

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



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

**FORMULACION DE UN ALIMENTO PARA NUTRICION INFANTIL LIBRE DE  
LACTOSA A BASE DE CASEINA CON MEZCLA DE PROBIOTICOS  
*Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* Y SU EFECTO SOBRE LA  
CINETICA DE MUERTE DE *Escherichia coli*, CEPA HOSPITALARIA.**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR**

**HEISY YAHAIRA ARTEAGA CASTRO  
FATIMA MARIA DE LEON RUIZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE**

**LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA**

**OCTUBRE DE 2014.**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

**SECRETARIO**

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

**DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION**

**DIRECTORA GENERAL**

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

**TRIBUNAL CALIFICADOR**

**COORDINADORAS DE AREA DE: MICROBIOLOGIA**

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

**DOCENTE ASESOR**

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios mi padre celestial, por abrir todas las puertas que me permitieron llegar hasta aquí, por darme la fortaleza en los momentos donde fui vulnerable; por esmerarse en mi vida y por su infinita fidelidad

A mi amada madre, mi maestra, ejemplo de vida, consejera y mejor amiga; Gracias mamita por su esfuerzo permanente, por su confianza, por su apoyo, usted es y será mi mayor motivación, la vida entera no me alcanzará para agradecer todo lo que hace por mi.

A mi querido hermano y padre, por ver en mi la capacidad de cumplir las metas que me propongo y por su continua motivación.

A mi mami Loly y papi Toño; Gracias a mis abuelitos por sus oraciones, por siempre recordarme que la gloria es para Dios y por sentirse orgullosos de su nieta.

A mi tía Mary y a mis primitos Edgar, David y Suzette. Mi segunda madre y mis hermanitos; Gracias por el apoyo que siempre me han dado, el amor y la admiración, que han servido de motivación para culminar mi carrera.

A mi apoyo incondicional Daniel, gracias por ser paciente y comprensible; por motivarme cada día a ser una mejor persona, por convertir tu familia en mi familia, por la calidez de tus palabras y sobretodo por el amor infinito que me has regalado.

A mi Docente Director, Msc. María Evelin Sánchez por la dedicación y tiempo invertido, por los consejos a lo largo de la carrera, horas sociales y tesis, muchas gracias. A Msc. Amy Morán, Msc. Coralia Gonzales, Lic. Odette Rauda, Doctora Tania Cuadra, Msc. Mirna Lorena Sorto, Alejandra Rodríguez; CENSALUD y ASEAL por su invaluable colaboración en el desarrollo de éste trabajo.

A mi amiga, compañera de carrera, horas sociales y tesis, Fátima De León; Por la entrega y dedicación; Por su disponibilidad y comprensión.

**Heisy Arteaga Castro**

## DEDICATORIA

Dedicado a Dios, toda gloria sea para Él. Por la sabiduría y comprensión que puso en mi, por hacerme entender que todo es posible si se realiza de su mano.

A mi madre, Sandra Castro; Porque sin ella no estuviera donde estoy y no fuera quien soy; Porque gracias a ella estoy cumpliendo una de mis metas y por ser la persona mas importante en mi vida, mi pilar, mi roca, mi guerrera, mi constante inspiración, la mujer que mas admiro y respeto; Por esas ganas de parecerme un poco a ella, mi ejemplo siempre.

A mi hermano Giovanni Arteaga, porque siempre confió en mi, porque nunca ha dudado de mis capacidades y deseo que se sienta orgullo de su hermanita.

A mi padre Giovanni Arteaga, quién siempre me motivo a seguir adelante y porque quiero ser un ejemplo para mis hermanitos.

A mi familia; mama Chinda, mami Loly, papi Toño, tía Mary, Edgar, David, Suzette. Porque todos los años me hacen sentir como la persona mas importante del mundo, por darme las mejores bienvenidas y por tanto amor.

A Daniel Flores, por su amor, respeto, comprensión y paciencia durante estos años; por brindarme paz, seguridad, por enseñarme algo nuevo todos los días, por compartir conmigo los mejores años de nuestras vidas y por abrirme las puertas de su hogar y recibirme en su familia.

A Erick Lozano, amigo, hermano, por compartir conmigo años inolvidables, por nunca dejarme sola, por estar presente en todo momento aún en la distancia.

A mi mejor amiga Gabriela Araujo, por estar conmigo incondicionalmente desde hace muchos años, apoyándome, siempre haciéndome sentir la mas importante, siempre demostrándome su cariño , por la amistad verdadera que hemos construido.

A mis amigos Fátima De León, Tania De La Cruz, Luis Guido, Karlita Villalta; Por compartir los mejores recuerdos de la carrera , por estar presentes en las buenas y en las malas, por ser mis consejeros, cómplices y hermanos.

**Heisy Arteaga Castro**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios Todopoderoso, por haberme dado la fuerza y voluntad de seguir en este camino desde el inicio de la carrera, y por darme las cosas en su tiempo.

A mis padres por su gran esfuerzo, ayuda y ánimos para culminar mi trabajo de graduación y mi abuelita por sus oraciones y amor brindado en todo este proceso. A mi Madrina, Padrino y Doña Silvia, por depositar su confianza en mí y por siempre darme palabras de ánimos. A Samuel Castillo, por estar siempre pendiente de mí, apoyándome en mis decisiones y dándome consejos para continuar en este camino.

A mi Docente Director, Msc. María Evelin Sánchez, por sus sabios consejos, dedicación y confianza en este trabajo y a Msc. Amy Morán, Msc. Coralia Gonzales y Lic. Odetter Rauda por su ayuda incondicional en este trabajo y por brindarnos ideas para la realización de la Investigación y la amabilidad que han tenido en las correcciones.

A la Doctora Tania Cuadra y Msc. Mirna Lorena Sorto por su disponibilidad y colaboración en ayudarnos en este trabajo.

A Ing. Andrea Rodríguez e Ing. Victor Natareno por su ayuda, consejos, apoyo y confianza en la realización de este proyecto, igualmente a ASEAL.

A CENSALUD, por su buen recibimiento en la realización de las horas sociales y de la tesis, además por el aprendizaje obtenido en este lugar y a la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y sus docentes, por haberme brindado tanto conocimiento y aptitudes durante todos estos años.

A mi compañera de Horas Sociales y tesis, mi amiga Heisy Arteaga, por haber compartido todo este tiempo y terminar este paso juntas.

**Fátima María De León Ruiz.**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por haberme brindado sabiduría y llevarme por el camino correcto a lo largo de estos años.

A mis Padres Patricia Ruiz y Leopoldo De León por apoyarme para terminar mi carrera y estar siempre pendiente de mí, agradezco los consejos que me brindaban desde que era una niña y los consejos que sigo escuchando ahora, ya que sin ellos, no sería la persona que soy hoy en día.

A mi abuelita, Mamá Chita, por ser mi segunda mamá y cuidarme desde pequeña y que lo siga siendo ahora.

A Sandra Ruiz y Carlos Melara, mis padrinos por estar siempre pendiente de mí, por apoyarme y haberme ayudado a terminar mis estudios.

A Doña Silvia por haberme ayudado tanto en la realización de esta tesis, siempre estaré agradecida con usted.

A mi novio y mejor amigo, Samuel Castillo, por ser mi gran apoyo durante estos 2 años y por ser mi partícipe de mis logros y alegrías.

A mis hermanos, Valeria De León y Rodrigo De León, por ser mis hermanitos y sacarme risas todos los días.

A mis amigos Rubén López, Herson López, Heisy Arteaga, Tania De La Cruz, Karla Villalta, Luis Guido, Carolina Rivas, por todos los momentos que hemos compartido juntos, son y serán la familia que yo escogí.

**Fátima María De León Ruiz.**

## INDICE

	Pág.
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xxx
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEORICO	35
3.1 Probióticos	35
3.1.1 Definición de probióticos	35
3.1.2 Características de los probióticos	36
3.1.3 Acción de los probióticos	37
3.1.4 Habitantes normales del sistema digestivo	41
3.1.5 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	41
3.1.6 <i>Bifidobacterium</i>	43
3.1.7 Inocuidad de los probióticos en los seres humanos	44
3.2 <i>Escherichia coli</i> y su relación con la diarrea infantil	44



3.2.1	<i>Escherichia coli</i>	44
3.2.2	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	46
3.2.3	Epidemiología	46
3.2.4	Patogenia	46
3.2.5	Cuadro clínico	48
3.2.6	Diagnóstico	49
3.2.7	Dosis infecciosa	49
3.3	Prevención de diarreas con Probióticos	49
3.3.1	Definición de diarrea	49
3.3.2	Probióticos contra la diarrea	50
3.3.3	Evidencias de probióticos contra la diarrea	50
3.3.3.1	Alimentación con <i>Bifidobacterium bifidum</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> en niños del hospital para la prevención de diarrea y de rotavirus	51
3.3.3.2	El consumo a largo plazo de las fórmulas infantiles que contienen bacterias probióticas vivas: la tolerancia y la seguridad	52
3.3.3.3	Fórmula de una leche acidificada suplementada con <i>Bifidobacterium lactis</i> : impacto sobre la diarrea infantil en los centros de atención residencial	
3.3.4	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 y <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 y su efecto simbiótico	54

3.4 Intolerancia a la lactosa	55
3.4.1 Causas de intolerancia a la lactosa	56
3.4.2 Síntomas de intolerancia a la lactosa	56
3.5 Alimentos nutricionales	56
3.5.1 Alimento Funcional	56
3.5.2 Probióticos como alimento Funcional	58
3.5.2.1 Probióticos en medio líquido	58
3.5.2.2 Cómo debe ser un buen Probiótico	58
3.5.3 Proteína láctea	59
3.5.4 Caseína	60
3.5.5 Normativa de probióticos, concentración recomendada	61
3.6 Directrices para la evaluación de microorganismo probióticos	63
3.7 Cinética de muerte de <i>Escherichia coli</i>	64
3.8 Medios selectivos utilizados	66
3.8.1 Agar Chromocult	66
3.8.2 Agar EMB	67
3.8.3 Agar MRS	
3.9 Pruebas de identificación del patógeno <i>Escherichia coli</i>	
3.9.1 Pruebas api	68
3.9.2 Pruebas bioquímicas	68

3.9.3 Tinción al gram	71
CAPITULO IV	
4.0. DISEÑO METODOLOGICO	74
4.1 Tipo de estudio	74
4.2 Investigación Bibliográfica	74
4.3 Parte Experimental	75
4.3.1 Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	78
4.3.2 Pruebas de Identificación de <i>Escherichia coli</i>	78
4.3.2.1 Frotis bacteriano y tinción gram	78
4.3.2.2 Pruebas bioquímicas	79
4.3.2.3 Pruebas API	81
4.3.3 Mantenimiento y estandarización de la bacteria patógena <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria	84
4.3.3.1 Mantenimiento de la cepa <i>Escherichia coli</i>	84
4.3.3.2 Estandarización de la bacteria patógena <i>Escherichia coli</i> cepa hospitalaria	85
4.3.4 Pre-Ensayo	86
4.3.4.1 Tratamiento de la mezcla de probióticos ABY-3	86
4.3.4.2 Preparación de la formulación 1 (F1)	86
4.3.4.3 Preparación de la formulación 2 (F2)	87
4.3.4.4 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de	

probióticos: <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5®, <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12®, <i>Streptococcus</i> <i>Thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> contra <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria	87
4.3.4.4.1 Determinación del efecto inhibitorio en Formulación 1 (F1)	87
4.3.4.4.2 Determinación del efecto inhibitorio en Formulación 2 (F2)	88
4.3.4.5 Conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad	90
4.3.4.5.1 Viabilidad de probióticos en Formulación 1 (F1) donde se ha inoculado <i>Escherichia coli</i> 10 <sup>5</sup> y 10 <sup>6</sup> UFC/mL	90
4.3.4.5.2 Viabilidad de probióticos en Formulación 2 (F2) donde se ha inoculado <i>Escherichia coli</i> 10 <sup>5</sup> y 10 <sup>6</sup> UFC/mL	90
4.3.4.5.3 Blanco de probióticos (viabilidad)	91
4.3.4.6 Blanco de <i>Escherichia coli</i>	91
4.3.4.6.1 Preparación de la bebida del pre-ensayo	91
4.3.4.6.2 Evaluación de <i>Escherichia coli</i> 10 <sup>5</sup> UFC/mL	92
4.3.4.6.3 Evaluación de <i>Escherichia coli</i> 10 <sup>6</sup> UFC/mL	92
4.3.5 Ensayo	93

4.3.5.1	Formulación del alimento nutricional	93
4.3.5.2	Elaboración del alimento funcional en polvo para reconstituir	93
4.3.5.3	Preparación del alimento funcional en polvo para reconstituir	94
4.3.5.4	Determinación del efecto inhibitorio de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5® y <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12® contra <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria	94
4.3.5.4.1	Determinación del efecto inhibitorio en Formulación 1 (F1)	95
4.3.5.4.2	Determinación del efecto inhibitorio en Formulación 2 (F2)	96
4.3.5.5	Conteo de las bacterias probióticas para determinar la Viabilidad	97
4.3.5.5.1	Viabilidad de probióticos en Formulación 1 (F1) donde se ha inoculado <i>Escherichia coli</i> 10 <sup>5</sup> y 10 <sup>6</sup> UFC/mL	97
4.3.5.5.2	Viabilidad de probióticos en Formulación 2 (F2) donde se ha inoculado <i>Escherichia coli</i> 10 <sup>5</sup> y 10 <sup>6</sup> UFC/mL	98
4.3.5.5.3	Blanco de probióticos (viabilidad)	98
4.3.5.6	Blanco de <i>Escherichia coli</i>	98

4.3.5.6.1 Preparación de la mezcla de polvos	99
4.3.5.6.2 Elaboración del alimento funcional en polvo para reconstituir	99
4.3.5.6.3 Preparación del alimento funcional en polvo para Reconstituir	100
4.3.5.6.4 Evaluación de blanco <i>Escherichia coli</i> 10 <sup>5</sup> UFC/mL	100
4.3.5.6.5 Evaluación de blanco <i>Escherichia coli</i> 10 <sup>6</sup> UFC/mL	101
4.3.5.7 Prueba preliminar de estabilidad para el alimento Formulado	101
4.3.5.7.1 Prueba preliminar de estabilidad para Formulación F1	101
4.3.5.7.2 Prueba preliminar de estabilidad para Formulación F2	102
4.3.5.8 Evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares	103
4.3.5.8.1 Resistencia a acidez	103
4.3.5.8.2 Resistencia a sales biliares	103
4.3.5.8.3 Determinación del porcentaje de células Viables	104

## CAPITULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	106
5.1. Pruebas de Identificación de <i>Escherichia coli</i>	106
5.2 Estandarización de la bacteria patógena <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria	108
5.3 Pre-ensayo	108
5.3.1 Elaboración de la bebida a base de probióticos ABY-3	108
5.3.2 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 en F1 y F2 contra <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria	111
5.3.3 Determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F1	115
5.3.4 Determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F2	116
5.3.5 Blanco del patógeno <i>Escherichia coli</i>	118
5.3.6 Toma de pH inicial y final de Bebidas	120
5.4. Ensayo	121
5.4.1. Identificación morfológica	121
5.4.2 Formulación del alimento nutricional	123
5.4.2.1 Formulación del alimento funcional sabor a fresa	127
5.4.2.2 Formulación del alimento funcional sabor a naranja	128
5.4.2.3 Elección de la formulación más adecuada	129
5.4.3 Elaboración del alimento funcional en polvo para reconstituir	130
5.4.4 Determinación del efecto inhibitorio de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5® y <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12® en F1 y F2	

contra <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria	131
5.4.5 Análisis estadístico ANOVA	135
5.4.6 Determinación de la viabilidad de probióticos en F1 y F2	138
5.4.7 Blanco del patógeno <i>Escherichia coli</i>	141
5.4.8 Prueba preliminar de estabilidad	144
5.4.8.1 Prueba preliminar de estabilidad para F1	144
5.4.8.2 Prueba preliminar de estabilidad para F2	145
5.4.9 Evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares	147
5.4.10 Toma de pH inicial y final de Bebidas	150
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	152
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	156
Bibliografía	160
Glosario	168
Anexos	171



## INDICE DE ANEXOS

### Anexo N°

1. Datos Epidemiológicos del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.  
(35)
2. Informe de análisis de identificación de cepa patógena *Escherichia coli* dada por el Laboratorio de Análisis Clínico, Departamento de Bacteriología del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.
3. Procedimientos a realizar para la identificación de la cepa patógena *Escherichia coli*
4. Procedimientos a realizar para el mantenimiento y estandarización de la cepa patógena *Escherichia coli*
5. Resultados de los conteos del probiótico ABY-3 que se utilizaron para determinar UFC por cada gramo.
6. Cálculos utilizados para determinar la cantidad de ABY-3 equivalente a las concentraciones de probióticos requeridas.
7. Procedimientos de los análisis a realizar en el pre-ensayo.
8. Cálculos utilizados en la formulación del Alimento Funcional
9. Procedimientos de los análisis a realizar en el ensayo.
10. Preparación de medios de cultivo.
11. Monografías y hojas de Especificaciones de Materias primas utilizadas en la formulación del alimento nutricional.
12. Muestras procesadas.
13. Resultados de Identificación del patógeno *Escherichia coli*
14. Resultados del Pre-ensayo.
15. Formulación del Alimento Funcional.
16. Resultados del Ensayo

## INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		N° de página
1.	Características morfológicas de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	42
2.	Características morfológicas de <i>Bifidobacterium lactis</i>	43
3.	Características morfológicas de <i>Escherichia coli</i>	45
4.	Función de materias primas dentro de la formulación	124

## INDICE DE FIGURAS

Figura N°	N° de página
1. Mecanismos de acción ejercidos por las bacterias probióticas <sup>(6)</sup>	40
2. Morfología microscópica de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	42
3. Morfología microscópica de <i>Bifidobacterium</i>	43
4. Reducción del riesgo de diarreas en niños con el uso de probióticos	51
5. Disminución de la frecuencia del síndrome de colon irritable y reducción del uso de antibióticos en niños	52
6. Reducción del número de días en que los niños presentan diarrea con el uso de probióticos	53
7. Función de la enzima lactasa	55
8. Cinética de muerte de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 de origen humano en cocultivo con <i>Lactobacillus casei</i> 206/1 <sup>(47)</sup>	65
9. Ensayos realizados en la Investigación	75
10. Hoja de resultados para pruebas api 20E	84
11. Resultados frotis bacteriano y tinción gram	106
12. Resultados de mantenimiento de <i>Escherichia coli</i> y pruebas Bioquímicas	107
13. Elaboración de las bebidas a base de probióticos ABY-3	110
14. Efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria en formulación F1 y F2	112
15. Cinética de muerte de <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria en el pre-ensayo	114
16. Comparación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F1	116
17. Comparación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F2	118
18. Blanco del patógeno <i>Escherichia coli</i> en concentración 10 <sup>5</sup> UFC/mL	119
19. Blanco del patógeno <i>Escherichia coli</i> en concentración 10 <sup>6</sup> UFC/mL	120

20. Morfología macroscópica de probióticos utilizados en el alimento funcional	121
21. Morfología microscópica de probióticos utilizados en el alimento funcional (Colonia circular)	122
22. Efecto inhibitorio de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5® y <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12® contra <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria en formulación F1 y F2	132
23. Cinética de muerte de <i>Escherichia coli</i> , cepa hospitalaria en el ensayo	134
24. Gráfico de Prueba Múltiple de rango	138
25. Comparación de la viabilidad de probióticos en F1	140
26. Comparación de la viabilidad de probióticos en F2	141
27. Blanco del patógeno <i>Escherichia coli</i> en concentración $10^5$ UFC/mL	142
28. Blanco del patógeno <i>Escherichia coli</i> en concentración $10^6$ UFC/mL	143
29. Viabilidad de probióticos en F1 en los días 0, 15 y 30 de Almacenamiento	145
30. Viabilidad de probióticos en F2 en los días 0, 15 y 30 de Almacenamiento	146
31. Evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares	148

## INDICE DE TABLAS

Tabla N°

1. Componentes del alimento funcional en polvo para reconstituir.
2. Componentes del alimento funcional blanco.
3. Resultados de frotis bacteriano y tinción gram.
4. Resultados de la estandarización de la bacteria patógena *Escherichia coli*, cepa hospitalaria.
5. Resultados de los conteos del probiótico ABY-3 para determinar UFC por cada gramo.
6. Cantidades utilizadas para la elaboración de las bebidas de las dos formulaciones de probióticos con ABY-3 en el pre-ensayo.
7. Promedio de resultados de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2.
8. Promedio de resultados de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2, convertido a Logaritmo natural (Ln).
9. Ecuación de la línea recta y Cinética de muerte de *Escherichia coli* en el pre-ensayo.
10. Comparación de resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F1.
11. Comparación de resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F2.
12. Promedio de resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^5$  UFC/mL.
13. Promedio de resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^6$  UFC/mL.

14. Porcentajes de Materia Prima utilizada en la formulación del alimento funcional sabor fresa y pH obtenido.
15. Porcentajes de Materia Prima utilizada en la formulación del alimento funcional sabor naranja y pH obtenido.
16. Promedio de resultados de la determinación del efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12® contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2.
17. Promedio de resultados de la determinación del efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12® contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2, convertido a Logaritmo natural (Ln).
18. Ecuación de la línea recta y Cinética de muerte de *Escherichia coli* en el ensayo.
19. Análisis de Varianza, Concentración.
20. Prueba múltiple de rango.
21. Comparación de resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos en F1.
22. Promedio de resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^5$ UFC/mL.
23. Promedio de resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^6$ UFC/mL.
24. Promedio de la viabilidad de probióticos en F1 en los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.
25. Promedio de la viabilidad de probióticos en F2 en los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.
26. Conteo de UFC/mL de probióticos del blanco, sistema A (pH ácido) y Sistema B (sales biliares).

## ABREVIATURAS

**°C**= Grados Celsius

**ABY-3**= Mezcla de 4 probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5®, *Bifidobacterium lactis* BB-12®, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*

**ADH**= Arginina deshidrolasa

**ADN**= Ácido desoxirribonucleico

**AGCC**= Ácido graso de cadena corta

**AMPc**= Adenosín monofosfato cíclico

**AMY**= Fermentación/oxidación de amígdalina

**ANOVA**= Análisis de varianza

**ARA**= Fermentación/oxidación de arabinosa

**BAL**= Bacterias ácido lácticas

**BB-12®**= *Bifidobacterium lactis*

**CENSALUD**= Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

**CIT**= Citrato

**CO<sub>2</sub>** = Dióxido de Carbono

**CODEX** = Código

**COL1**= *Escherichia coli* inoculada en 10<sup>5</sup> UFC/mL

**COL2**= *Escherichia coli* inoculada en 10<sup>6</sup> UFC/mL

**DAEC**= *E. coli* difusamente adherente

**df**= grados de libertad

***E. coli***= *Escherichia coli*

**EAEC**= E.coli enteroagregativa

**EHEC**= E. coli enterohemorrágica

**EIEC**= E. coli enteroinvasiva

**EMB**= Agar Eosina azul de metileno

**EPEC**= E. coli enteropatógena

**ETEC**= E.coli enterotoxigénica

**F1**= Probiótico inoculado en  $10^7$  UFC/mL

**F2**= Probiótico inoculado en  $10^8$ UFC/mL

**FAO**= Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**GALT**= Tejido linfoide asociado al intestino

**GEL**= Gelatinasa

**GLU**= Fermentación/oxidación de glucosa

**h** = Horas

**H<sub>2</sub>O**= Agua

**H<sub>2</sub>S**= Sulfuro de hidrógeno

**H<sub>a</sub>**= Hipótesis alternativa

**H<sub>o</sub>**= Hipótesis nula

**I<sub>2</sub>**= Yodo molecular

**IgA**= Inmunoglobulina A



**IMVIC**=Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato

**IND**= Indol

**INO**= Fermentación/oxidación de inositol

**LA-5®** = *Lactobacillus acidophilus*

**LDC**= Lisina descarboxilasa

**LSD**= Mínima diferencia significativa

**MAN**= Fermentación/oxidación de manitol

**MEL**= Fermentación/oxidación de melobiosa

**MG** = Materia grasa

**mL**= Mililitro

**MRS** = Medio de cultivo De Man Rogosa Sharpe

**O<sub>2</sub>** = Oxígeno

**ODC**= Ornitina descarboxilasa

**OMS**= Organización Mundial de la Salud

**ONPG**= beta-galactosidasa

**OX**= Citocromo oxidasa

**PCR** = Reacción en cadena de la polimerasa

**pH**= Potencial de hidrógeno

**RHA**= Fermentación/oxidación de ramnosa

**RTCA**= Reglamento Técnico Centroamericano

**AC**= Fermentación/oxidación de sacarosa

**SLC=** Sobrenadante libre de células

**SOR=** Fermentación/oxidación de sorbitol

**sp.** = Especie

**spp.** = Especies

**SRO=** Sales de rehidratación oral

**TDA=** Triptófano desaminasa

**TL=** Toxina termolábil

**TS=** Toxina termostable

**TSI=** Hierro triple azúcar

**UFC =** Unidades formadoras de colonias

**UFC/g =** Unidades formadoras de colonias por gramo

**UFC/mL=** Unidades formadoras de colonias por mililitro

**UNICEF=** Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia

**URE=** Ureasa

**USEPA=** Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

**VP=** Producción de acetoina, Voges-Proskauer

## RESUMEN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud , la definición de *probiótico* es: “Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo huésped”, existe gran evidencia que las *Bifidobacterias* y *Lactobacillus acidophilus* producen efectos beneficiosos en niños con infecciones entéricas y desordenes intestinales, siendo estos microorganismo un apoyo para prevenir casos de diarreas infecciosas en El Salvador, con el consumo regular de estos a través de un alimento funcional.

En esta investigación se formuló un alimento en polvo para reconstituir con los probióticos liofilizados *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12® más caseína al 1% además de saborizante y colorantes naturales, realizando varios ensayos hasta llegar al más aceptable organolépticamente.

Se realizó el análisis sobre la cinética de muerte del patógeno *Escherichia coli* al estar en contacto directo con la mezcla de probióticos del alimento reconstituido, al que se le aplicó el análisis de varianza y se determinó que la formulación que inhibió mayormente al patógeno fue la F1 donde el probiótico se encontraba en una concentración de  $10^8$  UFC/mL. A la vez se llevó un blanco del patógeno para comprobar que la inhibición era debido a los probióticos y no a otro componente de la formulación.

La evaluación de la viabilidad de los probióticos en la bebida reconstituida se mantuvo constante en el mismo logaritmo de concentración desde su inoculación hasta las 72 horas de análisis.

La prueba preliminar de estabilidad del polvo formulado sin reconstituir durante un mes, para F1 y F2 obtuvo una buena estabilidad de los probióticos junto a los polvos.

La resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares fue del 82.57% y del 95.54% respectivamente, los cuales son aceptados para considerarse a las cepas como probióticos. <sup>(26)</sup>

Con esta investigación se determinó que el alimento formulado posee un efecto inhibitorio in vitro contra el patógeno *Escherichia coli* llegando hasta una concentración menor a la dosis infecciosa de diarrea en niños ( $10^3$  UFC/mL), sin embargo se recomienda realizar un estudio de estabilidad fisicoquímico y microbiológico al producto y estudiar un material de empaque más adecuado para este.

Por lo tanto, el consumo regular de alimentos que posean probióticos, tal es el caso de la bebida formulada en este trabajo, puede ser una opción para prevenir diarreas.

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador durante el periodo de Mayo a Septiembre del año 2014.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

Las bacterias ácido lácticas (BAL), han estado presentes en la alimentación desde hace siglos; se encuentran en productos fermentados como la leche y derivados, productos cárnicos y vegetales. Estos microorganismos cuando fermentan carbohidratos producen una mezcla de sustancias con acción antimicrobiana como: ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas, que generan cambios en la microbiota intestinal como la inhibición de patógenos; lo cual repercute positivamente en el estado de salud del consumidor. <sup>(6)(20)</sup>

La diarrea infecciosa es un importante problema mundial de salud, que causa varios millones de muertes cada año. Aunque la mayoría de las muertes se producen entre niños de países en desarrollo, se estima que la diarrea transmitida por los alimentos afecta cada año hasta el 30 por ciento de la población, incluso en los países desarrollados. <sup>(45)</sup> Los probióticos pueden constituir un medio importante para reducir estos problemas.

Para dar respuesta a la problemática del país ante el alto índice de diarrea en niños y a la falta de consumo de probióticos, es necesario dar a conocer a los salvadoreños los efectos benéficos que pueden originarse al consumir probióticos por medio de un alimento funcional.

En esta investigación se formuló un alimento en polvo para reconstituir el cual tiene las siguientes características: el polvo no necesita refrigeración y se reconstituye en agua; es funcional ya que contiene probióticos y proporciona un aporte nutricional de caseína; es libre de lactosa por lo cual no posee un vehículo lácteo.

A este alimento funcional se le realizó un estudio sobre la cinética de muerte de *Escherichia coli* llegando este patógeno hasta una concentración menor a la dosis infecciosa de diarrea en niños. Además se le evaluó la estabilidad microbiológica de los probióticos en el alimento reconstituido y su resistencia a las barreras biológicas como son la acidez gástrica y las sales biliares.

Se realizó un estudio previo (pre-ensayo), en donde se comprobó la cinética de muerte del patógeno *Escherichia coli* con una mezcla de probióticos termolábiles ABY-3 comúnmente utilizados para la elaboración de yogurt, diferente a la mezcla de probióticos liofilizados termoestables para la formulación de alimentos en polvo. La finalidad de realizar este pre-ensayo, fue obtener los resultados de la inhibición de la primera mezcla de probióticos para así poder importar los probióticos termoestables con los cuales se formuló el alimento funcional.

Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el periodo de mayo a septiembre de 2014.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**



## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Formular un alimento para nutrición infantil libre de lactosa a base de caseína con mezcla de probióticos *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* y su efecto sobre la cinética de muerte de *Escherichia coli*, cepa Hospitalaria.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Realizar un ensayo previo de la mezcla de probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5®, *Bifidobacterium lactis* BB-12®, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* sobre la cinética de muerte de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria ( $10^5$  UFC/mL y  $10^6$ UFC/mL).
- 2.2.2 Preparar el alimento formulado para nutrición infantil del tipo polvo para reconstituir en agua utilizando dos diferentes concentraciones de probióticos ( $10^7$  UFC/mL y  $10^8$  UFC/mL).
- 2.2.3 Evaluar la estabilidad microbiológica del alimento formulado reconstituido en un periodo de 0, 24 y 72 horas realizando conteos de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*.
- 2.2.4 Obtener la cinética de muerte de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria, al estar en contacto con el alimento formulado reconstituido.
- 2.2.5 Cuantificar la resistencia a las barreras biológicas (acidez gástrica y sales biliares) del probiótico utilizado en la formulación.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

## 3.0 MARCO TEORICO

### 3.1 Probióticos

#### 3.1.1 Definición de probióticos.

Posiblemente el término “probiótico”, que etimológicamente procede del griego “pro bios” (por la vida), fue empleado por primera vez por Vergio en 1954, cuando comparaba los efectos adversos que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas ejercidas por otros factores que no pudo determinar. Una década más tarde, Lilly y Stillwell (1965) se referían a los probióticos como microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Fuller (1989) redefinió a los probióticos como “aquellos suplementos alimenticios integrados por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al hospedador que los consumo mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal”. <sup>(6)</sup>

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO), la definición de *probiótico* es: «Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo huésped». <sup>(44)</sup>

Entre los microorganismos a los que se les atribuyen características probióticas y que ocupan el lugar más destacado se encuentran las bacterias lácticas (productoras de ácido láctico como producto final de su metabolismo) y las bifidobacterias, entre estos dos grupos podemos mencionar: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus delbruecki subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Propionibacterium freudenrichi*, *Streptococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum*.

El género *Bifidobacterium* no está relacionado filogenéticamente con las bacterias lácticas, pero comparte con ellas diversas propiedades fisiológicas, bioquímicas y ecológicas <sup>(2)</sup>.

### 3.1.2 Características de los probióticos.

La concentración de probióticos viables que se estima que debe llegar al intestino para obtener un efecto clínico es mayor a  $10^6$  UFC/mL en el intestino delgado y mayor a  $10^8$  UFC/mL en el colon. Sin embargo una ingesta de  $10^5$  UFC/mL ha sido sugerida como la mínima para proveer efectos terapéuticos. <sup>(49)</sup>

Una vez que los microorganismos probióticos alcanzan el intestino, son capaces de permanecer allí durante un corto período de tiempo en estado no proliferativo. Sin embargo, para establecerse como habitante permanente del tubo gastrointestinal, deben adherirse a las células epiteliales intestinales o a la capa de mucus. La adhesión a la mucosa intestinal es el primer paso en la colonización, y muchos autores lo consideran un prerrequisito para ejercer efectos beneficiosos en el huésped, como la exclusión competitiva de bacterias enteropatógenas o la Inmunomodulación. <sup>(12)</sup>

Para poder atribuir propiedades probióticas a una bacteria es preciso comenzar por determinar que el microorganismo cumpla con varias características:

- Ser de origen humano, ya que, en teoría, las cepas aisladas de seres humanos sanos van a presentar una mayor facilidad de colonizar el intestino humano y probablemente no sean patógenas, no obstante se han utilizado probióticos de origen no humano, como *Saccharomyces cerevisiae*, demostrándose su seguridad tras el consumo regular por el hombre, <sup>(4)</sup> además deben ser habitantes normales del intestino.

- Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, ya que si los microorganismos probióticos han de llegar viales al intestino, es preciso que resista el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares.<sup>(6)</sup>
- Han de ser capaces de colonizar el intestino y producir efectos benéficos a este, con un tiempo corto de replicación, y de adherirse a la mucosa intestinal para que tenga lugar la modulación de la respuesta inmune, así como la exclusión de microorganismos patógenos, si bien esto último puede deberse también a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos.<sup>(6)</sup>
- Mantener la viabilidad y actividad en el alimento conductor o vector del microorganismo y ser estable en el almacenamiento y tener la capacidad de ser cultivado a escala industrial.<sup>(34)</sup>
- Asegurar que las cepas probióticas son completamente probadas y documentadas para garantizar que son seguros y no tienen los efectos indeseados ya que los probióticos también son llamados “bacterias amigables” los cuales poseen efectos benéficos específicos. Incluso las bacterias de la misma especie no se puede esperar a tener los mismos efectos.

