

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



**EVALUACION DE LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS
ENCAPSULADOS UTILIZANDO MATRICES POLIMERICAS**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

DIANA IVON SANCHEZ TURCIOS
DANIEL ANTONIO VIVIDOR RAMOS

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

JUNIO DE 2021

SAN SALVADOR, EL SALVADOR CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velázquez.

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORA DE AREA EN: CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y COSMETICOS.

Licda. Zenia Ivonne Arevalo de Márquez.

ASESORA DE AREA EN: MICROBIOLOGIA

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

DOCENTES ASESORES

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz.

MSc. Mario Herbert Romero Rivera.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso, por permitirme llegar hasta este momento de mi vida, darme las fuerzas necesarias para seguir estudiando y esperanza en los momentos más difíciles de mi vida. A mis padres Senia Ivon Turcios y Carlos Alberto Sánchez por los esfuerzos constantes, el apoyo emocional y económico y sobre todo por enseñarme que se pueden alcanzar los objetivos y metas que se desean realizar.

A mis hermanas Xenia Turcios y Karla Turcios por darme esperanzas en los momentos más cruciales de mi carrera.

A mis amigos Daniela Vargas por brindarme su amistad y apoyo.

A mi compañero de tesis Daniel Vividor por su dedicación y esmero por realizar este trabajo de graduación.

A mis Docentes Asesores, MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz y MSc. Mario Herbert Rivera por la dedicación, tiempo invertido y por sus consejos a lo largo del desarrollo de esta investigación.

Gracias a todo el personal docente de la Facultad de Química y Farmacia por los conocimientos brindados durante el proceso de formación profesional y sobre todo humana.

Diana Ivon Sánchez Turcios

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por darme la sabiduría y la dirección a seguir en el transcurso de mi vida, por darme la fortaleza y la persistencia para lograr culminar mis estudios.

A mi madre Mariella Cuellar a quien amo con todo mi corazón y quien es la persona que más admiro en mi vida, por darme el apoyo incondicional para cumplir mis metas y mis sueños de superación personal y profesional, por darme los ánimos que tanto necesite en los momentos más difíciles de mi vida.

A todos mis hermanos que siempre me dieron el apoyo y las palabras de aliento durante todo el tiempo de mis estudios, a mis tías Rufina Cuellar y Celia Cuellar, por brindarme sus sabios consejos y su apoyo incondicional.

A la familia Rivas por recibirme en su hogar y brindarme la confianza de compartir los últimos 5 años de mi vida realizando mis estudios.

A mis mejores amigos Gerardo Rivas, Kevin Estrada, José Luis Ayala, Rubén Guevara, por apoyarme y darme ánimos de seguir adelante en mis estudios, por la amistad y confianza que siempre me han brindado.

A mi compañera de tesis Diana Turcios, por su esmero y dedicación en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis docentes asesores por su dedicación y tolerancia en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A todo el personal de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador por compartir sus conocimientos para mi formación académica.

Daniel Antonio Vividor Ramos.

DEDICATORIA

A mi madre Senia Ivon Turcios por brindarme su cariño incondicional, consejos durante toda la vida y por ayudarme a alcanzar todos mis sueños.

A mi padre Carlos Alberto Sánchez por apoyarme filialmente toda mi vida y darme el apoyo económico y emocional para seguir adelante.

A mis amadas hermanas Xenia Turcios y Karla Turcios por siempre estar a mi lado, quererme y soportar mis momentos de enojo.

Diana Ivon Sánchez Turcios.

DEDICATORIA

A mi bisabuela Rufina Gutiérrez de Cuellar y mi bisabuelo Alejandro de Jesús Cuellar Alemán, quienes en vida siempre quisieron verme como todo un profesional de la salud.

A mi Madre Mariella Cuellar por brindarme su apoyo incondicional, por su amor inmenso que siempre me ha dado durante toda mi vida.

A mi padre Juan Antonio Vividor Figueroa, quien en vida siempre estuvo orgulloso de mi.

Daniel Antonio Vividor Ramos.

INDICE GENERAL

	Pág. N°
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xxii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	27
3.1 Alimentos fermentados.	27
3.1.1 Leche.	27
3.1.2 Composición de la leche.	27
3.2 Generalidades del queso.	28
3.2.1 Importancia.	28
3.2.2 Definición.	28
3.2.3 Queso fresco.	29
3.2.4 Composición del queso fresco.	29
3.3 Proceso de producción del queso.	30
3.3.1 Estandarización de la leche.	30
3.3.2 Fermentación; Inoculación de cultivos puros iniciadores.	30
3.3.3 Adición del cuajo.	31
3.3.4 Corte del cuajo.	31
3.3.5 Salado y moldeado de la cuajada.	32
3.3.6 Madurado.	32
3.3.7 Tipos de madurado.	32

3.3.8	Clasificación de los quesos.	33
3.4	Probióticos.	33
3.4.1	Selección de bacterias probióticas.	34
3.4.2	Mecanismo de acción de los probióticos.	35
3.4.3	Efectos beneficiosos de los microorganismos probióticos.	37
3.4.4	Diarrea.	37
3.4.5	Enfermedad inflamatoria intestinal.	39
3.4.6	Gastritis asociada a <i>Helicobacter pylori</i> .	39
3.4.7	Estreñimiento.	40
3.4.8	Síndrome de intestino irritable.	41
3.5	Probióticos en las distintas etapas de la vida.	42
3.5.1	Dosis de probióticos.	43
3.6	Bacterias del ácido láctico (BAL).	45
3.6.1	Género.	45
3.6.1.1	Caracteres bioquímicos y filogenéticos	45
3.7	Pruebas para diferenciar al género <i>Lactobacillus spp.</i>	48
3.7.1	Descripción de pruebas.	48
3.7.1.1	Tinción de Gram.	48
3.7.1.1.1	Expresión de resultados.	49
3.7.1.2	Prueba de catalasa.	49
3.7.1.3	Prueba de oxidasa.	49
3.7.1.4	Prueba de indol.	50
3.7.1.5	Prueba de triple azúcar y hierro.	50
3.8	Microencapsulación.	50
3.8.1	Microcápsulas.	51
3.8.2	Núcleo interno.	52
3.8.3	Agente encapsulante.	52
3.8.4	Mecanismo de liberación.	53

3.8.5	Análisis morfológico.	54
3.9	Encapsulación de microorganismos probióticos.	54
3.9.1	Métodos de encapsulación.	55
3.9.2	Metodología de extrusión o goteo.	56
3.9.3	Materiales de encapsulación.	57

Capítulo IV

4.0	Diseño metodológico.	63
4.1	Tipo de estudio.	63
4.1.1	De campo, experimental, prospectivo.	63
4.2	Investigación bibliográfica.	64
4.3	Investigación de campo.	64
4.3.1	Universo.	64
4.3.2	Tipo de muestreo.	65
4.3.2.1	Muestra.	65
4.3.3	Identificación de la muestra.	65
4.3.4	Transporte de la muestra.	65
4.4	Parte experimental.	65
4.5	Aislamiento y selección de las posibles cepas de <i>Lactobacillus spp</i> procedentes de quesos frescos.	66
4.6	Purificación de microorganismos.	67
4.7	Pruebas de identificación.	67
4.7.1	Pruebas iniciales.	67
4.7.2	Observación macroscópica de las colonias.	67
4.7.3	Tinción de Gram.	68
4.7.4	Prueba de catalasa.	68
4.7.5	Prueba de Oxidasa.	69
4.7.6	Prueba de TSI.	69
4.7.7	Prueba de indol.	70

4.8 Estandarización de <i>Lactobacillus spp.</i>	71
4.9 Evaluación de la supervivencia de microorganismos potencialmente probióticos en condiciones de bilis simulada y pH ácido.	71
4.10 Actividad antimicrobiana.	73
4.11 Preparación de mezclas poliméricas.	74
4.11.1 Preparación de mezcla de alginato de sodio – gelatina [3:10].	74
4.11.2 Preparación de mezcla de almidón de maíz – gelatina [3:10].	75
4.11.3 Preparación de mezcla de goma Xantana – gelatina [0.5:10].	75
4.12 Encapsulación de microorganismos.	75
4.12.1 Metodología de extrusión o goteo.	75
4.13 Determinación de la temperatura de fusión de las cápsulas.	76
4.14 Método de desintegración de las cápsulas.	76
4.15 Procedimiento de recuento de microorganismos.	77
4.16 Evaluación de la viabilidad de microorganismos probióticos encapsulados.	77
4.17 Observación de la morfología de las cápsulas al microscopio óptico.	78
4.17.1 Observación de las cápsulas por medio de la tinción de Gram.	78

Capítulo V

5.0 Resultados y discusión de resultados.	80
---	----

Capítulo VI

6.0 Conclusiones. 111

Capítulo VII

7.0 Recomendaciones. 114

Bibliografía.

Anexos.

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Materiales, Equipos y Reactivos
- 2 Procedimiento del aislamiento y selección de microorganismos potencialmente probióticos procedentes de queso fresco.
- 3 Procedimiento de aislamiento y selección de microorganismos potencialmente probióticos procedentes de queso duro viejo.
- 4 Procedimiento para realizar la purificación de los microorganismos seleccionados.
- 5 Procedimiento para realizar la observación microscópica de microorganismos aislados.
- 6 Procedimiento para realizar prueba de Catalasa.
- 7 Procedimiento a realizar para prueba de Oxidasa.
- 8 Procedimiento a realizar para prueba de TSI.
- 9 Procedimiento a realizar para prueba de Indol.
- 10 Procedimiento a realizar para la estandarización del microorganismo aislado.
- 11 Procedimiento de la prueba de resistencia a bilis y pH ácido.
- 12 Procedimiento de la prueba de resistencia a pH ácido.
- 13 Procedimiento de la prueba de actividad antimicrobiana.
- 14 Procedimiento a realizar para la encapsulación de microorganismos probióticos, utilizando diferentes mezclas de matrices poliméricas.
- 15 Procedimiento a realizar para la desintegración de las cápsulas.
- 16 Procedimiento a realizar para el recuento de microorganismos.
- 17 Porcentajes utilizados para determinar la cantidad adecuada de cada polímero a utilizar para la formación de las cápsulas.
- 18 Gráficos de liberación por agitación magnética.
- 19 Gráficos de liberación por estomacher.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		Pág. N°
1.	Crecimiento bacteriano en Agar MRS.	81
2.	Ejemplos de la morfología microscópica obtenida en el análisis de las	83
3.	muestras por medio de la tinción al Gram, (QF390A Y QF2113B respectivamente).	86
4.	Representación gráfica de los resultados obtenidos en la prueba de oxidasa en el análisis de los microorganismos aislados.	87
5.	Gráfico de los resultados obtenidos en la prueba de catalasa en el análisis de queso fresco.	88
6.	Representación gráfica de los resultados obtenidos en la prueba de Indol en el análisis de los microorganismos aislados.	89
7.	Representación gráfica de los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a pH ácido de los microorganismos aislados.	92
8	Representación gráfica de los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a bilis simulada de los microorganismos aislados.	93
9	Prueba de actividad antimicrobiana utilizando microorganismos aislados del género <i>Lactobacillus spp</i> de la muestra codificada como QF3110B frente a <i>Salmonella spp</i> .	95
10	Preparación de mezclas poliméricas de Goma Xantana: Gelatina (0.5:10%), Alginato de Sodio: Gelatina (3:10%) y Almidón de Maíz: Gelatina (3:10%) para realizar el proceso de encapsulación.	97

11	Microorganismos probióticos encapsulados por el método de extrusión utilizando mezclas de polímeros de Goma Xantana: Gelatina (0.5:10%), Alginato de Sodio: Gelatina (3:10%) y Almidón de Maíz: Gelatina (3:10%) Respectivamente.	98
12	Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C utilizando almidón de maíz-Gelatina.	101
13	Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C Goma Xantana-Gelatina.	102
14	Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C alginato de sodio maíz-Gelatina.	103
15	Imagen cápsula compuesta de la mezcla de polímeros de Almidón de Maíz y Gelatina, perteneciente a la muestra codificada como “QF2110B” a 10X.	105
16	Imagen cápsula compuesta de la mezcla de polímeros de Goma Xantana y Gelatina, perteneciente al microorganismo de control de comparación de <i>Lactobacillus casei</i> , a 10X.	105
17	Imagen cápsula compuesta de la mezcla de polímeros de Alginato de sodio y Gelatina, perteneciente a la muestra codificada como “QF3110B” a 10X.	106
18	Tinción de Gram de las cápsulas de la mezcla de polímeros de Almidón de Maíz y Gelatina que corresponden a la muestra codificada como “QF2110B”, observadas en el microscopio óptico, a 4X Y 100X respectivamente.	107

19	Tinción de Gram de las cápsulas de la mezcla de polímeros de Alginato de sodio y Gelatina que corresponden al microorganismo utilizado como microorganismo de control de comparación <i>Lactobacillus casei</i> , observadas en el microscopio óptico a 100X.	107
20	Tinción de Gram de las cápsulas de la mezcla de polímeros de Goma Xantana y Gelatina que corresponden a la muestra codificada como “QF3110B”, observadas en el microscopio óptico a 100X.	108

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°		Pág. N°
1.	Ejemplos de alimentos fermentados.	27
2.	Composición de la leche.	28
3.	Composición del queso fresco.	29
4.	Clasificación de quesos.	33
5.	Algunos microorganismos probióticos y efectos beneficiosos.	36
6.	Resultados y beneficios clínicos más frecuentes obtenidos con la administración de probióticos.	42
7.	Principales aplicaciones de los probióticos en gastroenterología con evidencia. Modificado de la Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología.	44
8.	Hábitats del género <i>Lactobacillus spp.</i>	47
9.	Polímeros y concentraciones a utilizar para el encapsulamiento.	76
10	Porcentajes de polímeros para la formación de las cápsulas.	141

INDICE DE TABLAS

TABLA N°		Pág. N°
1.	Resultados obtenidos en el análisis del microorganismo utilizado como control positivo para el desarrollo de la investigación.	80
2.	Características Morfológicas Macroscópicas identificadas en el análisis de los microorganismos aislados procedentes de muestras de quesos frescos y quesos duro viejo.	81
3.	Características Morfológicas Microscópicas identificadas en el análisis de los microorganismos aislados procedentes de muestras de quesos frescos y quesos duro viejo.	84
4.	Microorganismos seleccionados para ser estandarizados a 15 % de transmitancia y una longitud de onda de 580 nm, en espectrofotómetro UV/VIS.	91
5.	Resultados de la prueba de actividad antimicrobiana.	94
6.	Resultados de temperatura de fusión de las cápsulas obtenidas con cada mezcla de polímeros utilizada para la encapsulación.	100

ABREVIATURAS

AP:	Agua Peptonada.
ATCC:	American Type Collection.
BAL:	Bacterias Ácido Lácticas.
CENSALUD:	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.
EII:	Enfermedad Intestinal Inflamatoria.
SII:	Síndrome de Intestino Irritable.
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
HCl:	Ácido Clorhídrico.
NaOH:	Hidróxido de Sodio.
OMGE:	Organización Mundial de Gastroenterología.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
MRS:	Agar Man, Rogosa y Sharpe for <i>Lactobacilli</i> .
pH:	Potencial de Iones Hidrogeno.
TSA:	Trypto-Casein Soy Agar.
TSI:	Triple Sugar Iron Agar.
UFC:	Unidades Formadoras de Colonias.

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo principal evaluar la viabilidad de microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus spp* aislados a partir de quesos frescos y quesos duros viejo, a los cuales se les realizaron pruebas de identificación morfológicas, bioquímicas y de propiedades probióticas, utilizando durante todo el desarrollo de la investigación el microorganismo de control positivo *Lactobacillus casei*, los microorganismos que cumplieron con las características necesarias fueron encapsulados en las mezclas de matrices poliméricas de alginato de sodio-gelatina (3:10%), almidón de maíz-gelatina (3:10%) y goma Xantana-gelatina (0.5:10%), utilizando el método de extrusión para obtener las cápsulas. Los parámetros de evaluación para la determinación de la viabilidad y supervivencia de los microorganismos encapsulados establecidos fueron: almacenamiento de 30 días a 25°C y 4°C, y liberaciones y recuentos en los días 0, 15, y 30 días, al mismo tiempo se observó mediante el microscopio óptico la morfología de las cápsulas y la presencia de los microorganismos en su matriz polimérica. El desarrollo de la investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el periodo de julio a noviembre de 2019. En el proceso de aislamiento de microorganismos del género *Lactobacillus spp*, se obtuvo como resultado el cumplimiento de las características morfológicas, bioquímicas y de propiedades probióticas únicamente de los microorganismos aislados de queso fresco, los cuales se sometieron al proceso de encapsulación por medio del método de extrusión utilizando las mezclas de matrices poliméricas mencionadas anteriormente, estos microorganismos sobrevivieron a dicho proceso con valores de viabilidad del 84-119%. Para futuras investigaciones se recomienda realizar 3 repeticiones de las pruebas de viabilidad para determinar si existe diferencia significativa entre las mezclas de polímeros utilizadas.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos probióticos aportan grandes beneficios a la salud del ser humano, como el refuerzo del sistema inmune, o la prevención de enfermedades gastrointestinales, además disminuyen la intolerancia a la lactosa, estos beneficios son atribuidos a la capacidad de competir contra bacterias patógenas por medio de la liberación de ácido, pero es necesario que los microorganismos probióticos estén a una concentración de por lo menos 10^6 UFC/mL ó g; las bacterias que tienen actividad probiótica mejor documentada pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, cumpliendo con los criterios de estabilidad, seguridad, y funcionalidad.

A través de métodos de encapsulación se pueden mejorar los resultados de viabilidad de estos microorganismos, la encapsulación se puede definir como una técnica por la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son envueltas con una película polimérica porosa conteniendo en su interior una sustancia activa, estos métodos aumentan la supervivencia de dichas bacterias al protegerlas de las condiciones externas, ya sea en el proceso de producción o almacenamiento en alimentos, así como también en su paso por el tracto gastrointestinal, es importante que después de encapsular los microorganismos se evalué la supervivencia, liberación y viabilidad de estos.

Actualmente no existen investigaciones nacionales que proporcionen información sobre la encapsulación de microorganismos probióticos aislados a partir de fuentes de obtención secundarias, sin embargo en investigaciones internacionales se ha estudiado el proceso de aislamiento de microorganismos del género *Lactobacillus spp* y se han aplicado diferentes métodos de encapsulación para determinar su viabilidad y tolerancia a dicho proceso, con el objetivo de brindar protección ante los factores que pueden afectar su desarrollo, obteniendo un mejor resultado en todos los beneficios que estos microorganismos brindan al organismo.

En la presente investigación pretendió recopilar información sobre la encapsulación de microorganismos probióticos obtenidos de fuentes secundarias, y como sería su comportamiento al ser sometidos a un proceso de encapsulación para ello se realizó el aislamiento de microorganismos probióticos a partir de 15 muestras de quesos frescos y 15 de quesos duro viejo seleccionadas al azar en de un muestreo dirigido y puntual de un puesto de ventas del mercado municipal de San Martín y de un local seleccionado de Mejicanos, a los microorganismos aislados de dichas muestras se les realizaron pruebas de identificación morfológica, y pruebas bioquímicas específicas, además se determinó que estos pertenecen al género *Lactobacillus spp*, por medio de pruebas específicas, los microorganismos que cumplieron satisfactoriamente con los resultados esperados de las pruebas, fueron sometidos al proceso de encapsulación por medio del método de extrusión en el cual se utilizaron las mezclas de matrices poliméricas de: alginato de sodio-gelatina (3:10%), goma Xantana-gelatina (0.5:10%) y almidón de maíz-gelatina (3:10%), a las cápsulas obtenidas en dicho proceso se les realizaron pruebas de: temperatura de fusión, liberación y recuento de microorganismos, y por último se dejaron en condiciones de almacenamiento por un periodo de un mes a diferentes temperaturas (4°C y 25°C) realizando liberaciones y recuentos de los microorganismos encapsulados en los días 0, 15 y 30, en donde se obtuvo un resultado de viabilidad del 84 al 119%, durante el desarrollo de la investigación se utilizó como microorganismo de control de comparación a *Lactobacillus casei*.

La parte experimental de esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, CENSALUD durante el período de Julio a noviembre del 2019.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la viabilidad de microorganismos probióticos encapsulados utilizando matrices poliméricas.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Aislar microorganismos probióticos del género *Lactobacillus spp* procedentes de un queso no madurado (queso fresco) y un queso madurado (queso duro viejo).

2.2.2 Determinar mediante pruebas de identificación si los microorganismos aislados pertenecen al género *Lactobacillus spp* y si son probióticos.

2.2.3 Encapsular microorganismos probióticos del género *Lactobacillus spp* aislados de muestras seleccionadas utilizando mezclas de matrices poliméricas por el método de extrusión.

2.2.4 Demostrar la viabilidad de los microorganismos probióticos encapsulados en las diferentes matrices poliméricas.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1. Alimentos fermentados. ⁽¹⁾

Son aquellos alimentos que en su procesamiento involucran el crecimiento y actividad metabólica de microorganismos como mohos, bacterias, o levaduras, los cuales modifican las características organolépticas de los alimentos tales como: su sabor, olor o textura, además permiten un aumento en el tiempo de su vida útil.

En la actualidad se consumen una variedad de alimentos fermentados que resultan familiares ejemplo de ello son: el vino, la cerveza, el vinagre, los quesos, el pan y yogurt entre otros.

Cuadro N° 1. Ejemplos de alimentos fermentados. ⁽¹⁾

Sustrato	Alimento fermentado
Leche	Queso, yogurt, Kéfir
Trigo	Pan, Cerveza
Café	Té, chocolate, bebidas energizantes
Pescado	Salsa de pescado

3.1.1. Leche. ⁽¹⁾

Es la secreción de las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, elaborada para la nutrición de sus crías, la cual es muy nutritiva y contiene todos los componentes necesarios para la nutrición humana y animal, todos estos en pequeñas cantidades.

La leche posee un sabor suave, ligeramente dulce y salado, con aroma característico y es muy consumida a nivel mundial.

3.1.2. Composición de la leche. ⁽¹⁾

La leche posee proteínas las cuales se subdividen en Caseínas (Glicofosfoproteínas en forma de sales cálcicas) y en las proteínas del suero (componentes estables a los ácidos Beta-lactoglobulina, y alfa-lactoalbúmina), además posee lactosa, grasas y minerales.

Cuadro N° 2. Composición de la leche. ⁽¹⁾

Componente	Porcentaje %
Proteínas	3.1
(caseínas y lactoséricas)	2.4, 0.7
Grasas	3.4
Lactosa	4.7
Minerales	0.9
Sólidos totales	12.1

3.2. Generalidades del queso. ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁴⁾

3.2.1. Importancia.

El queso es la forma más antigua de transformación de la leche, proporcionando proteínas ricas en aminoácidos esenciales no sintetizables por el organismo.

3.2.2. Definición.

FAO/OMS: “Producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación del suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, crema o por una mezcla de estos”.

De acuerdo con la composición: Es el producto fermentado o no, constituido esencialmente por la caseína de la leche en forma de gel más o menos deshidratado, que retiene casi toda la materia grasa, un poco de lactosa en forma de ácido láctico y una fracción variable de sustancias minerales.

El queso es un alimento altamente consumido a nivel mundial, cuyas características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales son diferentes en

cada tipo. Es un producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, cultivos lácticos o enzimáticos, ácidos orgánicos comestibles con o sin tratamiento térmico, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales e ingredientes comestibles opcionales. Por su proceso se da lugar a diferentes variedades de queso: fresco, maduro y procesado.

3.2.3. Queso fresco. ⁽³⁾

Son aquellos productos higienizados y sin madurar, que después de su fabricación están listos para el consumo. Estos pueden ser blandos o duros, grasos o magros. Su cuajado puede ser a través de enzimas (por cuajo), por acidez (con cultivo láctico o con ácido orgánico). Puede ser prensado o no, molido o sin moler, de pasta cocida o no.

La duración sanitaria de los quesos frescos no pasa de los treinta días y generalmente necesitan refrigeración. Tiene un ligero sabor lácteo, con sabor entre dulce y salado. En su proceso de elaboración, la cuajada se suele moler finamente antes de la salazón, lo que hace que el queso sea desmenuzable. Este tipo de queso tiene un $\text{pH} > 6.1$.

3.2.4. Composición del queso fresco. ⁽³⁾

El porcentaje estimado de cada uno de los componentes del queso fresco son los descritos en la Cuadro N°3.

Cuadro N° 3. Composición del queso fresco. ⁽³⁾

Componente	Porcentaje %
Agua	46-57
materia grasa	18-29
Proteínas	17-21
Sal	1-3

Cuadro N° 3 continuación.

Minerales	4
Nutrientes	Cantidad
Energía	264 Kcal
Calcio	783 mg
Hierro	1.30 mg
Vitamina A	420 mg

3.3. Proceso de producción del queso. (2)(22)(18)

3.3.1. Estandarización de la leche.

Es necesario tener en cuenta el tipo de queso que se desea fabricar, y la tecnología que se va a seguir, para ello se prepara la leche normalizando todos o algunos de los siguientes parámetros:

- El color
- El contenido de grasa
- El diámetro de los glóbulos de la materia grasa
- La materia proteica
- La lactosa (hidrólisis enzimática)
- El contenido de material mineral
- El pH
- El extracto seco

3.3.2. Fermentación; Inoculación de cultivos puros iniciadores.

El ácido láctico se producía antiguamente por la presencia de bacterias naturales en la leche, actualmente se inoculan inicialmente con bacterias seleccionadas denominadas “iniciadoras”.

Para los quesos que son preparados a temperaturas menores de 40°C se utiliza el microorganismo *Lactobacillus lactis* como iniciador. Mientras que los quesos que son preparados a temperaturas mayores a 40°C, se utilizan los

microorganismos termófilos tales como: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaris*, y *Lactobacillus helveticus*.

En algunas ocasiones es necesario suministrar componentes como: Cloruro cálcico, nitratos, dióxido de carbono y enzimas (lisozima), para que el proceso de fermentación pueda llevarse a cabo.

El ácido láctico en el proceso de fermentación causa la coagulación de la caseína en su punto isoeléctrico: pH 4.6, lo cual se aprovecha para la fabricación de diferentes tipos de quesos, un ejemplo de ello es el queso Cottage, además provee un pH bajo favorable para la acción de la renina, que forma el coágulo de la caseína en otros tipos de queso, también provoca que el coágulo se encoja promoviendo el drenaje del suero.

3.3.3. Adición del cuajo.

El principio del cuajo es una enzima denominada “renina” o “quimosina”, de forma que la coagulación tiene lugar muy pronto después de la adición del cuajo a la leche, toda la fabricación del queso depende de la formación de la cuajada por acción del cuajo o de enzimas similares, además es necesario acidificar la leche para ello se utilizan microorganismos capaces de fermentar la lactosa formando ácido láctico tales como: *Lactococcus*, *Lactobacillus* o *Streptococcus*, de esta manera se obtiene un pH bajo y junto a las enzimas del cuajo se obtendrá la separación de la leche del suero líquido, el queso que se pretende obtener será prácticamente la cuajada a la que adicionalmente se le aplicarán otros procesos hasta dar con las características deseadas.

3.3.4. Corte del cuajo.

En este punto el queso ha adquirido una textura espesa y húmeda, algunos quesos blandos estarían prácticamente listos, faltando pasar a ser deshidratados, salados y empaquetados. En los demás quesos la cuajada se corta en pequeñas

secciones, para facilitar la extracción del agua de las piezas individuales de cuajada.

El tiempo de coagulación es de aproximadamente 30 minutos, el cortado rompe los granos con un tamaño de 3 – 15 mm, dependiendo del tipo de queso, cuanto más fino es el corte menor es el contenido de humedad.

Dependiendo del tipo de queso se aplican un gran número de técnicas específicas, que dan las características finales al sabor y a la textura. Después del corte se procede a realizar una leve agitación para evitar la formación de grumos

3.3.5. Salado y moldeado de la cuajada.

La sal es importante no sólo para el sabor, sino que también contribuye al control de la humedad y la acidez; se puede realizar agregando sal o sumergiendo la cuajada en salmuera, lo más importante es que ayuda a limitar el crecimiento de bacterias proteolíticas indeseables.

La cuajada se presiona para eliminar el suero y para moldearse antes de que se le permita madurar o no.

3.3.6. Madurado.⁽²²⁾

Es un proceso microbiológico y bioquímico lento que convierte la cuajada o queso blando en quebradizo inicial, en un queso final lleno de sabor. La maduración involucra cambios químicos como: Glucólisis (Fermentación de la lactosa a ácido láctico, acético, propiónico CO₂ y diacetilo), y la lipólisis (ruptura de las grasas).

3.3.7. Tipos de madurado.

- Interna o primaria: ocurre en el interior de la masa del queso por acción de los microorganismos del fermento lácteo, el cual transforma toda la lactosa en ácido láctico.

- Externa o secundaria: Se produce en la superficie del queso progresando gradualmente hacia el interior, y es ocasionada por el desarrollo de los microorganismos en la corteza.

3.3.8. Clasificación de los quesos:

Cuadro N° 4. Clasificación de quesos.

Criterio de clasificación	Tipo
De acuerdo con el contenido de humedad	Duros
	Semiduros
	Blandos
De acuerdo con el método de coagulación de la caseína	Quesos de coagulación láctica (ácido láctico)
	Quesos de coagulación de ambos métodos quesos al cuajo(enzimáticos)
De acuerdo con el microorganismo utilizado en la maduración y la textura	Quesos granulares
	Quesos de textura cerrada
	Quesos de ojos redondeados
Por el tipo de leche	Cruda
	Pasteurizada
	Termizada
Por el periodo de maduración	Fresco
	Madurado

3.4. Probióticos. ⁽¹⁰⁾

Los probióticos son microorganismos vivos que pueden agregarse a la fórmula de diferentes tipos de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos. Las especies de *Lactobacillus* son usadas más frecuentemente como probióticos, pero la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies *Bifidobacterium* también pueden ser utilizadas. Las bacterias ácido-lácticas, entre las que se incluye la especie *Lactobacillus* que ha sido utilizada para la conservación de alimentos por fermentación durante miles de años, pueden tener una doble función, actuando como agentes para la

fermentación de alimentos y además potencialmente confiriendo beneficios a la salud.

La intención de usar probióticos es que ayuden a la flora intestinal que aparece naturalmente en el organismo humano. Hay estudios que han documentado los efectos de los probióticos en una serie de trastornos gastrointestinales y extraintestinales, entre los que se incluyen la enfermedad intestinal inflamatoria (EII), el síndrome de intestino irritable (SII), las infecciones vaginales, y como refuerzo inmunológico. Los probióticos también han sido investigados en relación con el eczema atópico y las complicaciones de la cirrosis hepática. Si bien hay alguna evidencia clínica en cuanto al papel de los probióticos para reducir el colesterol, los resultados son contradictorios.

