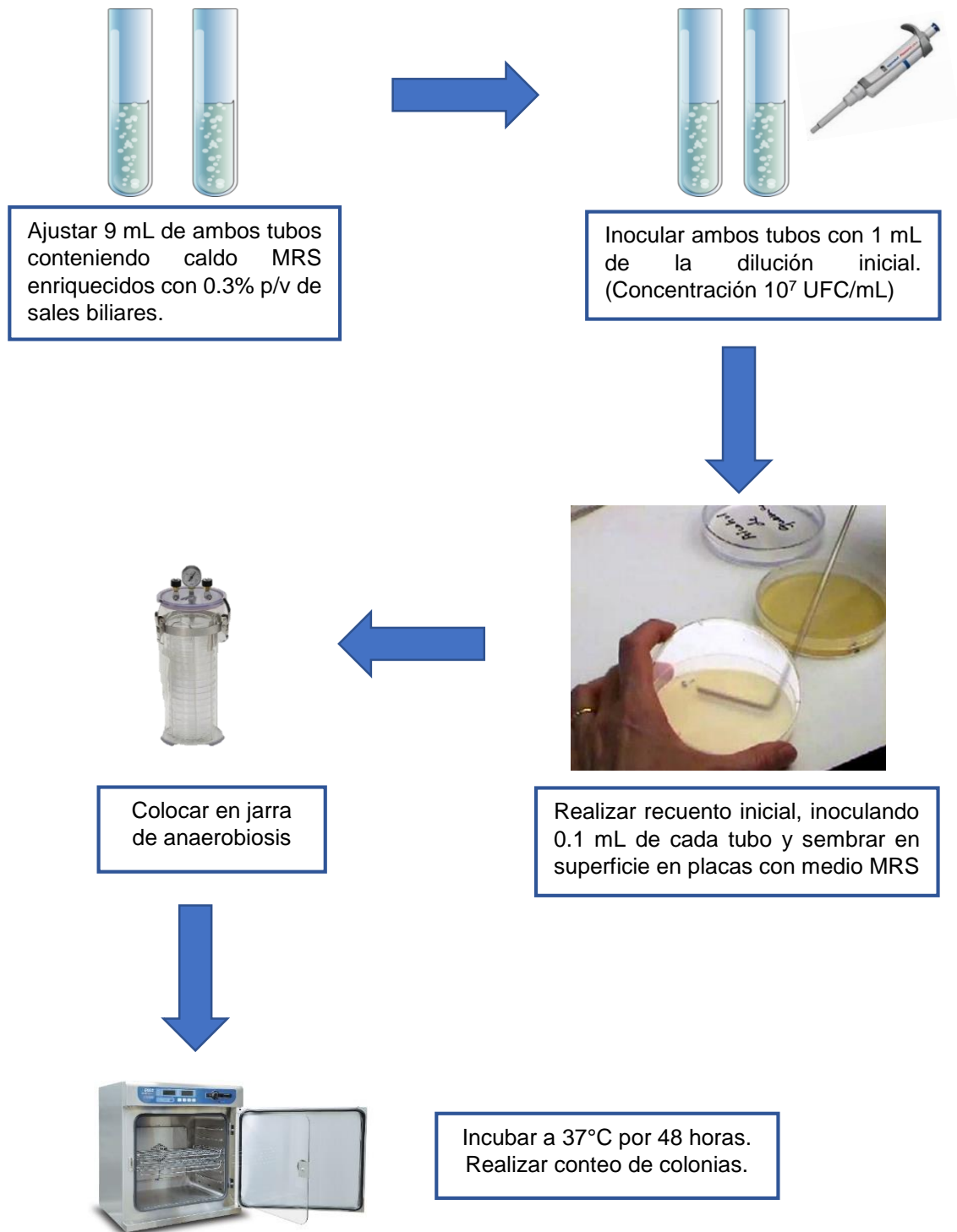


Figura N°30. Procedimiento para calcular recuento del probiótico presente en azúcar de dieta a tiempo inicial de sales biliares