### **3.1.3 Acción de los probióticos**

Aunque se sabe que ciertos probióticos pueden tener efectos beneficiosos, apenas se conocen los mecanismos moleculares de los beneficios notificados. Esos mecanismos pueden variar de un probiótico a otro (para obtener el mismo beneficio por diferentes medios) y pueden consistir en una combinación de eventos, haciendo con ello que esta sea una esfera muy problemática y

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

- Competencia con bacterias nocivas.

Las bacterias probióticas tienen capacidad de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y/o la acción de las bacterias patógenas <sup>(4)</sup>. Entre los posibles mecanismos se encuentran:

- a) Desplazamiento de su sitio de unión al epitelio. <sup>(6)</sup>

Para la eliminación de las bacterias patógenas no es necesaria muchas veces la producción de sustancias bacteriostáticas o bactericidas, sino que puede ser por una competencia física por unirse al epitelio, consumiendo también los sustratos disponibles para las bacterias patógenas.

- b) Inhibición de su crecimiento y/o muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos ó reducción del pH. <sup>(6)(48)</sup>

Los ácidos orgánicos son el mayor producto final de la fermentación en el colon y estos metabolitos actúan como inhibidores para algunas bacterias invasoras. La modificación del pH del lumen intestinal debido fundamentalmente a la producción de ácidos orgánicos, principalmente lactato y los ácidos grasos de cadena corta acetato, propionato y butirato, como consecuencia de su capacidad fermentativa sobre la fibra dietética. <sup>(41)</sup>

- Producción de compuestos antibacterianos. <sup>(47)</sup>

Otro mecanismo involucrado en la inhibición de patógenos es la capacidad de producción de sustancias antimicrobianas tales como bacteriocinas, aldehídos,

peróxidos, ácidos orgánicos, etc. Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteica cuya actividad es ejercida generalmente, aunque no en forma exclusiva, sobre bacterias estrechamente relacionadas desde el punto de vista taxonómico con la cepa bacteriocinogénica.

- Absorción de nutrientes importantes. <sup>(17)</sup>

Entre los beneficios nutricionales imputados al consumo de probióticos en productos lácteos se incluye el aumento de la absorción de minerales como el calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo, debido a que la acidez del medio facilita la ionización de éstos y la formación de sales solubles asimilables. Igualmente, por la acción microbiana aumenta la digestibilidad de la proteína del yogurt y la bio-disponibilidad de vitaminas como la riboflavina, facilitando la utilización de estos nutrientes. El consumo de bacterias probióticas también contribuye, mediante la producción de enzimas específicos, al aprovechamiento de otros nutrientes en el intestino.

- Mejora de la función de barrera intestinal. <sup>(6)</sup>

El tracto gastrointestinal, al tratarse de la mayor superficie del cuerpo en continuo contacto con el medio externo, cuenta con distintos mecanismos que tratan de prevenir la entrada de compuestos o agentes potencialmente lesivos para el organismo. Para este cometido, la monocapa epitelial y el revestimiento de moco que la recubre, junto con las uniones estrechas que mantienen unidos a los enterocitos, forma una barrera física que previene la entrada a la lámina propia de microorganismos potencialmente patógenos. Por otro lado, la inmunoglobulina A (IgA) es secretada por el intestino, además de bloquear la unión de microorganismos patógenos al epitelio, evitando por tanto su posterior acceso a la lámina propia intestinal, es también capaz de aglutinar bacterias y virus en unos grandes complejos que son atrapados en la barrera de moco y eliminados en las heces.

- Inmunomodulación. <sup>(6)</sup>

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario, ya que al estar en contacto con el exterior, recibe diariamente una enorme carga antigénica, debiendo distinguir entre potenciales patógenos y antígenos inocuos como son las proteínas de la dieta y las bacterias comensales. El principal componente del sistema inmunitario intestinal está constituido por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, Gut-Associated Lymphoid Tissue). Diversos estudios han puesto de manifiesto que numerosos *Lactobacillus* pueden alertar al sistema inmune intestinal, y secundariamente favorecer el rechazo de microorganismos infecciosos potencialmente lesivos, esto lo pueden realizar mediante la producción de inmunoglobulinas específicas del tipo A, o la activación de células K (Natural Killer).

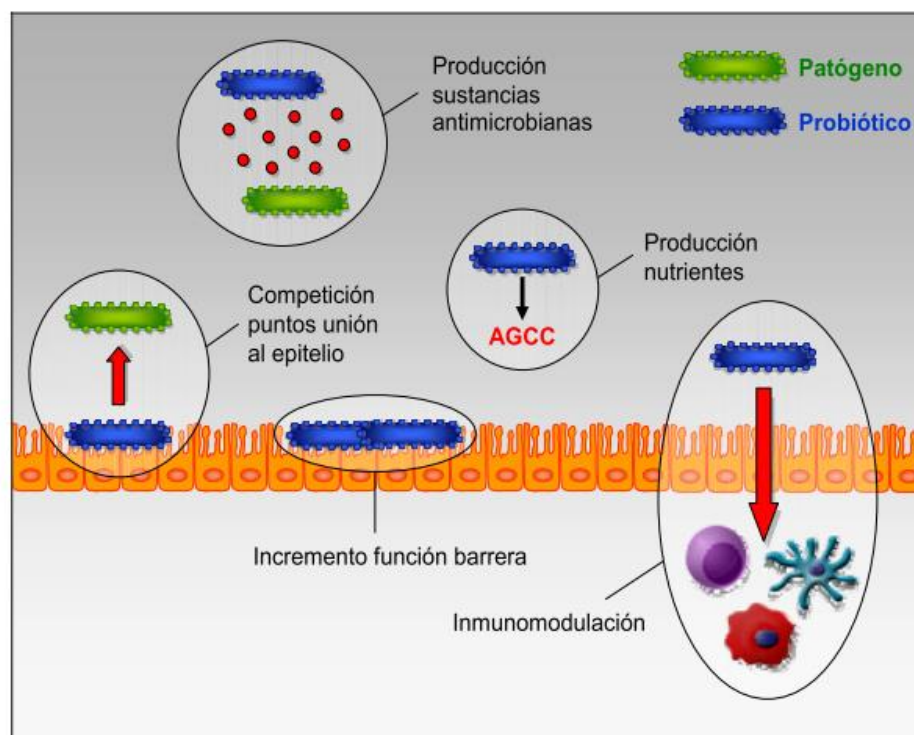


Figura N°1 Mecanismos de acción ejercidos por las bacterias probióticas: (6)



### 3.1.4 Habitantes normales del sistema digestivo. <sup>(36)</sup>

El hecho de que en ausencia de microflora intestinal aumente el transporte de antígenos demuestra la importancia de esta flora en el sistema defensivo. La principal función de la flora gastrointestinal radica en prevenir la colonización por microorganismos patógenos al competir por sus nichos ecológicos y sustratos metabólicos. El metabolismo microbiano supone, además una importante fuente de energía para la pared intestinal, aproximadamente un 50% de los requerimientos diarios, gracias a la fermentación de carbohidratos a ácidos orgánicos. La microbiota intestinal también modula el sistema inmune mediante la inducción de tolerancia y la producción de inmunoestimulantes no inflamatorios.

Los lactantes alimentados con leche materna tienen una flora intestinal mucho más rica en *Bifidobacterias* y *Lactobacillus* que los lactantes alimentados con fórmulas maternizadas. La presencia de estos microorganismos en el tracto gastrointestinal se ha asociado con la resistencia a la colonización por especies patógenas y con un aumento de la inmunidad gastrointestinal.

### 3.1.5 *Lactobacillus acidophilus* <sup>(3)(53)</sup>

Requieren medios nutricionales complejos, con aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables.

El medio de cultivo más empleado es el medio MRS descrito por Man, Rogosa y Sharpe en 1960, este medio contiene además, magnesio, manganeso acetato y polisorbato 80 (Tween 80) que facilitan de gran forma el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso de las especies más exigentes, como El medio MRS está especialmente recomendado para la enumeración y mantenimiento de

bacilos lácticos, ya sea por la técnica del número más probable (NMP) en caldo o por siembra en masa.



Figura N° 2 Morfología microscópica de *Lactobacillus acidophilus*.

Cuadro N°1 Características morfológicas de *Lactobacillus acidophilus*.

Bacilos microaerófilos gram positivos, catalasa negativo	Normalmente no reducen los nitratos.
Coagulan la leche en 48 horas.	No licuan la gelatina, ni digieren la caseína.
Forman ácido láctico como producto principal de fermentación, a partir de glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa.	Requiere medio nutricional complejo con aminoácidos, péptidos, vitamina, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables.
Crecimiento favorecido por anaerobiosis.	Temperatura óptima de crecimiento 30-40°C a pH 5.5-6.2

### 3.1.6 *Bifidobacterium* <sup>(17)</sup> (30)

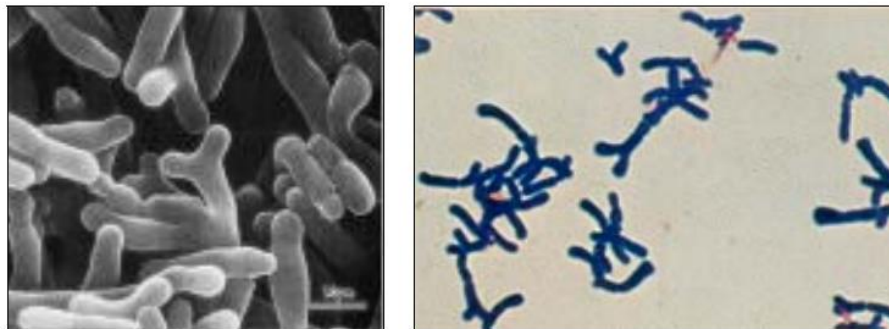


Figura N°3 Morfología microscópica de *Bifidobacterium*

Cuadro N°2 Características morfológicas de *Bifidobacterium lactis*.

Bacilos anaerobios gram positivos, inmóviles catalasa negativo	En algunos casos puede presentar morfología cocoidea.
Morfología macroscópica varía en función del medio que se emplee.	pH óptimo de crecimiento 6.5-7.
Difieren de las BAL en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético.	Requiere medio nutricional complejo con aminoácidos, péptidos, vitamina, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables.
Temperatura óptima de crecimiento especies origen animal 41-43°C	Temperatura óptima de crecimiento especies origen humano 36-38°C

La apariencia de las colonias de este género bajo condiciones de anaerobiosis puede variar mucho en función del medio que se emplee. En general, las colonias que se forman son redondeadas, pueden ser brillantes y de diámetro muy variable, pero se distinguen dos diferentes tipos de colonias de *B. bifidum*, algunas colonias son muy lisas, convexas, blancas, y brillantes, mientras que otras son rugosas, con bordes desiguales. Por ello, la morfología de colonia no es una buena referencia para la identificación del género. <sup>(24)</sup>

### **3.1.7 Inocuidad de los probióticos en los seres humanos.** <sup>(44)</sup>

La información reunida hasta la fecha indica que los *Lactobacillus* se han utilizado desde hace tiempo como probióticos sin que se hayan determinado riesgos para los seres humanos, y ésta sigue siendo la mejor prueba de su inocuidad. Además, no se han encontrado propiedades patógenas o virulentas en *Lactobacillus*, *bifidobacterias* o *Lactococos*. A pesar de esto, la Consulta reconoció que, en ciertas condiciones, algunas cepas de *Lactobacillus* han sido relacionadas con efectos perjudiciales, como por ejemplo raros casos de bacteremia. Sin embargo, un estudio epidemiológico reciente sobre casos notificados de bacteremia causada por *Lactobacillus*, recogidos sistemáticamente en un país, ha demostrado que no se observa un aumento de la incidencia o la frecuencia de la bacteremia cuando aumenta la utilización de *Lactobacillus* probióticos.

## **3.2 *Escherichia coli* y su relación con la diarrea infantil.**

### **3.2.1 *Escherichia coli*** <sup>(16)</sup>

*Escherichia coli* es la especie predominante de la flora anaeróbica facultativa del colon humano. Típicamente coloniza el tracto intestinal del recién nacido

dentro de las primeras horas de vida. Estableciéndose un beneficio mutuo entre *E. coli* y el huésped. Es la Enterobacteria comensal por excelencia. Cuando *E. coli* se encuentra confinada al lumen del intestino, generalmente no produce daño, pero cuando un individuo se encuentra debilitado o inmunodeprimido, o cuando sus barreras gastrointestinales se encuentran alteradas o dañadas, las cepas *E. coli* no patogénicas pueden causar infección. Las infecciones producidas por cepas *E. coli* patogénicas pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminadas. Tres síndromes clínicos pueden resultar de la infección por cepas patogénicas: infección de vías urinarias, Sepsis ó meningitis y enfermedad diarreica.

Cuadro N°3 Características morfológicas de *Escherichia coli*.

Bacilos aerobio gram negativo, móvil. catalasa negativo	Puede ser recuperada de pacientes en medios generales o selectivos a 37°C.
Morfología macroscópica forma colonias circulares convexas y lisas con bordes bien definidos.	En muestras de heces puede ser aislada en agar Mac. Conkey o en agar EMB.
Su prueba IMVIC es +++ (Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato).	Fermenta el manitol, lactosa y glucosa produciendo gas.

Las cepas de *E. coli* que causan diarrea se agrupan en seis categorías de acuerdo a su mecanismo patológico y definido por la presencia de genes que codifican los patrones característicos de virulencia, que inducen una respuesta del huésped predecible. Las categorías son: 1. *E. coli* enteropatógena (EPEC); 2. *E.coli* enterotoxigénica (ETEC); 3. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); 4. *E. coli*

enterohemorrágica (EHEC); 5.*E.coli* enteroagregativa (EAEC); y *E. coli* difusamente adherente (DAEC).

### **3.2.2 *Escherichia coli* enterotoxigénica.** <sup>(16)</sup>

Es la etiología bacteriana más común de diarrea en países en vías de desarrollo, sobre todo es la población infantil. Se le encontrado como causa común de diarrea leve a moderada-severa en lactantes en países en vías de desarrollo; un síndrome similar al cólera en adultos que viven en áreas donde el cólera es endémico; así como la fuente, más común de diarrea del viajero entre personas que viajan de países desarrollados a países en vías de desarrollo; estas cepas se caracterizan por producir toxina termolábil (TL) y/o termostable (TS), ocasionando diarrea agua líquida.

### **3.2.3 Epidemiología.** <sup>(16)</sup>

En necesario un inóculo grande para inducir la infección clínica. La transmisión es generalmente a través del agua y alimentos contaminados. En el adulto sano requieren aproximadamente más de  $10^8$  bacterias para producir enfermedad. El principal reservorio parece ser el tracto gastrointestinal del humano. La incidencia de la enfermedades es más alta en niños menores de 2 años de edad, declinando rápidamente alrededor de los 4 años, para permanecer después en un porcentaje bajo, sugiriendo que existe la posibilidad de inmunidad de tipo adquirida.

### **3.2.4 Patogenia.** <sup>(18)</sup>

Una vez que el organismos se encuentra en el tracto digestivo, se adhiere, coloniza, y prolifera en la superficie del intestino delgado proximal para

posteriormente producir enfermedad mediante dos mecanismos patogénicos: adhesión y producción de enterotoxinas.

Para producir diarrea, las cepas ETEC primero deben adherirse a los receptores específicos situados en el enterocito. Esta adherencia está mediada por fimbrias de superficie (pili), que le permiten a la bacteria vencer los mecanismos de defensa (peristalsis). Cuando *E. coli* ha colonizado el intestino, se une a las membranas celulares intestinales y elabora una o ambas enterotoxinas: TS y/o ST. La toxina TL es una proteína de peso molecular elevado, oligomérica constituida por una subunidad A y 5 subunidades B idénticas. Inmunológicamente está relacionada con la toxina del cólera (TC) en su estructura, antigenicidad y mecanismo de acción. La toxina penetra por endocitosis a la mucosa intestinal donde el péptido A cataliza la ADP-ribosilación de la proteína Gs que conduce a la activación de la adenilato ciclasa en la membrana plasmática de células eucarióticas. Esta activación de la adenilato ciclasa en las células de la mucosa del intestino delgado condiciona un incremento de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), que activa la proteína quinasa dependiente de AMPc, dando por resultado la salida de líquido y electrolitos (principalmente cloro) a la luz intestinal, y disminuyendo la absorción de cloruro de sodio, así como alteraciones en los niveles de calcio intracelular, lo que conduce a la presencia de diarrea de tipo acuoso.

Se han descrito 2 clases de toxinas TS no relacionadas entre sí, pues difieren tanto en su estructura como en el mecanismo de acción: La toxina TSa y la TSb. Los genes que la codifican se localizan en los plásmidos. La toxina TSa es producida por cepas de ETEC, por enterocolítica y *V. cholerae* no-01; mientras que la toxina TSb solo se ha detectado en cepas ETEC. El principal receptor de TSa es la guanilato ciclasa C que estimula la actividad enzimática intracelular e incrementa la concentración de GMPc (guanosín monofosfato cíclico), lo que activa la secreción, fundamentalmente de cloro, e inhibe la absorción de

cloruros de sodio. El receptor de la toxina TSb es desconocido y el mecanismo de estimulación de la secreción de bicarbonato de las células intestinales con un incremento en la concentración del calcio intracelular, la liberación de prostaglandina E<sub>2</sub> y serotonina, sugieren una acción mediada por el sistema nervioso intestinal.