3.4.1. Selección de bacterias probióticas. ⁽⁶⁾

Según la Organización Mundial de Gastroenterología (OMGE) existen características con las que los probióticos deben cumplir:

- Tolerancia al tracto gastrointestinal: deben resistir las enzimas salivales, el ácido del estómago, la secreción de sales biliares y enzimas pancreáticas, así como cambios de pH e ingredientes de alimentos y bebidas que se encuentren a su paso a lo largo del tracto gastrointestinal.
- Adherencia a las células epiteliales y a las superficies mucosas lo que prolonga su tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal y reduce la adhesión de microorganismos patógenos.
- Ser seguros: No deben tener antecedentes de ser patógenos ni estar asociados con otras enfermedades.
- Actividad antagonista contra patógenos al producir sustancias antimicrobianas que por medio de la acidificación del intestino ayudan a inhibir la proliferación de algunos microorganismos patógenos.

- Ausencia de resistencia transferible frente a antibióticos de interés clínico: No deben actuar como fuente de genes de resistencia a antibióticos para miembros microbianos menos inocuos del ecosistema intestinal y se debe verificar la ausencia de genes transferibles.
- Debe cumplir una serie de requisitos tecnológicos como el cultivo a gran escala, la estabilidad genética y el mantenimiento de su viabilidad dentro del producto alimenticio o suplemento.
- Principales pruebas realizadas a microorganismos para clasificarlos como probióticos:
 - Resistencia a la acidez gástrica.
 - Resistencia del ácido de bilis.
 - Adherencia al moco y/o células epiteliales y variedades de las células humanas.
 - Actividad antimicrobiana contra bacterias potencialmente patógenas.
 - Capacidad de reducir la adherencia del patógeno a las superficies.
 - Actividad hidrolasa para la sal de bilis.
 - Resistencia a los espermicidas (aplicables a probióticos de uso vaginal).

3.4.2. Mecanismo de acción de los probióticos. ⁽⁵⁾

- Producción de ácidos grasos de cadena corta:
- Disminución de pH (pH < 4) no es tolerado por determinados microorganismos.
- Cambios en la actividad enzimática
 - Aumento de Lactasa
 - Aumento de Glicosidasa
 - Capacidad de adhesión.
 - Disminución de Nitroreductasa, B-Glucuronidasa, azoreductasa efecto competitivo con otras bacterias ocupantes (inhibiendo el crecimiento o competición por nutrientes).
- Capacidad de secreción de lactobacilos y bacterias bífidas de antibióticos naturales (lactocinas, helveticinas, curvacinas, bacteriocinas, nicinas y bifidocinas).

- Inmunomodulador: estimulan el sistema inmune del huésped, estimulan a los macrófagos y modulan la respuesta IG As.

Cuadro N° 5. Algunos microorganismos probióticos y efectos beneficiosos.

Género	Especie	Cepa	Efecto
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La5	Disminuye la diarrea asociada a antibióticos.
<i>Lactobacillus</i>	<i>Casei</i>	Shirota	Reduce la recurrencia del cáncer de vejiga Efectos sobre el sistema inmune.
	<i>plantarum</i>	299v	Reducción del colesterol tipo LDL.
	<i>johnsonii</i>	La1	Mejora de la acción de vacunas orales.
	<i>brevis</i>	---	Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>lactis</i>	Bb12	Tratamiento de la alergia. Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> . Disminuye la incidencia de la "diarrea del viajero". Mejora la acción de las vacunas orales.
	<i>longum</i>	BB536	Efectos sobre el sistema inmune. Efecto antitumoral en cáncer de colon e hígado.
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	nisle 1917	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	nisle 1917	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	<i>boulardii</i>	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal

Cuadro N°5 continuación.

<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i>	JS	Convierte el ácido linoleico en ácido linoleico conjugado
--------------------------	-----------------------	----	---

3.4.3. Efectos beneficiosos de microorganismos probióticos. ⁽¹⁰⁾

A lo largo de los años, se ha atribuido a los microorganismos probióticos propiedades beneficiosas sobre el ser humano, ejerciendo sus efectos a diversos niveles, por ejemplo, sobre el tracto gastrointestinal, el sistema inmune, el sistema cardiovascular o el tracto urogenital. Mientras que algunos de estos beneficios han sido bien documentados y evidenciados sus efectos y su gran potencial en modelos animales, aún necesitan ser comprobados mediante estudios en humanos. Por otro lado, es muy importante destacar que estos efectos beneficiosos dependen de la cepa empleada, por lo tanto, no existe una cepa universal que proporcione todos los efectos probióticos beneficiosos, hasta incluso distintas cepas dentro de la misma especie pueden presentar variaciones en los efectos sobre el hospedador.

Los probióticos son microorganismos con una serie de propiedades que los hace interesantes para su aplicación en el sistema gastrointestinal. Son capaces de sobrevivir el paso a través de este tracto, es decir, son capaces de resistir el pH ácido del estómago, los enzimas pancreáticos y las sales biliares. Debido a su capacidad de adhesión al epitelio intestinal, pueden soportar daños producidos en las paredes intestinales, así como también facilitar la exclusión de patógenos. Los mecanismos de acción de los microorganismos probióticos dirigidos al control de patógenos intestinales incluyen: estimulación del sistema inmune; competición por los receptores o sitios de adhesión y los nutrientes y factores de crecimiento; cambios en el pH del medio debido a la producción de ácidos orgánicos por parte de las bacterias probióticas; secreción de componentes antimicrobianos como las bacteriocinas

3.4.4. Diarrea.

La diarrea se define comúnmente como heces frecuentes, sueltas o acuosas y es a menudo causada por patógenos. Microorganismos con potenciales probióticos han sido evaluados en distintos trabajos para determinar si son eficaces en la prevención de diversos tipos de diarrea en adultos, incluyendo diarrea asociada a antibióticos y/o inducida por quimioterapia.

En varios estudios de intervención controlados con placebo se ha evaluado la utilidad de los probióticos como tratamiento para la diarrea aguda, particularmente de tipo viral. Se ha demostrado que la administración de algunas cepas probióticas como *Lactobacillus* GG, *L. reuteri*, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus* (sola o dentro de una terapia de rehidratación oral) se asocia a una disminución de la severidad y duración de las diarreas, tanto en poblaciones de países desarrollados como sub-desarrollados.

Para el caso del *L. GG*, algunos estudios muestran que disminuye en un día la duración de la diarrea, aunque no modifica el número de deposiciones. También previene la diarrea asociada a los antibióticos, la diarrea nosocomial y la diarrea asociada a malnutrición, pero no tiene efectos significativos cuando se trata de diarreas severas. Otras de las cepas evaluadas en el tratamiento y prevención de la diarrea son las especies de bifidobacterias, como el *Bifidobacterium infantis* y el *B. bifidum* en combinación con *Lactobacillus*, mostrando de igual forma buenos resultados.

En el tratamiento de la diarrea persistente en niños las investigaciones muestran que el uso de probióticos es prometedor como tratamiento coadyuvante porque disminuyen la duración y persistencia de la diarrea.

Con respecto a la prevención de la diarrea asociada a antibióticos se ha estudiado el papel de los *Lactobacillus*, concluyendo que la administración de esta cepa como un agente profiláctico durante el tratamiento antibiótico reduce

el riesgo de desarrollar este tipo de diarrea en personas adultas, pero no en pacientes pediátricos.

3.4.5. Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son dos formas de enfermedad inflamatoria intestinal, de las que se plantea que un desbalance entre las bacterias “protectoras” y patogénicas de la flora intestinal (disbiosis) puede estar relacionado a su patogénesis. El fundamento para utilizar probióticos en el tratamiento de estas enfermedades se basa en la posibilidad de colonizar el tracto intestinal con cepas bacterianas que promuevan una respuesta inmune de tipo protectora. En algunos estudios se ha encontrado que esta respuesta se basa en la producción de citosinas anti-inflamatorias, sin embargo, este no es el único mecanismo, varios estudios muestran que ciertas cepas probióticas inducen la producción de IL-12 a concentraciones bajas y en otros casos de células T reguladoras.

Aunque el tratamiento activo con probióticos induce cambios en la respuesta inmune de personas con enfermedad inflamatoria intestinal (caracterizadas por una disminución en el número de monocitos y células dendríticas productoras de IFN y un aumento de la secreción de IL-10 y TGFb), la mayor parte de los ensayos clínicos realizados no han demostrado un efecto relevante en la evolución clínica de estos pacientes

3.4.6. Gastritis asociada a *Helicobacter pylori*.

Estudios in vitro y ensayos en modelos de experimentación revelan la capacidad que poseen las bacterias del ácido láctico de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, patógeno Gram negativo responsable de la gastritis crónica, úlcera péptica que incrementa el riesgo de padecer cáncer gástrico. Además, son capaces de inhibir la actividad ureasa de esta bacteria, necesaria para su supervivencia en el pH gástrico. En estudios in vivo en animales y humanos, los

microorganismos probióticos no son capaces de erradicar a este microorganismo, pero sí son capaces de reducir la carga microbiana y la inflamación.

3.4.7. Estreñimiento

Numerosos estudios demuestran que la adición de probióticos a bebidas lácteas puede contribuir a disminuir el estreñimiento, afección en la que el número de deposiciones es menor a tres veces por semana, asociado a heces duras o difíciles de evacuar, dolor y distensión abdominal. Las investigaciones muestran que el beneficio sobre el estreñimiento puede ser provisto por distintas cepas, sin embargo, se observan diferencias en la población en la cual logran el efecto (favorable para niños y/o adultos) así como, en el indicador de cambio a nivel digestivo (número de deposiciones, consistencia de heces, dolor, entre otras). A continuación, se mencionan algunas de las cepas probióticas para las cuales se han evidenciado resultados favorables: La administración de *L. reuteri* (DSM 17938) en niños con estreñimiento crónico muestra efectos positivos en la frecuencia de la evacuación intestinal, aun cuando no se han observado efectos favorables en la consistencia de las heces.

También, se ha comprobado que el *L. casei*, *L. rhamnosus* Lcr35 y el *Bifidobacterium breve*, pueden ser benéficos. El *Bifidobacterium breve*, incrementa la frecuencia de las evacuaciones, mejora la consistencia de las heces y disminuye el dolor abdominal en niños con estreñimiento funcional.

En adultos y niños la suplementación con los probióticos *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 ó *Lactobacillus casei* Shirota, ó *Escherichia coli* Nissle 1917 favorecen la frecuencia de las evacuaciones intestinales y la consistencia de las heces. Asimismo, se ha observado el efecto simbiótico del *Lactobacillus acidophilus* 145 y *Bifidobacterium spp.* 420 para prevenir la recurrencia de la enfermedad sintomática.

La mezcla de probióticos, se considera una alternativa en el tratamiento del estreñimiento: en niños se ha demostrado que la combinación de los probióticos *Bifidobacteria bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *Lactobacilli casei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* genera una reducción significativa en los síntomas de esta patología, especialmente en relación con el dolor abdominal y a la consistencia de las heces. En adultos el consumo de yogur con una mezcla de probióticos *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus* ha demostrado un significativo aumento en la frecuencia de las evacuaciones.

El *Bifidobacterium lactis* Bb-12 es otra de las cepas probióticas cuyo consumo en bebidas lácteas fermentadas ha demostrado efectos benéficos a nivel intestinal. Específicamente, se relaciona con el aumento en el volumen de las heces y en la frecuencia de evacuación, así como, en una reducción significativa del hedor.

3.4.8. Síndrome de intestino irritable

El síndrome de intestino irritable (SII) es una de las patologías gastrointestinales más comunes; se caracteriza por dolor abdominal, frecuencia de defecación alterada, consistencia de heces modificada, meteorismo e hinchazón. Diferentes estudios clínicos randomizados tanto en niños como en adultos han mostrado efectos significativos del consumo de probióticos sobre la frecuencia y severidad del dolor en el SII. Entre los probióticos que han sido estudiados se encuentran: *Lactobacillus* Lp299v, *L. casei* GG, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *B. lactis* DN-173010, *B. infantis* 35624, y el grupo de probióticos VSL#3.

Revisiones sistemáticas y meta-análisis han concluido que existe un potencial efecto benéfico de los probióticos en la disminución de la sintomatología general del SII, especialmente del dolor abdominal. No obstante, los estudios presentan heterogeneidad clínica y estadística, con limitantes en el tipo y tamaño de población, dosis y tipo de probiótico utilizado, variación en la definición de los síntomas, corto tiempo de intervención, y limitaciones metodológicas, por lo que

se ha recomendado realizar estudios clínicos randomizados aleatorizados de mayor duración y con un mayor rigor metodológico que demuestran el gran potencial de algunas cepas de probióticos.

En resumen, los probióticos han mostrado un efecto benéfico en el SII sobre todo para controlar el dolor abdominal, pero son necesarios estudios con mayor rigor metodológico, para que los probióticos sean reconocidos como efectivos en el manejo del SII.

3.5. Probióticos en las distintas etapas de la vida. ⁽²³⁾

Los probióticos se han utilizado en gran número de patologías pediátricas, principalmente en problemas gastrointestinales con alteración en la microbiota intestinal como la diarrea infecciosa, el sobredesarrollo bacteriano, la enterocolitis necrotizante y, más recientemente, en procesos inflamatorios crónicos como la enfermedad inflamatoria intestinal o en trastornos funcionales como el cólico del lactante o el estreñimiento.

También se ha valorado su efecto beneficioso en alteraciones inmunológicas como la dermatitis atópica, en la prevención y tratamiento de la alergia alimentaria y, en los últimos años, en la prevención de patología del recién nacido pretérmino y en la infección por *H. pylori*.

Algunos de los resultados y beneficios clínicos más frecuentes obtenidos con la administración de probióticos en pediatría y adultos se muestran en la siguiente tabla:

Cuadro N° 6. Resultados y beneficios clínicos más frecuentes obtenidos con la administración de probióticos.

Área de estudio	Beneficios clínicos
Tratamiento de la diarrea	Disminución en la frecuencia
	Disminución en la duración
	Reducción en la incidencia
	Reducción de la severidad de los síntomas

Cuadro N°6 continuación.

Diarrea asociada al tratamiento antibiótico	Reducción de la incidencia y/o severidad de los síntomas
Enterocolitis necrotizante	Reducción de la incidencia y severidad de los síntomas
Prevención de la diarrea	Reducción del tiempo de hospitalización y de la severidad de los síntomas durante la misma
Prevención de la dermatitis atópica	reducción de la incidencia
	Tratamiento de la dermatitis Atópica adaptada de Saavedra

Hay que considerar que los diferentes probióticos emplean distintas estrategias de acción y que no todas las cepas probióticas presentan la misma resistencia ni capacidad de colonización y, por tanto, no tienen la misma eficacia clínica. Por ello, hay que considerar que los efectos en la práctica clínica son específicos de cepa y no están indicados para las mismas situaciones.

3.5.1. Dosis de probióticos

Son muy variables, dependiendo de la cepa y de las indicaciones, oscilan entre 10^6 - 10^{11} UFC/dosis. Es importante definir la dosis terapéutica, esto es, la dosis con la que se alcanzan los efectos beneficiosos para la salud, tanto en la prevención como en el tratamiento de los diferentes procesos patológicos. Habitualmente, puede oscilar en un intervalo entre 1 millón y 10 000 millones (10^6 - 10^{10}) de UFC/dosis; han de llegar viables $\geq 10^6$ y de $\geq 10^8$ UFC/dosis al intestino delgado y colon, respectivamente.

Cuadro N° 7. Principales aplicaciones de los probióticos en gastroenterología con evidencia. Modificado de la Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología.

Trastorno	Cepa probiótica	Dosis	Edad
Tratamiento diarrea	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	10^{10-11} UFC, 2 veces por día	Pediátrico

Cuadro N° 7 continuación.

Trastorno	Cepa probiótica	Dosis	Edad
Tratamiento diarrea	<i>Saccharomyces boulardii</i> , cepa de <i>S. cerevisiae</i>	10 ⁹ 2-6 veces por día	Ambos
	<i>Enterococcus faecium</i> LAB SF68	10 ⁸ UFC, 3 veces al día	Adultos
aguda infecciosa	<i>Saccharomyces boulardii</i> , cepa de <i>S. cerevisiae</i>	10 ⁹ 2-6 veces por día	Ambos
	<i>Enterococcus faecium</i> LAB SF68	10 ⁸ UFC, 3 veces al día	Adultos
Prevención de la diarrea asociada	<i>S. boulardii</i> , cepa de <i>S. cerevisiae</i>	10 ⁹ 2-6 veces por día	Ambos
	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 ¹⁰ UFC, 1 o 2 veces al día	Ambos
Prevención de la diarrea asociada	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 + <i>Streptococcus thermophilus</i>	10 ⁷ + 10 ⁶ UFC /g de fórmula	Pediátrico
	<i>L. rhamnosus</i> (cepas E/N, Oxy y Pen)	2x10 ¹⁰ , 2 veces al día	Pediátrico
Prevención de la diarrea asociada	<i>L. acidophilus</i> CL1285 + <i>L. casei</i> LBC80R	5x10 ¹⁰ UFC, 1 o 2 veces al día	Adultos
	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 ¹⁰⁻¹¹ UFC, 2 veces por día	Pediátrico
	<i>B. lactis</i> Bb12 + <i>S. Thermophiles</i>	10 ⁸ + 10 ⁷ UFC /g de fórmula	Pediátrico
Terapia coadyuvante para de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>L. casei</i> DN-114 001 en leche fermentada	10 ¹⁰ UFC, 2 veces al día	Pediátrico
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .	5x10 ⁹ al día	Adultos
	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	10 ⁸ UFC /día	Adultos
Síndrome de intestino irritable	VSL#3	1 al día < 11 años resto 2 al día	Pediátrico
	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 9843	5 x10 ⁷ al día	Adultos

Cuadro N° 7 continuación.

Síndrome de intestino irritable	<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	10 ⁸ UFC, 1 vez al día	Adultos
	<i>B. animalis</i> DN-173 010 en leche fermentada	10 ¹⁰ UFC 2 veces al día	Adultos
	<i>L. rhamnosus</i> GG + <i>L. rhamnosus</i> LC705 + <i>B. breve</i> Bb99	10 ¹⁰ UFC, 1 vez al día	Adultos
	<i>B. longum</i> 101 + <i>L. acidophilus</i> 102 + <i>Lactococcus lactis</i>	10 ¹⁰ UFC, 1 vez al día	Adultos

3.6. Bacterias del Ácido Láctico o BAL. ⁽¹³⁾

Bacterias ácido-lácticas (BAL) En este grupo se incluye una clasificación funcional de bacterias no patógenas, no toxigénicas, Gram positivas, fermentativas, que se asocian a la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles para fermentación de los alimentos. En este grupo se incluyen las especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus thermophilus*. Dado que el género *Bifidobacterium* no se asocia con fermentación de alimentos y es taxonómicamente diferente de otras BAL, habitualmente no se lo agrupa como un miembro de las BAL.

3.6.1. Género *Lactobacillus*. ⁽¹³⁾

3.6.1.1. Caracteres bioquímicos y filogenéticos.

El género *Lactobacillus* (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o cocobacilos coryneformes. Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no móviles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos

bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativo presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30- 40°C, pero pueden crecer en un rango de 5 a 53°C, son de tipo anaerobios facultativos. El rango óptimo de pH para su crecimiento es 5,5-5,8 pero en general pueden soportar e incluso crecer a pH inferiores y superiores, hasta un pH máximo de 7,2. Se les considera microorganismos acidúricos, capaces de disminuir el pH de los alimentos que los contiene hasta 4, siempre y cuando contenga un carbohidrato fermentable en él, teniendo como consecuencia, en ocasiones, la supresión del crecimiento o la muerte de otras bacterias presentes.

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies forman colonias rugosas, otras, como *Lactobacillus confusus*, presentan colonias viscosas por excepción. Generalmente no presentan actividad proteolítica y lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas intracelulares. Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Los *Lactobacillus* no licúan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni ácido sulfídrico (H₂S). Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno.

Son citocromo negativo, por la ausencia de porfirinas; presentan una reacción bencidina negativa. La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y

cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo. Su crecimiento en medio líquido ocurre en la zona anaerobia del medio, además presenta células que precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso. Los *Lactobacillus* no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como el diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno (H₂S) y aminas en el queso.

Cuadro N° 8. Hábitats del género *Lactobacillus*.

Hábitat	Lugar
Humanos	Cavidad oral
	Tracto gastrointestinal
	Vagina
otros hábitats	
Plantas	Material de plantas
Tierra y estiércol	---
Fermentaciones alimentarias	Leche, queso, cerveza, Bebidas fermentadas
Agua	Aguas residuales
Alimentos deteriorados	---
Frutas y granos	Purés de fruta y grano
Pescado	---
Azúcar procesado	---
Carne	Productos cárnicos

Su estudio filogenético clásico divide al género en 3 grupos principales:

- Grupo de *L. delbrueckii*: Contiene la especie *L. delbrueckii*, especie tipo del género *Lactobacillus*, e incluye principalmente, aunque no exclusivamente, a los lactobacilos homofermentadores, los cuales solo producen ácido láctico derivadas de la fermentación de las moléculas de glucosa.
- Grupo *L. casei-Pediococcus*: formado por especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Comprende homofermentadores obligados, así como también heterofermentadores facultativos y obligados.

- Grupo *Leuconostoc*: Incluye algunos lactobacilos heterofermentadores obligados y ha sido, posteriormente, subdividido en 3 géneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*.

En cuanto a su perfil fisiológico/metabólico se clasifican en 3 grupos:

- Homofermentadores obligados: fermentan glucosa (hexosas) exclusivamente a ácido láctico mediante la ruta de Embden-Meyerhof- Parnas, sin embargo, no pueden fermentar pentosas o gluconato por su carencia en la enzima fosfocetolasa. Los Lactobacilos característicos de este grupo son *L. delbrueckii* y *L. acidophilus*.
- Heterofermentadores facultativos: fermentan hexosas a ácido láctico por la ruta de Embden-Meyerhof o a los ácidos láctico, acético y fórmico y etanol en situaciones de limitación de glucosa. También pueden fermentar pentosas, para producir ácidos láctico y acético, y gluconato, ya que poseen enzimas aldolasa y fosfocetolasa.
- Heterofermentadores obligados: fermentan hexosas a ácido láctico, acético y/o a etanol y CO₂ mediante la ruta del fosfogluconato. La producción de gas a partir de glucosa es característica de este tipo de bacterias. Fermentan también pentosas a ácido láctico y acético mediante esta ruta. Este grupo está generalmente asociado a bacterias responsables de la descomposición de los alimentos.

3.7. Pruebas para diferenciar al género *Lactobacillus* spp. ⁽²⁰⁾

3.7.1. Descripción de pruebas.

3.7.1.1. Tinción de Gram.

El objetivo de la tinción de Gram es clasificar las bacterias según su pared celular en Gram positivos y Gram negativos. La tinción de Gram es una tinción diferencial que permite observar la morfología bacteriana.

El fundamento radica en las diferencias estructurales de la pared celular de ambos grupos bacterianos. Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacárida externa.

Al añadir alcohol-acetona se arrastrará el colorante sólo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas queda retenido y las células permanecerán de color violeta. Las células Gram negativas se teñirán de color rosado por el colorante de contraste utilizado (safranina).

3.7.1.1.1. Expresión de los resultados:

La tinción de Gram permite, además de diferenciar las bacterias en cuanto a las características de su pared, observar las distintas morfologías (cocos, bacilos, coco- bacilos, etc.), su forma de agrupación (células aisladas, en cadena, en racimo, en tétradas, etc.) y también la medida de las células (pequeñas, grandes, cortas, largas, etc.).

3.7.1.2. Prueba de la catalasa. ⁽¹⁹⁾

La catalasa es una enzima que cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno H_2O_2 en oxígeno O_2 y agua H_2O . El peróxido de hidrógeno se encuentra en el metabolismo de muchos organismos vivos como consecuencia del uso de azúcares por vía oxidativa, y es utilizado, entre otras cosas, como reactivo antimicrobiano.

La reacción positiva de la catalasa implica desprendimiento de oxígeno.



3.7.1.3. Prueba de oxidasa. ⁽¹⁹⁾

La prueba se basa en que hay bacterias que producen una oxidasa intracelular. Esta reacción se debe a un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación de

un citocromo reducido por el oxígeno molecular, el cual a su vez es aceptor de un electrón en la etapa terminal del sistema de transferencia electrónica.

Una reacción positiva consiste en una serie de reacciones con un componente autooxidable del sistema citocromo como catalizador final. Se utilizan sustratos artificiales como aceptores de electrones: Por ejemplo, clorhidrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina. Estos sustratos son poco coloreados o incoloros y la reacción final produce compuestos fuertemente coloreados.

3.7.1.4. Prueba de indol. ⁽⁸⁾

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptófanasas son capaces de degradar el triptófano produciendo indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol puede detectarse en un medio de prueba con triptófano, observando la aparición de color rojo, luego de agregar una solución que contiene p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Erlich o Kovacs).

3.7.1.5. Prueba de Triple azúcar y hierro (TSI). ⁽⁸⁾

La prueba de TSI se basa en detectar la fermentación de la glucosa con producción de ácido y a la vez producción de gas de algunas bacterias. El medio también es útil para detectar la habilidad de algunos microorganismos para producir ácido sulfhídrico a partir de la utilización de compuestos que contengan azufre.

3.8. Microencapsulación. ⁽⁹⁾

La microencapsulación es un proceso en el que están inmersos una gran variedad de compuestos bioactivos; tales como productos farmacéuticos, vitaminas, ADN, péptidos, saborizantes, colorantes, aceites esenciales, nutrientes, y microorganismos, estos se encuentran cubiertos por una matriz o un sistema de membranas.

La sustancia encapsulada es generalmente un líquido, pero también puede presentarse en forma sólida.

El producto obtenido mediante este proceso se define como “micropartícula”, de acuerdo con su tamaño, las partículas se clasifican como nanopartículas (por debajo de 1 μm), y micropartículas (de 1 μm a 1000 μm), las partículas con un tamaño mayor a 1000 μm se denominan “macropartículas”.

Independientemente del método de microencapsulación aplicado, el producto final de este proceso es una suspensión de micropartículas que presentan diferentes tamaños, después de la separación de la preparación líquida de las micropartículas y el secado, el material puede ser presentado en forma de polvo suelto, teniendo en cuenta este hecho, las micropartículas pueden constituir por sí solas una forma farmacéutica, que puede ser administrada en forma de suspensión o acondicionada en otra forma farmacéutica, como las cápsulas de gelatina rígida o en comprimidos.

3.8.1. Micropartículas. ⁽⁹⁾

Las micropartículas son pequeñas partículas que se definen como sistemas sólidos elaborados a base de polímeros, u otros materiales, de naturaleza biodegradable o no, que se utilizan para vehicular distintos tipos de compuestos bioactivos, con respecto a su morfología y estructura interna, las micropartículas se dividen en dos tipos más específicos: las microesferas y microcápsulas.

Las denominadas “microesferas” son sistemas que tienen una estructura de tipo matricial, en este tipo de sistema las sustancias a encapsular pueden ser adsorbidas en la superficie de la partícula o encapsuladas en su interior, ya sean sistemas dispersos homogéneos o heterogéneos.

Las microesferas pueden ser sistemas dispersos homogéneos o heterogéneos en función de la sustancia encapsulada y de su estado molecular.

Las “microcápsulas” son sistemas reservorio que poseen una estructura morfológica relativamente simple, constituidas por dos elementos claramente diferenciados: El núcleo interno, que contiene el compuesto bioactivo, y una membrana de revestimiento, por lo general de naturaleza polimérica, al mismo tiempo las microcápsulas pueden ser constituidas por una partícula simple (microcápsulas mononucleares) o poseer varias partículas en el interior de la matriz de recubrimiento (microcápsulas polinucleares).

3.8.2. Núcleo interno. ⁽⁹⁾

El núcleo interno de las micropartículas (líquido, sólido, o más raramente en estado gaseoso) contiene el material a encapsular, este se encuentra limitado por una membrana generalmente de naturaleza polimérica, de espesor variable, la cual actúa como un film protector, aislando el material a encapsular y evitando de esta forma la exposición de este a las condiciones adversas del medio.

Cuando existe un determinado estímulo, la membrana de las micropartículas se altera liberando su contenido en el lugar y momento adecuado.

3.8.3. Agente encapsulante. ⁽⁹⁾

Existen diferentes materiales de encapsulación, los cuales pueden ser de origen natural o sintético, que se han utilizado con éxito en el proceso de microencapsulación.

Estos agentes generalmente incluyen materiales poliméricos (hidrófilo o hidrófobo) o una combinación de ambos.

Uno de los principales factores que afectan a la estabilidad del material encapsulado es la naturaleza del material encapsulante, el cual debe ser seleccionado de acuerdo al tipo de material a encapsular y sus propiedades fisicoquímicas, así como también el método a utilizar para la microencapsulación.

El agente encapsulante debe poseer características y propiedades adecuadas para su empleo, entre las que pueden mencionarse: baja viscosidad a concentraciones elevadas, y de fácil manipulación durante el proceso de microencapsulación, baja higroscopicidad, con el propósito de facilitar la manipulación y evitar la aglomeración, proporcionar la mayor protección a la sustancia de interés, poseer una solubilidad y mecanismo de liberación apropiados etc.

Además de lo anterior mencionado, el agente encapsulante debe ser biocompatible, biodegradable, no tóxico y no causar reacciones de hipersensibilidad, muchas veces es necesario utilizar mezclas de materiales de recubrimiento para poder obtener todas las características de un agente de encapsulación ideal.

3.8.4. Mecanismos de liberación. ⁽⁹⁾

El proceso de microencapsulación permite que el núcleo interno que contiene el fármaco esté aislado del medio exterior hasta que se produzca la liberación, los factores principales que afectan a la velocidad de liberación del material encapsulado son las interacciones entre el núcleo y el agente encapsulante, además de otras variables como la volatilidad del núcleo, la proporción entre el núcleo y el agente encapsulante, el tamaño de las partículas y el grado de viscosidad del agente encapsulante.

Los mecanismos de liberación del material encapsulado varían según el tipo y la geometría de las partículas, así como la naturaleza del agente encapsulante.

Los procesos que utilizan agentes encapsulantes hidrófilos suelen tener una liberación más rápida, por otro lado, el uso de agentes que son insolubles en agua como agentes encapsulantes tienden a retardar la liberación del núcleo interno.

Los mecanismos de liberación pueden ser:

- Liberación controlada por difusión.
- Liberación activada por el disolvente.
- Estímulos mecánicos.
- La liberación controlada por el pH.
- Liberación producida por cambios de temperatura.
- Permeabilidad selectiva.

Un aspecto para tomar en cuenta muy importante en la liberación del núcleo es el grosor de la membrana de revestimiento de la microcápsula, la cual puede ser modificada.

3.8.5. Análisis morfológico. ⁽⁹⁾

La morfología de la superficie de las micropartículas puede ser analizada por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión, estas técnicas permiten obtener información morfológica y topográfica.

Otra técnica para estudiar la morfología de las micropartículas es la microscopía de fuerza atómica, esta técnica proporciona imágenes reales de las tres dimensiones, con una resolución espacial que se acerca a las dimensiones atómicas, por lo tanto, permite observar in situ los procesos que se producen en la interfaz, también es posible observar las secciones de corte, efectuar mediciones de rugosidades y realizar un análisis a profundidad entre muchas otras posibilidades.