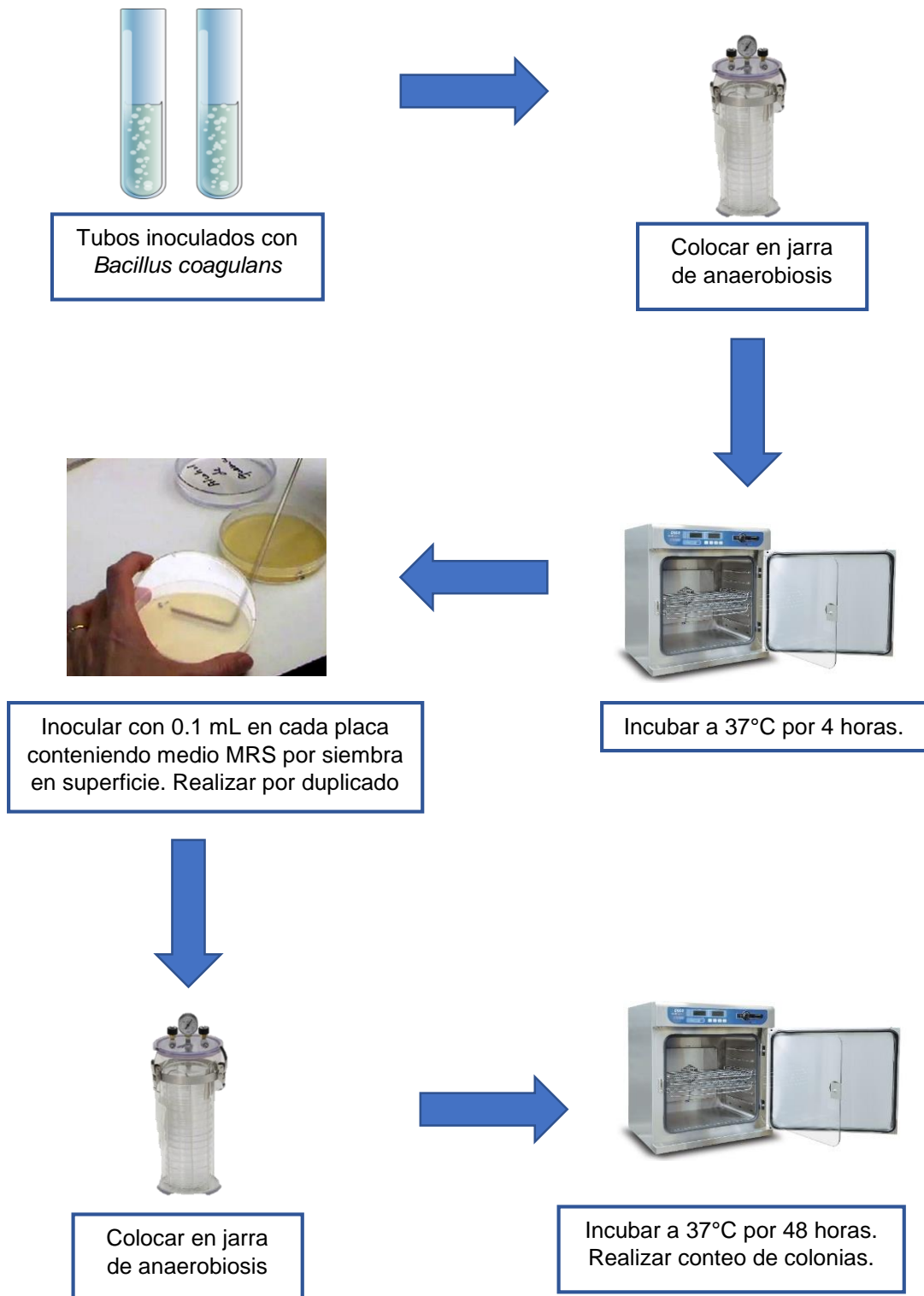


Figura N°31. Procedimiento verificar resistencia del probiótico presente en azúcar de dieta a sales biliares

ANEXO N°5
PROCEDIMIENTOS PARA DETERMINAR LA RESISTENCIA DEL
PROBIOTICO A CAMBIOS DE pH Y TEMPERATURA EN BEBIDAS ACIDAS
Y CALIENTES.

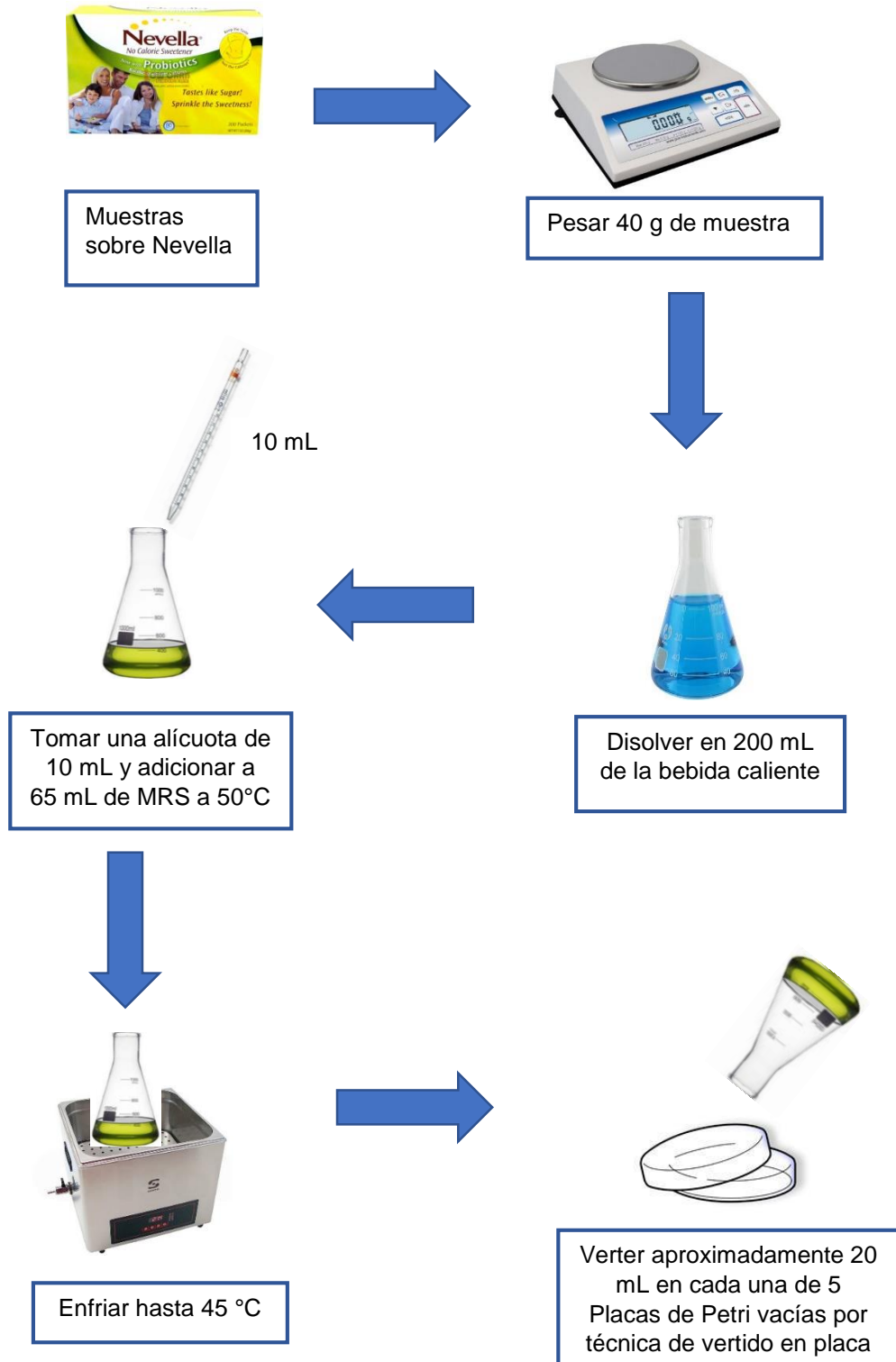


Figura N°32. Esquema del proceso de la resistencia del probiótico presente en azúcar de dieta a bebidas calientes.