### **3.2.5 Cuadro clínico.** <sup>(18)</sup>

El periodo de incubación habitual es de 12 horas, aunque puede ser de varios días. En lactantes y preescolares, el cuadro generalmente tiene una duración de hasta dos semanas. Se inicia en un niño inicialmente sano que en cuestión de horas se encuentra letárgico, hiporéxico, desarrolla distensión abdominal y de manera abrupta comienza con diarrea acuosa; puede o no haber fiebre y el vomito es frecuente a esta edad. En niños mayores, la enfermedad es menos dramática, a pesar de que las evacuaciones son de entre 10 y 20 al día; el vomito es menos frecuente encontrarlo, cediendo el cuadro generalmente en un lapso de 3 a 5 días.

La fiebre en cambio es muy frecuente, tiende a ser continua con oscilaciones entre 38 a 40°C. Las evacuaciones son acuosas sin moco, sangre o pus. En el adulto, el cuadro clínico es muy similar al del escolar, comúnmente desarrolla una enfermedad moderada que dura en promedio de 3 a 4 días. La severidad de la enfermedad está en relación directa con el tamaño del inóculo.

Dosis de 10<sup>8</sup> UFC produce diarrea moderada con 3 a 5 evacuaciones por día y una duración de 2 a 3 días; mientras que un inóculo de 10<sup>10</sup> UFC induce la aparición de un cuadro más severo con más de 5 evacuaciones por día y con una duración de 4 a 5 días, hay mocos en las heces y fiebre.



### **3.2.6 Diagnóstico.**

El estudio de moco fecal revela ausencia de leucocitos. Cuando se requieren estudios diagnósticos, el método tradicional consiste en el aislamiento de 5 a 10 cepas de *E. coli* de heces y se debe realizar la detección de toxinas. Para la identificación de toxina TS se encuentran disponibles comercialmente métodos por RIA y ELISA. Para la detección de TL se emplean ensayos inmunológicos como ELISA, coagulación, aglutinación en látex. <sup>(10)</sup>

### **3.2.7 Dosis infecciosa.**

Una dosis de  $10^7$  a  $10^{10}$  de células de ETEC, son necesarias para causar una infección en adulto, y para niños son necesarias dosis menores a ese valor. <sup>(29)</sup>

## **3.3 Prevención de diarreas con Probióticos.**

### **3.3.1 Definición de diarrea.**

La diarrea se define como un síndrome caracterizado por un incrementado en la frecuencia, el peso y/o el contenido de agua en las heces. De forma general, se trata de una respuesta inespecífica del intestino ante diferentes situaciones, incluyendo la presencia en el lumen intestinal de toxinas o microorganismos patógenos (diarrea del viajero, infección intestinal por Rotavirus y toxiinfecciones alimentarias); falta de absorción de sustancias osmóticamente activas (malabsorción de lactosa); consumo de fármacos (diarrea postantibiótica); así como por lesiones en la mucosa intestinal (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable). <sup>(6)</sup>

A pesar de los recientes avances en el conocimiento de la patogénesis de los procesos diarreicos, la diarrea aguda de tipo infeccioso constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. No obstante, la relevancia de la diarrea va a variar en función de la población que se vea

afectada. Mientras que en los países desarrollados la diarrea generalmente supone un problema de tipo socioeconómico, por el gasto sanitario y de absentismo laboral que conlleva, en los países subdesarrollados se trata de un grave problema de salud, siendo una de las principales causas de muerte en niños, fundamentalmente por deshidratación. <sup>(6)</sup>

### 3.3.2 Probióticos contra la diarrea.

Entre los mecanismos por los que los probióticos podrían prevenir o aminorar la diarrea se incluyen:

- Competición con virus o bacterias patógenas por sus sitios de unión a las células epiteliales. <sup>(6)</sup>

De este modo impedirán la alteración de la permeabilidad intestinal, así como la consiguiente translocación bacteriana.

- Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas debido a la producción de bacteriocinas. <sup>(28)</sup>

El efecto beneficioso de *L. acidophilus* vendría dado por la producción de sustancias antimicrobianas que podrían neutralizar a las enterotoxinas de *Escherichia coli*.

### 3.3.3 Evidencias de probióticos contra la diarrea.

Existe gran cantidad de evidencia que señala que las *Bifidobacterias* y *Lactobacillus acidophilus* producen efectos beneficiosos en niños e infantes con infecciones entéricas y desordenes intestinales, entre los que se encuentran:

### 3.3.3.1 Alimentación con *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus* en niños del hospital para la prevención de diarrea y de rotavirus. <sup>(55)</sup>

En este estudio aleatorio doble ciego llevando un control paralelo con placebo demuestra que la mezcla de *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus* reducen el riesgo de diarrea en niños. Se examinaron 55 niños hospitalizados entre 5 a 24 meses de edad. Se les trató con una fórmula infantil conteniendo  $1.9 \times 10^8$  UFC/g de *Bifidobacterium bifidum* y  $1.4 \times 10^7$  UFC/g de *Streptococcus thermophilus*, en un consumo durante toda la estadía en el hospital aproximadamente de 80 días.

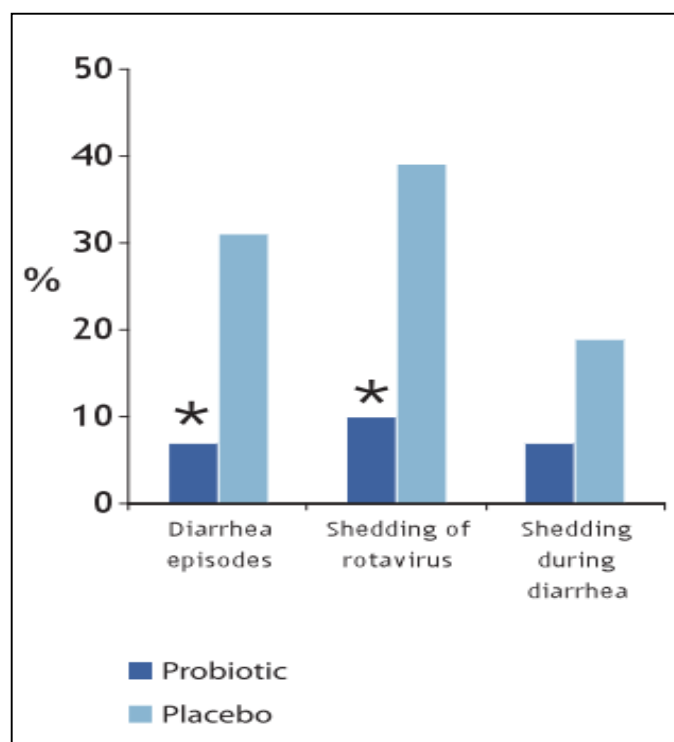


Figura N° 4 Reducción del riesgo de diarreas en niños con el uso de probióticos. <sup>(55)</sup>

### 3.3.3.2 El consumo a largo plazo de las fórmulas infantiles que contienen bacterias probióticas vivas: la tolerancia y la seguridad. <sup>(50)</sup>

En este estudio aleatorio doble ciego llevando un control paralelo con placebo estudiando a 118 niños sanos de entre 3 a 24 meses de edad de una guardería dándoles una fórmula infantil con  $10^7$  UFC/g en dosis alta y otra de  $10^6$  UFC/g en dosis baja de *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus* durante 210 días, se disminuye la frecuencia del síndrome de colon irritable y reduce el uso de antibióticos en niños.

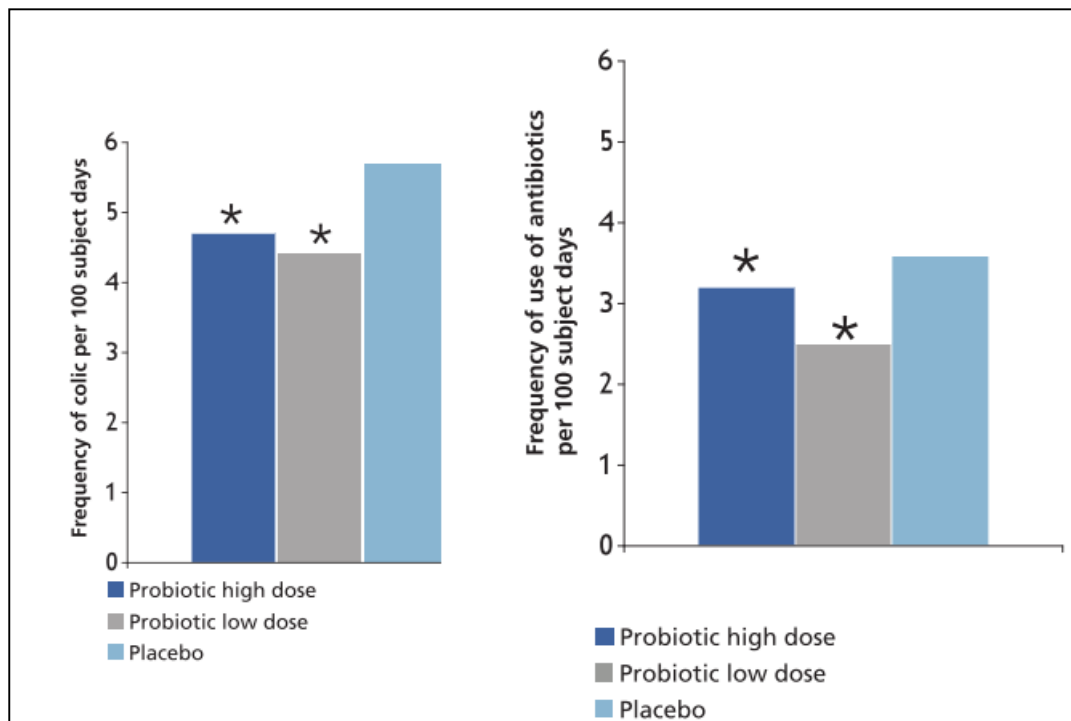


Figura N° 5 Disminución de la frecuencia del síndrome de colon irritable y reducción del uso de antibióticos en niños. <sup>(50)</sup>

### 3.3.3.3 Fórmula de una leche acidificada suplementada con *Bifidobacterium lactis*: impacto sobre la diarrea infantil en los centros de atención residencial. <sup>(21)</sup>

En este estudio se demuestra que el *Bifidobacterium lactis* tiene efectos protectores contra la diarrea aguda. Se realizó un estudio aleatorio doble ciego llevando un control paralelo con placebo, analizando a 90 niños sanos menores de 8 meses de edad de una guardería, dándoles una leche acidificada en una fórmula infantil de al menos  $10^8$  UFC/g de *Bifidobacterium lactis* por aproximadamente 140 días. Los resultados indican que el uso de esta fórmula reduce el número de días que los niños podrían presentar la diarrea y a la vez reduce en un 46% el riesgo de contraer diarrea.

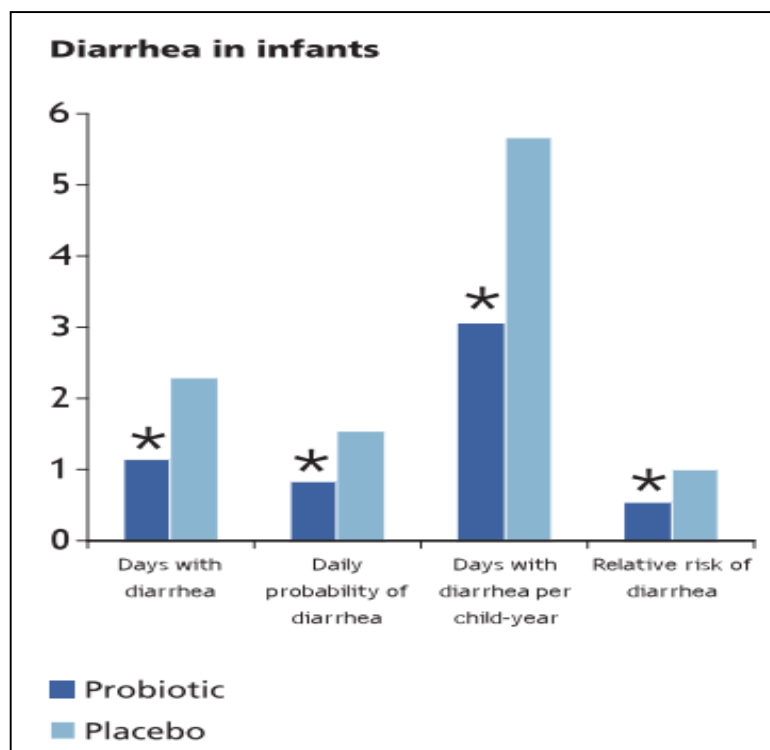


Figura N° 6 Reducción del número de días en que los niños presentan diarrea con el uso de probióticos. <sup>(21)</sup>

Es importante señalar que la terapia Probiótica de la diarrea aguda debe combinarse con la rehidratación, siempre que esté disponible. La OMS recomienda que el tratamiento clínico de la diarrea aguda incluya la reposición de los líquidos y electrolitos perdidos junto con un apoyo nutricional (OMS, 1995). Las sales de rehidratación oral (SRO) se han utilizado ampliamente en ese tratamiento de la enfermedad, y es en ese contexto en el que se propugna la terapia combinada con probióticos. Efectos tales como el restablecimiento probiótico de la microflora intestinal dominada por no patógenos que es un efecto secundario de la infección, el mantenimiento de la integridad de la mucosa y la mejora del equilibrio de electrolitos podrían tener consecuencias significativas en los programas de tratamiento y prevención de la diarrea aguda en los países en desarrollo. <sup>(44)</sup>

### **3.3.4 *Bifidobacterium lactis* Bb-12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5 y su efecto simbiótico.** <sup>(25)</sup>

*El Bifidobacterium lactis Bb-12* en conjunto con *el Lactobacillus acidophilus La-5* se encuentran entre los microorganismos más investigados y probados en la actualidad para su utilización conjunta en suplementos alimenticios.

Estos microorganismos poseen en conjunto características que los hacen sobresalir del resto de bacterias, entre las que se pueden mencionar:

- Habilidad para adherirse a las membranas de la mucosa gastrointestinal.
- Alta tolerancia a los ácidos estomacales y sales biliares.
- Habilidad para controlar el crecimiento de bacterias patógenas, levaduras, virus.
- Capacidad de producción de sustancias anti-microbianas con actividad contra patógenos.

- Efectividad clínica documentada en contra del crecimiento excesivo de *Cándida*, tolerancia a la lactosa, disminución de la constipación, salud intestinal, disminución de diarreas asociadas a antibióticos.
- Capacidad de asimilar y reducir el colesterol.

### 3.4 Intolerancia a la lactosa

La lactosa es el azúcar predominante de la leche. La causa de la intolerancia a la lactosa es la incapacidad del intestino para digerirla y transformarla en sus constituyentes (glucosa y galactosa). Esta incapacidad resulta de la escasez de un enzima (proteína) denominado lactasa, que se produce en el intestino delgado. Se estima que el 80% de la población mundial (95-100% de los indios americanos, 80-90% de negros, asiáticos, judíos y mediterráneos) sufren intolerancia a la lactosa en mayor o menor grado. La población del norte y centro de Europa, que convive con ganado vacuno, tiene mayor tolerancia a la lactosa que el resto de la población mundial. <sup>(55)</sup>

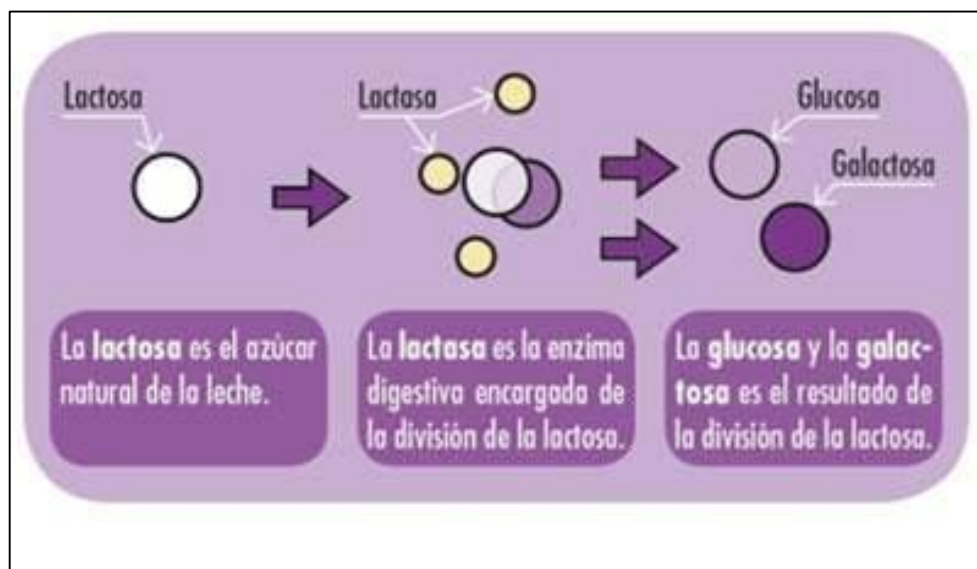


Figura N° 7 Función de la enzima lactasa.