3.9. Encapsulación de microorganismos probióticos. ⁽¹³⁾

Para intentar proteger a los microorganismos probióticos de los factores que pueden afectar a su viabilidad en el producto final, así como también para ofrecerles protección frente a las condiciones adversas que encuentran a su paso a través del tracto gastrointestinal superior, se vuelven cada día más importantes las técnicas de encapsulación.

La microencapsulación es definida como la tecnología empleada para el embalaje/ envoltura de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en pequeñas cápsulas que pueden liberar su contenido a una velocidad controlada bajo determinadas condiciones.

Mientras que la encapsulación es una tecnología en la cual se envuelve y cubre totalmente a los probióticos con la matriz que se esté utilizando para dicha finalidad, sin permitir la exposición de los probióticos al medio externo.

Una microcápsula se constituye principalmente por una fuerte y delgada membrana de forma esférica y semipermeable, la cual envuelve al núcleo sea este sólido o líquido, con diámetro que puede variar desde unas pocas micras hasta unos cuantos milímetros. Las perlas sin recubrimiento también se pueden considerar como microcápsulas en el sentido más amplio.

Por tanto, la microencapsulación permite separar al núcleo del medio externo, en este caso los microorganismos probióticos, hasta que sean liberados, protegiéndolos de los factores adversos en su paso por el tracto gastrointestinal como lo son: la acidez, concentración de oxígeno, y condiciones gástricas, mejorando en gran medida la estabilidad y su vida media, de esta manera se obtiene una liberación controlada dependiendo el tipo de matriz que se utilice. La liberación de los microorganismos probióticos de la cápsula se puede dar por varios mecanismos, tales como: Ruptura mecánica de la pared de la cápsula, disolución de la cápsula en el medio, fusión de la pared de la misma, o la difusión del contenido hacia el exterior, es necesario mencionar que las cápsulas al poseer una pared semipermeable, permiten el intercambio de nutrientes, y metabolitos con el medio externo, lo cual es de mucha importancia para mantener una adecuada viabilidad de los probióticos.

3.9.1. Métodos de encapsulación. ⁽¹³⁾

Existen una gran variedad de métodos de encapsulación aplicables en diversos campos (medicina, industria alimentaria, industria farmacéutica, agricultura, cosmética, etc.). Dependiendo de las características deseadas del producto final, así como también el equipo disponible para realizar los procesos de encapsulación y los materiales a utilizar se debe elegir el método más adecuado para llevar a cabo este proceso.

Algunos de los métodos de encapsulación más usados en la actualidad en las industrias son: El método de extrusión o goteo, emulsión, desecación por atomización, liofilización, pulverización, adhesión a almidón, etc.

Se debe señalar que como paso previo en todas las técnicas que se mencionan, se debe obtener un cultivo de microorganismos probióticos crecidos en condiciones óptimas, los cuales son luego centrifugados y empleados en forma de suspensión o de polvo liofilizado para su posterior microencapsulación.

3.9.2. Metodología de extrusión o goteo. ⁽¹³⁾

La extrusión consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado forzando el paso de una solución a través de una aguja de jeringa o de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo. Para ello, los microorganismos son adicionados a una solución hidrocoloide y esta suspensión se hace gotear sobre una solución de endurecimiento, la cual va a variar dependiendo del material empleado. El tamaño de las cápsulas obtenidas suele rondar los 2-4 mm, y éste va a depender del diámetro de salida de la solución, ya que cuanto menor sea el diámetro de la abertura correspondiente (aguja/boquilla), menor será el tamaño de las cápsulas. Se trata de una técnica apropiada para la encapsulación de microorganismos ya que es poco agresiva, no emplea disolventes perjudiciales para las bacterias, se puede llevar a cabo tanto en condiciones aerobias como anaerobias y, además, empleando los dispositivos adecuados se puede producir a gran escala. Es por ello que se trata de una técnica ampliamente aplicada en la encapsulación de probióticos.

Paralelamente al método de goteo simple y directo a través de una aguja, se han desarrollado otras técnicas más complejas como son el generador electrostático de goteo, el “jet cutter” y las técnicas de rotura de un flujo laminar. Mientras el generador electrostático de goteo emplea un potencial electrostático entre la aguja y la solución de endurecimiento para reducir el tamaño de las cápsulas mediante la reducción de la tensión superficial de la superficie de la gota, en el “jet cutter” el fluido es extruido continuamente a través de una boquilla y el flujo formado va a ser roto en segmentos mediante una herramienta giratoria, de manera que, debido a la tensión superficial, estos segmentos van a formar cápsulas esféricas a medida que caen. La técnica de rotura de un flujo laminar se basa principalmente en la rotura de un fino chorro líquido en gotas del mismo tamaño, rotura que puede llevarse a cabo mediante la aplicación de una vibración determinada.

3.9.3. Materiales de encapsulación.

Como material de encapsulación de microorganismos probióticos normalmente se emplean polisacáridos de diferente origen: algas marinas (carragenano, alginato), plantas (almidón y sus derivados, goma arábiga), animales (quitosano) o bacterias (Gelano, Xantanao); y proteínas animales (leche, gelatina). Mayoritariamente se emplean polisacáridos en la encapsulación de probióticos ya que constituyen una matriz cuya degradación se ve favorecida por microorganismos de la microbiota intestinal, lo que unido a la protección que ofrecen a nivel del tracto gastrointestinal superior, permite obtener una liberación de los microorganismos en el órgano diana.

Algunos de los materiales más comúnmente empleados para la encapsulación son:

Alginato. ⁽¹⁰⁾

El alginato es un material encapsulante no tóxico utilizado en la encapsulación de sustancias debido a su capacidad de formar geles, esferas, micro y nanopartículas, sus beneficios en caso de ingestión como fibra diaria para la reducción de los niveles de azúcar y colesterol en sangre y la capacidad para prolongar la vida útil en productos. El alginato puede interactuar con cationes divalentes que actúan como agente de reticulación.

Se ha demostrado que el alginato tiene biocompatibilidad, biodegradabilidad y no es tóxico. Ha sido ampliamente utilizado para encapsular productos farmacéuticos y aceites esenciales. En lo que respecta a su estructura, el alginato es un biopolímero lineal polianiónico compuesto por ácidos D-manúrico y L-gulurónico.

A valores bajos de pH se desintegra rápidamente de las cápsulas, permitiendo la liberación del producto encapsulado, lo cual ha llevado a buscar alternativas para prolongar la liberación de las sustancias encapsuladas a pH bajos, como ha sido cubrir las microcápsulas de alginato con quitosán para mejorar la estabilidad química y mecánica de las cápsulas e incrementar la efectividad de estas.

Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes. Por ejemplo, las microcápsulas resultantes son sensibles al ambiente ácido, lo cual no es compatible para su resistencia al paso por el estómago, además son porosas, suponiendo esto un defecto ya que lo que se pretende es proteger a las células microbianas de su entorno.

Quitosán. ⁽¹⁰⁾

El quitosán es un polímero no tóxico, bioadhesivo y biodegradable, formado por unidades de 2- desoxi-N-acetil-D-glucosamina y 2-desoxi-Dglucosamina unidos por b-1, 4 enlaces glicosídicos. Se obtiene a partir de la desacetilación de quitina (poli-N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa) de conchas de crustáceos. Es hidrófilo y puede formar una matriz hinchable por reticulación iónica entre los

grupos amino cargados positivamente de las cadenas de quitosán y polímeros o iones cargados negativamente. Se ha utilizado para la encapsulación de sustancias en conjunto con otros materiales, entre estos están el alginato, el tripolifosfato, el formaldehído y el glutaraldehído.

Se ha empleado para la encapsulación y la liberación de fármacos, microorganismos, aceites, probióticos, prebióticos y proteínas. También se ha empleado como recubrimiento para mejorar la encapsulación de *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum* en cápsulas de alginato, con el fin de proteger al probiótico y prebiótico de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal. En estudios publicados en el que se compara la estabilidad de las cápsulas de alginato, quitosán y alginato/quitosán se encontró que al combinar el alginato con el quitosán las cápsulas tuvieron mejor estabilidad y protección durante su paso hacia el tracto digestivo.

Gelatina. ⁽¹⁷⁾

La gelatina es una proteína compleja que se obtiene mediante la hidrólisis parcial del colágeno. La estructura de triple hélice del colágeno se desintegra mediante la destrucción de los puentes de hidrógeno y los enlaces hidrofóbicos, seguido del desenredo de las cadenas y la disociación de las moléculas en componentes más pequeños provocando la solubilización del colágeno. La gelatina, por tanto, está constituida por un conjunto de cadenas polipeptídicas que tienen un peso molecular inferior al del colágeno, y dependiendo de la especie.

Las cadenas de gelatina son altamente solubles y dan lugar a la formación de una red tridimensional en frío, resultado de su tendencia a volver a formar parcialmente la estructura del colágeno nativo. De la extensión en la formación de enlaces y entrecruzamientos en la red dependerá la fuerza del gel y la estabilidad térmica. Estos dos parámetros son los principales indicadores de la calidad de la gelatina comercial. Este biopolímero es ampliamente usado en la industria alimentaria, tanto por sus propiedades funcionales, como por su elevado

contenido en proteína. En el campo de la medicina y farmacia, la gelatina es utilizada para múltiples aplicaciones como por ejemplo como hidrogeles, como matriz para implantes, en microesferas inyectables para la liberación controlada de fármacos y para infusiones intravenosas entre otras.

Almidón. ⁽²⁾

El almidón es un polisacárido que consiste en un gran número de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos. Se compone principalmente de amilosa, polímero lineal formado por moléculas de D-glucopiranosas unidas mediante enlace α -1-4 y, amilopectina, un polímero ramificado de glucosa en el cual las moléculas se unen mediante enlaces glucosídicos 1-4 en su porción recta y enlaces 1-6 en sus ramificaciones.

La proporción de amilosa y amilopectina determina la absorción y retención de agua y, en consecuencia, la capacidad de formación de geles, lo cual influirá en las propiedades funcionales del almidón.

El almidón resistente es aquél que no es digerido por las enzimas pancreáticas (amilasas) en el intestino delgado. Por lo que puede llegar al colon donde es fermentado. Además, al tratarse de un prebiótico, puede ser utilizado por los microorganismos probióticos en el intestino grueso.

Los gránulos de almidón se consideran una superficie ideal para la adhesión de los microorganismos, lo cual mejora la viabilidad de los mismos hasta su llegada al intestino y los mantiene metabólicamente activos.

Goma Xantana ⁽¹¹⁾

Es un hetero-polisacárido producido por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Es utilizada en numerosas aplicaciones en la industria alimentaria y química como un agente espesante, estabilizante y emulsionante. Otra de sus aplicaciones es ser utilizado como agente de encapsulación para diferentes biocomponentes.

Se han realizado microencapsulaciones de *Bifidobacterium lactis* con una mezcla de goma Xantana - goma gellan, utilizando una técnica de ultrasonido; demostraron una alta supervivencia de *B. lactis* durante un periodo de 21 días, almacenadas a 4 y 22 °C con una población de 1.0×10^{10} UFC/g y 1.1×10^{11} UFC/g, respectivamente en un yogur. Por otro lado se han utilizado diferentes mezclas de gomas de origen microbiano (goma Xantanaa, gellan, pullulan y jamilan), para encapsular a *L. plantarum* CRL 1815 y *L. rhamnosus* ATCC 53103 y determinar la efectividad que tienen como agentes encapsulantes durante el paso por el tracto gastrointestinal; los resultados indicaron que la mezcla con Xantana (1%) y gellan (0.75%) prolongan la viabilidad de *L. plantarum* CRL 1815 y *L. rhamnosus* ATCC 53103 por 6 horas al exponerlas a sales biliares y pancreatina.

Otros investigadores estudiaron la resistencia de *L. acidophilus* LA14 y *B. lactis* BI07 en diferentes sistemas encapsulantes, utilizando alginato de sodio como base principal, goma Xantana y acetato ftalato de celulosa en diferentes proporciones por los métodos de extrusión, liofilización y secado por aspersion, mostrando que al incorporar 0.5 ó 1.0% de Xantana y 3% de acetato de ftalato de celulosa en mezcla con alginato, aumentaron la supervivencia de los probióticos en condiciones ácidas en un 63.71 y 91% respectivamente por cada método.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

4.1.1. De campo, experimental, prospectivo

-Campo: Se realizó una visita al mercado municipal de San Martín departamento de San Salvador para recolectar las muestras de queso fresco, y a un local seleccionado ubicado en Mejicanos departamento de San Salvador para recolectar las muestras de queso duro viejo.

-Experimental: Con las muestras recolectadas se procedió a realizar el proceso de aislamiento de microorganismos del género *Lactobacillus spp* que estuviesen presentes, los cuales fueron identificados por medio de sus características morfológicas y bioquímicas propias del género, determinando además sus propiedades probióticas.

Los microorganismos aislados que cumplieron satisfactoriamente las pruebas de identificación y verificación de las propiedades probióticas, fueron sometidos a un proceso de encapsulación por medio del método de extrusión, estandarizando previamente su concentración de inoculación a 10^8 UFC/mL, utilizando diferentes mezclas de polímeros para la formación de las cápsulas, al mismo tiempo se realizó el mismo procedimiento a un microorganismo de control de comparación, utilizando en este caso *Lactobacillus casei* para poder comparar los resultados, tanto en la identificación como en el proceso de encapsulación.

Finalmente, las cápsulas obtenidas conteniendo a los microorganismos del género de los *Lactobacillus spp* en su interior, fueron almacenadas por un periodo de 30 días, realizando recuentos durante los días 0, 15 y 30 con el objetivo de determinar su porcentaje de supervivencia y viabilidad.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador en los meses de julio a noviembre del 2019.

- **Prospectivo:** Los datos obtenidos de esta investigación se podrán tomar como una referencia para futuras investigaciones sobre el aislamiento de microorganismos del género *Lactobacillus spp* a partir de fuentes secundarias y su supervivencia durante la encapsulación en mezclas de matrices poliméricas por el método de extrusión para ser utilizado como probiótico.

4.2. Investigación bibliográfica:

Se consultaron las diferentes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.
- Felix Choussy, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Internet

4.3. Investigación de campo.

Las muestras de queso fresco producidas en El Salvador utilizadas para realizar esta investigación se recolectaron en el mercado municipal de San Martín, que corresponde al departamento de San Salvador y en un local seleccionado ubicado en Mejicanos departamento de San Salvador para adquirir las muestras de queso duro viejo.

4.3.1. Universo:

Todas las muestras de queso fresco comercializadas en el mercado municipal de San Martín y todas las muestras de queso duro viejo comercializadas de un local seleccionado ubicado en Mejicanos departamento de San Salvador.

4.3.2. Tipo de muestreo:

Se realizó un muestreo dirigido y puntual en el Mercado Municipal de San Martín para la obtención de los quesos no madurados (queso fresco), y de un local seleccionado ubicado en Mejicanos departamento de San Salvador para la obtención de quesos madurados (queso duro viejo), se consideró al criterio de los autores el muestreo de 15 quesos frescos y 15 quesos duro viejo tomados al azar, de los cuales se aislaron los probióticos objetos de estudio.

4.3.2.1.Muestra: Quesos no madurados (quesos frescos), quesos madurados (quesos duro viejo).

4.3.3. Identificación de la muestra:

Se identificaron las muestras con la siguiente información:

- Código de la muestra.
- Tipo de muestra.
- Fecha, hora y lugar de recolección.
- Responsable del muestreo.

4.3.4. Transporte de la muestra:

Las muestras recolectadas de quesos frescos y quesos duro viejo fueron colocadas en bolsas estériles y fueron transportadas en hieleras a una temperatura aproximada de 2°C, y llevadas al Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Se refrigeraron a temperaturas de 2°C a 8 °C, los análisis se realizaron inmediatamente, sin sobrepasar las 24 horas desde la recolección de las muestras.

4.4. Parte Experimental:

Los análisis se realizaron, en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Materiales, Equipos y reactivos: ver Anexo N° 1.

Se realizaron los siguientes análisis:

4.5. Aislamiento y selección de las posibles cepas de *Lactobacillus spp* procedentes de queso fresco ⁽⁷⁾

Para el aislamiento de *Lactobacillus spp* se utilizó el método de diluciones seriadas, de las cuales fueron utilizadas las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} para el recuento de microorganismos.

- Pesar 10 gramos de cada una de las muestras de queso fresco, utilizando bolsa para estomacher.
- Añadir 90 ml de diluyente de peptona estéril.
- Homogeneizar en estomacher a 260 RPM por 1 min. (dilución 10^{-1}).
- Transferir 0.1 mL con una micropipeta, de la dilución 10^{-1} a un tubo de ensayo con tapón de rosca que contiene 9.9 mL de Agua peptonada estéril (diluyente). Dilución 10^{-3} :
 - Homogeneizar en vortex a 260 RPM durante 1 minuto.
 - Transferir 0.1 mL con una micropipeta, de la dilución 10^{-3} a un tubo de ensayo con tapón de rosca que contiene 9.9 mL de Agua peptonada estéril (diluyente). Dilución 10^{-5}
 - Homogeneizar en vortex a 260 RPM durante 1 minuto.
 - Dilución 10^{-6} : Transferir 1 mL con una micropipeta, de la dilución 10^{-5} a un tubo de ensayo con tapón de rosca que contiene 9 mL de Agua peptonada estéril (diluyente). Dilución 10^{-6}
 - Homogeneizar en vortex a 260 RPM durante 1 minuto.
 - Transferir 1 mL con una micropipeta, de la dilución 10^{-6} a un tubo de ensayo con tapón de rosca que contiene 9 mL de Agua peptonada estéril (diluyente). Dilución 10^{-7} :
 - Homogeneizar en vortex a 260 RPM durante 1 minuto.

- De las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} tomar 1 mL y sembrar por la técnica de inoculación por superficie en medio MRS.
- extender con varilla de vidrio.
- incubar a 37° C durante 48 horas en condiciones aerobias. (Anexo N° 2).
- A partir de las cepas aisladas de las muestras de queso fresco, proceder a la selección de aquéllas que cumplan las características que presumiblemente permitan considerarlas como bacterias ácido-lácticas (BAL) de interés para el estudio: colonias pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos.

Nota: Seguir el mismo procedimiento para el tratamiento de las muestras de queso duro viejo, añadir 90 ml de caldo MRS como medio de enriquecimiento e incubar a 37°C por 48 h previo a las diluciones seriadas.

4.6 Purificación de microorganismos.

Seleccionar las colonias que cumplan con las características morfológicas macroscópicas del género *Lactobacillus spp*, y proceder de la siguiente manera:

- Esterilizar el asa microbiológica a la llama, hasta el enrojecimiento.
- Dejar enfriar cerca de la llama.
- Tomar una cantidad adecuada de colonias que se presumen del género *Lactobacillus spp*, abriendo la placa de Petri en la zona cercana a la llama.
- Inocular por método de tres cuadrantes en medio MRS sólido.
- Incubar en condiciones aerobias a 37°C durante 48 horas. (Anexo N° 4)

4.7. Pruebas de identificación. ⁽¹⁴⁾

4.7.1. Pruebas iniciales.

- Observación macroscópica de las colonias.
- Observación microscópica de las colonias (Tinción de Gram).

4.7.2. Observación macroscópica de las colonias.

- Observar detenidamente los crecimientos microbianos obtenidos.

- Identificar las características morfológicas macroscópicas (forma, tamaño, color, superficie, borde y textura).
- Documentar los resultados.
- Las colonias del género *Lactobacillus spp* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos.

4.7.3. Tinción de Gram.

- Esterilizar el asa microbiológica a la llama, hasta el enrojecimiento.
- Dejar enfriar cerca de la llama.
- Tomar una colonia aislada del crecimiento bacteriano obtenido en el medio MRS.
- Suspende la colonia, en un portaobjetos que contiene una gota de solución salina y flamear en el mechero para fijar la bacteria.
- Agregar suficiente cristal violeta en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Adicionar suficiente lugol en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Agregar suficiente Alcohol – Cetona en el frotis, y lavar con agua destilada inmediatamente.
- Adicionar suficiente safranina en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X), los microorganismos del género *Lactobacillus spp*, son Gram positivo, de tipo bacilos cortos, formados en cadena y en general no móviles. (Anexo N° 5).

4.7.4. Prueba de la catalasa.

- Colocar sobre un porta objetos una gota de peróxido de hidrógeno al 30%.
- Esterilizar el asa en la llama, hasta el enrojecimiento.
- Dejar enfriar cerca de la llama.

- Tomar con el asa, una colonia típica del género *Lactobacillus spp*, de un cultivo en medio MRS de no más de 48 h.
- Suspender la colonia sobre la gota de peróxido de hidrógeno al 30%.
- Un burbujeo en los primeros segundos indica una reacción positiva.
- Incluir un testigo positivo (*Staphylococcus aureus*). Para el caso de los microorganismos del género de los *Lactobacillus spp*, el resultado esperado para esta prueba según sus características metabólicas es negativa. (Anexo N° 6).

4.7.5. Prueba de oxidasa.

- Esterilizar el asa a la llama, hasta el enrojecimiento.
- Dejar enfriar cerca de la llama.
- Tomar con el asa una colonia típica del género *Lactobacillus spp*, del crecimiento bacteriano obtenido en el medio MRS.
- Extender cuidadosamente sobre una gota de agua destilada estéril colocada en un portaobjeto.
- Tomar un disco de oxidasa y ubicarlo sobre el frotis.
- Esperar como máximo 1 minuto para observar si existe algún cambio de coloración (rosa-morado), si esto no ocurriera, al microorganismo se le consideraría oxidasa negativa. Incluir un testigo positivo (*Pseudomona aeruginosa*). Para el caso de los microorganismos del género de los *Lactobacillus spp*, el resultado esperado para esta prueba según sus características metabólicas es negativa. (Anexo N° 7).

4.7.6. Prueba de TSI.

- Esterilizar el asa en la llama, hasta el enrojecimiento.
- Dejar enfriar cerca de la llama.
- Tomar con el asa en punta, una colonia típica del género *Lactobacillus spp*, del crecimiento obtenido en el medio MRS.
- Inocular por picadura en agar TSI contenido en tubos inclinados, hasta el fondo del tubo y por estría simple al momento de retirar el asa.

- Incubar en condiciones aerobias por 24 horas a 37°C.
- Realizar la lectura de los resultados obtenidos. (Anexo N° 8).

LECTURA:

- Parte superior del tubo y fondo del tubo alcalino (Color rojo intenso) azúcares sin fermentación (K/K).
- Parte superior del tubo color rojo (alcalino) y fondo del tubo negro, glucosa fermentada, lactosa y sacarosa sin fermentación, producción de ácido sulfhídrico (K/A).
- Parte superior del tubo color rojo (alcalino) fondo del tubo amarillo (ácido) glucosa fermentada, lactosa y sacarosa no fermentada, producción de gas (K/A).
- Parte superior del tubo y fondo del tubo color amarillo lactosa y/o sacarosa y glucosa fermentada, producción de ácido sulfhídrico (A/A).

Nota: Según las características bioquímicas de los microorganismos del género de *Lactobacillus spp*, son de tipo homofermentadores obligados, capaces de fermentar la glucosa a ácido láctico exclusivamente, pero incapaces de fermentar las pentosas, por lo tanto, se espera obtener un resultado de tipo A/A.

4.7.7. Prueba de Indol.

- Esterilizar el asa en la llama, hasta el enrojecimiento.
- Dejar enfriar cerca de la llama.
- Tomar con el asa una o dos colonias del crecimiento obtenido en medio MRS.
- Inocular en tubo con rosca que contiene agua peptona y tapan.
- Incubar el tubo por 24 h a 37°C en condiciones aerobias.
- Posterior al tiempo de incubación, abrir el tubo y agregar 5 gotas del reactivo de Kovacs.
- La formación de un anillo violeta en la superficie del medio indica una prueba positiva.

Nota: Según las características bioquímicas del género *Lactobacillus spp*, estos no deben ser capaces de degradar el triptófano, por tanto, el resultado debe ser negativo. (Anexo N° 9).

4.8. Estandarización de *Lactobacillus spp*.⁽¹⁶⁾

- Esterilizar el asa en la llama, hasta el enrojecimiento.
- Dejar enfriar cerca de la llama.
- Tomar una colonia del crecimiento bacteriano obtenido en medio MRS.
- Inocular en 3 tubos con rosca que contengan medio MRS.
- Incubar por 48 horas a 37°C en condiciones aerobias.
- Posterior al tiempo de incubación, realizar lavados con agua peptonada estéril 0.1%, utilizando perlas de ebullición estériles para el arrastre del crecimiento bacteriano.
- Colectar los lavados realizados en un mismo tubo para obtener la suspensión bacteriana.
- Realizar lecturas en el espectrofotometro UV/VIS a 580 nm.
- Ajustar la transmitancia de las suspensiones obtenidas al 15%.
- Realizar diluciones en tubos conteniendo agua peptonada estéril al 0.1% (p/v), hasta llegar a la dilución 10^{-8} .
- Tomar 1.0 mL de la dilución 10^{-8} e inocular por técnica de placa vertida en medio MRS.
- Incubar por 48 horas a 37 °C en condiciones aerobias.
- Verificar la concentración de 10^8 UFC/mL de las suspensiones realizadas por medio del recuento en placa.
- realizar el mismo procedimiento para el microorganismo de control de comparación (*Lactobacillus casei*). (Anexo N° 10)

4.9. Evaluación de la supervivencia de microorganismos potencialmente probióticos en condiciones de bilis simulada y pH ácido.

- Preparar una cantidad de 30 mL de caldo MRS.
- Repartir en cantidades de 10 mL en dos Erlenmeyer (rotular como medio MRS y MRS más sales biliares).
- Ajustar el pH de ambos a 2.0 con HCl 6 M y NaOH 6 M.
- Esterilizar ambos medios en autoclave a 121°C x 15 min a 15 lbs de presión.
- Preparar las sales biliares de origen bovino al 0.3 %.
- Después de la esterilización adicionar 300µL de sales biliares al medio de cultivo rotulado como: Medio MRS más sales biliares.

En el primer Erlenmeyer que contiene medio MRS más sales biliares:

- transferir 1.0mL de *Lactobacillus spp* estandarizado a una concentración de 10^8 UFC/mL a 10 mL de caldo MRS enriquecido con sales biliares de origen bovino al 0.3%.
- Incubar por 2 horas a 37°C en condiciones aerobias.
- Tomar 1.0 mL e inocular por medio de la técnica de placa vertida en medio MRS.
- Realizar el recuento de las UFC presentes. (Anexo N° 11).

En el segundo Erlenmeyer que contiene medio MRS:

- Transferir 1.0 mL de *Lactobacillus spp* estandarizado a una concentración de 10^8 UFC/mL a 10.0mL de caldo MRS.
- Incubar por 2 horas a 37 °C en condiciones aerobias.
- Tomar 1.0 mL e inocular por medio de la técnica de placa vertida en medio MRS.
- Incubar por 48 horas a 37 °C en condiciones anaerobias.
- Realizar el recuento de las UFC presentes. (Anexo N° 12).

Determinación del porcentaje de células viables.

- Determinar el porcentaje de supervivencia utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de supervivencia} = \frac{\text{Log UFC N1}}{\text{Log UFC N0}} \times 100\%$$

En donde N1= total de unidades formadoras de colonias obtenidas de los recuentos después de las 48 horas de incubación en agar MRS y

N0= número inicial de BAL inoculadas en medio ácido/ en medio ácido con bilis simulada.

4.10. Actividad antimicrobiana.

Utilizando cultivos previos de los microorganismos patógenos de *Salmonella typhimurium*, proceder de la siguiente manera:

- Esterilizar el asa en la llama, hasta el enrojecimiento.
- Dejar enfriar cerca de la llama.
- Tomar una colonia típica de *Salmonella typhimurium*, procedente de un cultivo previo en medio TSA.
- Sembrar por duplicado por método de tres cuadrantes *Salmonella typhimurium* en placa con medio TSA.
- Incubar en condiciones aerobias durante 24 horas a 37 °C.
- Tomar una asada y sembrar en 3 tubos inclinados de medio TSA.
- Incubar en condiciones aerobias por 24 horas a 37 °C.
- Realizar lavados con agua peptonada estéril 0.1% (utilizar perlas de ebullición estéril para el arrastre del cultivo bacteriano).
- Colectar en un mismo tubo los lavados realizados para obtener una suspensión bacteriana.
- Realizar lecturas en el espectrofotómetro UV/VIS a 580 nm.
- Ajustar las suspensiones de los microorganismos patógenos obtenidos, a 15% de transmitancia.
- sembrar en placas con medio TSA, por método de inoculación en superficie utilizando la técnica de hisopado.

- Colocar 3 cilindros de acero inoxidable estériles separados por 120° uno del otro.
- Llenar los cilindros con suspensión de *Lactobacillus spp* estandarizado a 10⁸ UFC/mL obtenido en el proceso de aislamiento de microorganismos, según el apartado 4.9.
- Incubar por 48 horas a 37 °C en condiciones aerobias. (Anexo N° 13)
- Medir las zonas de inhibición y calcular la actividad inhibitoria por la medida del valor de inhibición, calculado como:

$$\text{Valor de inhibición} = (I - D_c) / 2$$

En donde: D_c = diámetro del cilindro de cultivo (mm).

I = diámetro de inhibición (mm).

Nota: Realizar el mismo procedimiento utilizando *Staphylococcus aureus*, como microorganismo patógeno y como medio de cultivo TSA incubar en aerobias a 37° durante 24 horas y separadamente realizar el mismo procedimiento utilizando *Escherichia coli* en medio de cultivo TSA, en condiciones aerobias por 24 horas a 37° C.

4.11. Preparación de mezclas poliméricas.

4.11.1 Preparación de mezcla de alginato de sodio – gelatina [3:10].

- Pesar 4.0 g de carbonato de sodio utilizando un beaker de 250 mL.
- Adicionar 100.0 mL de agua destilada.
- Agitar manualmente para disolverlo en el medio acuoso.
- Adicionar 10.0 g de gelatina.
- Calentar a 75° C con agitación constante a 1200 rpm (utilizando un hot plate).
- Adicionar 3.0 g de alginato de sodio, mantener la temperatura a no más de 85 °C con agitación constante a 1200 rpm hasta completar la disolución (utilizando un hot plate).
- Trasegar el contenido del beaker a un Erlenmeyer de capacidad adecuada.

- Someterse al proceso de esterilización en autoclave a 121°C x 15 min a 15 lbs de presión.

4.11.2 Preparación de mezcla de Almidón de maíz – gelatina [3:10].

Realizar el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.12.1 utilizando 3.0 g de Almidón de maíz sustituyendo al alginato de sodio.

4.11.3 Preparación de mezcla de Goma Xantana – gelatina [0.5:10].

Realizar el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.12.1 utilizando 0.50 g de Goma Xantana sustituyendo al alginato de sodio.