Colocar en jarra de anaerobiosis



Incubar de 50°C a 55°C de 48 a 72 horas



Observar morfología en objetivo 100X y realizar tinción de Gram

Figura N°32. Continuación

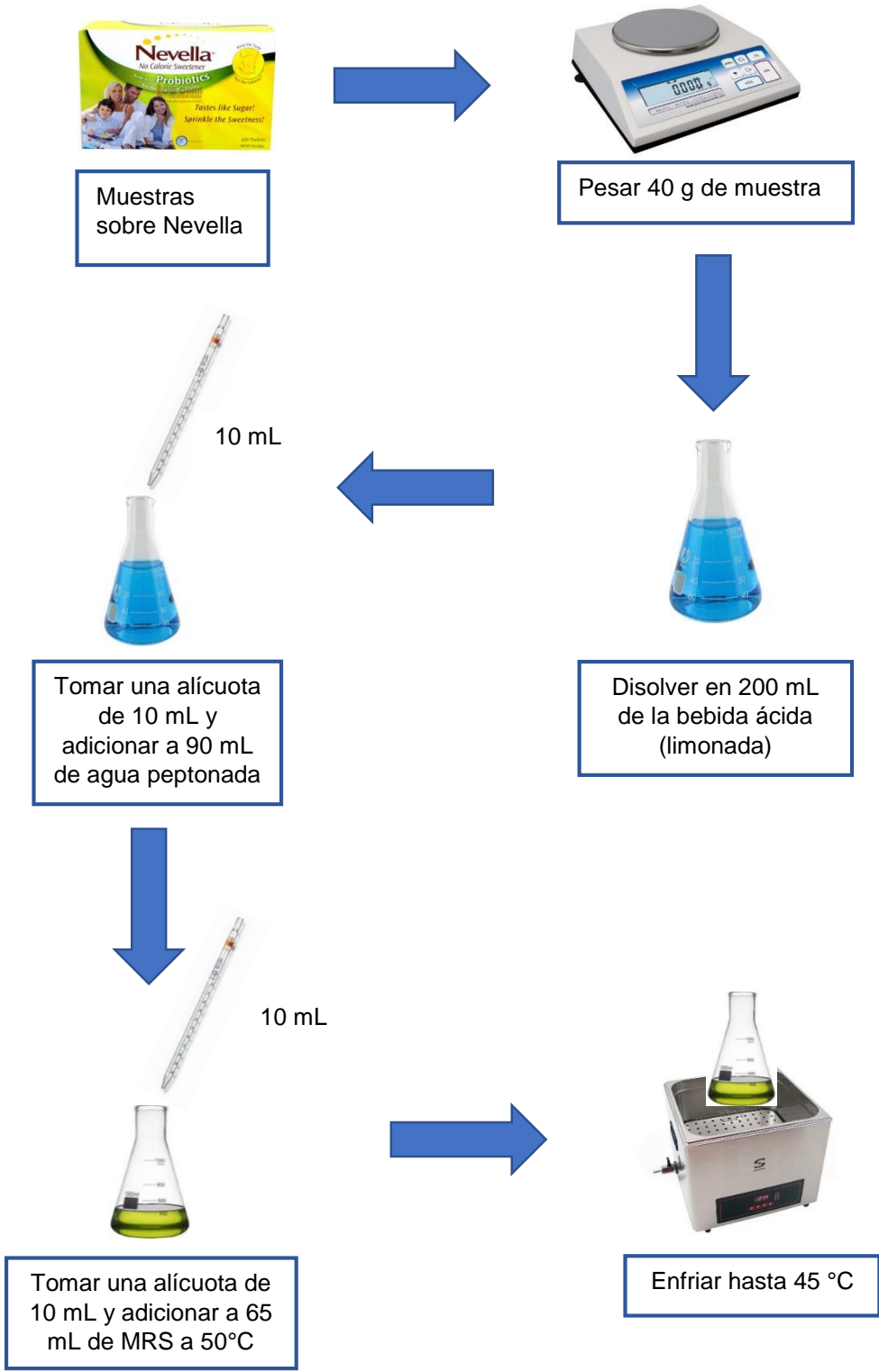


Figura N°33. Comprobación de la resistencia del probiótico presente en azúcar de dieta a bebidas ácidas.