### **3.4.1 Causas de intolerancia a la lactosa.**

La intolerancia primaria a la lactosa se da por el déficit de la enzima lactasa, una intolerancia secundaria es causada por cualquier daño de la mucosa intestinal o reducción de la superficie de absorción. Este tipo de intolerancia suele ser transitoria y depende de la enfermedad de base que tenga el paciente: enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, parásitos intestinales y gastroenteritis, entre otras. Por último existe un raro trastorno de origen genético, que es el déficit congénito de lactasa, en el cual el intestino delgado no produce dicha enzima y se pone de manifiesto en la primera semana de vida.

El cuerpo del bebé produce lactasa para poder digerir la leche, incluida la leche materna. Los bebés prematuros a veces tienen intolerancia a la lactosa. Los niños nacidos a término generalmente no muestran signos de esta intolerancia hasta que tienen al menos tres años de edad. <sup>(39)</sup>

### **3.4.2 Síntomas de intolerancia a la lactosa**

Se debe sospechar este cuadro cuando tras la ingestión de leche se presentan síntomas tales como dolor abdominal, distensión abdominal, gases y diarrea. La gravedad de síntomas varía dependiendo de la cantidad de lactosa ingerida y de la tolerancia individual, hay pacientes que con cantidades pequeñas de lactosa (de 5 a 12 gramos, contenidos en 100 a 250 mL de leche) pueden presentar síntomas. <sup>(39)</sup>

## **3.5 Alimentos nutricionales.**

### **3.5.1 Alimento Funcional**

En los últimos años el área de nutrición se ha desarrollado mucho más como resultado de los nuevos estilos de vida de la sociedad y su preocupación por



obtener una mejor calidad de vida, lo que origina la aparición del término “alimento funcional”, el cual se define como: “Aquel producto, alimento modificado o ingrediente alimentario, que puede proveer beneficios a la salud superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales”.<sup>(6)</sup>

Otra definición de alimento funcional es “Aquellos alimentos que contienen componentes biológicos activos que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades”,<sup>(36)</sup> este concepto nació en Japón, en los años ochenta, debido a la necesidad de garantizar una mejor calidad de vida a la vista de los elevados gastos sanitarios originados por el aumento de la longevidad de la población.

El objetivo de un alimento funcional puede ser tanto para mantener en óptimas condiciones el estado de salud o bien para reducir el riesgo de padecer enfermedades.

De esta forma, los alimentos que sean capaces de modificar la flora intestinal, derivándose consecuencias positivas en la salud del individuo, pueden considerarse como funcionales.<sup>(6)</sup>

Debe destacarse que, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, muchos productos lácteos tradicionales (yogurt, leches fermentadas, calostro o la propia leche) pueden considerarse en sí mismos alimentos funcionales, a la vez que contienen multitud de ingredientes para la formulación de otros alimentos funcionales. Por otra parte, cada vez es más frecuente la inclusión de ingredientes funcionales de origen lácteo o no lácteo en leche y alimentos de base láctea, que incluyen bacterias probióticas y carbohidratos prebióticos, salvado, avena, almidón, calcio, ácido fólico, vitaminas, minerales y proteína.<sup>(36)</sup>

### **3.5.2 Probióticos como alimento funcional.**

#### **3.5.2.1 Probióticos en medio líquido.** <sup>(52)</sup>

Es difícil conservar una mezcla de cepas probióticas en equilibrio dentro de un medio líquido, ya que cada una de ellas evoluciona de manera diferente durante la fermentación y la conservación (se debe respetar la cadena de frío).

En el caso del yogur clásico, contiene dos cepas bacterianas (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) que después de su elaboración, llega al consumidor final (varias semanas), la supervivencia de las bacterias y el equilibrio entre cepas se altera fuertemente (se rompe la cadena de frío).

Como consecuencia de ello, el producto que se consume no permite regenerar la flora intestinal, sino únicamente conservar las condiciones de pH beneficiosas para el intestino.

#### **3.5.2.2 Cómo debe ser un buen probiótico.** <sup>(52)</sup>

Para que un probiótico actúe como alimento funcional se debe considerar:

- Se necesita agregar un conjunto de ingredientes que permitan a las bacterias probióticas fijarse y desarrollarse rápidamente en el intestino (calcio, magnesio, manganeso, aminoácidos, lactoferrina y fosfolípidos, dotados cada uno de propiedades particulares).
- El probiótico se debe conservar en forma de polvo liofilizado dentro de sobres estancos, en una atmósfera de nitrógeno, al abrigo de la luz, del oxígeno del aire y de la humedad. Por esta razón los sobres están hechos de tres capas (polietileno, aluminio y polietileno) que garantizan una excelente impermeabilidad evitando el contacto entre las bacterias y el aluminio, que es tóxico.

La forma perfecta de tomar probióticos es diluyendo el producto en polvo en un vaso de agua templada a unos 35°C (para reavivar las bacterias, sin matarlas por el agua muy fría o muy caliente), y después beber el contenido, que directamente pasará al intestino a través del píloro. Los probióticos se mantendrán viables en el producto es polvo y después podrán viajar por todo el intestino delgado para llegar a su destino, el colon, donde podrán adherirse y reproducirse.

### **3.5.3 Proteína láctea.**

La leche y los productos lácteos son fuente de proteínas de alta calidad nutricional que proporcionan al organismo una amplia variedad de aminoácidos, de los cuales una gran proporción son aminoácidos esenciales. Además de por su elevado valor nutricional, en los últimos años se ha prestado atención a distintos componentes lácteos para ser utilizados como ingredientes funcionales. <sup>(36)</sup>

Las proteínas de suero lácteo contienen todos los aminoácidos esenciales y en concentraciones más elevadas que otras fuentes proteicas, como proteínas de origen vegetal (soya, maíz, trigo) y son ricas en aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina). <sup>(36)</sup>

Se ha evaluado mediante ensayos clínicos el beneficio de la utilización de proteínas séricas en la formulación de leches maternizadas frente a leches maternizadas estándar (conteniendo proteínas de suero y caseínas). En un estudio doble-ciego con 102 bebés sanos se observó que, tras 12 semanas, el grupo que había recibido la fórmula maternizada basada en proteínas de suero parcialmente hidrolizadas presentaba niveles más altos de *Bifidobacterias* en las heces que el grupo alimentado con la fórmula estándar <sup>(45)</sup>. Además, las fórmulas basadas en proteínas de suero también mostraron su superioridad

frente a las fórmulas maternizadas estándar en la reducción de los cólicos del lactante, como se demostró en un ensayo con 43 bebés. <sup>(37)</sup>

#### **3.5.4 Caseína** <sup>(1)(15)</sup>

La caseína es la proteína dominante en la leche de la vaca, constituyendo el 80% del contenido total proteico de la leche. El otro 20% lo constituyen las seroproteínas o proteínas del lactosuero. La caseína es el componente básico del queso ordinario. Durante el proceso de la elaboración de quesos la caseína precipita por la acción enzimática del cuajo, formándose un coagulo de caseína, seroproteínas, grasa, lactosa y las sales minerales de la leche. <sup>(15)</sup>

La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0% (30-40 gramos por litro). El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche. Existe una estrecha relación entre la cantidad de grasa y la cantidad de proteína en la leche-cuanto mayor es la cantidad de grasa, mayor es la cantidad de proteína. <sup>(1)</sup>

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%). Históricamente, esta clasificación es debida al proceso de fabricación de queso, que consiste en la separación del cuajo de las proteínas séricas luego de que la leche se ha coagulado bajo la acción de la renina (una enzima digestiva colectada del estómago de los terneros). <sup>(16)</sup>

La caseína comercial se obtiene a partir de la leche desnatada por medio de uno de los dos métodos generales de precipitación por ácido o coagulación mediante el cuajo. En este proceso de separación es necesario eliminar, en la medida de lo posible y mediante lavados en varias etapas con agua, la grasa, las seroproteínas, las sales y la lactosa de la leche, ya que dichas sustancias reducen la calidad de la caseína y el mantenimiento de la misma.

La caseína seca y adecuadamente obtenida se conserva relativamente bien y se utiliza principalmente en la elaboración de alimentos y en las industrias químicas.

Diferentes tipos de caseína:

- Caseína al cuajo, obtenida por precipitación enzimática de la leche por el citado cuajo.
- Caseína ácida, obtenida por acidificación de la leche desnatada hasta el punto isoelectrico (pH 4.6-4.7).

Como el estómago degrada la caseína en polipéptidos (cadenas de aminoácidos), la proteína se espesa, retardando su paso al intestino delgado. Tanto la caseína como el suero poseen un valor biológico alto y una riqueza en aminoácidos esenciales, pero el suero de leche tiene aminoácidos de cadena ramificada y potenciadores del sistema inmunológico que pueden escapar intactos al proceso de digestión. <sup>(26)</sup> Además que por su sabor neutro e insípido de puede adicionar a diferentes preparaciones.

### **3.5.5 Normativa de probióticos, concentración recomendada.**

Las bacterias probióticas consumidas en altos números no se convierten en colonizadores permanentes y son raramente detectados en muestras fecales o intestinales más allá de un par de semanas luego de la ingestión. Por lo tanto, para poder recibir los beneficios terapéuticos atribuidos a la ingesta de estos microorganismos se debe contar con además de un consumo periódico, con un mínimo de células viables en el alimento.

Este número varía de recomendación en recomendación dependiendo de los autores y de los tipos de estudio que llevaron a cabo, entre los cuales se pueden mencionar:

- **Organización Mundial de la Salud.** <sup>(46)</sup>

Para que los probióticos puedan ejercer una acción bactericida en vitro debe haber una concentración constante a través del tiempo, obteniendo un rango de  $10^7$  -  $10^8$  UFC/g, además de ser el número recomendado por la OMS como la cantidad de bacterias necesaria para que ejerzan efectos benéficos sobre el organismo.

- **Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010.** <sup>(42)</sup> **(Ver anexo N°6)**

Un alimento con probiótico debe contener como mínimo  $10^7$  UFC/g de la suma de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruecki* subespecie *bulgaricus* viables, conforme al método de bacterias que fermentan los productos, del numeral 8 de la NMX-703-COFOCALEC-2004. En caso de contener cultivos alternativos adicionales, estos deben estar en valores de  $10^6$  UFC/g viables de cultivos lácticos, como mínimo. Los microorganismos deben permanecer viables, activos y abundantes hasta la fecha de caducidad del producto.

- **Norma Venezolana COVENIN 2393:2001.** <sup>(43)</sup> **(Ver anexo N°7).**

Para que un alimento se considere un probiótico deberá cumplir con los requisitos que esta establece: *Lactobacillus delbruecki* subespecie *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, viables y activos en cantidad no menor a  $10^6$  UFC/g de cada uno; *Bifidobacterium* no menor de  $10^4$  UFC/g, durante el período de vida útil.

- **RTCA 67.01.60.10. Etiquetado Nutricional de Productos Alimenticios Preenvasados para Consumo Humano para la Población a Partir de 3 Años de Edad.** <sup>(46)</sup>

El alimento debe contener un número mayor o igual a  $1 \times 10^6$  UFC/g de bacterias viables de origen probiótico en el producto terminado hasta el final de la vida útil.

### **3.6 Directrices para la evaluación de microorganismo probióticos.** <sup>(26)(44)</sup>

Con el fin de evaluar las propiedades de los probióticos, la Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, propuso que se utilizaran directrices. Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deberían ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino.

Esto significa que deberían ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en los intestinos, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis.

Las compañías fabricantes de probióticos poseen líneas de cultivos que son capaces de sobrevivir el paso por el estómago, tolerando incluso pH tan bajo como 2.

Además, se busca que posean la habilidad de colonizar la pared intestinal, inhibiendo microorganismos patógenos como *E.coli* y disminuyendo así la incidencia de diarreas.

Los ensayos in vitro son de utilidad para adquirir conocimiento sobre las cepas y el mecanismo del efecto probiótico. Sin embargo, se señaló que los ensayos actualmente disponibles no son completamente adecuados para predecir la funcionalidad de los microorganismos probióticos en el cuerpo humano.

Los probióticos para uso humano requerirán la confirmación de su eficacia con ensayos en seres humanos.

Se recomiendan ensayos dirigidos a resultados específicos in vitro que se correlacionan con resultados in vivo.

Por ejemplo, se mostró correlación entre la resistencia in vitro a las sales biliares con la supervivencia al paso por el estómago in vivo.

A continuación se detallan los principales ensayos in vitro actualmente utilizados para el estudio de las cepas probióticas. Todos estos ensayos requieren, sin embargo, validación mediante acción in vivo. <sup>(44)</sup>

- Resistencia a la acidez gástrica.<sup>(26)</sup>
- Resistencia a los ácidos biliares.<sup>(26)</sup>
- Adherencia a mucosas y/o células epiteliales y líneas celulares.
- Actividad antimicrobiana contra potenciales bacterias patógenas.
- Capacidad para reducir la adhesión de agentes patógenos a superficies.
- Actividad hidrolasa de sales biliares.
- Resistencia a espermicidas (aplicable a probióticos para uso vaginal).

### **3.7 Cinética de muerte de *Escherichia coli*.** <sup>(47)</sup>

Se ha estudiado que las curvas de cinética de muerte de cada cepas de *E. coli* O157:H7 en cultivos con *L. casei* 206/1, se observa que una vez que la BAL alcanza la etapa final de su fase exponencial de crecimiento, las sustancias antimicrobianas que ésta libera al medio alcanzan suficiente concentración como para ejercer su acción bactericida sobre el patógeno, razón por la cual a las 24 horas de cultivo ya no se detecta la presencia de *E. coli* O157:H7.

Se ha comprobado que, al incubar las cepas de *E. coli* O157:H7 durante 24 horas en presencia *L. casei* 206/1, este ejerce una acción bacteriostática durante las primeras 12 horas de propagación, no permitiendo que el patógeno se desarrolle y manteniéndolo aproximadamente en los mismos niveles de concentración celular que presentaron los inóculos iniciales.



Luego de ese tiempo la acción de *L. casei* 206/1 se convierte en bactericida, dado que al cabo de 24 horas de incubación no se detectaron células viables de ninguna de las tres cepas estudiadas de *E. coli* O157:H7.

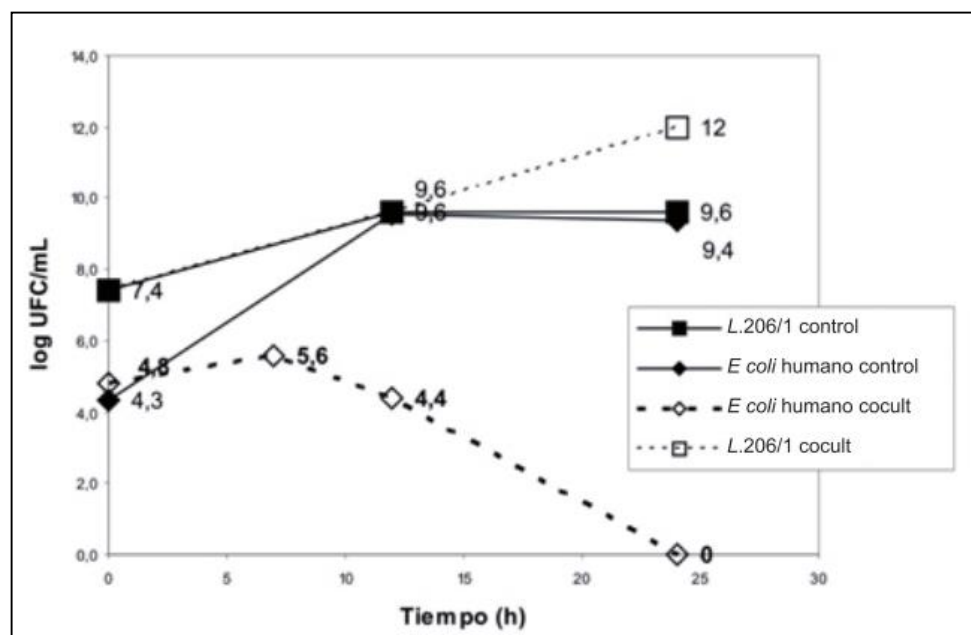


Figura N° 8 Cinética de muerte de *Escherichia coli* O157:H7 de origen humano en cocultivo con *Lactobacillus casei* 206/1. <sup>(47)</sup>

González et al. <sup>(32)</sup> Informaron que una cepa de *E. coli* en cultivos asociativos con cepas de *L. casei* y de *Lactobacillus acidophilus* comenzó su fase acelerada de muerte a partir de las 9 horas de cultivo. Por su parte Canganella et al. <sup>(19)</sup> demostraron que una cepa de *E. coli* en cocultivo con una de *Streptococcus thermophilus* mostró una cinética de muerte muy pronunciada a partir de las 8 horas, mientras que con una cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* este efecto ya se hizo evidente a partir de las 4 horas de cultivo: en ambos casos el comienzo de la fase de muerte acelerada de *E. coli* coincidió con el comienzo de la fase exponencial máxima de las cepas de BAL.