4.12. Encapsulación de microorganismos. ⁽¹³⁾

4.12.1. Metodología de extrusión o goteo.

- Tomar 1.0 mL del microorganismo probiótico aislado y estandarizado obtenido en el apartado 2.9.
- Adicionar en un tubo de rosca conteniendo 9.0 mL de una mezcla de solución polimérica de: alginato de sodio – Gelatina [3%: 10%] preparada previamente.
- homogeneizar la mezcla a 260 rpm, utilizando un vortex.
- Extraer 10.0 mL de la mezcla resultante con una jeringa de 15 mL de capacidad.
- Ejercer presión al émbolo de la jeringa para hacer pasar la mezcla obtenida a través de la aguja, con el objetivo de formar las cápsulas.
- Dejar caer las cápsulas sobre una placa de Petri estéril, a una altura no mayor a 5cm, para evitar deformaciones.
- Conservar las cápsulas formadas, en placas de Petri estériles a 4 °C y 25 °C.
- Liberar el contenido de las cápsulas a los 0, 15 y 30 días de almacenamiento.
- Realizar recuentos microbianos para determinar la cantidad de UFC presentes dentro de las cápsulas. (Anexo N° 14).

Cuadro N°9. Polímeros y concentraciones para utilizar para en el encapsulamiento.

Mezcla de polímeros a utilizar	Concentración (%)	Microorganismos para encapsular
Alginato de sodio – Gelatina	3 : 10	<i>Lactobacillus spp</i> aislado <i>Lactobacillus casei</i>
Almidón de maíz – Gelatina	3 : 10	<i>Lactobacillus spp</i> aislado <i>Lactobacillus casei</i>
Goma Xantana – Gelatina	0.5 : 10	<i>Lactobacillus spp</i> aislado <i>Lactobacillus casei</i>

4.13. Determinación de la temperatura de fusión de las cápsulas.

- Colocar dentro de un tubo capilar una fracción de las cápsulas formadas.
- Introducir dentro un tubo tiel conteniendo aceite vegetal.
- Aplicar calor por medio de un mechero de bunsen.
- Tomar la lectura de la temperatura de fusión de las cápsulas a través de un termómetro.
- Realizar el mismo procedimiento con cada una de las diferentes mezclas de polímeros utilizadas.

4.14. Método de desintegración de las cápsulas.

Desintegración por agitación magnética:

- Pesar 1.0 gramo de las cápsulas obtenidas con el microorganismo probiótico aislado.
- Adicionar en un beaker de 100 mL conteniendo 9.0 mL del Buffer Fosfato Sódico pH 7.
- Someterlas a agitación constante durante 1 minuto a 900 rpm usando un agitador magnético.

Desintegración por estomacher:

- Pesar 1.0 gramo de las cápsulas obtenidas con el microorganismo probiótico aislado.
- Adicionar en una bolsa para estomacher conteniendo 9.0 mL del Buffer Fosfato Sódico pH 7.
- Homogeneizar durante 1 minuto a 260 rpm en el equipo estomacher.

Nota: Realizar el mismo procedimiento con ambos métodos, para las cápsulas que contienen el microorganismo de control de comparación (*Lactobacillus casei*) y las capsulas de microorganismos aislados según las condiciones del apartado 4.16. (Anexo N° 15).

4.15. Procedimiento de recuento de microorganismos

- Tomar 1.0 mL de la suspensión de células resultante de la desintegración de las cápsulas.
- Realizar diluciones seriadas en agua peptonada estéril al 0.1% hasta 10^{-6} .
- Sembrar por duplicado 1.0 mL de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} en medio MRS, utilizando la técnica de placa vertida.
- Incubar en condiciones aerobias durante 48 h a 37 °C.
- Determinar el recuento en placa de las UFC presentes.
- Realizar el mismo procedimiento con las cápsulas que contienen el microorganismo de control de comparación. (Anexo N° 16).

4.16. Evaluación de la viabilidad de microorganismos probióticos encapsulados.

- Almacenar los probióticos encapsulados dentro de las placas de Petri tanto a 25 °C como a 4 °C.
- Realizar liberación y recuento de las UFC presentes dentro de las cápsulas a los 0, 15 y 30 días de almacenamiento, como se describió en el apartado 4.15 y 4.16.
- Realizar el mismo procedimiento con las cápsulas que contienen el microorganismo de control de comparación (*Lactobacillus casei*).

4.17. Observación de la morfología de las cápsulas al microscopio óptico

- Colocar sobre un portaobjeto las cápsulas.
- Enfocar en los objetivos, 4X, 10X.
- Por medio del uso del programa scopephoto y una cámara MiniVID de 3 MP adaptada al microscopio obtener imágenes de la morfología de las cápsulas.
- Realizar el mismo procedimiento con cada mezcla de polímeros utilizada.

4.17.1. Observación de las cápsulas por medio de la tinción de Gram:

- Tomar una cápsula (de cada una de las mezclas utilizadas).
- Suspender la cápsula, en un portaobjetos que contiene una gota de solución salina y flamear en el mechero para fijar.
- Agregar suficiente cristal violeta en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Adicionar suficiente lugol en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Agregar suficiente alcohol – cetona en el frotis, y lavar con agua destilada inmediatamente.
- Adicionar suficiente safranina en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X), los microorganismos del género del *Lactobacillus spp*, son Gram positivo, de tipo bacilos cortos, formados en cadena y en general no son móviles.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1. Aislar microorganismos probióticos del género *Lactobacillus spp* procedentes de muestras queso no madurado (queso fresco) y muestras de queso madurado (queso duro viejo).

Se realizó el aislamiento de microorganismos probióticos del género *Lactobacillus spp*, procedentes de muestras de quesos frescos y quesos duro viejo, (15 para cada tipo de quesos respectivamente), en el cual se tuvo como resultado el crecimiento bacteriano de diferentes tipos de morfologías macroscópicas, se utilizó como microorganismo de control de comparación a *Lactobacillus casei* (Ver tabla N°1), durante el proceso de análisis.

Se seleccionaron únicamente aquellas colonias que coincidieran con los resultados del microorganismo de control de comparación, así como también las que cumplieran con lo descrito en la literatura para los microorganismos del género *Lactobacillus spp*, tomando en cuenta las características morfológicas macroscópicas y microscópicas.

Tabla N° 1. Resultados obtenidos en el análisis del microorganismo utilizado como control positivo para el desarrollo de la investigación.

Microorganismo usado como control positivo	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Prueba de Oxidasa	Prueba de Catalasa	Agar TSI	Prueba de Indol
<i>Lactobacillus casei</i>	Colonias transparentes, borde entero, convexas, puntiformes	Bacilos cortos Gram Positivo	Negativo	Negativo	A/A	Negativo

La tabla N° 1 refleja los resultados obtenidos con el microorganismo de control de comparación *Lactobacillus casei*, los cuales se utilizaron como patrón para seleccionar los microorganismos aislados de las muestras de quesos frescos y quesos duro viejo que cumplieron con las características morfológicas y bioquímicas del género *Lactobacillus spp*.

5.2. Pruebas de identificación de microorganismos aislados y purificados de las muestras analizadas.

5.2.1. observación macroscópica en Agar MRS.



Figura. N° 1. Crecimiento bacteriano en Agar MRS.

En la Figura N°1 se muestran algunos ejemplos de los tipos de morfología macroscópica de los cultivos bacterianos obtenidos en el análisis de las muestras, se pueden observar colonias puntiformes, circulares, color crema, borde entero, así como también colonias puntiformes, transparentes, borde entero y convexas.

Se observó que algunas de las colonias cumplen con las características morfológicas macroscópicas descritas en la literatura para el género *Lactobacillus spp* (colonias pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza).

Así como también coinciden en algunos casos con los resultados del microorganismo de control de comparación *Lactobacillus casei*, (Ver tabla N°1), por lo tanto, esto sugiere la presencia de este tipo de microorganismos en las muestras analizadas.

Tabla N° 2. Características Morfológicas Macroscópicas identificadas en el análisis de los microorganismos aislados procedentes de muestras de quesos frescos y quesos duro viejo.

Tipo de morfología macroscópica (Clasificación)	Descripción	Cantidad de Muestras	Porcentaje %
A	Colonias puntiformes, borde entero, convexas, opacas color crema.	23	57.5%
B	Colonias puntiformes, borde entero, convexas, transparentes.	9	22.5%
C	Colonias circulares, borde entero, convexas, opacas, color crema.	3	7.5%
D	Colonias circulares, borde entero, convexas, transparentes.	2	5%
E	Colonias circulares, borde entero, convexas, opacas, color blanco	2	5%
F	Colonias puntiformes, borde entero, convexas, opacas color blanco	1	2.5%
	Total	40	100%

La Tabla N°2 refleja los resultados obtenidos en la identificación de las características morfológicas macroscópicas de los microorganismos aislados de las muestras de quesos frescos y quesos duro viejo, en donde se evidencia que las únicas clasificaciones que cumplen con lo descrito para el género *Lactobacillus spp*, según su forma, tamaño, forma, elevación, borde, y coloración son las de tipo “B” con un 22.5% la cual se asemeja a los resultados manifestados en el microorganismo de control de comparación (*Lactobacillus casei*), y la clasificación “D” con un 5% la cual cumple con lo descrito en la literatura para dicho género, lo cual sugiere que un 27.5%, del total de muestras analizadas pertenecen a dicho género.

5.2.2 Observación microscópica.

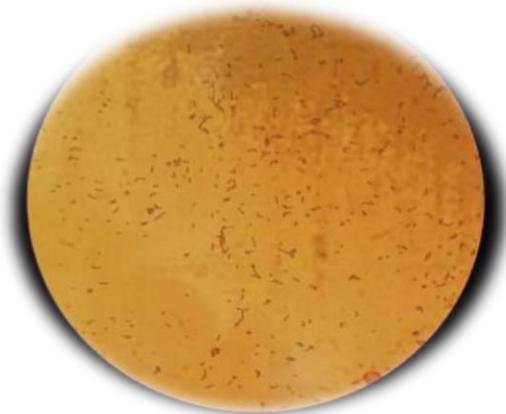


Figura N°2. Ejemplo de la morfología microscópica obtenida en el análisis de las muestras por medio de la tinción al Gram, (QF390A Y QF2113B respectivamente).

La Figura N°2. Refleja algunos de los tipos de morfología microscópica obtenidos en el análisis de las muestras de los microorganismos aislados, procedentes de las muestras de quesos frescos y quesos duro viejo, en donde se puede apreciar las características morfológicas tales como: Gram positivo, bacilos cortos, aislados y en cadena, lo cual coincide con lo descrito en la literatura para el género *Lactobacillus spp.*

Se observó que algunos de los microorganismos aislados cumplen con las características morfológicas microscópicas descritas en la literatura para el género *Lactobacillus spp.*, (bacilos largos y extendidos, bacilos cortos o cocabacilos coryneformes. Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas, y son Gram positivos).

Así como también coinciden en algunos casos, con los resultados del microorganismo de control de comparación *Lactobacillus casei*, (Ver tabla N°1), por lo tanto, esto sugiere la presencia de este tipo de microorganismos en las muestras analizadas.

Tabla N° 3. Características Morfológicas Microscópicas identificadas en el análisis de los microorganismos aislados procedentes de muestras de quesos frescos y quesos duro viejo.

Tipo de morfología microscópica (Clasificación)	Descripción	Tinción de Gram	Cantidad de muestras	Porcentaje %
A	Cocos en cadena	Negativo	8	16%
B	Cocos en cadena y diplococos	Positivo	6	12%
C	Bacilos cortos	Positivo	8	16%
D	Bacilos cortos	Negativo	13	26%
E	Cocos en cadena y diplococos	Negativo	2	4%
F	Bacilos cortos en cadena	Positivo	6	12%
G	Diplococos	Negativo	1	2%
H	Diplococos	Positivo	1	2%
I	Levaduriforme	Positivo	2	4%
J	Bacilos largos	Positivo	1	2%
K	Cocos en racimo y diplococos	Positivo	2	4%
Total			50	100%

La tabla N°3 refleja los resultados obtenidos en la identificación de las características morfológicas microscópicas de los microorganismos aislados de las muestras de quesos frescos y quesos duro viejo en donde se evidencia que las únicas clasificaciones que cumplen con los criterios de selección, son las de

tipo: “C” con un 16% la cual se asemeja a los resultados obtenidos en el microorganismo de control de comparación, que presentó una morfología de tipo bacilos cortos Gram positivo según detalle de la tabla N° 1, coincidiendo en los parámetros de la forma, y coloración al Gram, al ser en ambos casos bacilos cortos Gram positivos, mientras que las clasificaciones que cumplen con las características microscópicas descritas en la literatura para el género *Lactobacillus spp*, son las de tipo “F” con 12% (Bacilos cortos en cadena Gram positivo) y “J” 2% (bacilos largos Gram positivos), por lo tanto es posible asumir que en total el 30% pertenece a dicho género.

En el proceso de aislamiento de los microorganismos procedentes de las muestras de quesos frescos y quesos duro viejo, se obtuvo como resultado el crecimiento de colonias de consistencia húmeda, forma circular, puntiformes, con bordes enteros, pequeñas (2-5 mm) y superficie convexa y cuyo color variaba de blanco a cremosas y translúcidas, lo cual corresponde a características previamente reportadas por Vélez Ruiz, J. F. y Ramírez López, C. (2016), donde se obtuvo un “aislamiento de microorganismos procedentes de muestras de quesos frescos artesanales de cabra, las colonias obtenidas en el crecimiento bacteriano fueron de un tamaño de 1 a 2 mm, color blanco cremoso, forma redonda, puntiformes, con bordes enteros, y superficie convexa, de consistencia butirosa y húmeda, con la diferencia que el proceso de aislamiento se llevó a cabo en condiciones anaerobias” Vélez y Ramírez et. al.

En comparación con los resultados obtenidos en esta investigación, las condiciones de aislamiento fueron de tipo aerobias, lo que deja en evidencia que en ambas condiciones de incubación se puede obtener el crecimiento de este tipo de microorganismos correspondientes al género *Lactobacillus spp*, al ser de tipo anaerobios facultativos, por otra parte las características microscópicas obtenidas se describen como “bacilos Gram positivos, cocos Gram positivos, identificándose presuntivamente como bacterias ácido lácticas” Vélez y Ramírez

et. al, mientras que los resultados obtenidos en este estudio para las características microscópicas son de tipo bacilos cortos en cadena Gram positivos, bacilos largos Gram positivos, según la tabla N°3, lo cual coincide con las características propias del género *Lactobacillus spp*, según lo descrito previamente por Vélez y Ramírez et. al., investigación en la cual se obtuvo el aislamiento de microorganismos con características morfológicas de tipo bacilos cortos en cadena y aislados Gram positivo.

5.3. Realizar pruebas de identificación a los microorganismos aislados para determinar que pertenecen al género *Lactobacillus spp* y que sean probióticos.

5.3.1. Prueba de Oxidasa.

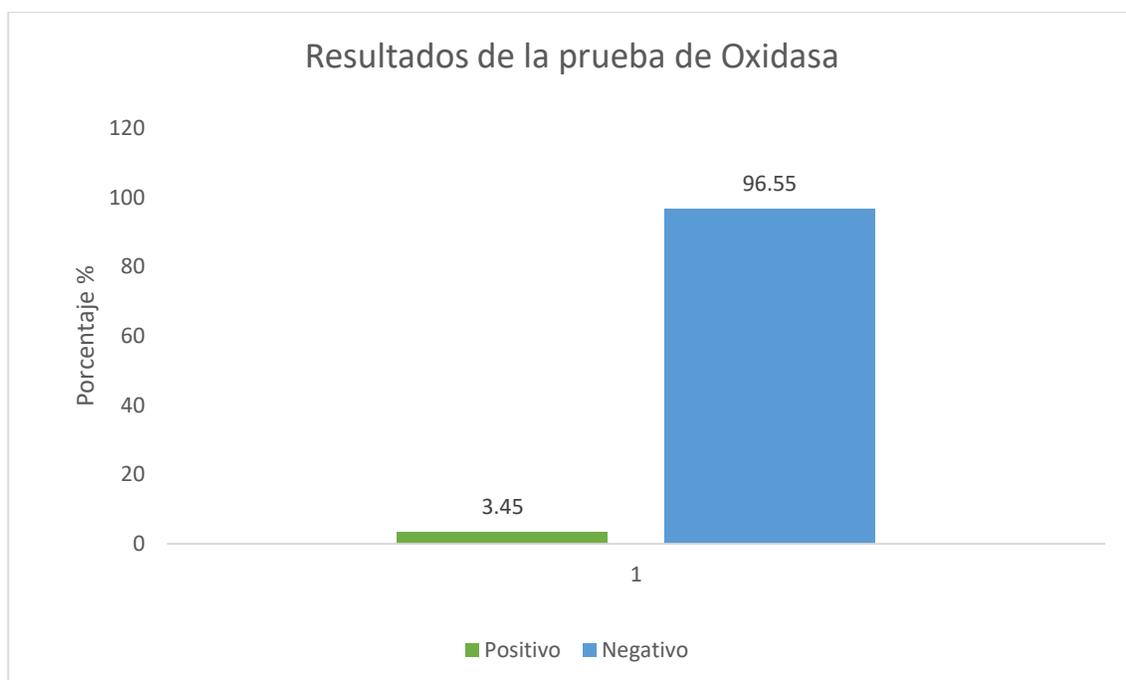


Figura N°3. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la prueba de oxidasa en el análisis de los microorganismos aislados.

La figura N°3 refleja los resultados obtenidos en la prueba de oxidasa realizada en microorganismos aislados y purificados que cumplieron con las características morfológicas macroscópicas y microscópicas, en la cual se determinó que el

96.55% de las muestras analizadas no produjeron ningún cambio de color sobre la superficie de los discos de oxidasa, por tanto, fue una respuesta negativa a la presencia de esta enzima, mientras que únicamente el 3.45% manifestó un resultado positivo.

En comparación con el resultado obtenido con el microorganismo de control de comparación (*Lactobacillus casei*), descritos en la tabla N° 1, se observa que el 96.55 % coincide al ser de tipo negativo, además es necesario mencionar que según las características bioquímicas de los microorganismos probióticos del género de *Lactobacillus spp*, estos deben dar un resultado negativo para dicha prueba.

5.3.2. Prueba de Catalasa.

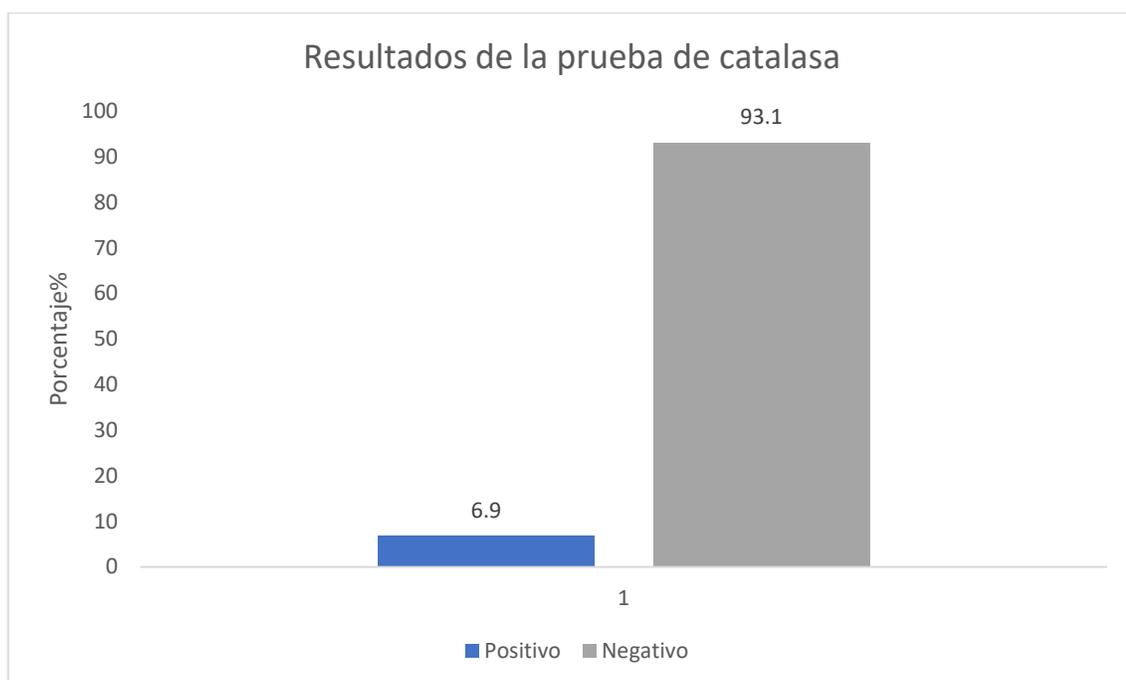


Figura N°4. Gráfico de los resultados obtenidos en la prueba de catalasa en el análisis de queso fresco.

La Figura N°4 muestra los resultados obtenidos en la prueba de catalasa realizada en las muestras de los microorganismos aislados y purificados que

cumplieron con las características morfológicas macroscópicas y microscópicas, se determinó en esta prueba que en el 93.10% de las muestras analizadas no se produjo liberación de gas o burbujeo, por tanto fue una respuesta negativa a la presencia de la enzima catalasa, mientras que el 6.90% manifestó un resultado positivo en la producción de gas que corresponde al oxígeno liberado en la descomposición del peróxido de hidrógeno.

En comparación con el resultado obtenido con el microorganismo utilizado como control positivo (*Lactobacillus casei*), descritos en la tabla N° 1, se observa que el 93.10 % coincide con este al manifestar un resultado negativo para la presencia de la enzima catalasa, según las características bioquímicas de los microorganismos probióticos del género *Lactobacillus spp*, estos deben dar un resultado negativo para dicha prueba.

5.3.3. Prueba de TSI.



Figura N°5. Representación gráfica de los resultados obtenidos en agar TSI en el análisis de los microorganismos aislados.

La Figura N°5 muestra los resultados obtenidos en la prueba de TSI realizada a los microorganismos aislados procedentes de las muestras de quesos frescos y quesos duro viejo, al comparar los resultados obtenidos con el resultado del microorganismo de control de comparación *Lactobacillus casei*, descritos en la tabla N° 1, en el cual se obtuvo una fermentación completa del medio diferencial de TSI de tipo A/A, se observa que el 52.71 % de los microorganismos aislados que cumplieron con las características morfológicas del género *Lactobacillus spp* según los resultados descritos en las tablas N°2 y N°3, coinciden al obtener una fermentación completa, de los azúcares presentes en el medio de cultivo diferencial TSI (A/A), además según las características metabólicas de los microorganismos probióticos del género *Lactobacillus spp*, estos son capaces de fermentar los carbohidratos, por lo que el resultado esperado es de tipo A/A.

5.3.4. Prueba de Indol.



Figura N°6. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la prueba de Indol en el análisis de los microorganismos aislados.

La Figura N°6 muestra los resultados obtenidos en el análisis realizado a los microorganismos aislados que cumplieron con las características morfológicas según lo descrito en las tablas N°2 y N°3, en donde se observa que el 100% de los microorganismos aislados no son capaces de degradar el triptófano, al no ocurrir ningún cambio de coloración en el medio de cultivo, lo que indica un resultado negativo a la presencia de la enzima triptófanasasa

En comparación con el resultado obtenido con el microorganismo de control de comparación (*Lactobacillus casei*), descritos en la tabla N°1, se observa que su resultado es negativo, por lo tanto, los microorganismos aislados coinciden al manifestar un resultado negativo, además según las características bioquímicas de los microorganismos probióticos del género *Lactobacillus spp*, estos deben dar un resultado negativo para dicha prueba.

En investigaciones realizadas por Guijie ,L.; Xin, Z.; Xingyao, L.; Yanni P. y Yu, Q. (2018), describen los resultados obtenidos para identificación de microorganismos aislados de fuentes secundarias utilizando las pruebas bioquímicas de indol y TSI, en donde los resultados fueron de tipo negativo para la prueba de indol, mientras que en medio TSI los microorganismos en estudio manifestaron una capacidad fermentativa completa en la prueba de fermentación de azúcares, además fueron sometidos a la prueba de oxidasa y catalasa, en las cuales se obtuvieron resultados negativos en cada una de estas, lo que confirma la ausencia del sistema citocromo oxidasa y a enzima oxidasa respectivamente, adicionalmente en dicha investigación se realizaron pruebas de movilidad e hidrofobicidad con el objetivo de evaluar su capacidad de adhesión a las células epiteliales.

Al comparar con los resultados obtenidos en las pruebas de identificación bioquímicas realizadas en el presente estudio, se puede observar que para los microorganismos aislados que cumplieron con las características morfológicas macroscópicas y microscópicas, coinciden en los resultados obtenidos en las

pruebas de oxidasa, catalasa e indol al ser en su mayoría de tipo negativo en cada una de estas pruebas según la representación gráfica en las figuras N°3, N°4, Y N°6 respectivamente, sin embargo un porcentaje de los microorganismos en estudio manifestó un resultado de tipo positivo en las pruebas de catalasa y oxidasa, lo que indica la presencia de enzimas catalasas y peroxidases lo cual no es propio de los microorganismos del género *Lactobacillus spp.*

Por otra parte, en la prueba de fermentación de azúcares se obtuvo como resultado que el 52.71 % de los microorganismos en estudio son de tipo fermentación completa según lo manifestado en la prueba diferencial de TSI representados en la figura N°5, los cuales cumplen con lo descrito por Azat, R.; Kayir, A.; Lin D.-b.; Li, W.; Liu, Y.; Zheng, X.-d. y Zhou, W.-w. (2016), para los microorganismos del género *Lactobacillus spp.*

Según los resultados del microorganismo de control de comparación *Lactobacillus casei* el cual manifestó una capacidad fermentativa completa y un resultado negativo para las pruebas de oxidasa, catalasa e indol en concordancia con los resultados presentados por los autores mencionados anteriormente y razón por la cual se descartaron todos los microorganismos aislados que presentaron resultados diferentes al microorganismo de control de comparación.

5.4. Estandarización de microorganismos del género *Lactobacillus spp.*

Tabla N°4. Microorganismos seleccionados para ser estandarizados a 15 % de transmitancia y una longitud de onda de 580 nm, en espectrofotómetro UV/VIS.

Código de muestra	Transmitancia a 580 nm (%T)	Recuento (UFC/mL)
QF2110B	15.1	4.00x10 ⁸
QF189A	15.6	1.00 x10 ⁹
QDV11	15.2	5.00 x10 ⁸
QF3110B	15.1	1.30 x10 ⁹
<i>L. casei</i>	15.2	5.00 x10 ⁸

La Tabla N°4 muestra los resultados de la estandarización de los microorganismos aislados de las muestras de quesos frescos y quesos duro viejo, se seleccionaron únicamente los microorganismos que cumplieron con las características morfológicas y bioquímicas del género *Lactobacillus spp*, las muestras en las que se obtuvo un resultado satisfactorio fueron aquellas codificadas como: QF3110B, QF2110B, QF189A, y QDV11.

5.5. Evaluación de la supervivencia de microorganismos potencialmente Probióticos en condiciones de bilis simulada y pH ácido.

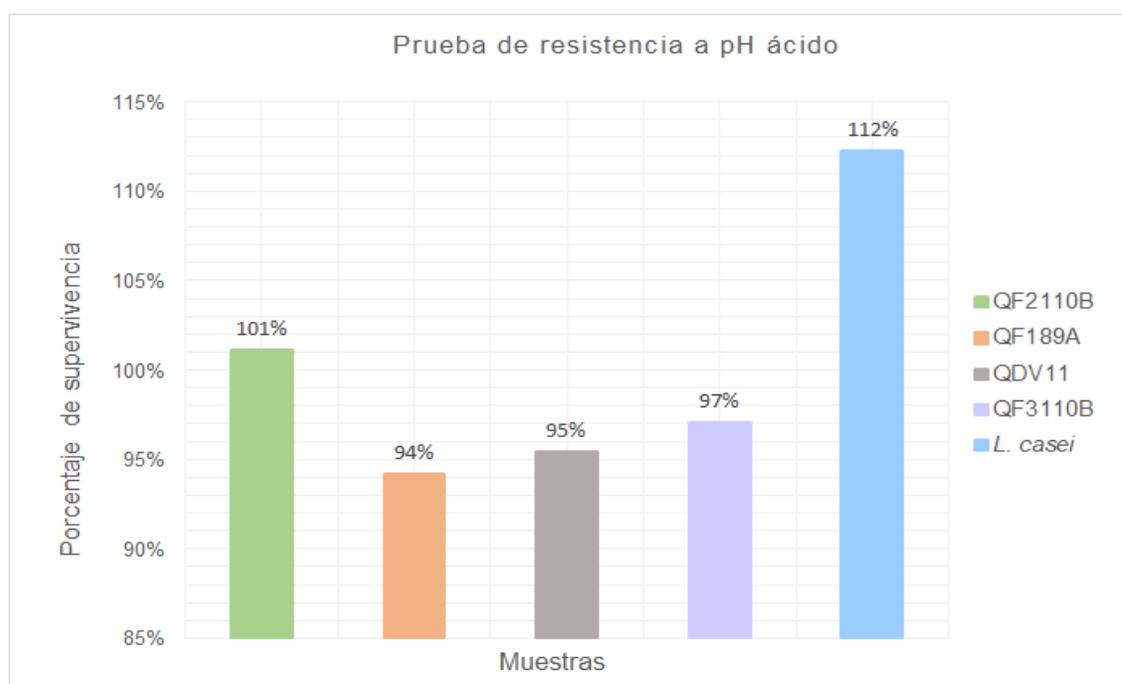


Figura N°7. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a pH ácido de los microorganismos aislados.

La Figura N°7 muestra los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a pH ácido, en donde se observa que todos los microorganismos sometidos a esta prueba son capaces de sobrevivir en condiciones de pH ácido al obtener un resultado de supervivencia en un rango de 94 a 112%.

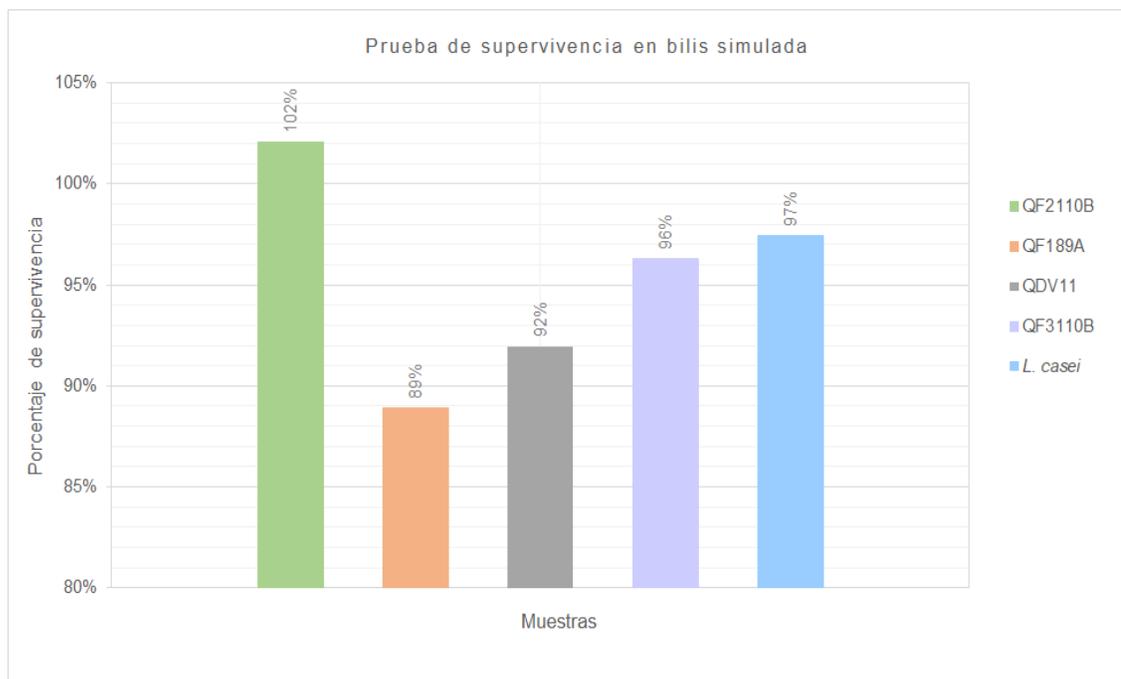


Figura N°8. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a bilis simulada de los microorganismos aislados.