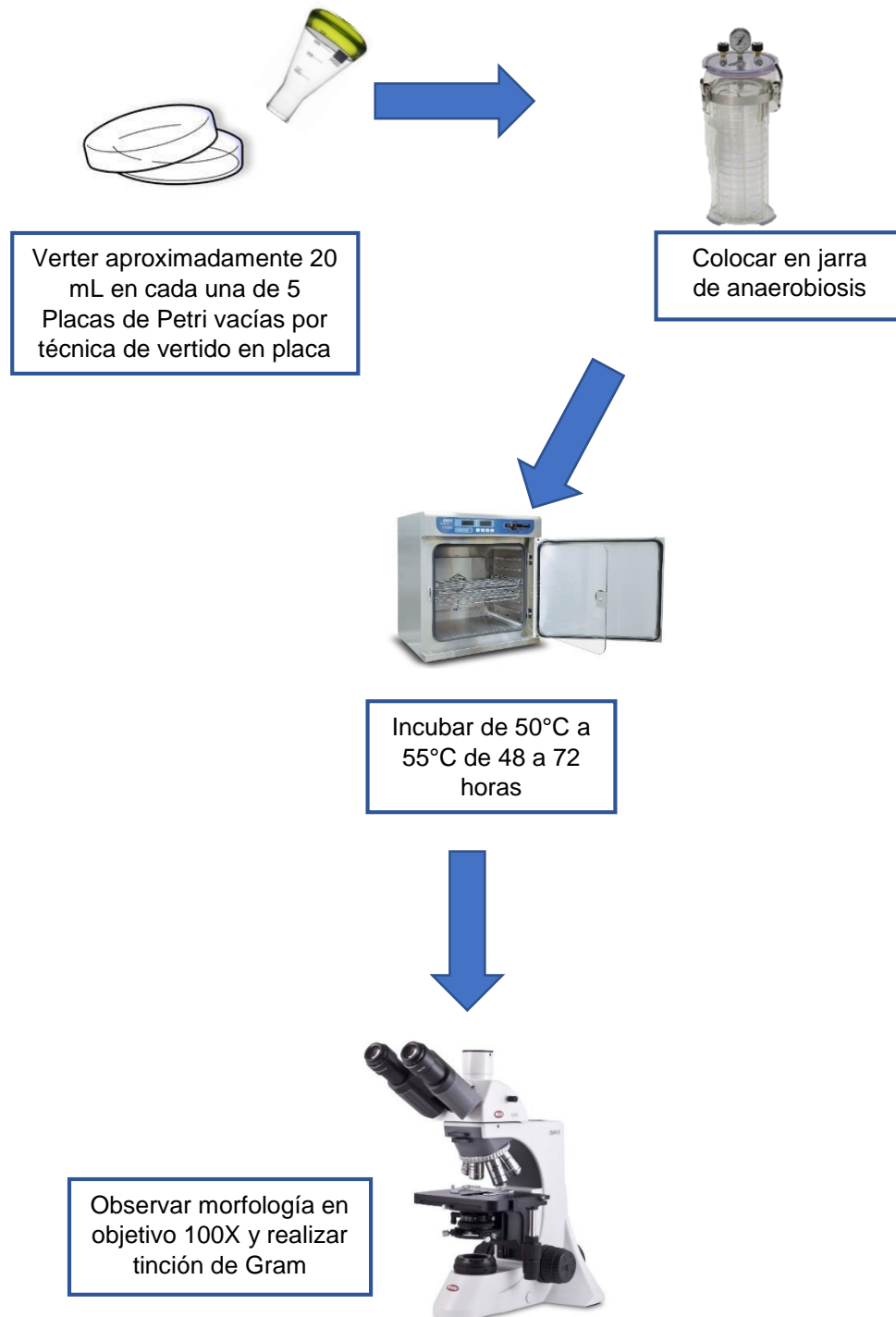


Figura N°33. Continuación.

ANEXO N°6
PROCEDIMIENTOS PARA CUANTIFICAR LOS mg DE GLUCOSA QUE ES
CAPAZ DE DEGRADAR EL PROBIOTICO PRESENTE EN AZUCAR DE
DIETA

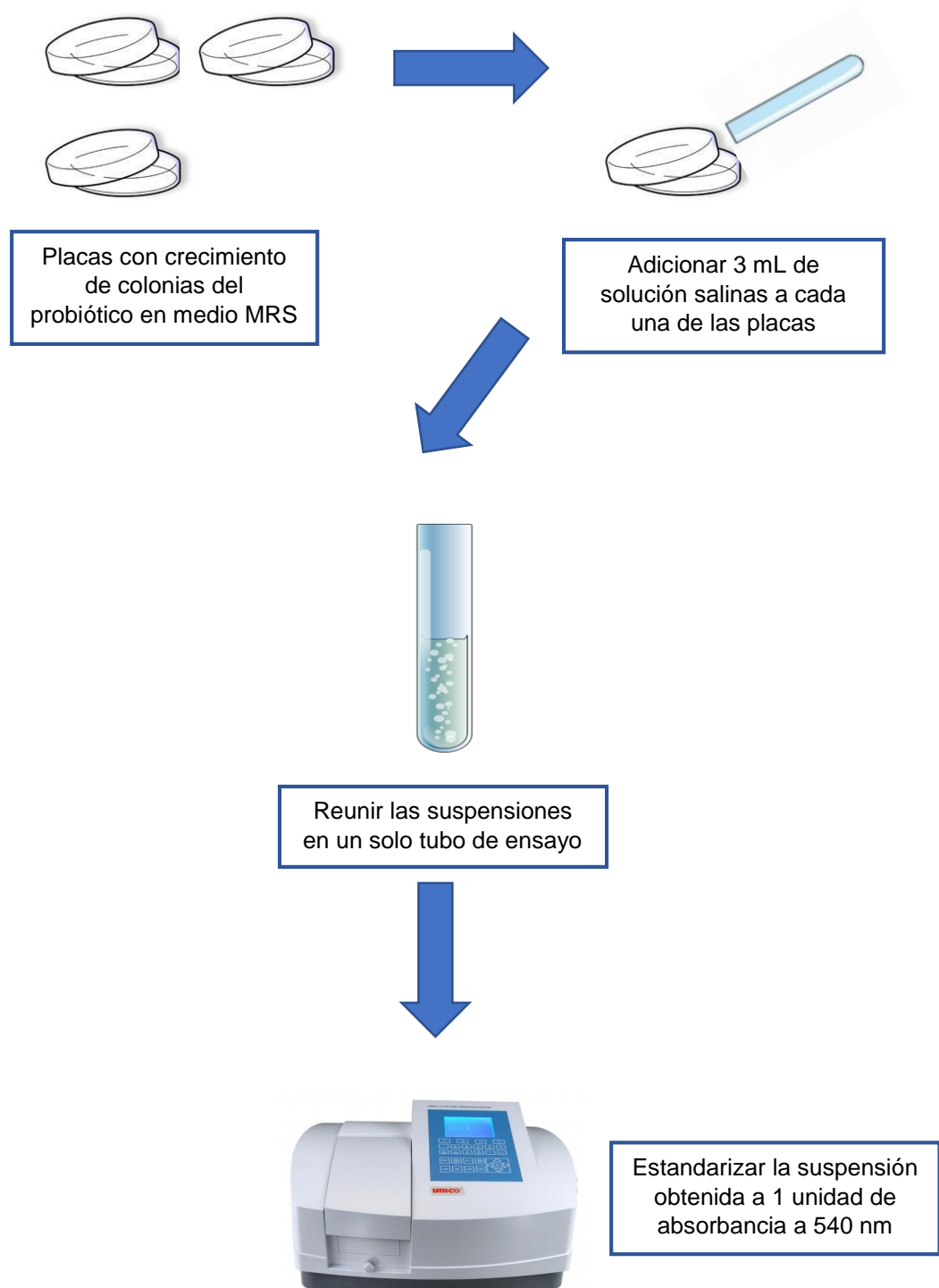


Figura N°34. Procedimiento para estandarización del probiótico presente en azúcar de dieta.