### **3.8 Medios selectivos utilizados.**

Un medio de cultivo consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de microorganismos. Según el microorganismo que se quiera hacer crecer, el medio requerirá unas u otras condiciones.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

A continuación se detallan los medios de cultivos necesarios para el crecimiento, identificación y conteo de los microorganismos patógenos (*Escherichia coli*) y probióticos.

#### **3.8.1 Agar Chromocult.** <sup>(22)</sup> (Ver Figura N° 67)

Agar selectivo para la detección y conteo de coliformes totales y *Escherichia coli* contenidas en agua y en comidas. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) aprueba como un método alternativo para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en agua.

Cerca de las 24 horas este medio permite la detección, diferenciación y conteo de *Escherichia coli* y coliformes provenientes de agua, bebidas y comidas. El agar Chromocult contiene Tergitol (un surfactante no iónico) el cual es un inhibidor de bacterias gram positivas pudiendo crecer solamente las gram negativas.

### 3.8.2 Agar EMB.<sup>(33)</sup> (Ver Figura N° 60)

El agar EMB (eosina azul de metileno) es recomendado para el aislamiento y diferenciación de bacterias entéricas gran negativas.

El agar EMB inhibe las bacterias gram-positivas en un grado limitado. Estos colorantes sirven como indicadores diferenciales en respuesta a la fermentación de carbohidratos. La relación de eosina y azul de metileno se ajusta aproximadamente a 6:1. La sacarosa se añade al medio como una fuente de carbohidratos alternativa ya que los microorganismos gram-negativos típicamente fermentan la lactosa o en ocasiones no la fermentan o lo hacen lentamente. Los coliformes producen colonias negras purpúreas debido a la toma de metileno y forma el complejo colorante azul-eosina, cuando el pH desciende. El complejo de tinte se absorbe en la colonia. Las bacterias no fermentadoras probablemente solubilizan el complejo azul-eosina de metileno resultando en colonias incoloras El digerido péptico de tejido animal sirve como fuente de carbono, nitrógeno y otros nutrientes esenciales para el crecimiento. La lactosa y sacarosa son las fuentes de energía por ser carbohidratos fermentables. La Eosina y el azul de metileno sirven como indicadores diferenciales. El Fosfato dipotásico amortigua el medio.

Por su parte la bacteria *Escherichia coli* forma colonias con color verde brillante metálico.

### 3.8.3 Agar MRS.<sup>(33)</sup> (Ver Figura N° 65)

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

Polisorbato 80 suministra los ácidos grasos requeridos para el metabolismo de los *Lactobacillus*. El acetato de sodio y citrato de amonio inhiben estreptococos, mohos y muchos otros microorganismos. El sulfato de magnesio y sulfato de manganeso proporcionan iones esenciales para la multiplicación de los *Lactobacillus*. Los fosfatos proporcionan una buena acción tampón en el medio.

Los *Lactobacillus* son microaerófilo y generalmente requieren cultivo aeróbico en medios sólidos. Por su lado el género *Bifidobacterium* requiere un cultivo anaeróbico en medio sólido.

### **3.9 Pruebas de identificación del patógeno *Escherichia coli*.**

#### **3.9.1 Pruebas API <sup>(13)</sup>**

La batería de pruebas API20E es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otras bacterias Gram -. Básicamente consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos (cada pocillo tiene un tubo y una cúpula) con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta. La prueba número 21, la oxidasa, se hace de forma independiente a la tira.

#### **Principio**

La galería del sistema 20E se compone de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye los test. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de colores espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos.

La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la tabla de lectura (Ver Cuadro N° 9) y la identificación se obtiene con la ayuda del catálogo analítico o del software de identificación.

Las pruebas de que consta la galería son las siguientes: ONPG (beta-galactosidasa), ADH (arginina deshidrolasa), LDC (lisina descarboxilasa), ODC (ornitina descarboxilasa), CIT (utilización de citrato), H<sub>2</sub>S (producción de H<sub>2</sub>S), URE (ureasa), TDA (triptófano desaminasa), IND (producción de indol), VP (producción de acetoina, Voges-Proskahuer), GEL (gelatinasa), GLU (fermentación/oxidación de glucosa), MAN (fermentación/oxidación de manitol), INO (fermentación/oxidación de inositol), SOR (fermentación/oxidación de sorbitol), RHA (fermentación/oxidación de ramnosa), SAC (fermentación/oxidación de sacarosa), MEL(fermentación/oxidación de melobiosa), AMY (fermentación/oxidación de amigdalina), ARA (fermentación/oxidación de arabinosa), OX (citocromo oxidasa).

### **3.9.2 Pruebas bioquímicas.** <sup>(38)</sup>

Las pruebas bioquímicas consisten en análisis químicos aplicados a medios de cultivos, los cuales nos permiten identificar distintos microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

Para la realización de las pruebas bioquímicas se dispone de múltiples medios, los cuales se deben aplicar de acuerdo a las exigencias del microorganismo en estudio.

Dentro de las pruebas bioquímicas están:

- Catalasa

El objetivo es buscar la presencia de la enzima catalasa. El peróxido de hidrógeno se produce al utilizar la bacteria al azúcar por vía oxidativa. Al ser este un compuesto muy oxidante las bacterias la eliminan mediante la producción de la enzima catalasa.



- Citrato

La utilización de citrato como única fuente de carbono se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7,6

- TSI

El TSI es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de la glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la identificación de la producción de H<sub>2</sub>S a partir de sustancias orgánicas que contiene el azufre.

- MIO (MOVILIDAD-INDOL-ORNITINA)

Esta prueba bioquímica permite identificar bacterias de acuerdo a su motilidad a la reacción del Indol a la descarboxilación de la ornitina.

- ROJO DE METILO

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo), que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación de la glucosa ácido mixta, en la cual se forman fundamentalmente ácido láctico, acético y succínico, además de etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

#### - VOGUES PROSKAUER

En esta prueba se determina la vía de fermentación de la glucosa del 2,3 butanodiol. El acetil-metil-carbinol (acetoína) es un producto intermediario en la producción de butanodiol.

En medio alcalino y en presencia de oxígeno la acetoína es oxidada a diacetilo. Este se revela en presencia de alfa-naftol dando un color rojo-fucsia.

En esta vía se forman cantidades menores de ácido (acetato y succinato) y los principales productos son el butanodiol, etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

#### - INDOL

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoniacó. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos.

Esta prueba está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del dimetilaminobenzaldehído.

### **3.9.3 Tinción al gram.** <sup>(38)</sup>

La tinción de Gram o coloración de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en Bacteriología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color morado, y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa o rojo.

El cristal violeta (colorante catiónico) penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas) a través de la pared bacteriana. El lugol es un compuesto formado por  $I_2$  (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio) y SI (Soluto), los cuales están presente para solubilizar el yodo, y actúan de mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. El  $I_2$  entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.

La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo  $I_2$ /cristal violeta. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos sí lo hacen.

Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen violetas.



**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## **4.0 DISEÑO METODOLÓGICO**

### **4.1 TIPO DE ESTUDIO.**

#### **Prospectivo**

Los resultados obtenidos en este trabajo podrán ser útiles para continuar el estudio sobre el alimento formulado con estas cepas probióticas y realizarle estudios de estabilidad para su comercialización.

#### **Experimental**

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

### **4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA.**

La investigación bibliográfica se realizó en los siguientes sitios:

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

### 4.3 PARTE EXPERIMENTAL

Este trabajo de investigación constó de un Pre-ensayo y un ensayo, en los que a continuación se detallan los procesos realizados en cada uno.

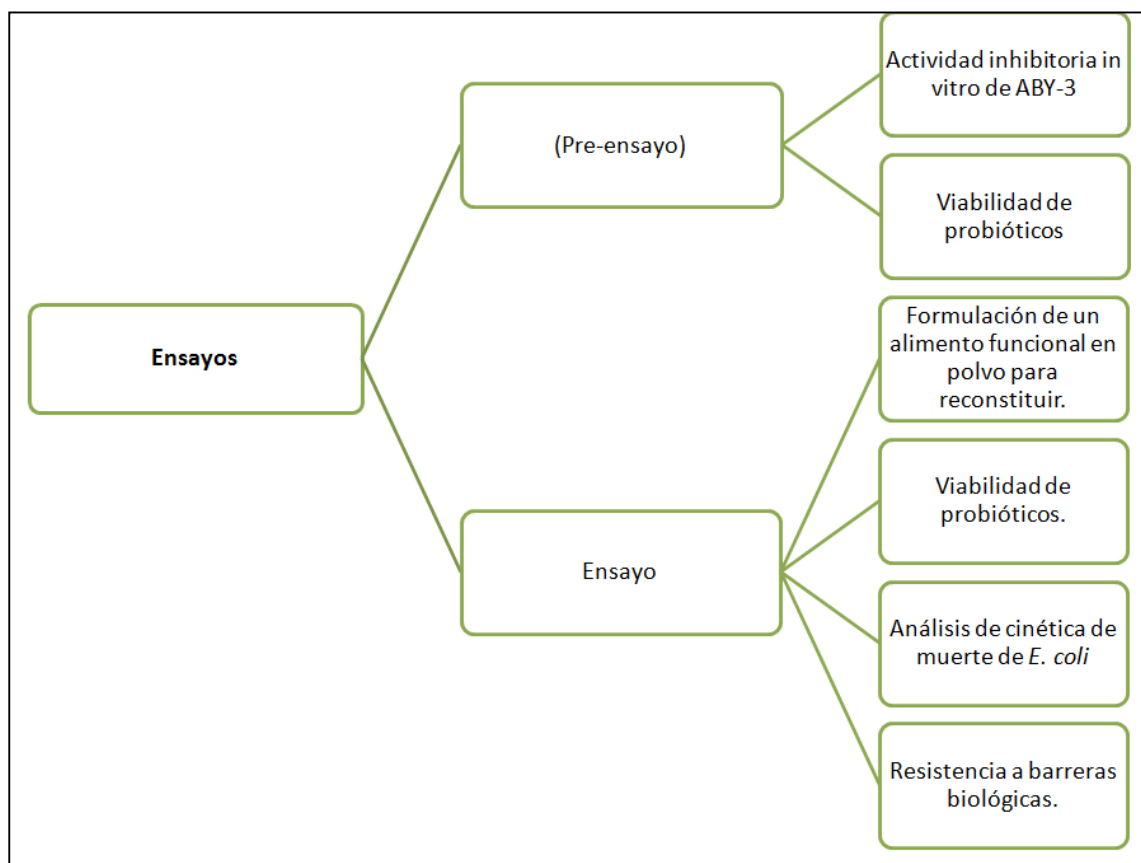


Figura N°9 Ensayos realizados en la Investigación.

#### Pre- ensayo

Se realizó una prueba previa donde se probó la actividad inhibitoria in vitro de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria con una mezcla de cuatro cepas bacterianas probióticas que contiene *Lactobacillus acidophilus* LA-5®, *Bifidobacterium lactis* BB-12®, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, a dos diferentes concentraciones ( $10^6$  y  $10^7$  UFC/mL de probióticos) en 250 mL de agua con 3.4% de caseína.

Este pre ensayo se hizo debido a que la empresa interesada en la formulación del alimento en polvo para reconstituir necesitaba un informe del comportamiento de esta mezcla de probióticos frente a la bacteria patógena *Escherichia coli* y así extrapolar este resultado hacia la mezcla de dos probióticos, *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12®, los cuales vienen en una presentación de bacterias liofilizadas especialmente para formular alimentos en polvo y que no necesitan refrigeración, pero que actualmente no se comercializan en el país y se tienen que importarse a través de un pedido especial a la empresa fabricante de probióticos junto con el informe de este pre-ensayo.

### **Ensayo.**

Se formuló y preparó el alimento nutricional el cual tiene una mezcla de cepas probióticas liofilizadas *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12®, especialmente para un producto en polvo y que no necesita refrigeración, el cual realiza la función nutricional y al reconstituirse en 250 mL de agua es una bebida libre de lactosa pero con la proteína de la leche, es decir la caseína en menor proporción que la que se toma en un vaso de leche (3.40% de caseína por vaso de leche)<sup>(1)</sup>. La concentración de caseína es del 1.0%, ya que el producto se dirige a la población más vulnerable a las diarreas (niños de escasos recursos económicos) reduciendo la cantidad de caseína debido al alto costo de esta, pero dejando un margen de concentración con la cual aun aporta contenido nutritivo.

Además se aumento la concentración de probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en cada una de las formulaciones en un logaritmo (F1 de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/mL y F2 de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL), con respecto al preensayo, con la finalidad de observar una mayor inhibición del patógeno.

Para que sea de aceptación a la población a la cual va dirigida se formuló con saborizante y colorante natural para obtener buenas características organolépticas.

Se realizó el análisis sobre la cinética de muerte que sigue el patógeno *Escherichia coli* al estar en contacto directo con la mezcla de probióticos contenidos en el alimento reconstituido. A este efecto inhibitorio se le dio seguimiento durante 4 días seguidos, cada 24 horas, debido a que esta bebida guardada en refrigeración posee buenas características organolépticas un máximo de 5 días, a su vez es el tiempo en el que los microorganismos probióticos permanecen vivos en el intestino, evaluando su viabilidad durante este tiempo (0, 24, 72 horas).

Se llevó a cabo una prueba preliminar de estabilidad del polvo formulado sin reconstituir durante un mes, con la finalidad de obtener la viabilidad de los probióticos frente a la mezcla de polvos, el cual en este caso es el vehículo.

Se realizó una caracterización biológica a la mezcla de probióticos liofilizados estudiados, tal como lo indica el estudio de la FAO “Probióticos en los alimentos, propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación”.<sup>(44)</sup> Aquí se evaluó dos principales ensayos in vitro utilizados actualmente para el estudio de cepas probióticas (barreras biológicas) como son la resistencia gástrica utilizando HCl 6M hasta pH 2 y la resistencia a ácidos biliares con una mezcla de sales biliares de bovino 0.3%.<sup>(26)</sup>

Los siguientes análisis se realizaron tanto en el pre-ensayo como en el ensayo:

Se llevó un blanco con la mezcla de probióticos y todos los componentes del alimento funcional reconstituido menos el patógeno *Escherichia coli*, con la

finalidad de cuantificar la viabilidad de estos probióticos durante 4 días que representan la vida de estos en el intestino.

Durante los dos ensayos se llevó un blanco con *Escherichia coli* más todos los componentes del alimento funcional reconstituido menos la mezcla de probióticos, con el propósito de comprobar que en efecto la mezcla de probióticos inhibió al patógeno y no otro componente de la formulación.

Se evaluó el pH de las bebidas formuladas.

Se utilizó una cepa patógena de *Escherichia coli* extraída de un coprocultivo de un niño atendido por diarrea de origen infeccioso del Hospital Nacional Benjamín Bloom en el mes de febrero del año 2014. Este patógeno se trabajó a dos diferentes concentraciones ( $10^5$ UFC/mL y  $10^6$ UFC/mL), tomando en consideración la dosis infectiva del patógeno <sup>(16)</sup> y verificar de manera más clara la reducción logarítmica de esta en su cinética de muerte.

En los siguientes numerales se detalla el proceso de aislamiento, identificación y estandarización del patógeno *Escherichia coli* utilizado en los análisis, así como también los procesos del pre-ensayo y del ensayo.

#### **4.3.1 Aislamiento de *Escherichia coli*.**

La cepa patógena *Escherichia coli*, se obtuvo a partir de un coprocultivo de niño con diarrea del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom. Esta cepa salvaje se nos brindó aislada en medio agar Mac. Conkey y en medio agar chocolate.

#### **4.3.2 Pruebas de Identificación de *Escherichia coli*.**

##### **4.3.2.1 Frotis bacteriano y tinción gram (Ver Figura N° 34)**

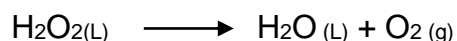
Tomar con una asa estéril una colonia aislada de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria, a partir del crecimiento en medio agar TSA; extender sobre una

gota de solución salina en un portaobjeto de vidrio, para formar una película. Pasar por el mechero cerca de la llama el frotis y luego dejar secar cerca del mechero. Aplicar al frotis unas cuantas gotas de cristal violeta y dejar actuar durante un minuto. Enjuagar con agua destilada y agregar unas gotas de lugol, y dejar actuar un minuto. Enjuagar con agua destilada y decolorar de inmediato con alcohol acetona. Luego enjuagar con agua destilada. Después adicionar gotas de safranina hasta cubrir el frotis, esperar un minuto y enjuagar con agua destilada. Eliminar el exceso de agua secar con papel toalla para quitar la humedad. Por último observar al microscopio y determinar la morfología.

#### **4.3.2.2 Pruebas bioquímicas (Ver Figura N° 35)**

##### **CATALASA.**

1. Seleccionar una colonia aislada de agar TSA con asa en punta y colocar sobre un porta objeto.
2. Agregar una gota de peróxido de Hidrogeno al 3 % (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Un burbujeo en los primeros segundos indica reacción positiva.



##### **MOVILIDAD**

1. Seleccionar una colonia aislada de agar TSA con asa en punta e inocular en un tubo que contenga medio SIM
2. Incubar de 24-48 horas a 37° C.

**TSI**

1. Seleccionar una colonia aislada de agar TSA con asa en punta e inocular en un tubo que contenga medio TSI.
2. Incubar de 24-48 horas a 37° C.

**CITRATO**

1. Seleccionar una colonia aislada de agar TSA con asa en punta e inocular en un tubo que contenga medio citrato.
2. Incubar de 24-48 horas a 37° C.