La Figura N°8 muestra los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a bilis simulada, en donde se observa que todos los microorganismos sometidos a esta prueba son capaces de sobrevivir en condiciones de bilis simulada al obtener un resultado de supervivencia mayor al 90%, con excepción de la muestra QF189A en la cual su porcentaje de supervivencia fue de 89% al no ser una diferencia significativa no se descartó para proceder al proceso de encapsulación.

En estudios realizados por Azat, R. y Kayir et. al, describen la obtención del crecimiento bacteriano en condiciones de pH ácido de 3.0 y sales biliares al 0.3% en medio MRS para bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus spp*, en los cuales los valores de supervivencia están dentro de un rango del 74% al 87% con recuentos mayores a 10^6 UFC/ml por medio de recuento en placa, las condiciones en que se realizaron las pruebas fue en Buffer fosfato pH 3.0 y Buffer fosfato con sales biliares al 0.3%, preparando previamente una suspensión bacteriana; en general concluyen que todas las cepas sometidas al estudio

presentaron un crecimiento y tolerancia a las condiciones simuladas de los fluidos gástricos.

Lo anterior mencionado coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, además de observar que las metodologías de análisis en cada una de ambas pruebas son comparables con las realizadas por los autores mencionados anteriormente, lo que permite comprobar las propiedades probióticas de los microorganismos aislados en esta investigación.

5.6. Actividad antimicrobiana

Los microorganismos que fueron capaces de sobrevivir a las pruebas de tolerancia a pH ácido y bilis simulada, fueron sometidos a la prueba de actividad antimicrobiana para verificar su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, siendo sometidas a la prueba las muestras codificadas como: QF3110B, QF2110B, QF189A, y QDV11, mientras que los microorganismos patógenos seleccionados fueron: *Salmonella spp*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, además se realizó el mismo proceso con el microorganismo de control de comparación *Lactobacillus casei*.

Tabla N°5. Resultados de la prueba de actividad antimicrobiana.

Código de muestra	Actividad inhibitoria		
	<i>Salmonella spp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
QF3110B	+, 18mm	+, 16mm	+, 13 mm
QF2110B	+, 16mm	+, 13mm	+, 14mm
QF189A	-	-	-
QDV11	-	-	-
<i>L. casei</i>	+, 45mm	+, 51mm	+, 47mm

(+), Capacidad inhibitoria presente, (-) Capacidad inhibitoria ausente.

La tabla N°5 muestra los resultados obtenidos en la prueba de actividad antimicrobiana, en donde se observa que únicamente los microorganismos codificados como: QF3110B Y QF2110B poseen la capacidad para inhibir el

crecimiento de los microorganismos patógenos utilizados para dicha prueba, sin embargo, el microorganismo de control de comparación supera la capacidad inhibitoria de los microorganismos aislados.



Figura N°9. Prueba de actividad antimicrobiana utilizando microorganismos aislados del género *Lactobacillus spp* de la muestra codificada como QF3110B frente a *Salmonella spp*.

En la Figura N°9 se observa el crecimiento bacteriano alrededor de los cilindros de acero inoxidable, los cuales contienen la muestra codificada como QF3110B en cada pocillo frente a *Salmonella spp*, se realizó el mismo proceso con los demás microorganismos aislados del género *Lactobacillus spp*, inhibiendo el crecimiento de los microorganismos patógenos seleccionados (según la tabla N°5), sobre la superficie del medio de cultivo, lo que permitió verificar que estos microorganismos poseen propiedades probióticas.

En los microorganismos ensayados en este estudio se evaluó la capacidad inhibitoria frente a microorganismos patógenos que están implicados en enfermedades del tracto gastrointestinal.

Los resultados obtenidos con los microorganismos codificados como QF2110B y QF3110B frente a los microorganismos patógenos de *Escherichia coli*,

Salmonella spp, y *Staphylococcus aureus* manifestaron una actividad inhibitoria para los 3 patógenos ensayados según lo descrito en la tabla N°4.

Estos resultados coinciden con los reportados por Álvarez, C.; Baroni, M. R.; Carrasco, M. S.; Méndez, E.; Otero, J. L.; Roldán, M. L.; Russell-White, K.; Simonetta, A. C.; Villarreal, F.; (2011), “estos microorganismos presentan una actividad de inhibición frente a microorganismos patógenos utilizando cepas de *Lactobacillus casei* aisladas de fuentes secundarias” Álvarez et. al, siendo este último, el microorganismo de control de comparación utilizado en los ensayos realizados para esta investigación, el cual manifestó una actividad inhibitoria frente a todos los microorganismos patógenos utilizados según lo descrito en la tabla N°4, existen estudios previos que demuestran la capacidad de inhibición de las bacterias del género de *Lactobacillus spp*, frente a microorganismos patógenos como *Escherichia coli* O157: H7, así como también frente a *Salmonella spp*, *Shigella spp*, y *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte, los cultivos ensayados en este estudio presentan similitud con los resultados obtenidos por Analía I. Etcheverría, María J. Ruiz, Nora L, Rocio Colello. (2017)., en donde se evaluó la capacidad inhibitoria de microorganismos del género *Lactobacillus spp*, frente a los microorganismos patógenos (*Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella spp*, y *Staphylococcus aureus*), que para el caso son los mismos microorganismos utilizados para el desarrollo de esta investigación, sin embargo la metodología que utilizaron I.Etcheverría y J. Ruiz et al,. difiere, puesto que los autores mencionados anteriormente utilizaron un método de puntura en placas con medio MRS, posteriormente aplicaron una capa de agar TSA que contenía el microorganismo patógeno y se consideró como resultado positivo la aparición de un halo mayor a 1 mm³, mientras que en este estudio se utilizó el método de cilindro placa, lo cual dificultó la difusión homogénea de la suspensión del microorganismo en estudio a través del borde

del cilindro, originando un crecimiento bacteriano por difusión no uniforme sobre la superficie del medio de cultivo.

5.7. Encapsular microorganismos probióticos del género *Lactobacillus spp* aislados de muestras seleccionadas utilizando mezclas de matrices poliméricas por el método de extrusión.

Se sometieron al proceso de encapsulación por extrusión los microorganismos codificados como: QF3110B Y QF2110B, por ser los únicos en cumplir satisfactoriamente todas las pruebas de identificación, tanto morfológicas como bioquímicas además de comprobarse sus propiedades probióticas por medio de las pruebas de tolerancia a pH ácido, bilis simulada y actividad antimicrobiana, siendo en ambos casos microorganismos aislados de las muestras de queso fresco, se realizó el mismo proceso de encapsulación con el microorganismo de control de comparación *Lactobacillus casei*.

5.7.1. Preparación de las mezclas poliméricas.



Figura N°10. Preparación de mezclas poliméricas de Goma Xantana: Gelatina (0.5:10%), Alginato de Sodio: Gelatina (3:10%) y Almidón de Maíz: Gelatina (3:10%) para realizar el proceso de encapsulación.

En la Figura N°10 se observa la preparación de las mezclas de los polímeros utilizados en el proceso de encapsulación, en donde las mezclas presentaron una textura semisólida, de aspecto húmedo y uniforme, sin presencia de grumos o partículas en suspensión, sin embargo, al aumentar el porcentaje de gelatina en

cada una de las muestras mejoró su consistencia, aunque debe tenerse en cuenta no exceder del 20%.

5.7.2. Encapsulación de microorganismos por medio del método de extrusión.

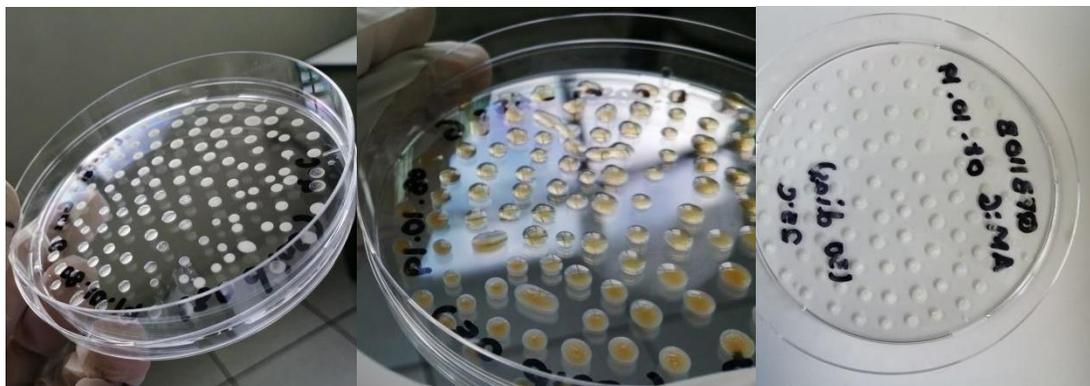


Figura N°11 Microorganismos probióticos encapsulados por el método de extrusión utilizando mezclas de polímeros de Goma Xantana: Gelatina (0.5:10%), Alginato de Sodio: Gelatina (3:10%) y Almidón de Maíz: Gelatina (3:10%) Respectivamente.

En la Figura N°11 se observan las cápsulas formadas con cada una de las mezcla poliméricas usadas durante el proceso de encapsulación de los microorganismos aislados, se observó que al inocular los microorganismos en la matriz polimérica respectiva, no hubo separación de fases y se logró una incorporación uniforme y homogénea, por tanto al ejercer fuerza para obtener las cápsulas conteniendo los microorganismos probióticos aislados, el fluido paso por la boquilla de la jeringa sin mayor dificultad, las mezclas de polímeros eran relativamente viscosas y su comportamiento fue de tipo pseudoplástico, propiedad atribuida a la presencia de gelatina en cada una de ellas.

Los microorganismos aislados en esta investigación que se sometieron al proceso de encapsulación corresponden a las muestras codificadas como QF2110B, QF3110B y el microorganismo de control de comparación *Lactobacillus casei*, proceso en el cual se utilizaron las matrices poliméricas de

alginate de sodio: gelatina (3:10%), goma Xantana: gelatina (0.5:10%) y almidón de maíz: gelatina (3:10%), utilizando el método de extrusión, el cual no es destructivo o agresivo, debido a que no se somete a ningún tipo de calentamiento para la formación de las cápsulas, por lo que el porcentaje de supervivencia de los microorganismos encapsulados obtenido se encuentra dentro del rango del 86 a 120%, según lo descrito en las figuras N° 12, 13 y 14, estos resultados sugieren que las cápsulas obtenidas por este método y con los componentes utilizados en las mezclas poliméricas son capaces de brindar una adecuada protección frente a los factores externos que pudiesen afectar el crecimiento de los microorganismos en estudio como el pH, temperatura, factores físicos, entre otros.

En investigaciones realizadas sobre la encapsulación de microorganismos probióticos se utilizan diferentes metodologías de encapsulación, como describe Efrain Cayra, Jor H. Dávila, Jenny M. Villalta, Yovani Rosales, (2017)., el cual utilizó el método de lecho fluidizado, los porcentajes de viabilidad obtenidos se mantuvieron en el rango del 95 a 96%, lo que sugiere que el método de encapsulación de lecho fluidizado posee una eficiencia muy buena para su aplicación sin embargo, al comparar con los resultados de viabilidad obtenidos en esta investigación los cuales se mantuvieron en el rango del 86 al 120% utilizando el método de extrusión, se evidencia que el método de extrusión brinda mejores resultados de viabilidad, esto debido a que en este no es necesario aplicar calor para la formación de las cápsulas, además las cápsulas obtenidas con este método son capaces de brindar la protección necesaria a los microorganismos ante los factores externos como el pH, temperatura y factores físicos, por otra parte es necesario tener en consideración los factores como el diámetro de la boquilla de la jeringa, así como la distancia de separación entre la boquilla y la solución de endurecimiento, el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución de endurecimiento, la carga bacteriana y el tiempo de

exposición ante la solución de endurecimiento, debido a que estos pueden originar variaciones en el tamaño y forma de las cápsulas obtenidas, por lo anterior es necesario estandarizar el proceso para eliminar estos inconvenientes, sin embargo la metodología a utilizar dependerá del tamaño y consistencia deseada para la obtención de las cápsulas.

5.7.3. Temperatura de fusión de las cápsulas.

Se determinaron los puntos de fusión de las cápsulas obtenidas en el proceso de encapsulación, con el propósito de determinar la tolerancia a temperaturas elevadas, y verificar que no sufrieran algún tipo de inestabilidad química o separación de los componentes de cada una de ellas.

Tabla N°6. Resultados de temperatura de fusión de las cápsulas obtenidas con cada mezcla de polímeros utilizada para la encapsulación.

Microorganismo encapsulado	Mezcla de polímeros	Tiempo de almacenamiento	Temperatura de almacenamiento °C	Punto de fusión °C
<i>Lactobacillus casei</i>	Almidón/ Gelatina	30 días	25	190
<i>Lactobacillus casei</i>	Alginato de sodio/ Gelatina	30 días	25	220
<i>Lactobacillus casei</i>	Goma Xantana/ Gelatina	30 días	25	250

La Tabla N°6 muestra los resultados obtenidos en la determinación de los puntos de fusión de las cápsulas, determinando que estas mezclas poseen un rango de temperatura de fusión de 190 a 250°C, en donde la temperatura de fusión más alta corresponde a la mezcla de Goma Xantana – Gelatina (0.5%-10%), por tanto las cápsulas formadas con estos materiales encapsulantes son capaces de tolerar temperaturas mayores a los 37 °C, que corresponde a la temperatura corporal, sin sufrir ningún cambio en la estabilidad química o separación de sus componentes frente a dichas condiciones.

Evaluación de la viabilidad de microorganismos probióticos encapsulados.

Se determinó la viabilidad de los microorganismos aislados y encapsulados, con el objetivo de verificar la tolerancia al proceso de encapsulación y condiciones de almacenamiento con cada una de las mezclas poliméricas utilizadas para dicho proceso.

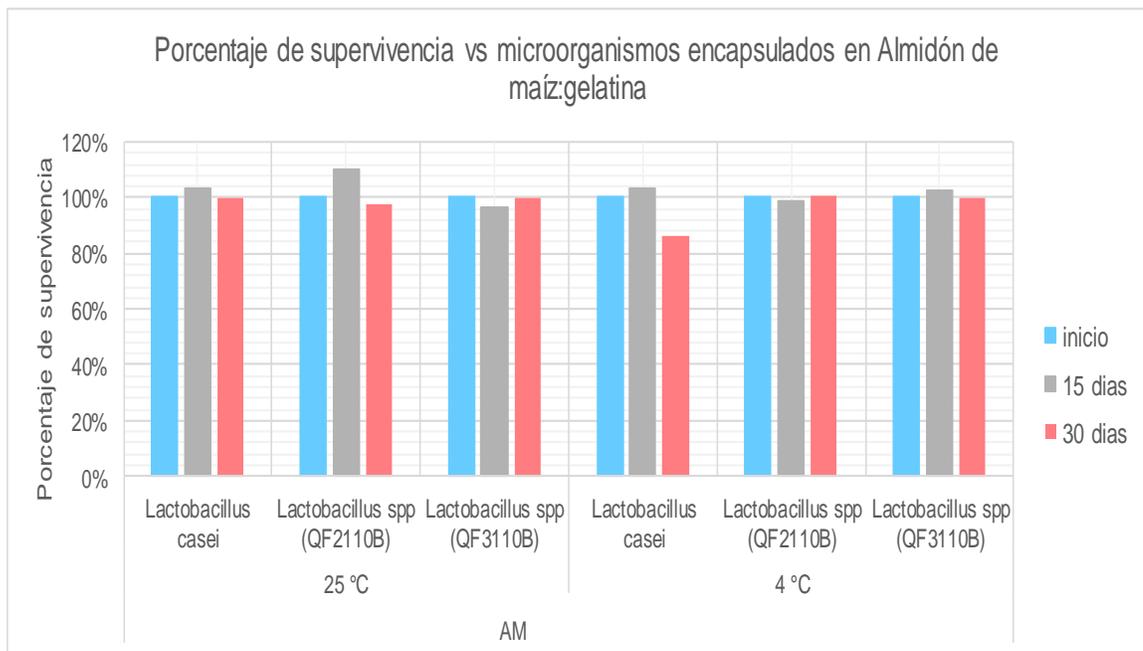


Figura N°12. Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C utilizando almidón de maíz-Gelatina.

La Figura N°12 Muestra los resultados obtenidos en la determinación de la viabilidad de los microorganismos encapsulados en la mezcla de almidón de maíz y gelatina, en donde se realizaron los recuentos microbianos a los 0, 15 y 30 días de almacenamiento, y se obtuvo como resultado un rango de supervivencia del 85 al 115%, por tanto, se evidencia que los microorganismos encapsulados en dicha matriz polimérica son capaces de sobrevivir a 25 y 4 °C.

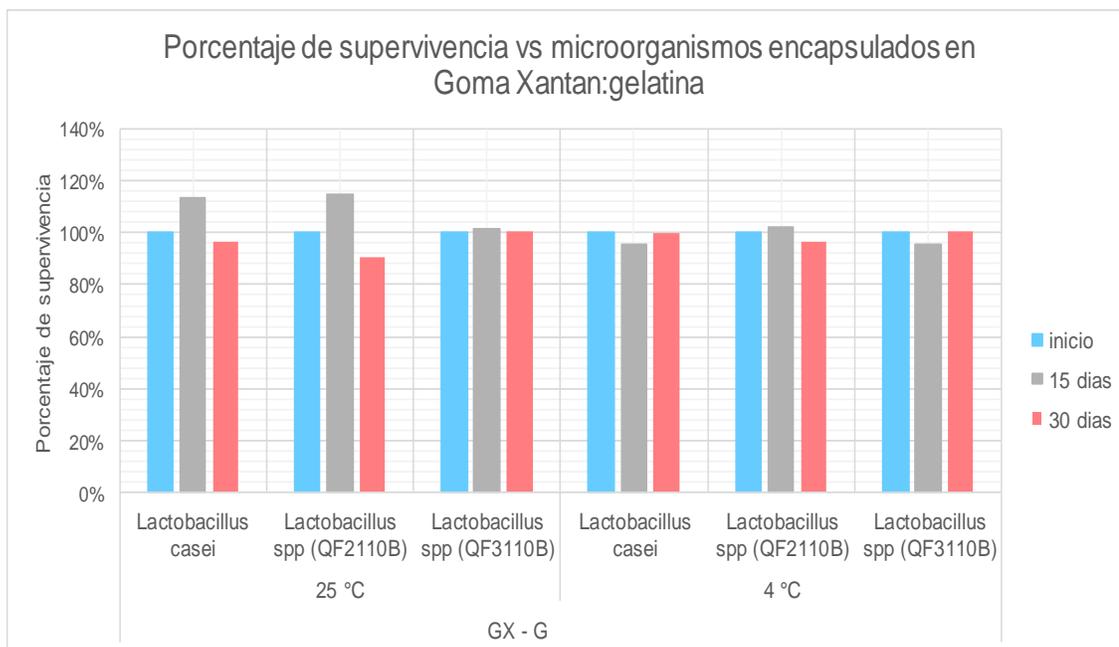


Figura N°13. Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C Goma Xantana-Gelatina.

La Figura N°13 Muestra los resultados obtenidos en la determinación de la viabilidad de los microorganismos encapsulados en la mezcla de Goma Xantana y gelatina, en donde se realizaron los recuentos microbianos a los 0, 15 y 30 días de almacenamiento, y se obtuvo como resultado un rango de supervivencia del 84 al 119%, por tanto, se evidencia que los microorganismos encapsulados en dicha matriz polimérica son capaces de sobrevivir a 25 y 4 °C.

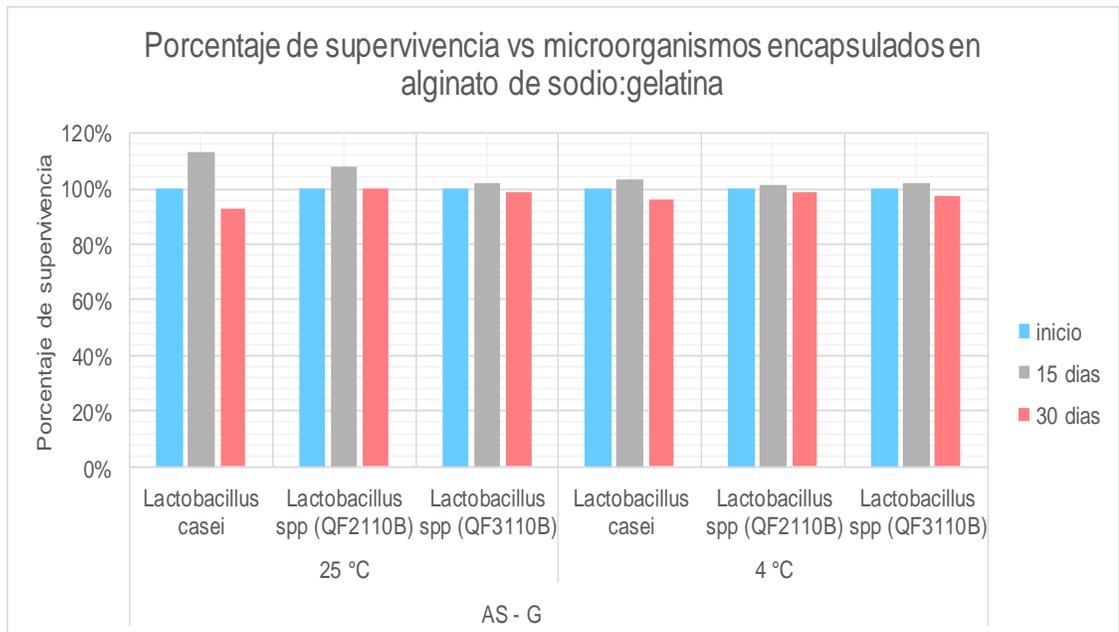


Figura N°14. Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C alginato de sodio maíz-Gelatina.

La Figura N°14 Muestra los resultados obtenidos en la determinación de la viabilidad de los microorganismos encapsulados en la mezcla de alginato de sodio y gelatina, en donde se realizaron los recuentos microbianos a los 0, 15 y 30 días de almacenamiento, y se obtuvo como resultado un rango de supervivencia del 85 al 115%, por tanto, se evidencia que los microorganismos encapsulados en dicha matriz polimérica son capaces de sobrevivir a 25 y 4 °C.

Investigaciones realizadas por López, D (2013)., en las cuales se describe el uso de mezclas de alginato al 1% y diferentes concentraciones de almidón del 1.25% al 4.5% para encapsular probióticos, favorecen la supervivencia dentro de un rango del 51.21% al 69.39%, sin embargo, se demostró que a mayores proporciones de almidón el porcentaje de supervivencia de los probióticos encapsulados se reduce.

Al respecto también se ha encontrado que utilizando la mezcla polimérica de Goma Xantana – gelatina para la encapsulación de los microorganismos aislados se obtienen resultados de supervivencia del 90% al 115” López D.et al.

En investigaciones realizadas por Guowei, S.; Li, C.; He, C.; Jiangpeng, M.; Yajuan, S. y Yunxia, H. (2017), sugiere que “al utilizar el complejo polielectrolítico (PEC) de Xantana-quitosano (0.68,0.76%) para la encapsulación de *Lactobacillus acidophilus* se obtiene un porcentaje de supervivencia alrededor del 86%”, Guowei et. al, por lo que es posible decir que los resultados obtenidos en esta investigación para el caso de la mezcla de goma Xantana - gelatina son comparables con la metodología descrita por el autor antes mencionado, por otra parte la mezcla polimérica de alginato de sodio – gelatina obtuvo como resultado la formación de cápsulas semiesféricas, de consistencia sólida y aspecto húmedo, en donde el porcentaje de viabilidad para los microorganismos aislados encapsulados estuvo dentro de un rango de 90 a 113%.

Otros autores como Castillo S.L., Alvarado J.M., Baez J.G., Macías E., Ramirez BacaP., Candelas Castillo Ma. G, Gallardo C.T. (2017), describen el uso de alginato de sodio al 2% junto con una solución de aloe a 10%, para la obtención de cápsulas por el método de extrusión en el estudio de microorganismos probióticos como *Lactobacillus plantarum*, en donde hace énfasis en que la forma de las cápsulas obtenidas dependen de factores como la viscosidad del alginato utilizado, la concentración de la solución de endurecimiento, el tiempo de exposición y la agitación a la cual es sometida la mezcla a utilizar para el proceso de encapsulación.

5.8. Observación de la morfología de las cápsulas al microscopio óptico

Se obtuvieron imágenes de las características microscópicas de las cápsulas con cada una de las mezclas poliméricas utilizadas.

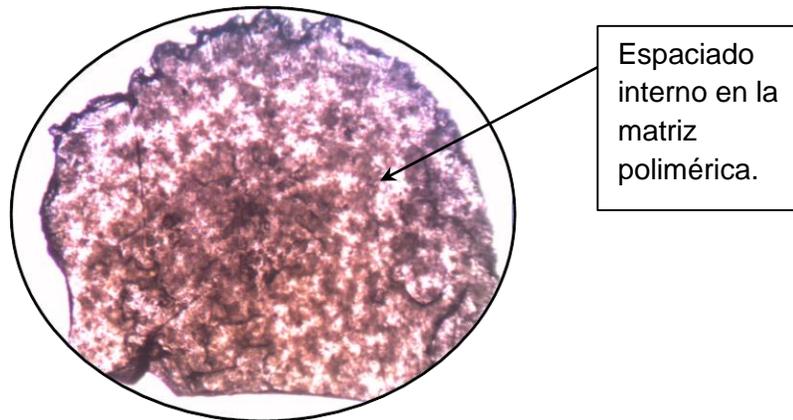


Figura N°15. Imagen cápsula compuesta de la mezcla de polímeros de Almidón de Maíz y Gelatina, perteneciente a la muestra codificada como "QF2110B" a 10X.

En la Figura N°15 se observa el espaciado interno de la matriz polimérica de almidón de maíz y gelatina de forma irregular.

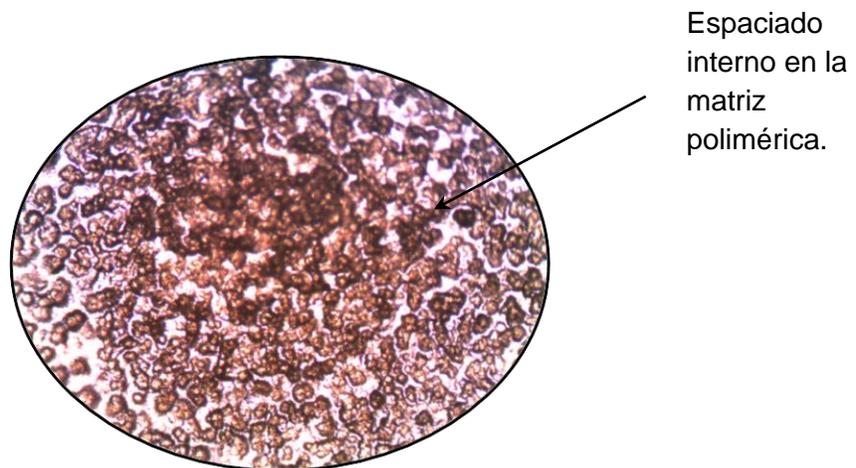


Figura N°16. Imagen cápsula compuesta de la mezcla de polímeros de Goma Xantana y Gelatina, perteneciente al microorganismo de control de comparación de *Lactobacillus casei*, a 10X.

En la Figura N°16 se observa la conformación interna de las cápsulas de goma Xantana y gelatina, se aprecia un orden al azar y espacios en su estructura interna.

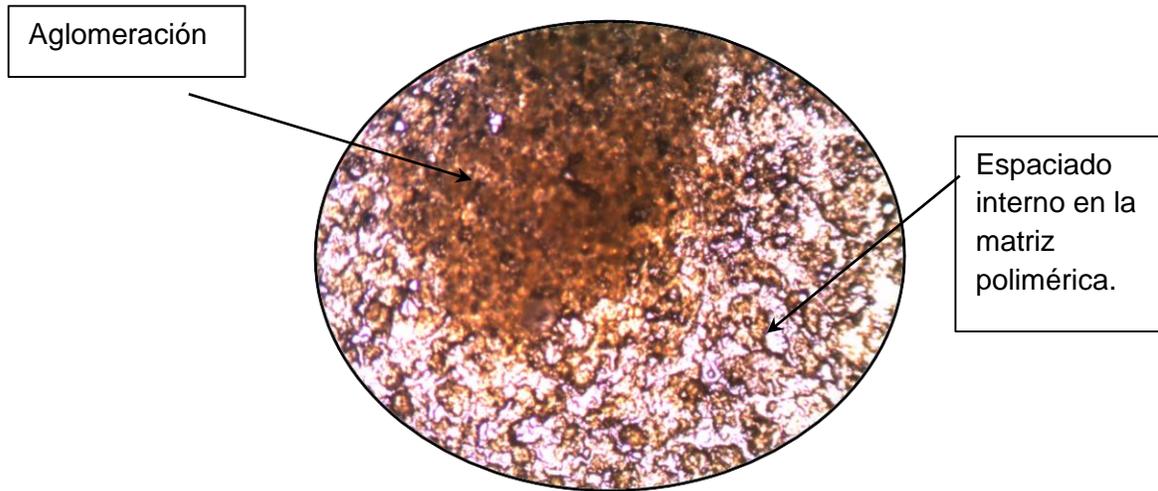


Figura N°17. Imagen cápsula compuesta de la mezcla de polímeros de Alginato de sodio y Gelatina, perteneciente a la muestra codificada como "QF3110B" a 10X.

En la Figura N°17 se observa la conformación interna de las cápsulas de alginato de sodio y gelatina, se aprecia una aglomeración considerable, así como también un orden al azar y espacios en su estructura interna.

Las imágenes obtenidas reflejan las características microscópicas de las cápsulas de cada una de las mezclas de los polímeros utilizadas, en donde se puede apreciar la estructura polimérica formada, así como los espacios internos en forma de poros en su estructura, en los cuales se evidencia el posible suministro de aire dentro de las cápsulas, lo cual genera un ambiente de tipo aerobio durante todo el tiempo de almacenamiento.