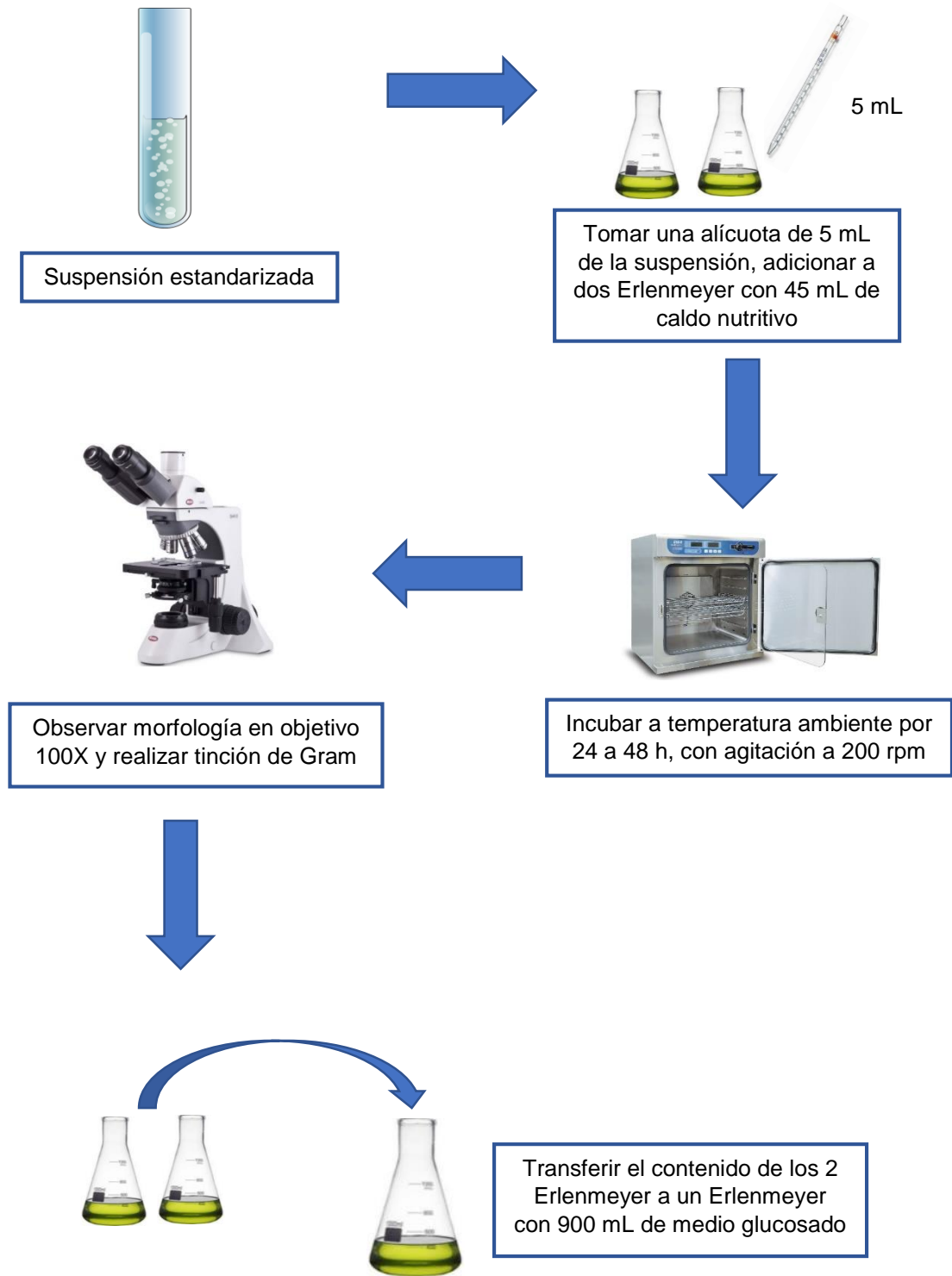
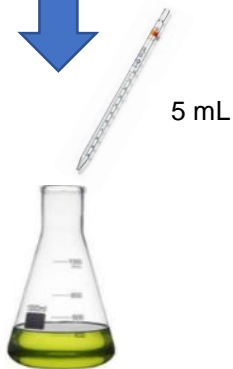


Figura N°35. Procedimiento para siembra del probiótico presente en azúcar de dieta en medio glucosado



Incubar a 30°C por 96 h



Tomar muestras de 5 mL por duplicado cada 24 h hasta 96 h. Codificar cada muestra de acuerdo con tabla N°5

Figura N°35. Continuación.