**VOGES-PROSKAUER**

1. Seleccionar una colonia aislada de agar TSA con asa en anillo e inocular en un tubo que contenga medio Voges- Proskaur.
2. Incubar durante 24 horas a 35° C
3. Agregar 10 gotas de la solución de  $\alpha$ - naftol.
4. Agregar 5 gotas de la solución de hidróxido de potasio; luego, agitar bien durante un minuto.
5. Una coloración rojiza (que puede aparecer con extrema lentitud) indica un resultado positivo.

**ROJO DE METILO**

1. Inocular un tubo que contenga medio de rojo de metilo con colonia de microorganismo en estudio e incubar durante 24 horas a 37° C.



2. Agregar 4 o 5 gotas del indicador al inóculo.
3. La aparición de una coloración roja denota un resultado positivo y una coloración amarilla demuestra un resultado negativo.

## **INDOL**

1. Seleccionar una colonia aislada de agar TSA con asa en anillo e inocular en un tubo que contenga medio para Indol.
2. Incubar durante 24 horas a 35° C
3. Agregar diez gotas del reactivo de Kovacs a cada tubo
4. La aparición de una coloración roja indica una prueba positiva.

### **4.3.2.3 Pruebas API<sub>(13)</sub>**

#### **Preparación de la galería**

- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada en los alveolos, para crear la atmósfera húmeda.
- Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- Sacar la galería de su envase.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.

#### **Preparación del inóculo**

- Abrir la ampolla de API NaCl 0.85% médium (5ml) o una ampolla de API suspensión médium (5ml).

- Con una pipeta extraer una sola colonia bien aislada sobre medio agar. Se utilizan preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).
- Realizar una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en el medio. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.

### **Inoculación de la galería**

Introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería con ayuda de la misma pipeta (para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos, colocar la punta de la pipeta sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia adelante).

- Para las pruebas CIT, VP, GEL, llenar el tubo y la cúpula.
- Para las otras pruebas, llenar únicamente los tubos (no las cúpulas)
- Para las pruebas ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE crear una atmósfera anaerobia llenando la cúpula con aceite de parafina.
- Cerrar la cámara de incubación.
- Incubar a 36°C ± 2°C durante 18-24 horas.

### **Lectura e interpretación**

#### **Lectura de la galería**

Después de la incubación la lectura debe hacerse remitiéndose a la tabla No.1.

Anotar en la hoja de resultados todas las reacciones espontáneas y después revelar los ensayos que necesiten la adición de reactivos.

- Prueba de TDA: Agregar una gota del reactivo TDA. Un color marrón-rojizo indica una reacción positiva que se anotará en la hoja de resultados.
- Prueba de IND: agregar 1 gota del reactivo JAMES. Un color rosado que se difumina en toda la cúpula indica una reacción positiva, que se debe anotar en la hoja de resultados.
- Prueba de VP: agregar una gota de los reactivos VP<sub>1</sub> y VP<sub>2</sub>. Esperar un mínimo de 10 minutos. Un color rosa o rojo indica una reacción positiva que se anotará en la hoja de resultados. Una débil coloración rosa que aparece después de 10 minutos debe ser considerada como negativa.

### **Interpretación (Ver Cuadro N°6)**

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico.

Determinación del perfil numérico.

En la hoja de resultado, los test están separados en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1,2 o 4. Como la galería api 20E comporta 20 ensayos, sumando al interior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. (A la reacción de la oxidasa que constituye el test No.21 se le asigna el valor 4, cuando resulte positiva).

Identificación.

Se realiza a partir de la base de datos

- Con la ayuda del catálogo analítico: localizar el perfil numérico en la lista de los perfiles.
- Con la ayuda del software de identificación Apiweb<sup>TM</sup>: Introducir manualmente mediante el teclado el perfil numérico de 7 cifras.

The image shows a form for the api 20E test. At the top left is the logo 'api 20E' and a CE mark with '07223 C'. To the right is a 'REF:' field with a barcode-like structure. Below that is a field for 'Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie'. The main part of the form is a grid of 20 wells, each with a number (1, 2, or 4) and a biochemical test name: ONPG, ADH, LDC, ODC, LITJ, H.S., URE, TDA, IND, LVPJ, GELJ, GLU, MAN, INO, SDR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA, OX, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, MOB, McC, OF-0, OF-F. Below the grid are two text boxes: 'Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy:' and 'Ident. / Ταυτοποίηση:'. The Biomerieux logo is at the top right, and 'Imprimé en France / Printed in France' is at the bottom right.

Figura N° 10 Hoja de resultados para pruebas api 20E.

### 4.3.3 Mantenimiento y estandarización de la bacteria patógena *Escherichia coli*, cepa hospitalaria.

#### 4.3.3.1 Mantenimiento de la cepa *Escherichia coli*. (Ver Figura N°36)

A partir del crecimiento en medio agar Mac. Conkey y en medio agar chocolate brindado por el Laboratorio de microbiología del Hospital, inocular la bacteria *Escherichia coli* en medio agar EMB para confirmar la presencia de esta bacteria, incubar por 24 horas a 37°C y observar el crecimiento de colonias aisladas de color verde metálico, a partir de estas colonias inocular *E. coli* en tubos con caldo BHI y en crioviales con caldo BHI, dejándolos incubar por 24 horas a 37°C. Luego de su crecimiento colocar los tubos con BHI en refrigeración a 3°C y los crioviales en congelación a -18°C.

A las tres semanas de refrigeración, la bacteria crecida en caldo BHI se procede a su reanimación de la siguiente manera: Se toma inóculo con un aza y estriar en medio agar EMB, incubar por 24 horas a 37°C, después de su crecimiento

en EMB verificar si las colonias tienen el verde metálico característico de *Escherichia coli*, de ser así inocular estas colonias en caldo BHI, incubar por 24 horas a 37°C, y refrigerar a 3°C. Este proceso de reanimación se deberá llevar a cabo cada tres semanas.

#### **4.3.3.2 Estandarización de la bacteria patógena *Escherichia coli*, cepa hospitalaria. (Ver Figura N°37)<sup>(4)</sup>**

La bacteria patógena *Escherichia coli* proveniente de un coprocultivo de un niño con diarrea del Hospital Nacional de niños Benjamín Bloom se estandariza por medio del método espectrofotométrico de la siguiente manera:

Del criovial donde se mantiene la cepa patógena, sembrar en caldo BHI para su enriquecimiento e incubar a 37°C por 24 horas en aerobiosis, posteriormente tomar una azada del caldo BHI y sembrar en agar EMB para aislar cualquier contaminante posible y dejar solo *Escherichia coli*, incubar a 37°C por 24 horas en aerobiosis. Luego de su promoción en EMB sembrar en agar TSA e incubar bajo las mismas condiciones anteriores. Luego de su crecimiento en TSA preparar una solución madre a partir de las colonias aisladas con 15 mL de solución salina estéril. A esta solución madre se le debe medir la absorbancia producida a una longitud de onda de 620 nm. Esta solución madre se le deberá agregar solución salina estéril hasta obtener una absorbancia entre 0.2 y 0.3<sup>(4)</sup> ya que a estas absorbancias las bacterias gram negativas tienen una concentración aproximada entre  $1.5-5 \times 10^8$  UFC/mL. Cuando la suspensión de bacterias se encuentre a la absorbancia mencionada anteriormente se le realizarán diluciones seriadas 1 en 10 hasta llegar a la dilución  $10^{-8}$ .

Las últimas tres diluciones ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$ ) se deben colocar en placa 1 mL junto con agar Chromocult (agar para coliformes) por triplicado realizar el

conteo a las 24 horas de incubación a 37°C, esperando obtener un conteo dentro del rango al multiplicar por el factor de dilución respectivo.

De obtener un resultado adecuado, el día del inicio del ensayo realizar el mismo procedimiento y llevar a la misma absorbancia la bacteria patógena e inocular en los frascos de bebidas conteniendo los probióticos la bacteria *Escherichia coli* 10<sup>8</sup> UFC/mL y una dilución de 10<sup>7</sup> UFC/mL para que en las bebidas se diluya y se encuentre a una concentración de 10<sup>6</sup>UFC/mL y 10<sup>5</sup>UFC/mL, respectivamente.

#### **4.3.4 Pre-Ensayo.**

##### **4.3.4.1 Tratamiento de la mezcla de probióticos ABY-3 (Ver Figura N°38)**

Para poder determinar la concentración de bacterias presentes por gramo de producto, realizar el siguiente proceso:

Pesar 1.0 g de ABY-3 y mezclar con 100 mL de caldo MRS, tomar 1.0 mL de esta solución y llevar a 9.0 mL de caldo MRS (dilución 10<sup>-1</sup>) continuar haciendo diluciones seriadas 1 en 9 hasta llegar a la dilución 10<sup>-10</sup>.

Realizar el conteo utilizando la técnica de placa vertida en las últimas tres diluciones (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>) utilizando el medio agar MRS, realizar este procedimiento por cuadruplicado.

De esta forma se podrá determinar la concentración de probióticos presentes en cantidades de producto ABY-3.

##### **4.3.4.2 Preparación de la formulación 1 (F1) (Ver Figura N°39)**

Colocar dentro de un frasco estéril con tapón de rosca 240mL de agua estéril medidos con una probeta estéril, adicionar caseinato de calcio al 3.4% (8.5 g

para 250mL de la mezcla) y la cantidad equivalente de probióticos requerida para la formulación 1 (F1)  $10^7$  UFC/mL. Realizar este procedimiento por triplicado, para evaluar el efecto inhibitorio de F1 en *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL y *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL, así como también se llevará un blanco.

#### **4.3.4.3 Preparación de la formulación 2 (F2)** (Ver Figura N° 39)

Colocar dentro de un frasco estéril con tapón de rosca 245mL de agua estéril medidos con una probeta estéril, adicionar caseinato de calcio al 3.4% (8.5 g para 250mL de la mezcla) y la cantidad equivalente de probióticos requerida para la formulación 2 (F2)  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Realizar este procedimiento por triplicado, para evaluar el efecto inhibitorio de F2 en *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL y *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL, así como también se llevará un blanco.

**4.3.4.4 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos:**  
*Lactobacillus acidophilus* **LA-5®**, *Bifidobacterium lactis* **BB-12®**,  
*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* **subsp.**  
*Bulgaricus* **contra** *Escherichia coli*, **cepa hospitalaria.**

**4.3.4.4.1 Determinación del efecto inhibitorio en Formulación 1 (F1)** (Ver Figura N° 40 y 41)

Inocular con 1 mL de la suspensión de *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL un frasco que contiene la formulación 1 (F1), el segundo frasco inocular con *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL y un tercer frasco no será inoculado ya que tendrá la función de blanco de probiótico (viabilidad) para F1.

Del frasco F1 inoculado con *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL tomar 10 ml con pipeta de morh estéril de 10 mL y adicionar a un frasco estéril con tapón de

rosca que contenga 90 mL de agua peptonada siendo esta la dilución  $10^{-1}$ , realizar diluciones seriadas 10 en 90, hasta llegar a la dilución  $10^{-7}$ .

Posteriormente realizar el conteo de las colonias de *Escherichia coli*  $10^5$ UFC/mL en F1, por la técnica de placa vertida, en las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ; llevar a cabo este conteo tomando 1 mL de las diluciones anteriormente mencionadas y utilizar el medio agar para coliformes (Chromocult),incubar a  $37^{\circ}$  Celsius durante 24 horas.

El conteo será por duplicado, cada 24 horas durante 4 días (hora cero, hora 24, hora 48 y hora 72). Considerar las diluciones a inocular en placa de acuerdo al conteo obtenido en cada día.

Del frasco F1 inoculado con *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL tomar 10 ml con pipeta de morh estéril de 10 mL y se adicionar a un frasco estéril con tapón de rosca que contenga 90 mL de agua peptonada siendo esta la dilución  $10^{-1}$ , realizar diluciones seriadas 10 en 90 hasta llegar a la dilución  $10^{-7}$ .

Posteriormente realizar el conteo de las colonias de *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL en F1, por la técnica de placa vertida, en las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ; llevar a cabo este conteo tomando 1 mL de las diluciones anteriormente mencionadas y utilizar el medio agar para coliformes(Chromocult), incubando a  $37^{\circ}$  Celsius durante 24 horas.

El conteo será por duplicado, cada 24 horas durante 4 días (hora cero, hora 24, hora 48 y hora 72). Considerar las diluciones a inocular en placa de acuerdo al conteo obtenido en cada día.

#### **4.3.4.4.2 Determinación del efecto inhibitorio en Formulación 2 (F2) (Ver Figura N° 42 y 43)**



Inocular con 1 mL de la suspensión de *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL un frasco que contiene la formulación 2 (F2), el segundo frasco inocular con *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL y un tercer frasco no será inoculado ya que tendrá la función de blanco de probiótico (viabilidad) para F2.

Del frasco F2 inoculado con *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL tomar 10 ml con pipeta de morh estéril de 10 mL y adicionar a un frasco estéril con tapón de rosca que contenga 90 mL de agua peptonada siendo esta la dilución  $10^{-1}$ , realizar diluciones seriadas 10 en 90, hasta llegar a la dilución  $10^{-6}$ .

Posteriormente realizar el conteo de las colonias de *Escherichia coli*  $10^5$ UFC/mL en F2, por la técnica de placa vertida, en las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ; llevar a cabo este conteo tomando 1 mL de las diluciones anteriormente mencionadas y utilizar el medio agar para coliformes (Chromocult),incubar a  $37^{\circ}$  Celsius durante 24 horas.

El conteo será por duplicado, cada 24 horas durante 4 días (hora cero, hora 24, hora 48 y hora 72). Considerar las diluciones a inocular en placa de acuerdo al conteo obtenido en cada día.

Del frasco F2 inoculado con *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL tomar 10 ml con pipeta de morh estéril de 10 mL y se adicionar a un frasco estéril con tapón de rosca que contenga 90 mL de agua peptonada siendo esta la dilución  $10^{-1}$ , realizar diluciones seriadas 10 en 90 hasta llegar a la dilución  $10^{-6}$ .

Posteriormente realizar el conteo de las colonias de *Escherichia coli*  $10^6$ UFC/mL en F2, por la técnica de placa vertida, en las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ; llevar a cabo este conteo tomando 1 mL de las diluciones anteriormente mencionadas y utilizar el medio agar para coliformes(Chromocult), incubando a  $37^{\circ}$  Celsius durante 24 horas.

El conteo será por duplicado, cada 24 horas durante 4 días (hora cero, hora 24, hora 48 y hora 72). Considerar las diluciones a inocular en placa de acuerdo al conteo obtenido en cada día.

La técnica anterior se realizará durante 3 semanas más, haciendo un total de 4 pre- ensayos.

#### **4.3.4.5 Conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad.**

##### **4.3.4.5.1 Viabilidad de probióticos en Formulación 1(F1) donde se ha inoculado *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/mL (Ver Figura N° 44 y 45)**

De los dos frascos F1 que contienen la mezcla de probióticos a una concentración de 10<sup>7</sup> (los mismos frascos donde se debe inocular *E. coli* 10<sup>5</sup>UFC/mL y *E. coli* 10<sup>6</sup>UFC/mL), realizar diluciones seriadas 10 en 90 mL hasta llegar a la dilución 10<sup>-7</sup>. Inocular en placa 1mL de las últimas 3 diluciones (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>) utilizar la técnica de placa vertida con medio agar MRS, incubar en medio de anaerobiosis 5% CO<sub>2</sub> a 37° Celsius, de 48 a 72 horas.

Realizar lo anterior en las horas 0, 24 y 72, durante 3 semanas más, haciendo un total de 4 pre- ensayos.

##### **4.3.4.5.2 Viabilidad de probióticos en Formulación 2 (F2) donde se ha inoculado *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/mL (Ver Figura N° 47 y 48)**

De los dos frascos F2 que contienen la mezcla de probióticos a una concentración de 10<sup>6</sup> (los mismos frascos donde se debe inocular *E. coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL y *E. coli* 10<sup>6</sup>UFC/mL), realizar diluciones seriadas 10 en 90 mL hasta llegar a la dilución 10<sup>-6</sup>. Inocular en placa 1mL de las últimas 3 diluciones (10<sup>-6</sup>,

$10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ) utilizar la técnica de placa vertida con medio agar MRS, incubar en medio de anaerobiosis 5% CO<sub>2</sub> a 37° Celsius, de 48 a 72 horas.

Realizar lo anterior en las horas 0, 24 y 72, durante 3 semanas más, haciendo un total de 4 pre- ensayos.

#### **4.3.4.5.3 Blanco de probióticos (viabilidad)** (Ver Figura N° 46 y 49)

De los dos frascos que contienen la mezcla de probióticos a una concentración de  $10^7$  y  $10^6$ , realizar diluciones seriadas 10 en 90 mL hasta llegar a la dilución  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$ , respectivamente, inocular en placa 1mL de las ultimas 3 diluciones( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ) y ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ) utilizando la técnica de placa vertida con medio agar MRS, incubar en medio de anaerobiosis 5% CO<sub>2</sub> a 37° Celsius, de 48 a 72 horas.

Realizar lo anterior en las horas 0, 24 y 72, durante 3 semanas más, haciendo un total de 4 pre- ensayos.