5.8.1. Observación de las cápsulas por medio de la tinción de Gram:

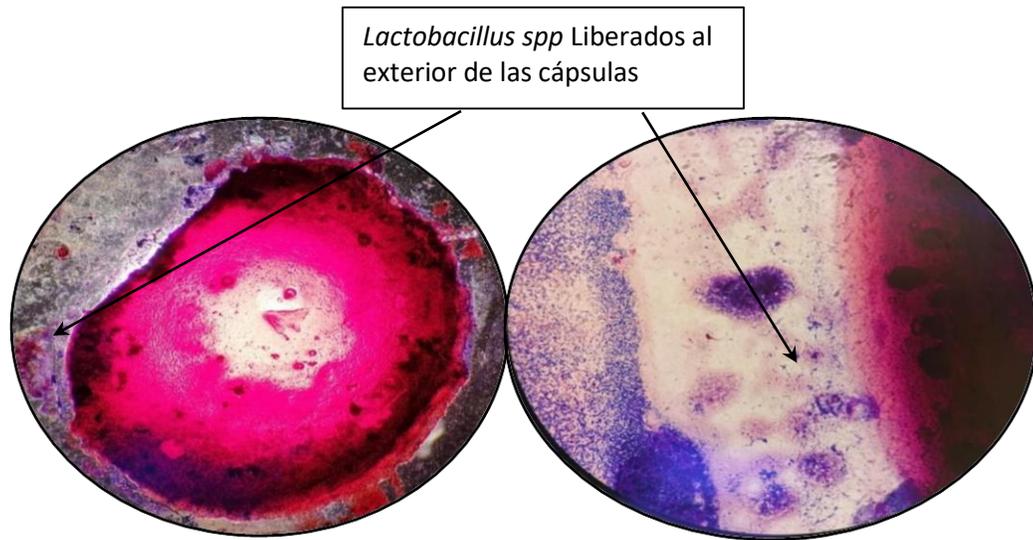


Figura N°18. Tinción de Gram de las cápsulas de la mezcla de polímeros de Almidón de Maíz y Gelatina que corresponden a la muestra codificada como "QF2110B", observadas en el microscopio óptico, a 4X Y 100X respectivamente.

En la Figura N°18 se observa la abundante presencia de microorganismos de tipo bacilos cortos Gram positivo, tanto dentro de la cápsula como en la superficie externa siendo liberados poco a poco hacia el exterior de la cápsula.

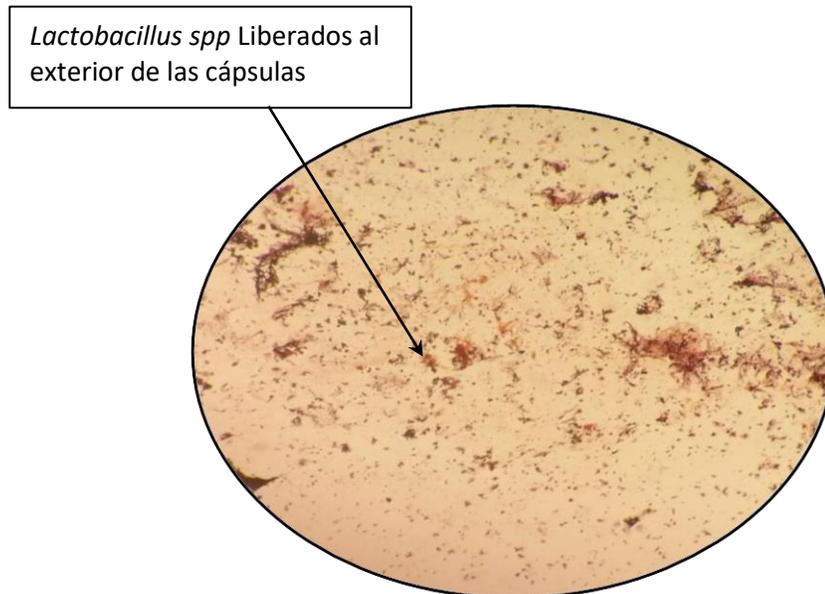


Figura N°19. Tinción de Gram de las cápsulas de la mezcla de polímeros de Alginato de sodio y Gelatina que corresponden al microorganismo utilizado como microorganismo de control de comparación *Lactobacillus casei*, observadas en el microscopio óptico a 100X.

En la Figura N°19 se observan los residuos de la cápsula esparcidos en todo el espacio del frotis, así como también se logra apreciar la presencia de microorganismos de tipo bacilos cortos Gram positivo, correspondiente al microorganismo de control de comparación, en esta matriz polimérica los microorganismos son liberados totalmente hacia el exterior por la desintegración total que sufre la cápsula.

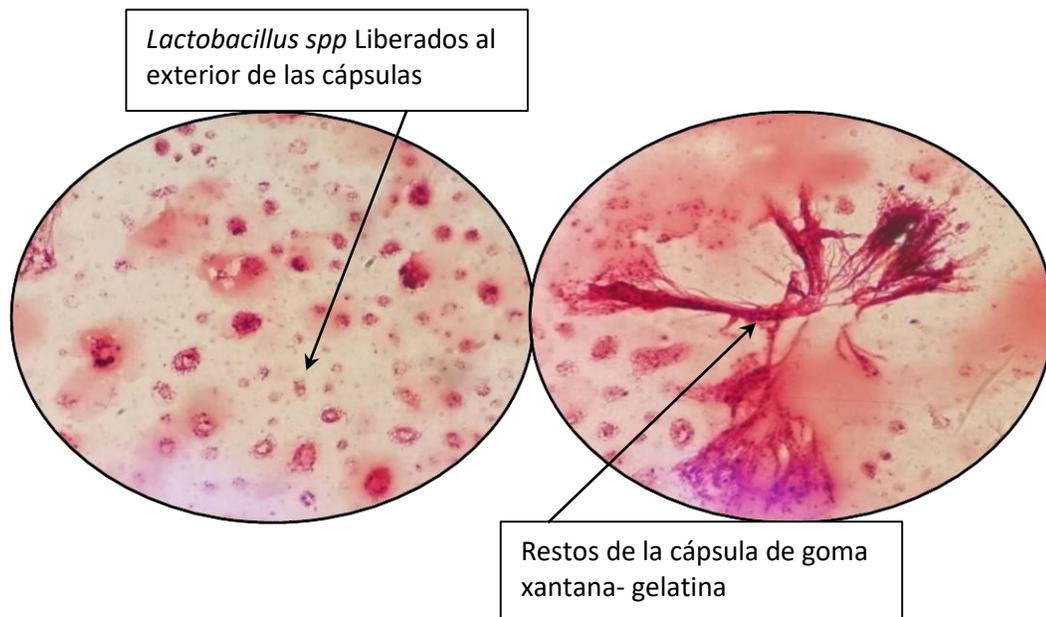


Figura N°20. Tinción de Gram de las cápsulas de la mezcla de polímeros de Goma Xantana y Gelatina que corresponden a la muestra codificada como "QF3110B", observadas en el microscopio óptico a 100X.

En la Figura N°20 se observan los residuos de la cápsula de la mezcla polimérica de Goma Xantana y gelatina, así como también la abundante presencia de microorganismos de tipo bacilos cortos Gram positivo, siendo liberados al medio exterior en diminutas cápsulas y también se observan en todo el espacio del frotis

de manera individual o agrupados debido a la desintegración parcial que sufre la cápsula.

En la observación de la morfología obtenida en las cápsulas, utilizando un microscopio óptico se aprecia la formación de una estructura sólida de tipo porosa, de forma irregular y espacios dispuestos al azar, este patrón se repite para las 3 mezclas de polímeros utilizados lo que sugiere una liberación constante del microorganismo encapsulado.

Para esta investigación las cápsulas se sometieron al proceso de tinción al Gram como método de observación alternativo a la espectroscopia electrónica de barrido para verificar la presencia de los microorganismos dentro de la matriz, a lo cual se obtuvo como resultado la presencia de microorganismos de tipo Gram positivo, en forma de bacilos cortos, en cadena, sin movilidad, dichas características son propias de las bacterias del género *Lactobacillus spp*, lo que concuerda con lo descrito por Jáminto Pérez, Elizabeth Rocha, David Uzcategui, Yani Aranguren, Elvi Machado., (2015)., investigación en la cual se reportan características morfológicas de tipo “Gram positivo, de tipo bacilos cortos en cadena o individuales” Pérez et al, lo que sugiere además que la observación por tinción de Gram puede ser utilizada para la observación de microorganismos encapsulados con las matrices poliméricas utilizadas en este estudio.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES.

- 1- La caracterización de los microorganismos aislados permitió seleccionar a las muestras codificadas como: QF2110B y QF3110B procedentes de las muestras de queso fresco, cuyas características morfológicas y bioquímicas se colocan dentro del grupo de las bacterias ácido-lácticas correspondientes al género *Lactobacillus spp.*
- 2- De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de tolerancia *in vitro* a pH ácido y bilis simulada, y de la evaluación de actividad inhibitoria, los microorganismos aislados de QF2110B y QF3110B poseen propiedades probióticas, y actividad inhibitoria contra las especies patógenas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*
- 3- Las cápsulas obtenidas por medio del método de extrusión muestran que se favorece la supervivencia de los microorganismos en su interior al brindar protección frente a los factores externos que pueden afectar su desarrollo como lo son el pH, bilis la temperatura, y el estrés mecánico al pasar por el aparato digestivo.
- 4- Las cápsulas obtenidas por medio del método de extrusión varían en su forma y tamaño, lo cual puede estar influenciado por factores como el material encapsulante, el tamaño y poro de la jeringa, y el tipo de solución de endurecimiento, estos factores deben ser controlados y estandarizados para obtener cápsulas uniformes.
- 5- Los puntos de fusión de las cápsulas presentaron resultados mayores a los 37°C, siendo capaces de ser ingeridas y no sufrir cambios en su composición por causa de la temperatura corporal, lo cual favorece que la liberación de los microorganismos probióticos sea por desintegración mecánica tal como

sugieren los resultados de las pruebas de liberación y desintegración de las cápsulas.

- 6- Los métodos de desintegración utilizados para la liberación de los microorganismos encapsulados en las mezclas poliméricas son eficientes para recuperar microorganismos en concentraciones superiores a 10^8 UFC/mL y no presentan diferencias significativas en los valores de porcentaje de recuperación entre ambos métodos.
- 7- Las formulaciones óptimas de las mezclas de polímeros utilizados para la obtención de los microorganismos encapsulados fueron: alginato de sodio-gelatina 3:10%, goma Xantana-gelatina 0.5:10% y almidón de maíz- gelatina 3:10%.
- 8- Las muestras codificadas como QF2110B y QF3110B ambas procedentes de la matriz de queso fresco, fueron capaces de tolerar el proceso de encapsulación, y las condiciones de almacenamiento establecidas de temperatura de valores de 4°C y 25°C y un tiempo de almacenamiento de 0, 15 y 30 días.
- 9- La mezcla polimérica con la cual se obtuvieron los mejores resultados de viabilidad para los microorganismos probióticos encapsulados fue con goma Xantana-gelatina 0.5:10%.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES:

- 1- Para futuras investigaciones realizar un proceso de enriquecimiento previo en el análisis de las muestras de queso duro viejo, en caldo MRS o Caldo Casoy, después de someterlas a la desintegración en estomacher, con el objetivo de estimular el crecimiento de los microorganismos del género *Lactobacillus spp* que pueden estar presentes en las muestras.
- 2- Para futuras investigaciones determinar la efectividad y seguridad de los microorganismos codificados como: QF2110B y QF3110B, mediante estudios *in vivo* con el fin de evaluar las propiedades benéficas para el organismo, tales como, pruebas de efectos inmunomoduladores, colonización del tracto intestinal, y metabolismo lipídico.
- 3- Realizar en futuras investigaciones pruebas de hidrofobicidad, agregación y co-agregación, resistencia a antibióticos, adhesión a células epiteliales, con el objetivo de determinar con una mayor certeza que los microorganismos aislados posean propiedades probióticas y que son capaces de sobrevivir en el sistema digestivo humano.
- 4- Para futuras investigaciones evaluar la posibilidad de combinar otros materiales encapsulantes como carragenano, gelano, quitosan etc., que pudieran ser de utilidad para los microorganismos probióticos encapsulados, incorporando una matriz prebiótica como el *aloe vera* con la finalidad de potenciar aún más su crecimiento bacteriano.
- 5- Para futuras investigaciones realizar pases de los microorganismos cada 4 días, controlando la temperatura de refrigeración para estandarizar dicho proceso.

- 6- Para futuras investigaciones realizar el proceso de encapsulación por el método de extrusión con una distancia entre el punto de la jeringa y la superficie de contacto no mayor a 3 cm.

- 7- Para futuras investigaciones realizar 3 repeticiones de los procesos de encapsulación y liberación de microorganismos para poder determinar si existen diferencias significativas entre las mezclas de polímeros utilizada, además de obtener resultados estadísticamente más representativos.

BIBLIOGRAFIA.

1. AF Rojas, Rodríguez-Barona S, Rodríguez YA. (2016) Encapsulación de Probióticos para Aplicaciones Alimenticias. Revista Biosalud, Recuperado de: www.scielo.org.co/pdf/biosa/v15n2a09.pdf
2. Álvarez, C.; Baroni, M. R.; Carrasco, M. S.; Méndez, E.; Otero, J. L.; Roldán, M. L.; Russell-White, K.; Simonetta, A. C.; Villarreal, F.; (2011). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7 Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, vol. 31, Sociedad Venezolana de Microbiología Caracas, Venezuela. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1994/199421829008.pdf>
3. Analía I. Etcheverría, María J. Ruiz, Nora L, Rocio Colello. (2017) Efecto Inhibitorio de *Lactobacillus spp* sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. Revista Argentina de Microbiología Volumen 49. (174-177).
4. Azat, R.; Kayir, A.; Lin D.-b.; Li, W.; Liu, Y.; Zheng, X.-d. y Zhou, W.-w. (2016) Propiedades probióticas de las bacterias del ácido láctico aisladas del queso Xinjiang fermentado tradicionalmente. Journal of Zhejiang University Science. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4980438/
5. Belmares Cerda, R. E.; Contreras Esquivel, J. C.; Hernández Torres, C.; Iliina, A.; Michelena Álvarez, G.; Martínez Hernández, J. L. y Ventura Sobrevilla, J. M.; (2016). La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba. *Redalyc*. vol. 50, núm. 1, pág. 12-19.:<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420003>

6. Bonetb, R. y Garrotea, A. (2017). Probióticos. *Elsevier*. Vol. 31 Núm.2. páginas 13-16; <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-probioticos-X0213932417608720>
7. Buendía Monreal, M.; Gonzáles Rodríguez, V.; Márquez, A.; Muñoz Hernández, J. E. y Reyes Díaz C.A. Queso Fresco (2015).: Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TEMA3.QUESO_2832.Pdf
8. Castillo S.L., Alvarado J.M., Baez J.G., Macías E., Ramirez BacaP., Candelas Castillo Ma. G, Gallardo C.T. (2017). Diseño de microcápsulas de alginato con matriz prebiótica de Aloe Vera para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum*. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/Volume2/3/87
9. Chandrakanth, R. y Prabhurajeshwar, C.; (2017). Probiotic potential of *Lactobacillus* with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *ELSEVIER Biomedical Journal*. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6138816/
10. Córdoba, D.; Córdoba, M. y Lozano, M. (2016). Tecnología farmacéutica. Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica, Facultad de farmacia, Universidad Complutense de Madrid. *Elsevier*. Pág. 51 – 54.
11. De Montijo, P. y Soumi, M. (2017). Estudio del potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* C4, Tesis doctoral. Facultad de Farmacia Departamento de Microbiología, Universidad de Granada. Granada. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/28915975.pdf>
12. Efrain Cayra, Jor H. Dávila, Jenny M. Villalta, Yovani Rosales, (2017). Evaluación de la Estabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas por Lecho Fluidizado. *Inf. Tecnol. Editorial la Serena*

Vol. 28 no.6 scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642017000600005.

13. García C., A. y López M., A. (2012). Biopolímeros utilizados en la encapsulación. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Fundación Universidad de las Américas Ex hacienda Sta. Catarina Martir S/N, Cholula, Puebla, México. Disponible en: [https://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6\(1\)-Garcia-Ceja-et-al-2012.pdf](https://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6(1)-Garcia-Ceja-et-al-2012.pdf)
14. Guijie ,L.; Xin, Z.; Xingyao, L.; Yanni P. y Yu, Q. (2018). Aislamiento e identificación de bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus plantarum* YS2) del yogur de yak y sus propiedades probióticas. Allied academies. Disponible en: <https://www.alliedacademies.org/articles/isolation-and-identification-of-lactic-acid-bacteria-lactobacillus-plantarum-ys2-from-yak-yogurt-and-its-probiotic-properties-9780.html>
15. Guowei, S.; Li, C.; He, C.; Jiangpeng, M.; Yajuan, S. y Yunxia, H. (2017). Microencapsulación de *Lactobacillus acidophilus* por Xantanao-quitosano y su estabilidad en yogur. Polímeros (Basilea). 9(12): 733. doi: 10.3390/polym9120733 www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6418684/
16. Hassan, H.; Hosna, H.; Mahmoud, B.; Mahmoodnia, L.; Mahmoud, R.; Mohammad, R. y Sahar, K. (2017). Aislamiento e identificación de probióticos *Lactobacillus* de productos lácteos locales y evaluación de su efecto antagonista sobre patógenos. Int J Pharm Investigación. 7(3): 137–141. doi: 10.4103/jphi.JPHI_8_17
17. Heideibach, T., P. Frost and U. Kulozik., (2010). Microencapsulación of probiotic cell by means of rennet-gelation pf milk proteins. Foods Hydrocolloids. 23(7):1670-1677 DOI:10.1016/j.foodhyd.2009.01.006

www.researchgate.net/publication/221997760_Microencapsulation_of_probiotic_cell_by_means_of_rennet-gelation_of_milk_proteins.

18. Hitchins, A.; Jinneman, K. y Yi Chen. U.S. (2016). Food and Drugs Administration (FDA). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Bacteriological Analytical Manual; <http://www.fda.gov/FoodsScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm07400.htm>.
19. Jámino Pérez, Elizabeth Rocha, David Uzcategui, Yani Aranguren, Elvi Machado., (2015). Aislamiento, Selección y Caracterización de Cepas Del Género *Lactobacillus* Aisladas de Líquido Ruminal Vacuno, en la Zona Sur del Lago, Venezuela., Revista Colombiana de Ciencia Animal. www.Revistas.unisucra.edu.co/index.php/recia/article/view/259&ved.
20. Jiménez Pranteda, M. L. (2010). Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: Evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral. Facultad De Farmacia Departamento De Microbiología Universidad de Granada. Granada; <https://hera.ugr.es/tesisugr/19121507.pdf>
21. Lopardo Horacio, A. (2016). Introducción a la microbiología clínica. Facultad De Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52389/Documento_completo.pdf?sequence=1
22. López Córdoba, A. F. (2012). Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional De La Plata Buenos Aires.

23. López, D. (2013). Efecto del almidón en la viabilidad gastrointestinal de *Lactobacillus acidophilus* en biosoportos de alginato/almidón. Tesis de maestría en Biotecnología Alimentaria, Universidad de Ovideo, España. digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19091/6/TFM_Derek%20Amoros%20Lopez.pdf
24. Maldonado López, E. Y. (2013). Determinación del efecto de *Lactobacillus acidophilus* con potencial probiótico sobre la bacteria patógena: *Salmonella typhimurium* y su tiempo de sobrevivencia a los ácidos biliares y pH ácido del estómago. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, Centroamérica; <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5303/1/16103408.pdf>
25. Mosquera Jordán, M. E. (2014). Nanoencapsulación de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas procedentes de subproductos de la pesca. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria Universidad Complutense de Madrid. www.researchgate.net/publication/263180788_NANOENCAPSULACION_DE_HIDROLIZADOS_PEPTIDICOS_CON_ACTIVIDADES_BIOLÓGICAS_PROCEDENTES_DE_SUBPRODUCTOS_DE_LA_PESCA
26. Rafael Zamora Vega, Hector Eduardo Martínez- Flores, José Luis Montañez-Soto y José Octavio Rodiles- López., (2015). Viabilidad de *Saccharomyces boullardi*, en queso fresco bajo condiciones de acidez “in vitro”.Revista Electronica Nova Scientia.
27. Serrano-Casas,V., Gaime, I., Pérez-Chabela,M.L., (2019) Evaluación de las Características Probióticas de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Ensilados de Pulpa de Café. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

28. Okafor, N. (2016). Modern industrial microbiology and biotechnology. Department of Biological Sciences Clemson University, Clemson South Carolina USA. *Science publishers*. Disponible en: [http://site.iugaza.edu.ps/mwhindi/files/Modern-Industrial Microbiology Biotechnology.pdf](http://site.iugaza.edu.ps/mwhindi/files/Modern-Industrial-Microbiology-Biotechnology.pdf)
29. Organización Mundial de Gastroenterología. (2011). Probióticos y prebióticos. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. Autor. Disponible en: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-spanish-2011.pdf>
30. Vélez Ruiz, J. F. y Ramírez López, C. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla. La Serena scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642016000600012
31. Zambrano Davalos, M. C. (2010). Elaboración de queso fresco con la utilización de un fermento (*Lactobacillus acidophilus*). Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional. Quito; <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1929/1/CD-2816.pdf>

ANEXOS

ANEXO N°1
MATERIAL, EQUIPOS, REACTIVOS.

Materiales:

- 1- Bolsa para estomacher
- 2- Tubos de ensayo con tapón de rosca
- 3- Micropipeta mecánica de 100-1000 microlitros
- 4- Cuchillo
- 5- Placas de Petri desechables
- 6- Asa en punta
- 7- Asa punta redonda
- 8- Porta objetos
- 9- Pinzas metálicas
- 10-Beaker 100 mL, 250 mL, 500 mL
- 11-Erlenmeyer de 125 mL
- 12-Cilindros de acero inoxidable
- 13-Jeringas estériles
- 14-Agitadores magnéticos
- 15-Probeta de 1000 mL
- 16-Probeta de 25 mL
- 17-Mechemo Bunsen

Equipos:

- 1- Balanza semianalítica
- 2- Estomacher
- 3- Incubadora
- 4- Cámara Refrigerante
- 5- Microscopio óptico
- 6- Espectrofotómetro UV
- 7- Hot-plate
- 8- Contador de colonias
- 9- Cámara de flujo laminar

Reactivos:

- 1- Agua peptonada
- 2- Medio MRS
- 3- Caldo MRS
- 4- Cristal violeta
- 5- Lugol
- 6- Alcohol acetona
- 7- Safranina
- 8- Agua destilada
- 9- Peróxido de hidrogeno al 30%
- 10-Disco de oxidasa
- 11-Medio TSI
- 12-Reactivo de Kovacs
- 13-Agua peptonada estéril 0.1%
- 14-NaOH 1N
- 15-HCL 6 M
- 16-Medio TSA
- 17-Alginato de sodio
- 18-Gelatina
- 19-Almidón de maíz
- 20-Goma Xantana
- 21-Buffer fosfato pH: 7.0

ANEXO N° 2

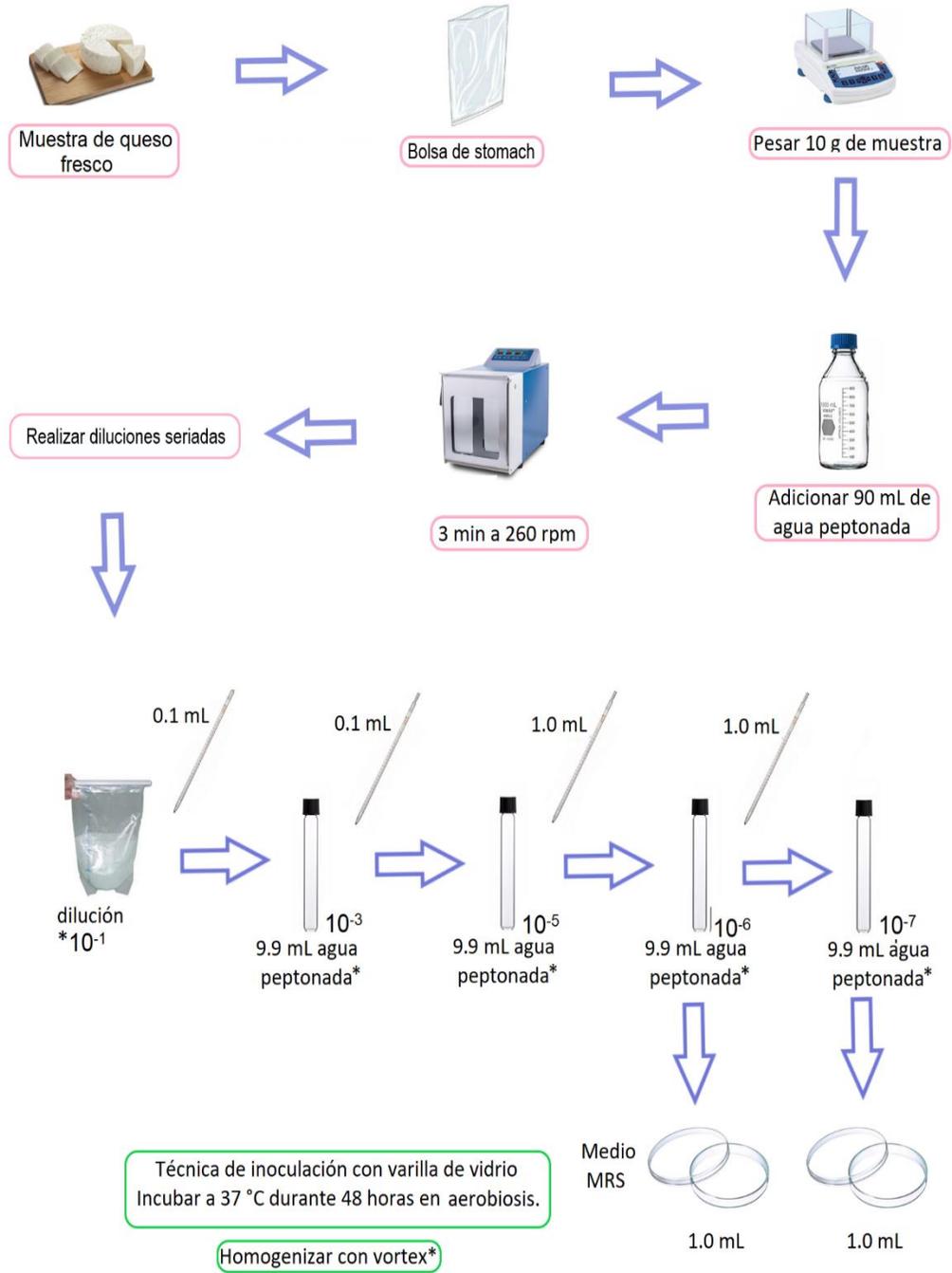


Figura N° 21. Procedimiento del aislamiento y selección de microorganismos potencialmente probióticos procedentes de queso fresco.

ANEXO N° 3

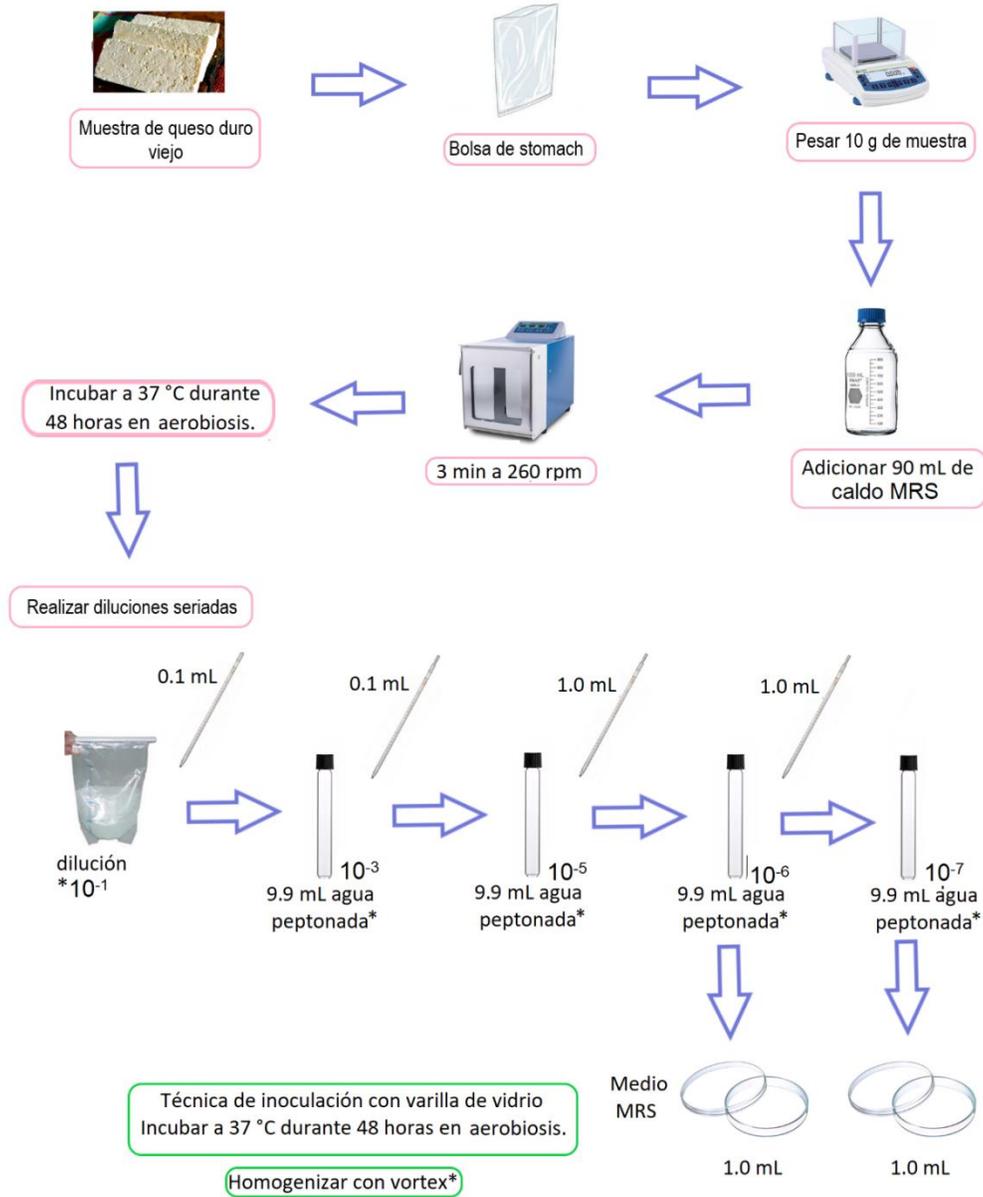


Figura N° 22. Procedimiento de aislamiento y selección de microorganismos potencialmente probióticos procedentes de queso duro viejo.