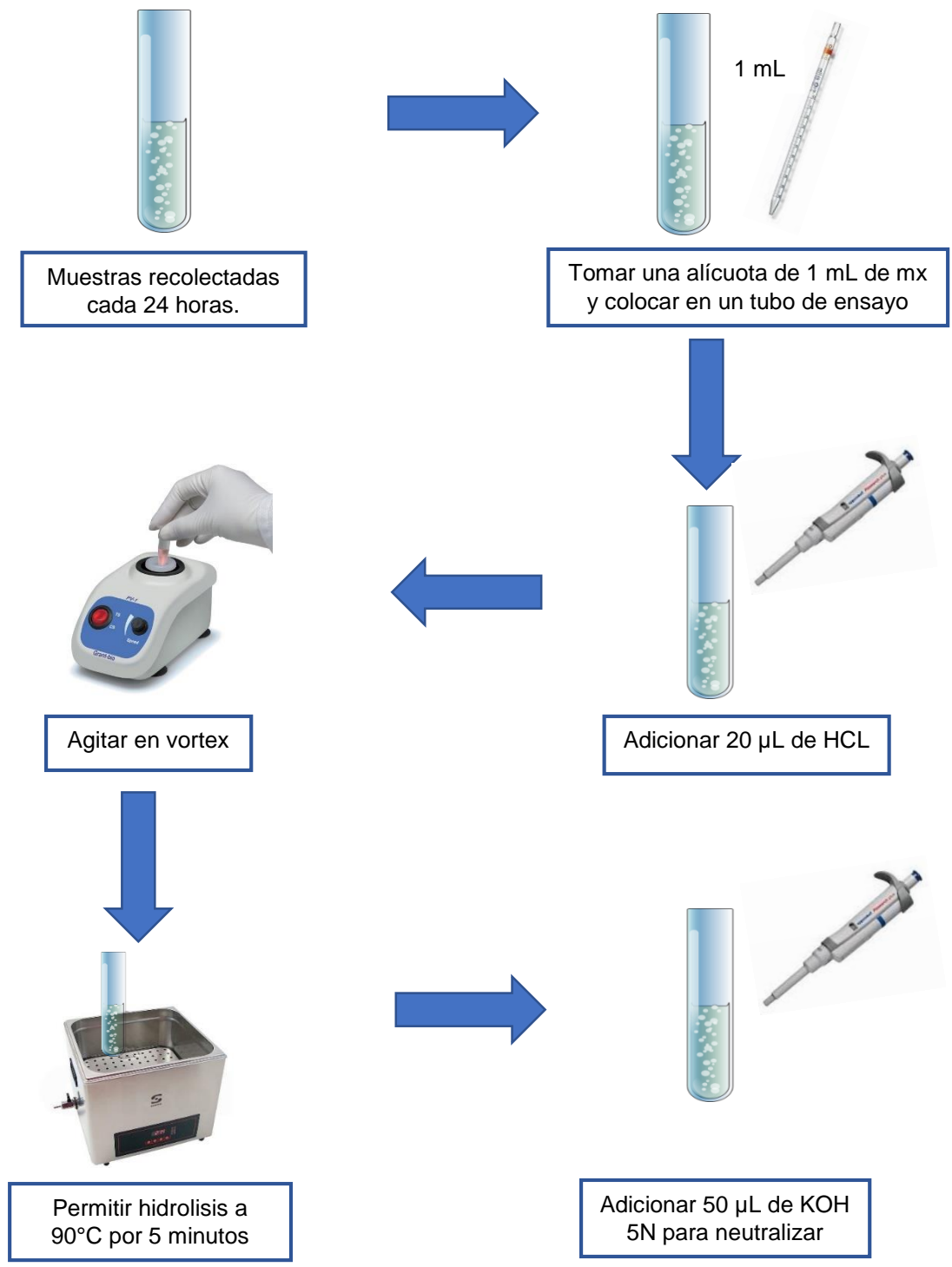


Figura N°36. Esquema del tratamiento de la muestra para cuantificar la cantidad de glucosa que degrada por el probiótico presente en azúcar de dieta



Agitar en vortex



Agregar 1 mL del reactivo DNS
(ácido 3,5-dinitrosalicílico)



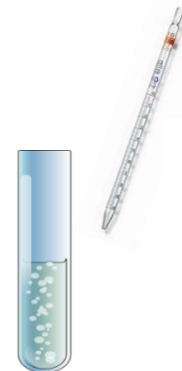
Llevar a ebullición
durante 5 minutos



Agitar en vortex



Enfriar en baño de hielo



8 mL

Agregar 8 mL de agua destilada

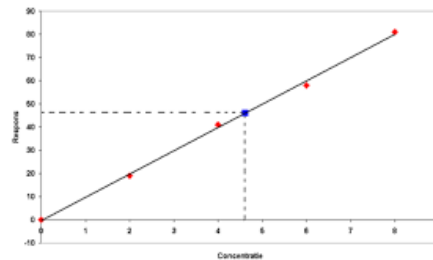
Figura N°36. Continuación.