ANEXO N° 4

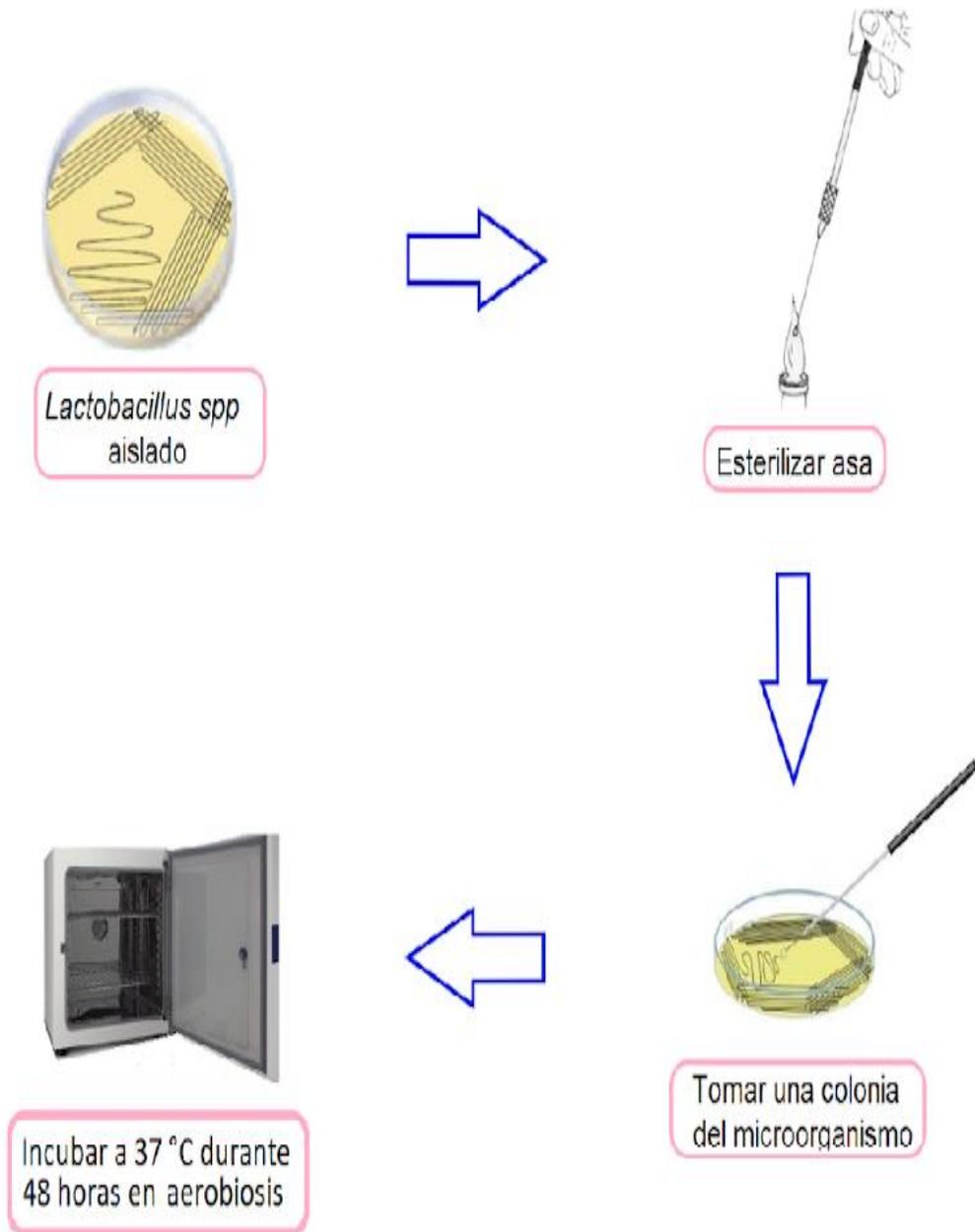


Figura N°23. Procedimiento para realizar la purificación de los microorganismos seleccionados.

ANEXO N° 5

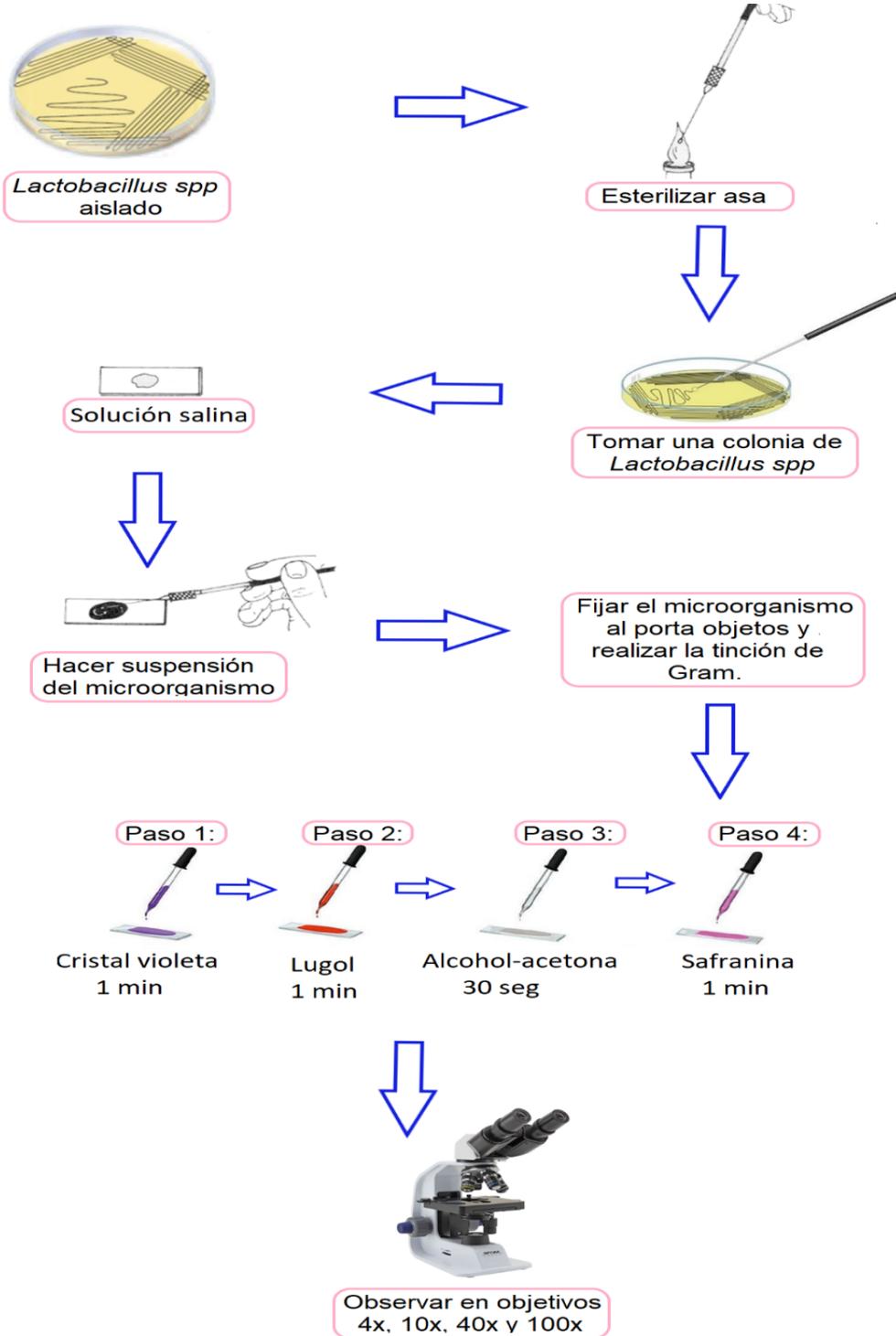


Figura N° 24. Procedimiento para realizar la observación microscópica de microorganismos aislados.

ANEXO N° 6

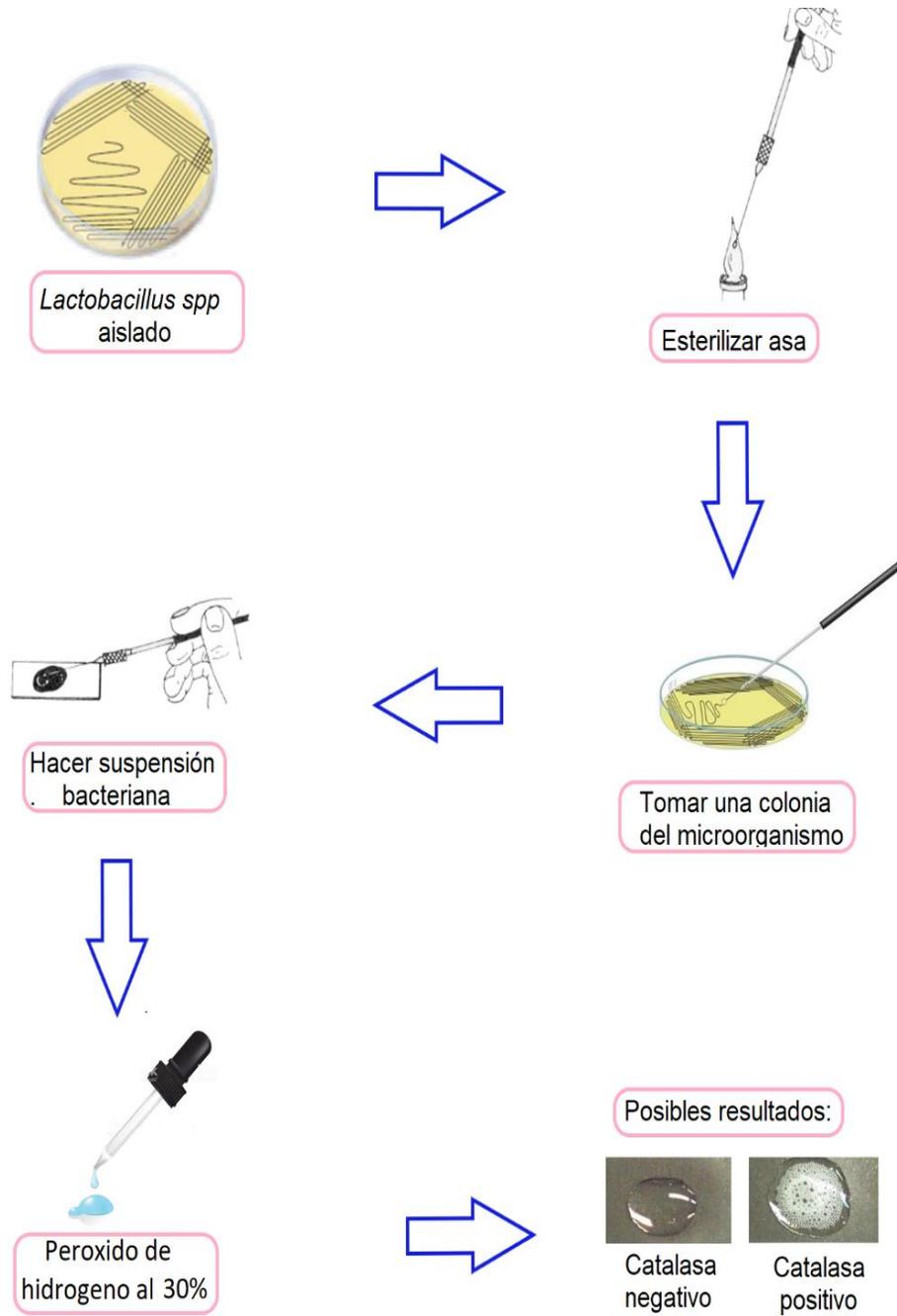


Figura N° 25. Procedimiento para realizar prueba de Catalasa.

ANEXO N° 7

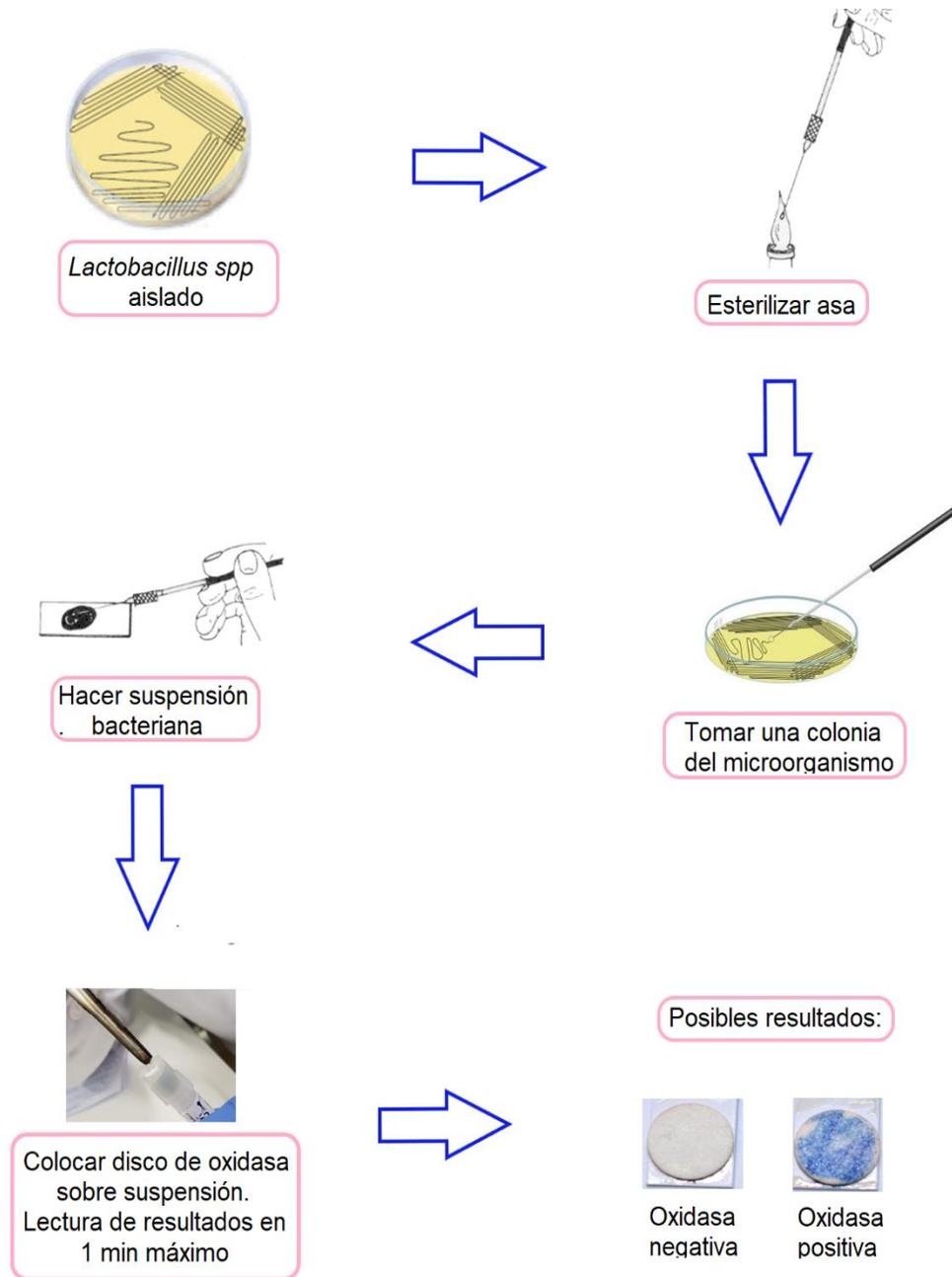


Figura N° 26. Procedimiento a realizar para prueba de Oxidasa.

ANEXO N° 8

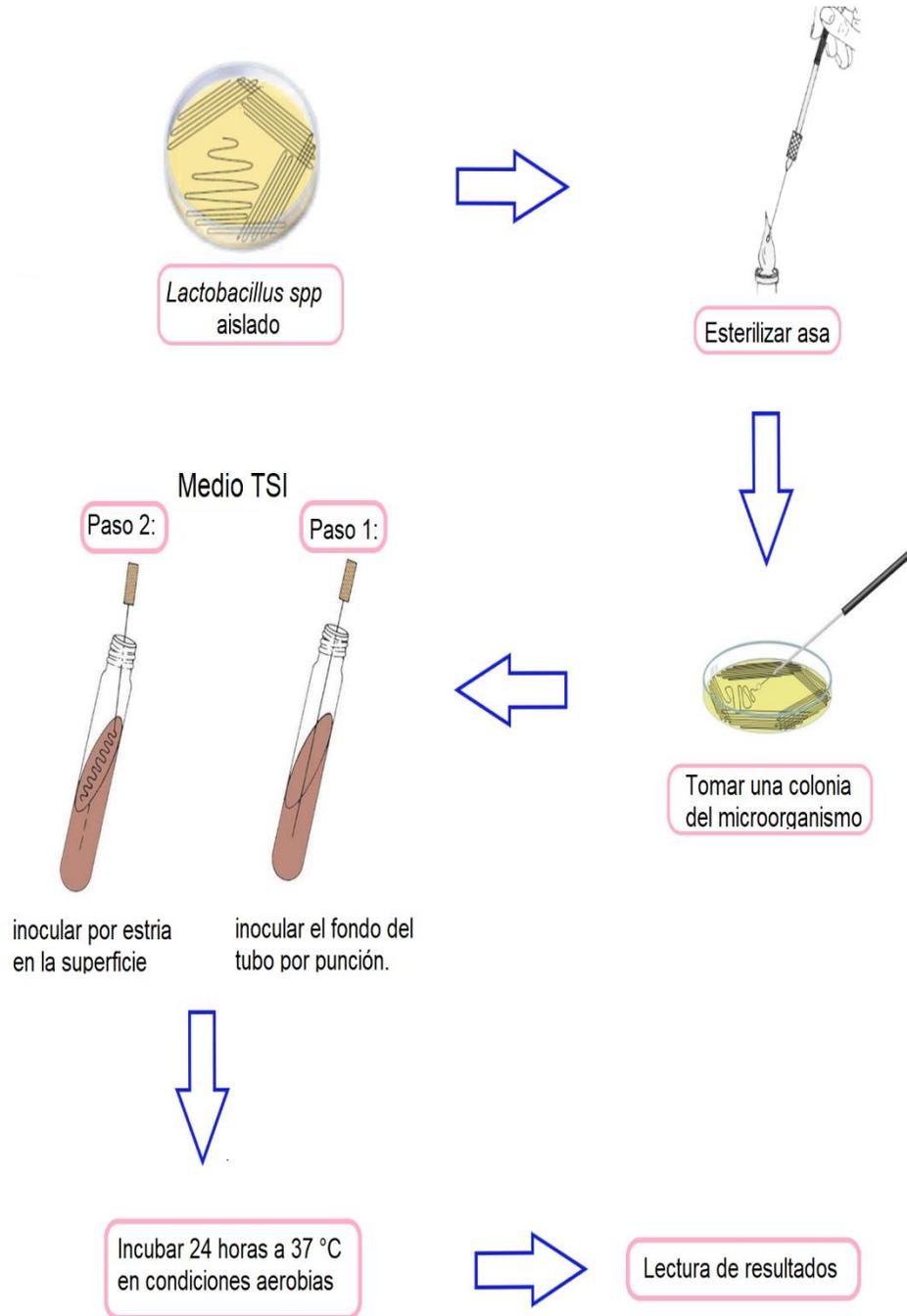


Figura N° 27. Procedimiento a realizar para prueba de TSI.

ANEXO N° 9

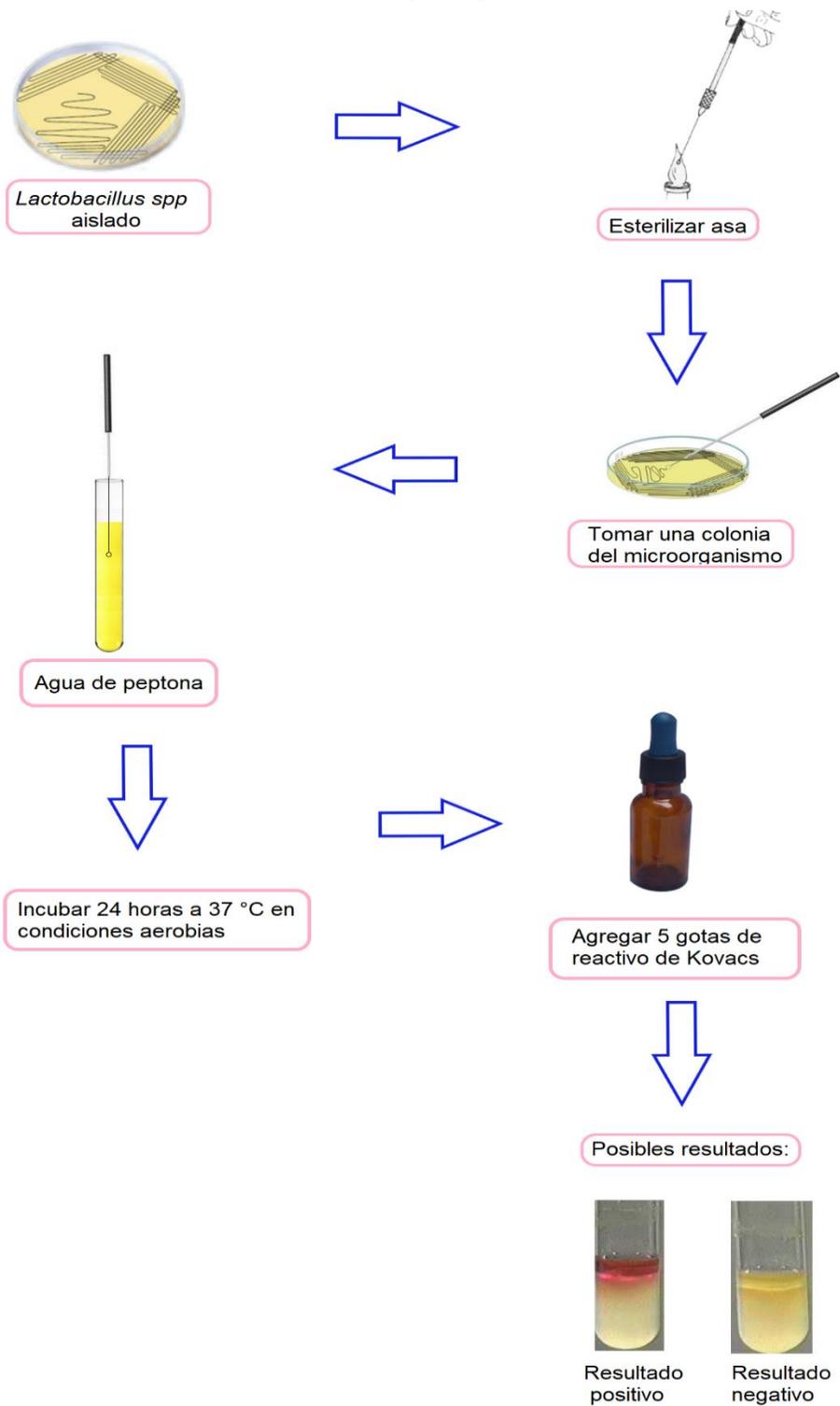


Figura N° 28. Procedimiento a realizar para prueba de Indol.

ANEXO N° 10

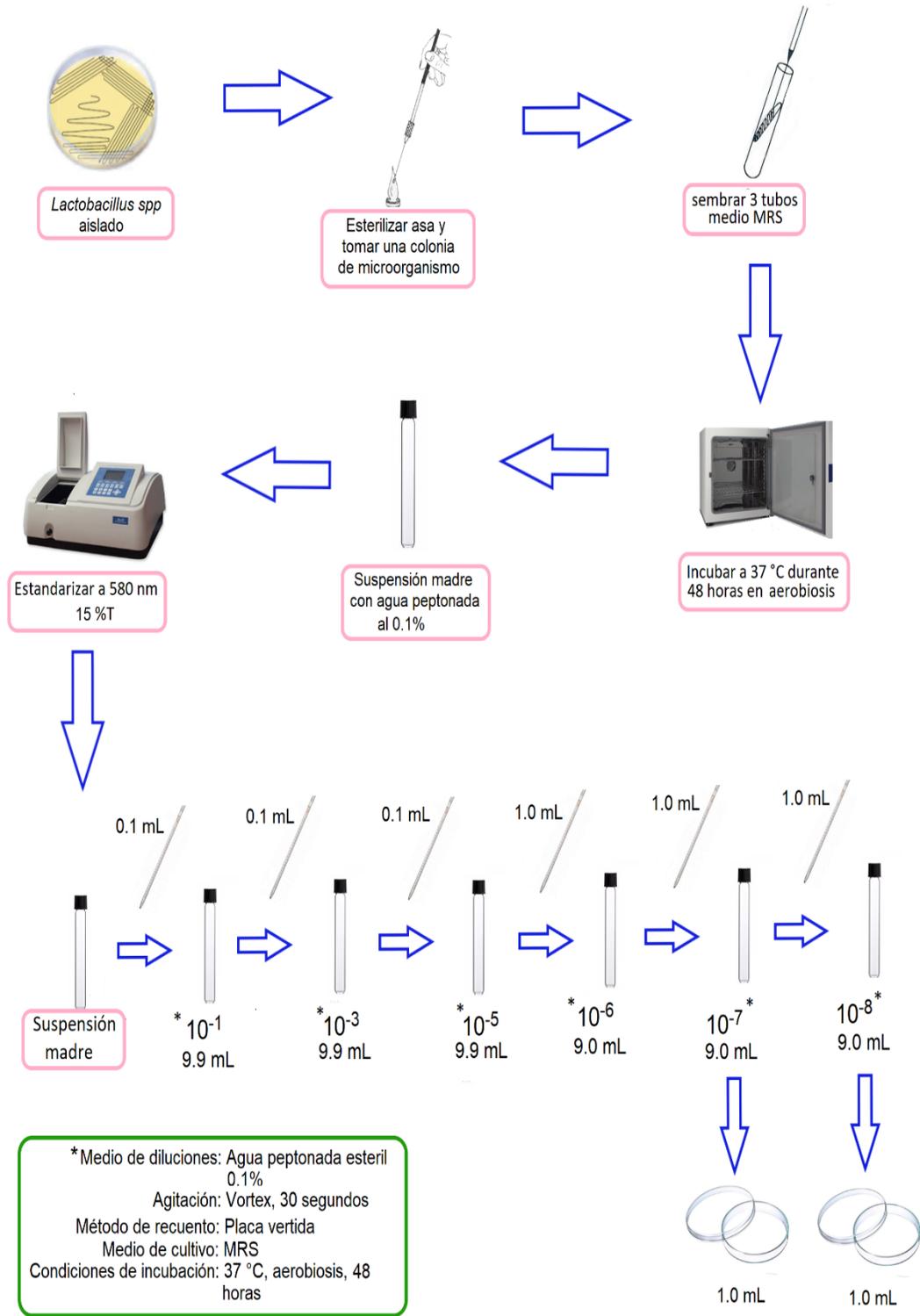


Figura N° 29. Procedimiento a realizar para la estandarización del microorganismo aislado.

ANEXO N° 11

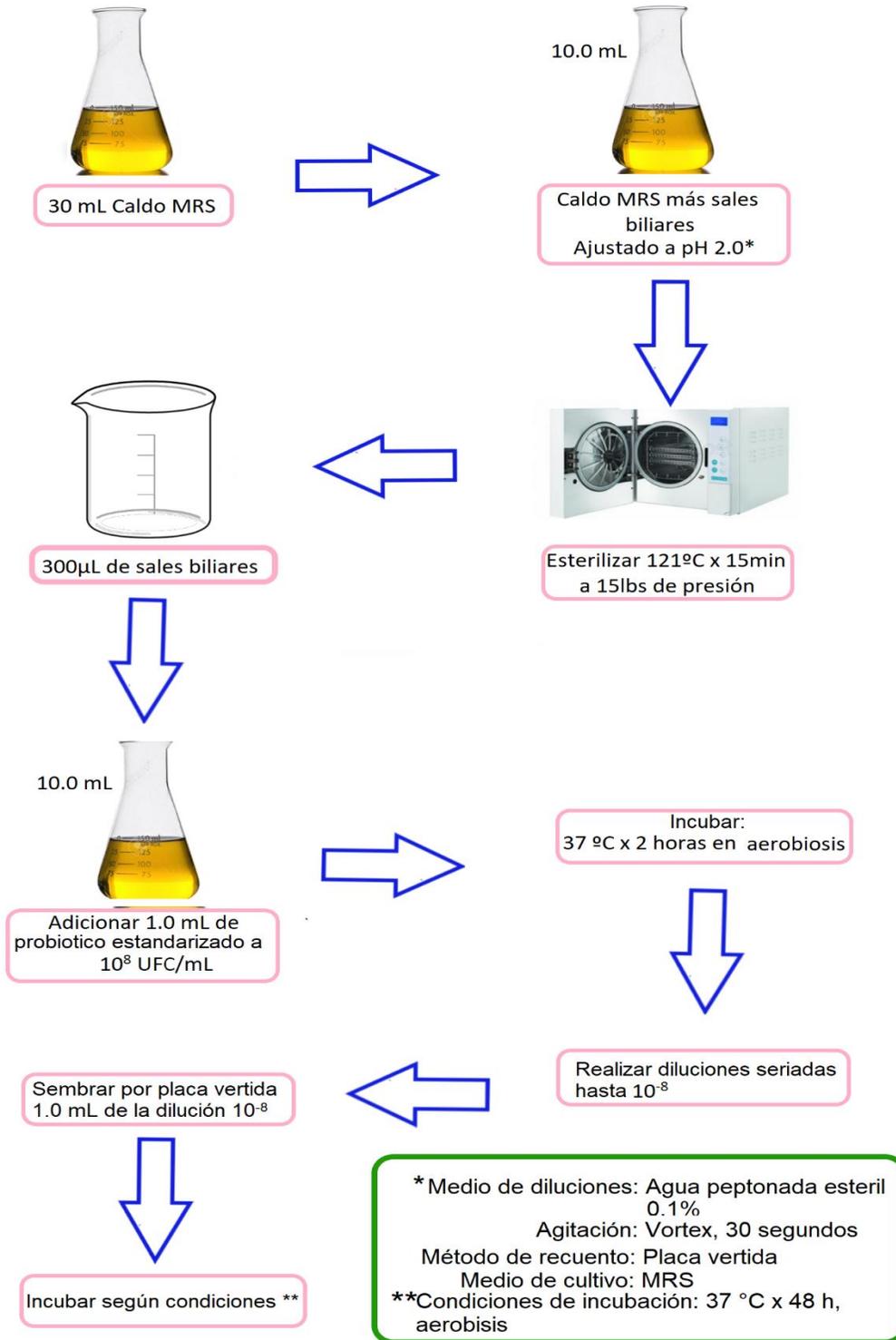


Figura N° 30. Procedimiento de la prueba de resistencia a bilis y pH ácido.