Agitar en vortex



Leer absorbancia de cada una de las muestras a 540 nm



Realizar cálculos de cantidad de glucosa que es degradada mediante

Figura N°36. Continuación

ANEXO N°7

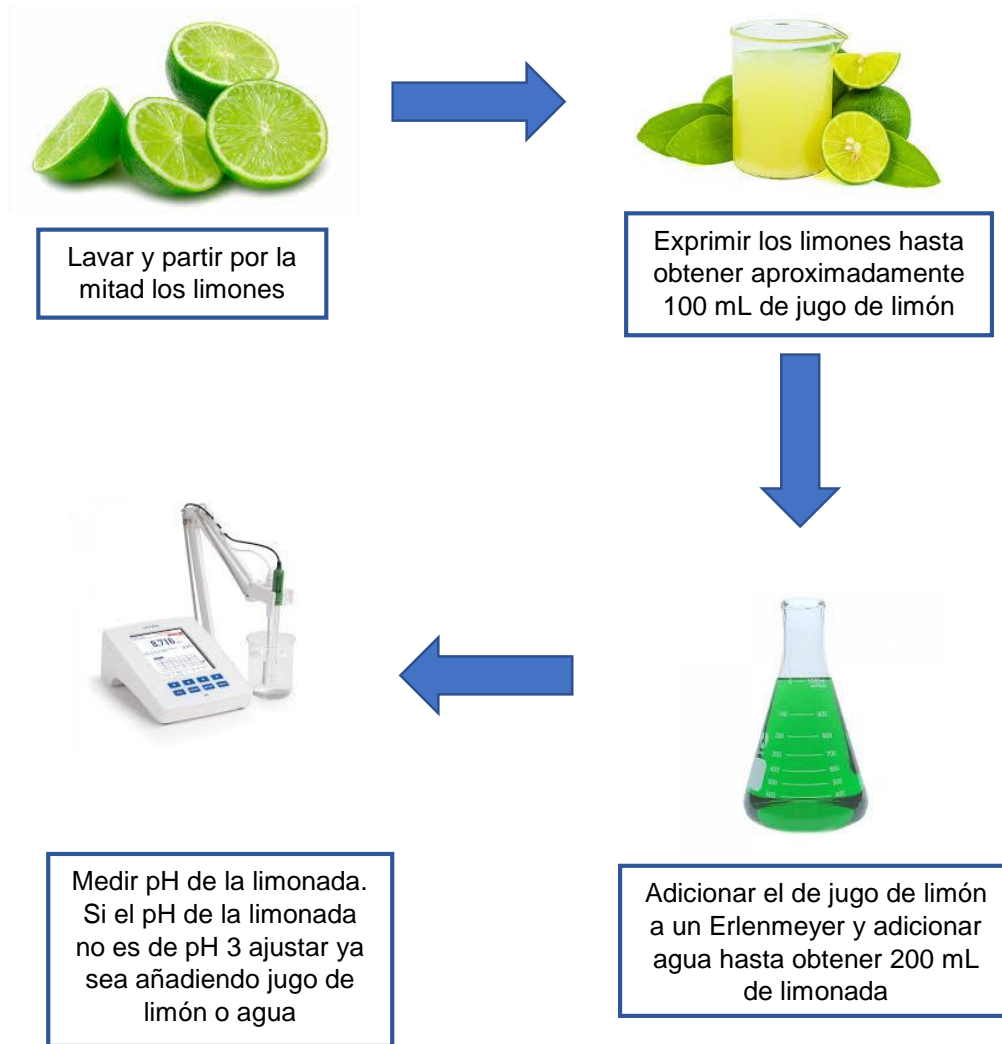


Figura N°37. Procedimiento para preparar limonada. (Bebida ácida)

ANEXO N°8.

GLUCOSE ISOMERASE from *BACILLUS COAGULANS*

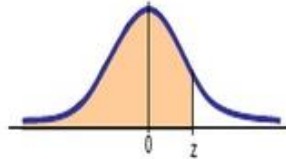
Prepared at the 28th JECFA (1984), published in FNP 31/2 (1984) and in FNP 52 (1992). An ADI 'acceptable' was established at the 29th JECFA (1985)

SYNONYMS	Xylose isomerase
SOURCES	Produced by the controlled fermentation of <i>Bacillus coagulans</i>
Active principles	Xylose isomerase (glucose isomerase)
Systematic names and numbers	D-Xylose ketol-isomerase (EC 5.3.1.5)
Reactions catalyzed	D-Xylose and D-glucose are converted to D-xylulose and D-fructose, respectively
DESCRIPTION	Off-white to brown granules (immobilized preparation) or liquids, insoluble in water (granules), ethanol, chloroform and ether The immobilized preparations are rendered insoluble in water by treatment with gelatine (carrier) and glutaraldehyde (immobilization agent).
FUNCTIONAL USES	Enzyme preparation Used in the preparation of high fructose corn syrup and other fructose starch syrups.
GENERAL SPECIFICATIONS	Must conform to the <i>General Specifications for Enzyme Preparations used in Food Processing</i> (see Volume Introduction)
CHARACTERISTICS	
IDENTIFICATION	
<u>Glucose isomerase activity</u> (Vol. 4)	The sample shows glucose isomerase activity
PURITY	
<u>Glutaraldehyde</u> (Vol. 4)	Passes Limit Test for Glutaraldehyde from Immobilized Glucose Isomerases crosslinked with Glutaraldehyde

Figura N°38. Monografía de Glucosa isomerasa de *Bacillus coagulans*

ANEXO N° 10.


UNIVERSIDAD PRIVADA DEL NORTE
 FORMAMOS LÍDERES CON RESPONSABILIDAD SOCIAL



DISTRIBUCIÓN NORMAL - Términos Acumulativos
 Probabilidad de menos de x éxitos con λ promedio

$$P(Z \leq z) = \int_{-\infty}^z \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2}} dz$$