ANEXO N° 12

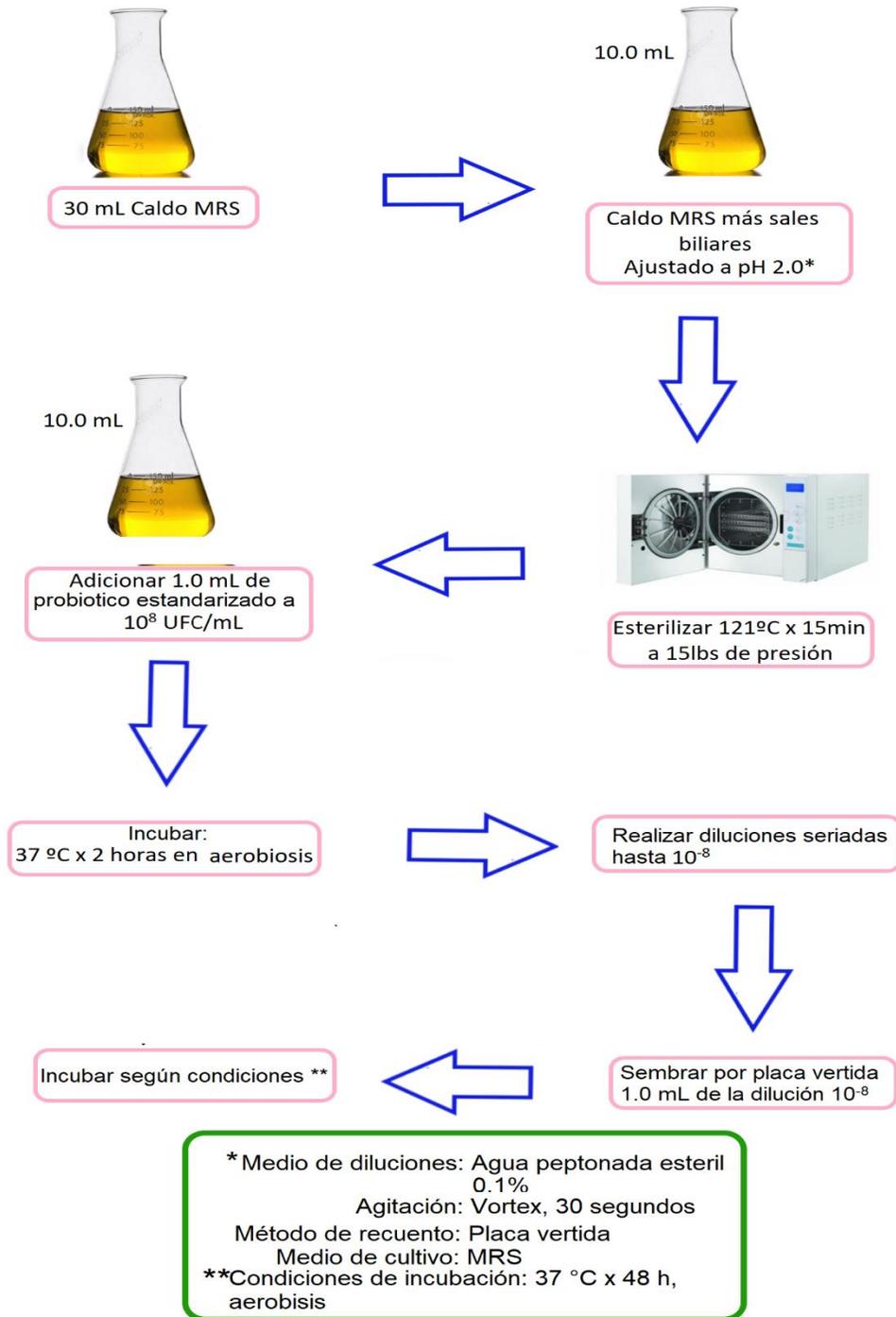


Figura N° 31. Procedimiento de la prueba de resistencia a pH ácido.

ANEXO N° 13

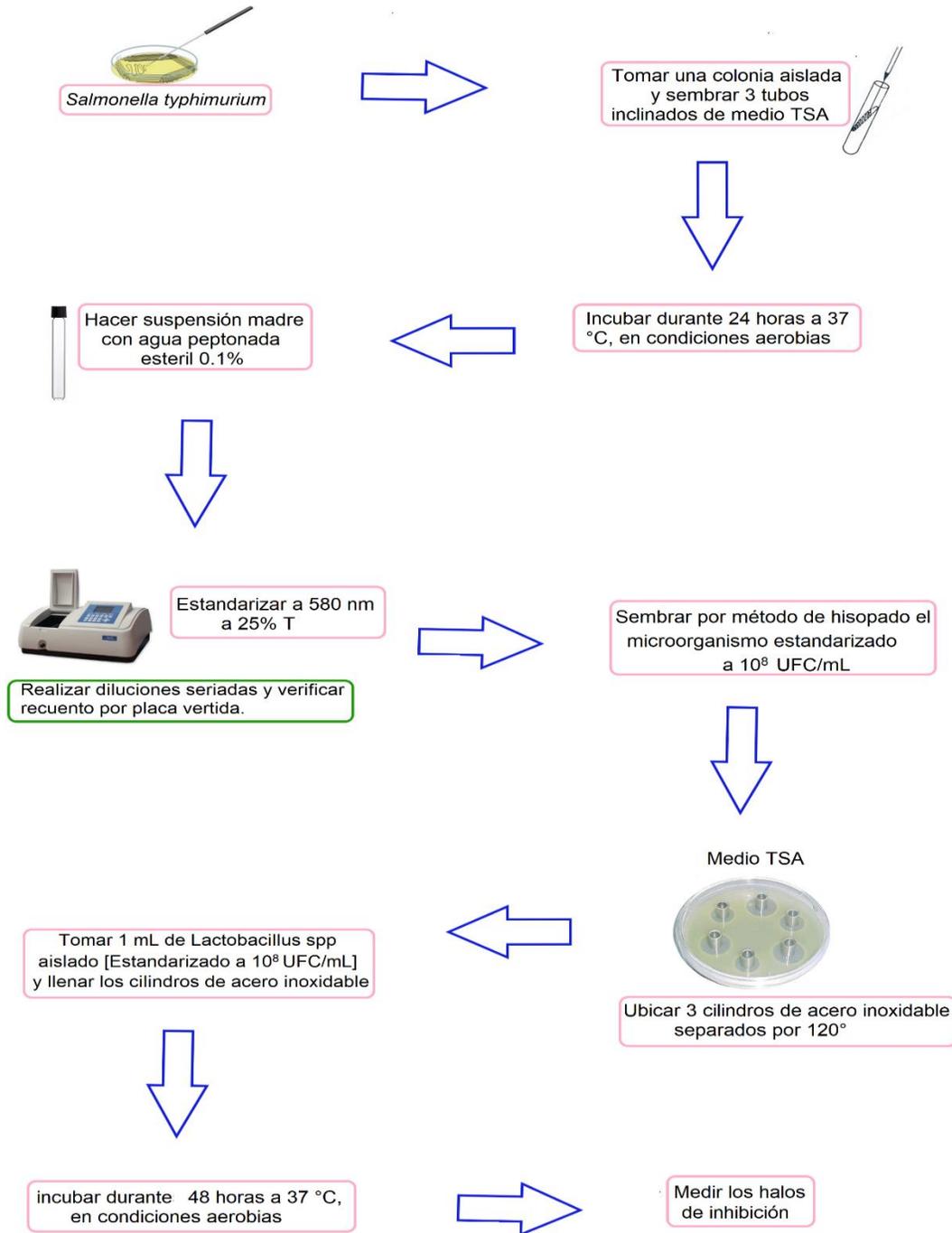


Figura N°32. Procedimiento de la prueba de actividad antimicrobiana.

ANEXO N° 14

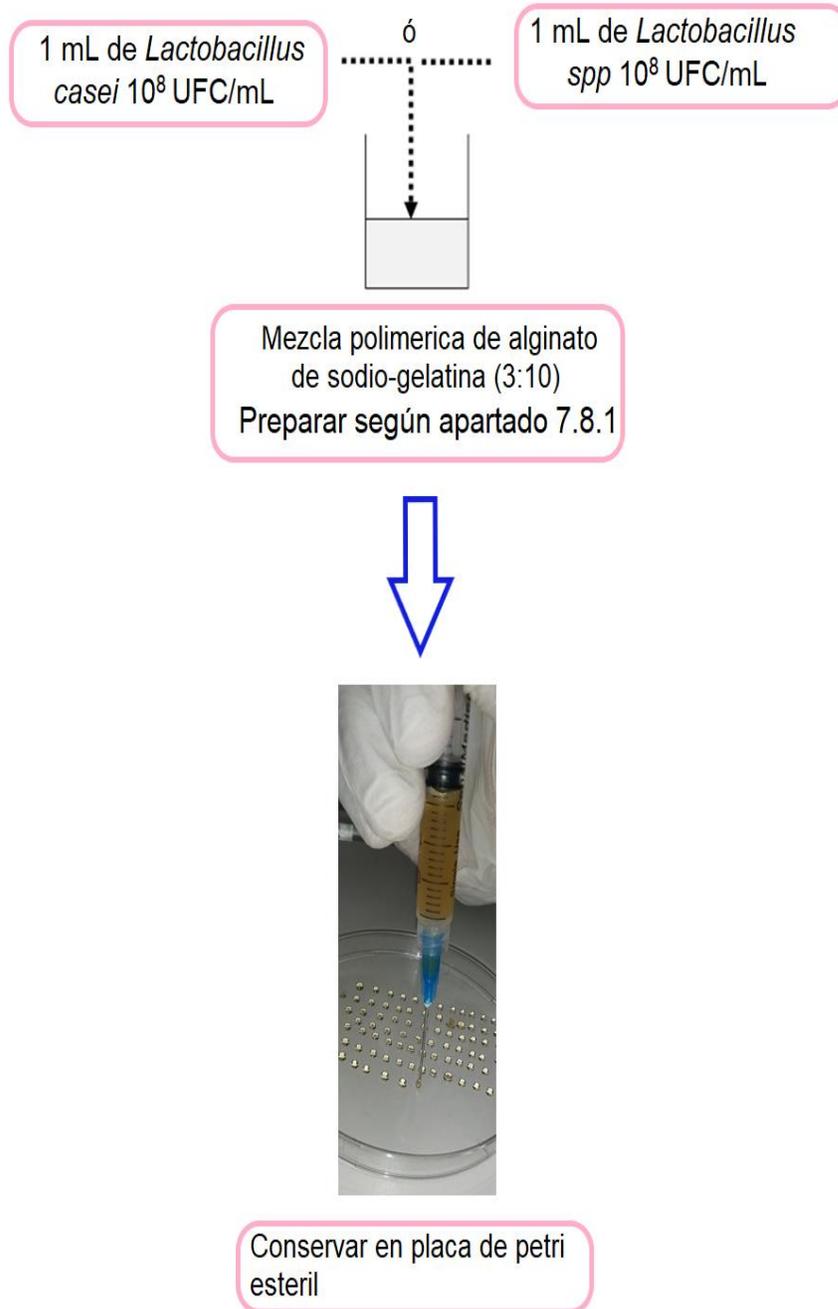


Figura N° 33. Procedimiento a realizar para la encapsulación de microorganismos probióticos, utilizando diferentes mezclas de matrices poliméricas.

ANEXO N° 15

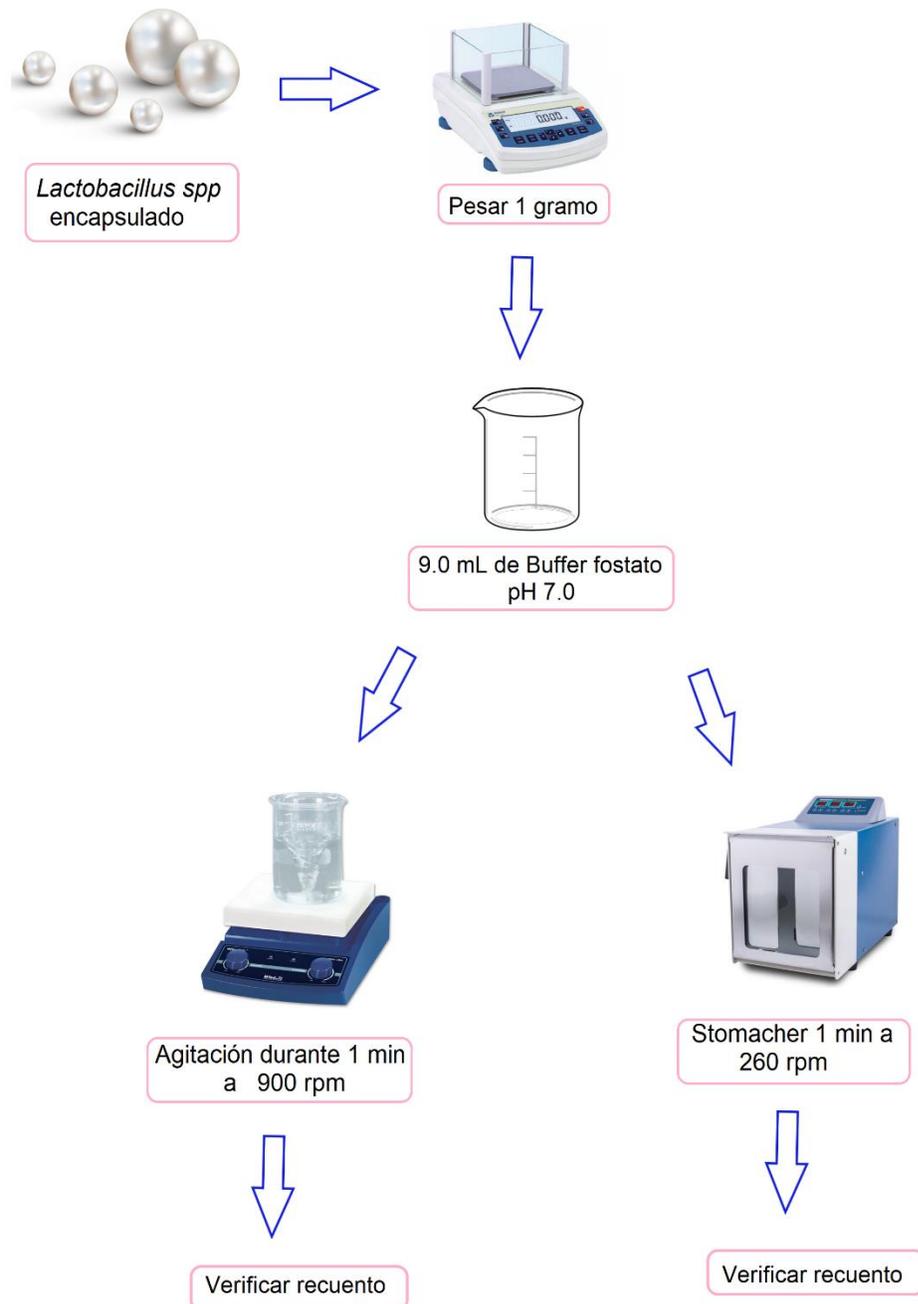
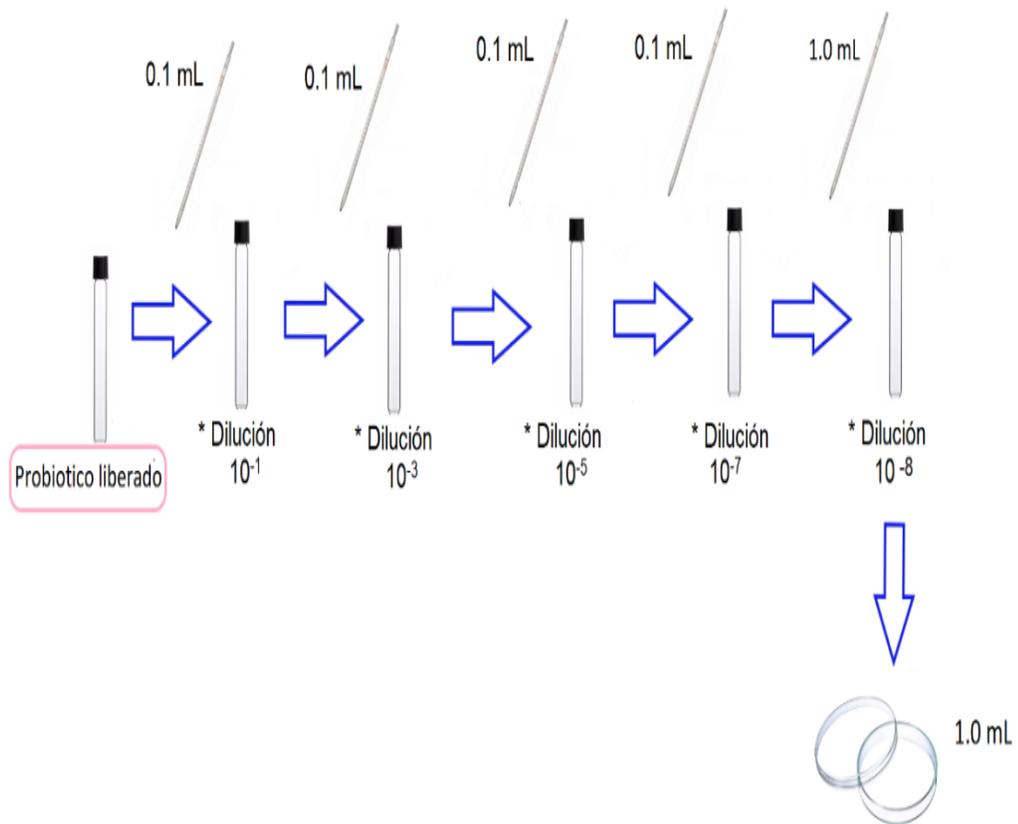


Figura N° 34. Procedimiento a realizar para la desintegración de las cápsulas.

ANEXO N° 16



Medio de diluciones: Agua peptonada esteril 0.1%
Agitación: con vortex, 30 s
Método de cultivo: Placa vertida
Medio de cultivo: MRS
Condiciones de incubación: 37 °C, 48 horas, en aerobiosis

Figura N° 35. Procedimiento a realizar para el recuento de microorganismos.

ANEXO N° 17

Cuadro N°10 Porcentajes de polímeros para la formación de las cápsulas.

Porcentaje de formulación %	Almidón de maíz - gelatina	Alginato de sodio - gelatina	Goma Xantana - gelatina
	Resultado		
3:10	Viscosidad adecuada	Viscosidad adecuada	Alta viscosidad
0.5: 10	Baja viscosidad	Baja viscosidad	Viscosidad adecuada
10: 10	Alta viscosidad	Alta viscosidad	Alta viscosidad
8: 10	Alta viscosidad	Alta viscosidad	Alta viscosidad
10: 15	Alta viscosidad	Alta viscosidad	Alta viscosidad

Porcentajes utilizados para determinar la cantidad adecuada de cada polímero a utilizar para la formación de las cápsulas.

Anexo N° 18

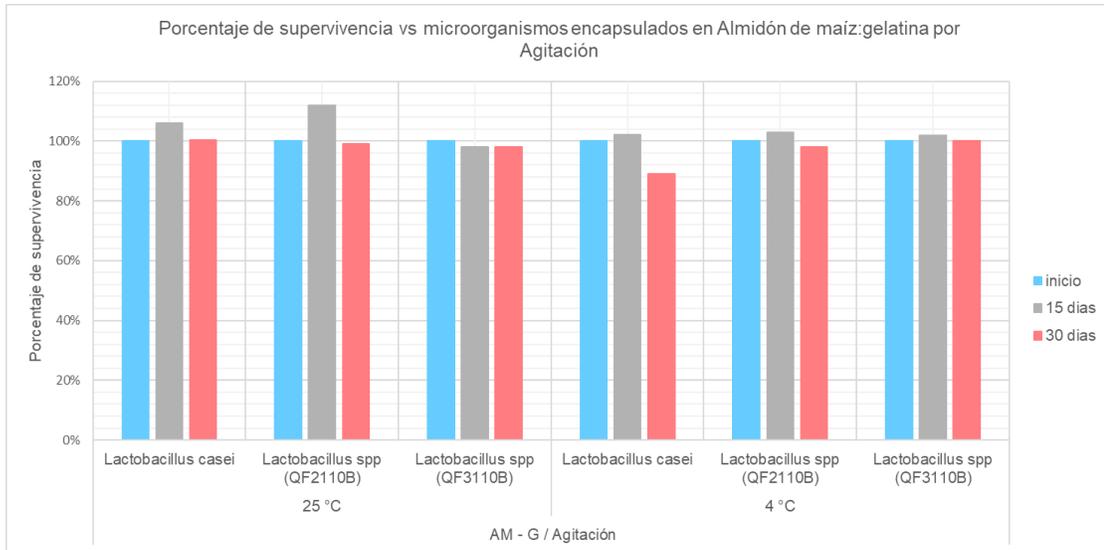


Figura N° 36. Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C Almidón de maíz-Gelatina por método de Agitación magnética.

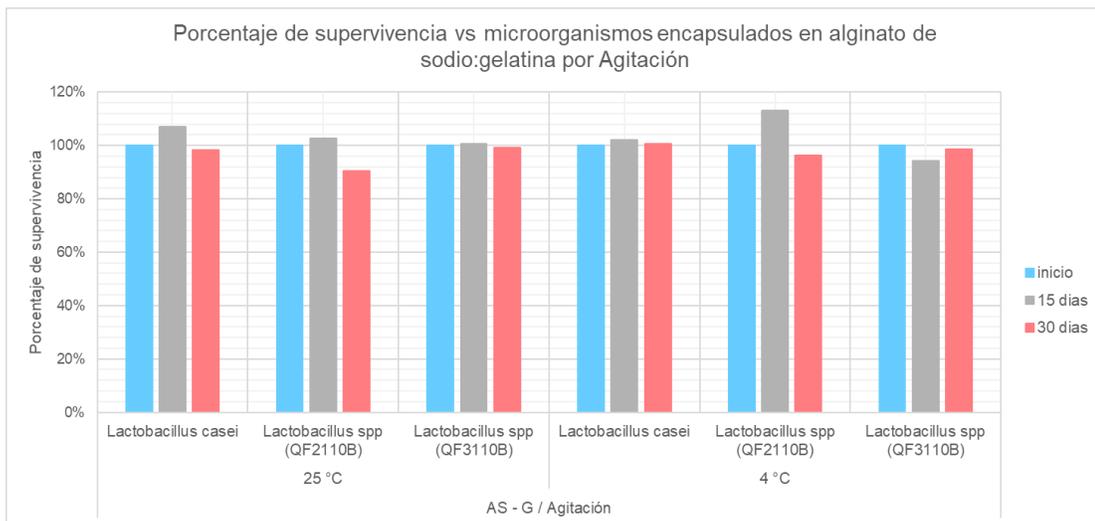


Figura N° 37. Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C alginato de sodio maíz-Gelatina por agitación magnética.

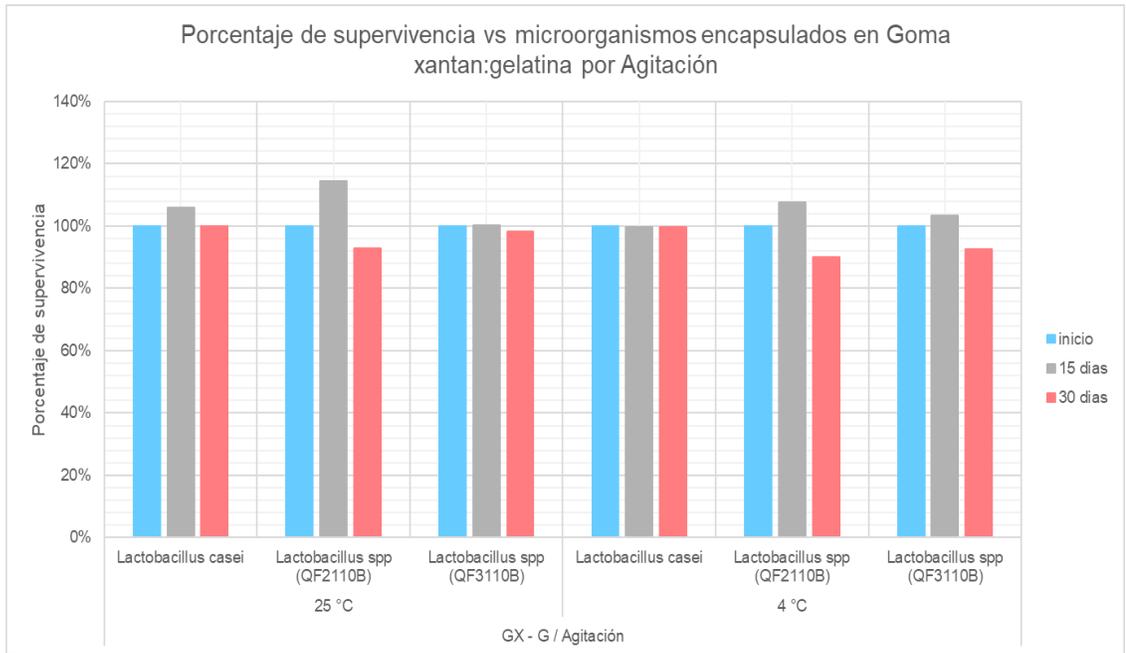


Figura N° 38. Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C Goma Xantana-Gelatina por método de Agitación magnética.

Gráficos de liberación por agitación magnética.

Anexo N°19

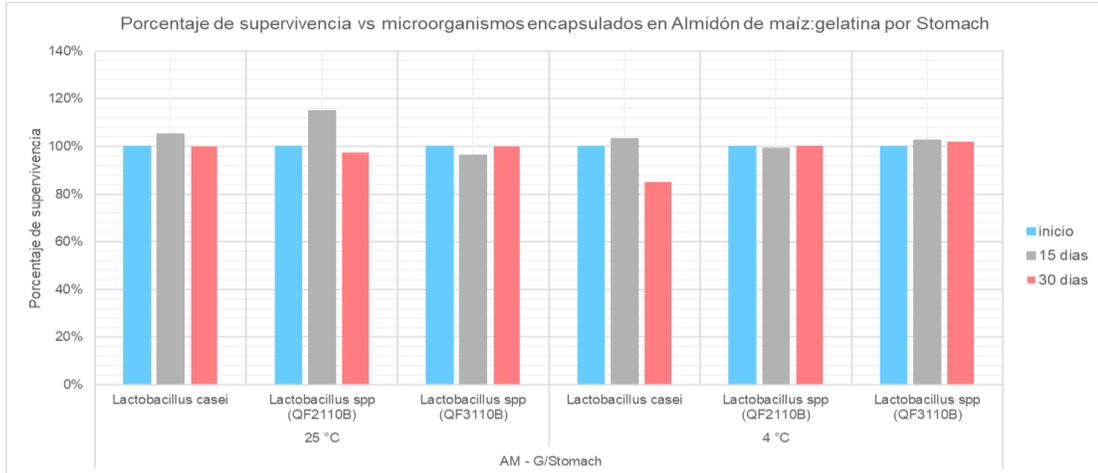


Figura N° 39. Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C utilizando almidón de maíz-Gelatina por el método de estomacher.

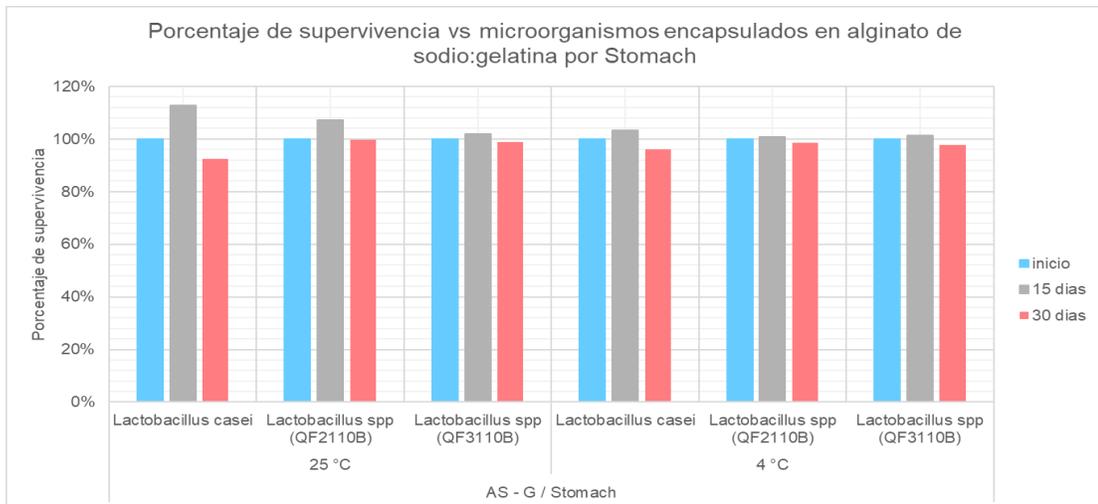


Figura N°40. Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C alginato de sodio maíz-Gelatina por estomacher.

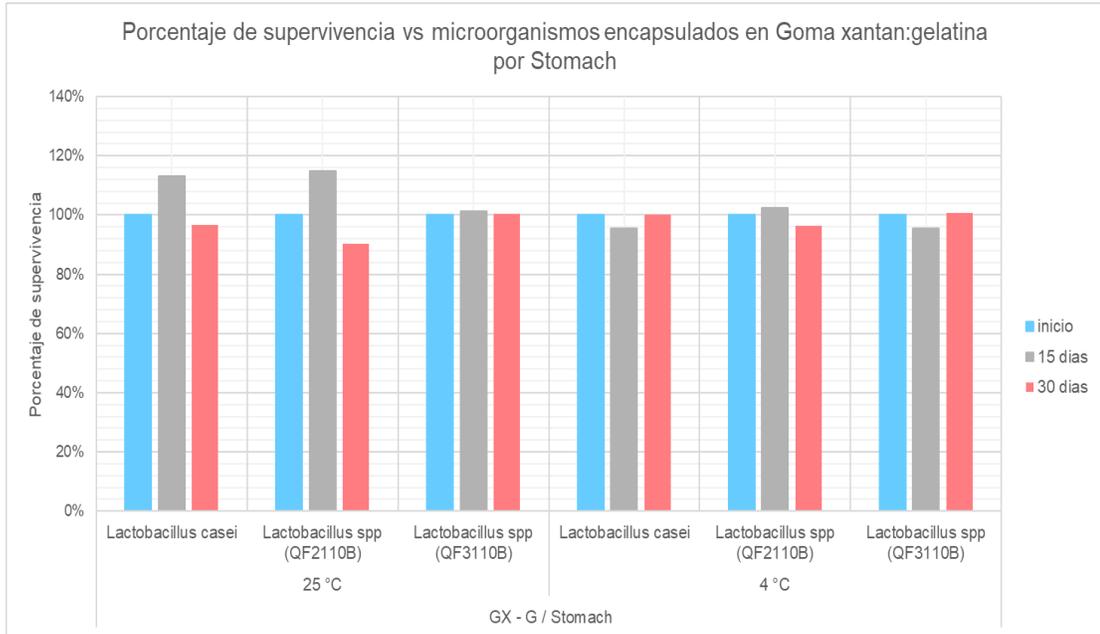


Figura N°41. Representación gráfica de los resultados de supervivencia de los microorganismos encapsulados a 25°C y 4 °C Goma Xantana-Gelatina por método de estomacher.

Gráficos de liberación por estomacher.