z	f(z)	z	f(z)	z	f(z)	z	f(z)	z	f(z)	z	f(z)	z	f(z)	z	f(z)	z	f(z)
-4	0.000	-3.55	0.000	-3.1	0.001	-2.65	0.004	-2.2	0.014	-1.75	0.040	-1.3	0.097	-0.85	0.198	-0.4	0.345
-3.99	0.000	-3.54	0.000	-3.09	0.001	-2.64	0.004	-2.19	0.014	-1.74	0.041	-1.29	0.099	-0.84	0.200	-0.39	0.348
-3.98	0.000	-3.53	0.000	-3.08	0.001	-2.63	0.004	-2.18	0.015	-1.73	0.042	-1.28	0.100	-0.83	0.203	-0.38	0.352
-3.97	0.000	-3.52	0.000	-3.07	0.001	-2.62	0.004	-2.17	0.015	-1.72	0.043	-1.27	0.102	-0.82	0.206	-0.37	0.356
-3.96	0.000	-3.51	0.000	-3.06	0.001	-2.61	0.005	-2.16	0.015	-1.71	0.044	-1.26	0.104	-0.81	0.209	-0.36	0.359
-3.95	0.000	-3.5	0.000	-3.05	0.001	-2.60	0.005	-2.15	0.016	-1.7	0.045	-1.25	0.106	-0.8	0.212	-0.35	0.363
-3.94	0.000	-3.49	0.000	-3.04	0.001	-2.59	0.005	-2.14	0.016	-1.69	0.046	-1.24	0.107	-0.79	0.215	-0.34	0.367
-3.93	0.000	-3.48	0.000	-3.03	0.001	-2.58	0.005	-2.13	0.017	-1.68	0.046	-1.23	0.109	-0.78	0.218	-0.33	0.371
-3.92	0.000	-3.47	0.000	-3.02	0.001	-2.57	0.005	-2.12	0.017	-1.67	0.047	-1.22	0.111	-0.77	0.221	-0.32	0.374
-3.91	0.000	-3.46	0.000	-3.01	0.001	-2.56	0.005	-2.11	0.017	-1.66	0.048	-1.21	0.113	-0.76	0.224	-0.31	0.378
-3.9	0.000	-3.45	0.000	-3	0.001	-2.55	0.005	-2.1	0.018	-1.65	0.049	-1.2	0.115	-0.75	0.227	-0.3	0.382
-3.89	0.000	-3.44	0.000	-2.99	0.001	-2.54	0.006	-2.09	0.018	-1.64	0.051	-1.19	0.117	-0.74	0.230	-0.29	0.386
-3.88	0.000	-3.43	0.000	-2.98	0.001	-2.53	0.006	-2.08	0.019	-1.63	0.052	-1.18	0.119	-0.73	0.233	-0.28	0.390
-3.87	0.000	-3.42	0.000	-2.97	0.001	-2.52	0.006	-2.07	0.019	-1.62	0.053	-1.17	0.121	-0.72	0.236	-0.27	0.394
-3.86	0.000	-3.41	0.000	-2.96	0.002	-2.51	0.006	-2.06	0.020	-1.61	0.054	-1.16	0.123	-0.71	0.239	-0.26	0.397
-3.85	0.000	-3.4	0.000	-2.95	0.002	-2.50	0.006	-2.05	0.020	-1.6	0.055	-1.15	0.125	-0.7	0.242	-0.25	0.401
-3.84	0.000	-3.39	0.000	-2.94	0.002	-2.49	0.006	-2.04	0.021	-1.59	0.056	-1.14	0.127	-0.69	0.245	-0.24	0.405
-3.83	0.000	-3.38	0.000	-2.93	0.002	-2.48	0.007	-2.03	0.021	-1.58	0.057	-1.13	0.129	-0.68	0.248	-0.23	0.409
-3.82	0.000	-3.37	0.000	-2.92	0.002	-2.47	0.007	-2.02	0.022	-1.57	0.058	-1.12	0.131	-0.67	0.251	-0.22	0.413
-3.81	0.000	-3.36	0.000	-2.91	0.002	-2.46	0.007	-2.01	0.022	-1.56	0.059	-1.11	0.133	-0.66	0.255	-0.21	0.417
-3.8	0.000	-3.35	0.000	-2.9	0.002	-2.45	0.007	-2	0.023	-1.55	0.061	-1.1	0.136	-0.65	0.258	-0.2	0.421
-3.79	0.000	-3.34	0.000	-2.89	0.002	-2.44	0.007	-1.99	0.023	-1.54	0.062	-1.09	0.138	-0.64	0.261	-0.19	0.425
-3.78	0.000	-3.33	0.000	-2.88	0.002	-2.43	0.008	-1.98	0.024	-1.53	0.063	-1.08	0.140	-0.63	0.264	-0.18	0.429
-3.77	0.000	-3.32	0.000	-2.87	0.002	-2.42	0.008	-1.97	0.024	-1.52	0.064	-1.07	0.142	-0.62	0.268	-0.17	0.433
-3.76	0.000	-3.31	0.000	-2.86	0.002	-2.41	0.008	-1.96	0.025	-1.51	0.066	-1.06	0.145	-0.61	0.271	-0.16	0.436
-3.75	0.000	-3.3	0.000	-2.85	0.002	-2.40	0.008	-1.95	0.026	-1.5	0.067	-1.05	0.147	-0.6	0.274	-0.15	0.440
-3.74	0.000	-3.29	0.001	-2.84	0.002	-2.39	0.008	-1.94	0.026	-1.49	0.068	-1.04	0.149	-0.59	0.278	-0.14	0.444
-3.73	0.000	-3.28	0.001	-2.83	0.002	-2.38	0.009	-1.93	0.027	-1.48	0.069	-1.03	0.152	-0.58	0.281	-0.13	0.448
-3.72	0.000	-3.27	0.001	-2.82	0.002	-2.37	0.009	-1.92	0.027	-1.47	0.071	-1.02	0.154	-0.57	0.284	-0.12	0.452
-3.71	0.000	-3.26	0.001	-2.81	0.002	-2.36	0.009	-1.91	0.028	-1.46	0.072	-1.01	0.156	-0.56	0.288	-0.11	0.456
-3.7	0.000	-3.25	0.001	-2.8	0.003	-2.35	0.009	-1.9	0.029	-1.45	0.074	-1	0.159	-0.55	0.291	-0.1	0.460
-3.69	0.000	-3.24	0.001	-2.79	0.003	-2.34	0.010	-1.89	0.029	-1.44	0.075	-0.99	0.161	-0.54	0.295	-0.09	0.464
-3.68	0.000	-3.23	0.001	-2.78	0.003	-2.33	0.010	-1.88	0.030	-1.43	0.076	-0.98	0.164	-0.53	0.298	-0.08	0.468
-3.67	0.000	-3.22	0.001	-2.77	0.003	-2.32	0.010	-1.87	0.031	-1.42	0.078	-0.97	0.166	-0.52	0.302	-0.07	0.472
-3.66	0.000	-3.21	0.001	-2.76	0.003	-2.31	0.010	-1.86	0.031	-1.41	0.079	-0.96	0.169	-0.51	0.305	-0.06	0.476
-3.65	0.000	-3.2	0.001	-2.75	0.003	-2.30	0.011	-1.85	0.032	-1.4	0.081	-0.95	0.171	-0.5	0.309	-0.05	0.480
-3.64	0.000	-3.19	0.001	-2.74	0.003	-2.29	0.011	-1.84	0.033	-1.39	0.082	-0.94	0.174	-0.49	0.312	-0.04	0.484
-3.63	0.000	-3.18	0.001	-2.73	0.003	-2.28	0.011	-1.83	0.034	-1.38	0.084	-0.93	0.176	-0.48	0.316	-0.03	0.488

Figura N°40: Tabla de valores Z