#### **4.3.4.6 Blanco de *Escherichia coli*.**

Se evaluó el posible efecto inhibitorio de los componentes del alimento funcional (a excepción del probiótico) sobre la bacteria patógena *Escherichia coli*. Este ensayo se realizó con el objetivo de descartar que los componentes de la fórmula ejerzan un efecto inhibitorio sobre el patógeno, y que no sea solo el probiótico el único responsable de la inhibición. Por ello se realizó una mezcla de polvos igual a la que se realizó para formular el alimento con la diferencia que no llevará probióticos.

##### **4.3.4.6.1 Preparación de la bebida del pre-ensayo.**

Preparar 250mL de agua estéril con caseína al 3.4%.

#### **4.3.4.6.2 Evaluación de *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL (Ver Figura N° 50)**

A partir de la bebida anterior, inocular 1.0mL de *Escherichia coli* en concentración 10<sup>5</sup>UFC/mL obtenida de la estandarización de la misma.

Tomar 10mL de la mezcla anterior y diluir con 90mL de agua peptonada siendo esta la dilución 10<sup>-1</sup>, realizar diluciones seriadas hasta la dilución 10<sup>-5</sup>.

Inocular 1.0mL de las últimas 3 diluciones (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup>) en placa, utilizar medio agar para coliformes (Chromocult) por medio de la técnica placa vertida para realizar el conteo. Incubar durante 24 horas a 37°C ± 2 °C.

Realizar el procedimiento anteriormente descrito cada 24 horas por un periodo de 4 días consecutivos.

Hacer este análisis por cuadruplicado para obtener datos más puntuales.

#### **4.3.4.6.3 Evaluación de *Escherichia coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL (Ver Figura N° 51)**

A partir de la bebida, inocular 1.0mL de *Escherichia coli* en concentración 10<sup>6</sup>UFC/mL obtenida de la estandarización de la misma.

Tomar 10mL de la mezcla anterior y diluir con 90mL de agua peptonada siendo esta la dilución 10<sup>-1</sup>, realizar diluciones seriadas hasta la dilución 10<sup>-6</sup>.

Inocular 1.0mL de las últimas 3 diluciones (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>) en placa, utilizando medio agar para coliformes (Chromocult) por medio de la técnica placa vertida para realizar el conteo. Incubar durante 24 horas a 37°C ± 2 °C.

Realizar el procedimiento anteriormente descrito cada 24 horas por un periodo de 4 días consecutivos.

Hacer este análisis por cuadruplicado para obtener datos más puntuales.

### 4.3.5 Ensayo

En el ensayo con el alimento formulado, se decidió aumentar las concentraciones de probióticos en un logaritmo cada formulación, es decir F1 ahora tiene una concentración de  $10^8$  y F2 una concentración de  $10^7$ , se hace esta aclaración debido a que se utilizarán los mismos diagramas del pre-ensayo que se encuentran en los anexos para explicar el procedimiento.

#### 4.3.5.1 Formulación del alimento nutricional.

El alimento formulado tiene los componentes que muestra la Tabla N°1, los porcentajes de cada uno de ellos se determinan de acuerdo a los análisis sensoriales a realizar en su formulación.

Tabla N°1 Componentes del alimento funcional en polvo para reconstituir.

Componente	Cantidad F1	Cantidad F2
Mezcla de probiótico	A determinar	A determinar
Caseína	1.00%	1.00%
Ácido cítrico	A determinar	A determinar
Color	A determinar	A determinar
Sabor	A determinar	A determinar
Dextrosa	A determinar	A determinar

#### 4.3.5.2 Elaboración del alimento funcional en polvo para reconstituir. (Ver Figura N° 52)

1. Limpieza de área de fabricación.
2. Sanitización de área de fabricación.
3. Pesado de las materias primas en bolsas plásticas estériles de capacidad adecuada.

4. Mezclado de los polvos en una bolsa plástica estéril de capacidad adecuada de la siguiente manera:
  - Agregar sobre la dextrosa el saborizante y mezclar durante 3 minutos.
  - Agregar sobre la mezcla anterior el colorante y mezclar por 3 minutos
  - Agregar sobre la mezcla anterior el ácido cítrico y mezclar por 3 minutos.
  - Agregar sobre la mezcla anterior el caseinato de calcio y mezclar por 5 minutos.
5. Una vez mezclados todos los polvos, se pesar el granel.
6. Dividir el granel en bolsas pequeñas estériles conteniendo 15 gramos cada una (cada bolsita representa la unidad de alimento para un vaso de 250 mL con agua).
7. Agregar a cada bolsita la cantidad requerida de probiótico según la formulación, es decir para F1 agregar 1.0g y para F2 0.1g.
8. Mezclar cada bolsita para que el probiótico se encuentre homogéneo en todo el contenido.
9. Guardar estas bolsitas protegidas de la luz y con sílica para evitar humedad.

#### **4.3.5.3 Preparación del alimento funcional en polvo para reconstituir.** (Ver Figura N°53)

Tomar una bolsita del alimento funcional (unidad) y reconstituir en 250 mL de agua estéril, luego agitar hasta la formación de un líquido libre de grumos.

#### **4.3.5.4 Determinación del efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12® contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria.**

#### 4.3.5.4.1 Determinación del efecto inhibitorio en Formulación 1 (F1) (Ver Figura N°40 y 41)

Inocular con 1 mL de la suspensión de *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL un frasco que contiene la formulación 1 (F1), el segundo frasco inocular con *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL y un tercer frasco no será inoculado ya que tendrá la función de blanco de probiótico (viabilidad) para F1.

Del frasco F1 inoculado con *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL tomar 10 ml con pipeta de morh estéril de 10 mL y adicionar a un frasco estéril con tapón de rosca que contenga 90 mL de agua peptonada siendo esta la dilución  $10^{-1}$ , realizar diluciones seriadas 10 en 90, hasta llegar a la dilución  $10^{-8}$ .

Posteriormente realizar el conteo de las colonias de *Escherichia coli*  $10^5$ UFC/mL en F1, por la técnica de placa vertida, en las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ; llevar a cabo este conteo tomando 1 mL de las diluciones anteriormente mencionadas y utilizar el medio agar para coliformes (Chromocult),incubar a  $37^{\circ}$  Celsius durante 24 horas.

El conteo será por duplicado, cada 24 horas durante 4 días (hora cero, hora 24, hora 48 y hora 72). Considerar las diluciones a inocular en placa de acuerdo al conteo obtenido en cada día.

Del frasco F1 inoculado con *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL tomar 10 ml con pipeta de morh estéril de 10 mL y se adicionar a un frasco estéril con tapón de rosca que contenga 90 mL de agua peptonada siendo esta la dilución  $10^{-1}$ , realizar diluciones seriadas 10 en 90 hasta llegar a la dilución  $10^{-8}$ .

Posteriormente realizar el conteo de las colonias de *Escherichia coli*  $10^6$ UFC/mL en F1, por la técnica de placa vertida, en las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ; llevar a cabo este conteo tomando 1 mL de las diluciones anteriormente

mencionadas y utilizar el medio agar para coliformes (Chromocult), incubando a 37° Celsius durante 24 horas.

El conteo será por duplicado, cada 24 horas durante 4 días (hora cero, hora 24, hora 48 y hora 72). Considerar las diluciones a inocular en placa de acuerdo al conteo obtenido en cada día.

#### **4.3.5.4.2 Determinación del efecto inhibitorio en Formulación 2 (F2) (Ver Figura N° 42 y 43)**

Inocular con 1 mL de la suspensión de *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL un frasco que contiene la formulación 2 (F2), el segundo frasco inocular con *Escherichia coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL y un tercer frasco no será inoculado ya que tendrá la función de blanco de probiótico (viabilidad) para F2.

Del frasco F2 inoculado con *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL tomar 10 ml con pipeta de morh estéril de 10 mL y adicionar a un frasco estéril con tapón de rosca que contenga 90 mL de agua peptonada siendo esta la dilución 10<sup>-1</sup>, realizar diluciones seriadas 10 en 90, hasta llegar a la dilución 10<sup>-7</sup>.

Posteriormente realizar el conteo de las colonias de *Escherichia coli* 10<sup>5</sup>UFC/mL en F2, por la técnica de placa vertida, en las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>; llevar a cabo este conteo tomando 1 mL de las diluciones anteriormente mencionadas y utilizar el medio agar para coliformes (Chromocult),incubar a 37° Celsius durante 24 horas.

El conteo será por duplicado, cada 24 horas durante 4 días (hora cero, hora 24, hora 48 y hora 72). Considerar las diluciones a inocular en placa de acuerdo al conteo obtenido en cada día.

Del frasco F2 inoculado con *Escherichia coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL tomar 10 ml con pipeta de morh estéril de 10 mL y se adicionar a un frasco estéril con tapón de



rosca que contenga 90 mL de agua peptonada siendo esta la dilución  $10^{-1}$ , realizar diluciones seriadas 10 en 90 hasta llegar a la dilución  $10^{-7}$ .

Posteriormente realizar el conteo de las colonias de *Escherichia coli*  $10^6$ UFC/mL en F2, por la técnica de placa vertida, en las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ; llevar a cabo este conteo tomando 1 mL de las diluciones anteriormente mencionadas y utilizar el medio agar para coliformes(Chromocult), incubando a  $37^{\circ}$  Celsius durante 24 horas.

El conteo será por duplicado, cada 24 horas durante 4 días (hora cero, hora 24, hora 48 y hora 72). Considerar las diluciones a inocular en placa de acuerdo al conteo obtenido en cada día.

La técnica anterior se realizará durante 3 semanas más, haciendo un total de 4 ensayos.

#### **4.3.5.5 Conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad.**

##### **4.3.5.5.1 Viabilidad de probióticos en Formulación 1(F1) donde se ha inoculado *Escherichia coli* $10^5$ y $10^6$ UFC/mL (Ver Figura N° 44 y 45)**

De los dos frascos F1 que contienen la mezcla de probióticos a una concentración de  $10^8$ (los mismos frascos donde se debe inocular *E. coli*  $10^5$ UFC/mL y *E. coli*  $10^6$ UFC/mL), realizar diluciones seriadas 10 en 90 mL hasta llegar a la dilución  $10^{-9}$ .Inocular en placa 1mL de las últimas 3 diluciones ( $10^{-9}$ · $10^{-8}$ ·  $10^{-7}$ ) utilizar la técnica de placa vertida con medio agar MRS, incubar en medio de anaerobiosis 5% CO<sub>2</sub> a  $37^{\circ}$  Celsius, de 48 a 72 horas.

Realizar lo anterior en las horas 0, 24 y 72, durante 3 semanas más, haciendo un total de 4 ensayos.

#### **4.3.5.5.2 Viabilidad de probióticos en Formulación 2(F2) donde se ha inoculado *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/mL (Ver Figura N° 47 y 48)**

De los dos frascos F2 que contienen la mezcla de probióticos a una concentración de 10<sup>7</sup> (los mismos frascos donde se debe inocular *E. coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL y *E. coli* 10<sup>6</sup>UFC/mL), realizar diluciones seriadas 10 en 90 mL hasta llegar a la dilución 10<sup>-8</sup>. Inocular en placa 1mL de las últimas 3 diluciones (10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>) utilizar la técnica de placa vertida con medio agar MRS, incubar en medio de anaerobiosis 5% CO<sub>2</sub> a 37° Celsius, de 48 a 72 horas.

Realizar lo anterior en las horas 0, 24 y 72, durante 3 semanas más, haciendo un total de 4 ensayos.

#### **4.3.5.5.3 Blanco de probióticos (viabilidad) (Ver Figura N° 46 y 49)**

De los dos frascos que contienen la mezcla de probióticos a una concentración de 10<sup>8</sup>UFC/mL y 10<sup>7</sup>UFC/mL, realizar diluciones seriadas 10 en 90 mL hasta llegar a la dilución 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-7</sup>, respectivamente, inocular en placa 1mL de las ultimas 3 diluciones(10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>) y (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>) utilizando la técnica de placa vertida con medio agar MRS, incubar en medio de anaerobiosis 5% CO<sub>2</sub> a 37° Celsius, de 48 a 72 horas.

Realizar lo anterior en las horas 0, 24 y 72, durante 3 semanas más, haciendo un total de 4 ensayos.

#### **4.3.5.6 Blanco de *Escherichia coli*.**

Se evaluó el posible efecto inhibitorio de los componentes del alimento funcional (a excepción del probiótico) sobre la bacteria patógena *Escherichia coli*.

Este ensayo se realizó con el objetivo de descartar que los componentes de la fórmula ejerzan un efecto inhibitorio sobre el patógeno, y que no sea solo el probiótico el único responsable de la inhibición. Por ello se realizó una mezcla de polvos igual a la que se realizó para formular el alimento con la diferencia que no llevaba probióticos.

#### **4.3.5.6.1 Preparación de la mezcla de polvos.**

El alimento que se formuló tiene los componentes presentes en la Tabla N°2 los porcentajes de cada uno de ellos se determina de acuerdo a los análisis sensoriales a realizar en su formulación.

Tabla N°2 Componentes del alimento funcional blanco.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Caseína	1.00%
Ácido cítrico	A determinar
Color	A determinar
Sabor	A determinar
Dextrosa	A determinar

#### **4.3.5.6.2 Elaboración del alimento funcional en polvo para reconstituir.**

1. Limpieza de área de fabricación.
2. Sanitización de área de fabricación.
3. Pesado de las materias primas en bolsas plásticas estériles de capacidad adecuada.
3. Mezclado de los polvos en una bolsa plástica estéril de capacidad adecuada de la siguiente manera:
  - Agregar sobre la dextrosa el saborizante y mezclar durante 3 minutos.
  - Agregar sobre la mezcla anterior el colorante y mezclar por 3 minutos

- Agregar sobre la mezcla anterior el ácido cítrico y mezclar por 3 minutos.
  - Agregar sobre la mezcla anterior el caseinato de calcio y mezclar por 5 minutos.
4. Una vez mezclados todos los polvos, se pesar el granel.
  5. Dividir el granel en bolsitas pequeñas estériles conteniendo 15 gramos cada una (cada bolsita representa la unidad de alimento para un vaso de 250 mL con agua).
  6. Guardar estas bolsitas protegidas de la luz y con sílica para evitar humedad.

#### **4.3.5.6.3 Preparación del alimento funcional en polvo para reconstituir.**

Tomar una bolsita del alimento funcional (unidad) y reconstituirla en 250 mL de agua estéril, luego se agitará hasta la formación de un líquido libre de grumos.

#### **4.3.5.6.4 Evaluación de blanco *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL (Ver Figura N°54)**

A partir de la mezcla de polvos reconstituida en 250mL de agua estéril, inocular 1.0mL de *Escherichia coli* en concentración 10<sup>5</sup>UFC/mL obtenida de la estandarización de la misma.

Tomar 10mL de la mezcla anterior y diluir con 90mL de agua peptonada siendo esta la dilución 10<sup>-1</sup>, realizar diluciones seriadas hasta la dilución 10<sup>-5</sup>.

Inocular 1.0mL de las últimas 3 diluciones (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup>) en placa, utilizar medio agar para coliformes (Chromocult) por medio de la técnica placa vertida para realizar el conteo. Incubar durante 24 horas a 37°C ± 2 °C.

Realizar el procedimiento anteriormente descrito cada 24 horas por un periodo de 4 días consecutivos. Hacer este análisis por cuadruplicado para obtener datos más puntuales.

#### **4.3.5.6.5 Evaluación de blanco *Escherichia coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL (Ver Figura N° 55)**

A partir de la mezcla de polvos reconstituida en 250mL de agua estéril, inocular 1.0mL de *Escherichia coli* en concentración 10<sup>6</sup>UFC/mL obtenida de la estandarización de la misma.

Tomar 10mL de la mezcla anterior y diluir con 90mL de agua peptonada siendo esta la dilución 10<sup>-1</sup>, realizar diluciones seriadas hasta la dilución 10<sup>-6</sup>.

Inocular 1.0mL de las últimas 3 diluciones (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>) en placa, utilizar medio agar para coliformes (Chromocult) por medio de la técnica placa vertida para realizar el conteo. Incubar durante 24 horas a 37°C ± 2 °C.

Realizar el procedimiento anteriormente descrito cada 24 horas por un periodo de 4 días consecutivos. Hacer este análisis por cuadruplicado para obtener datos más puntuales.

#### **4.3.5.7 Prueba preliminar de estabilidad para el alimento formulado.**

Se almacenaron 6 bolsas del alimento funcional formulado F1 y 6 bolsas del alimento funcional formulado F2 sin reconstituir cuya concentración de probióticos es de 10<sup>8</sup>UFC/mL y 10<sup>9</sup> UFC/mL respectivamente, las cuales fueron analizadas durante un período de 30 días, realizando conteos de viabilidad de probióticos en el día 0, 15 y 30, con el objetivo de verificar la viabilidad de estos como parte de una prueba preliminar de estabilidad. Este procedimiento se realizó por duplicado para obtener un promedio de resultados.

##### **4.3.5.7.1 Prueba preliminar de estabilidad para Formulación F1 (Ver Figura N° 56)**

En el día 0 del análisis, tomar una bolsa del alimento funcional formulado F1 y reconstituir en 250 mL de agua estéril, agitar hasta disolverlo completamente.

Tomar 10 mL del alimento funcional reconstituido y diluir con 90 mL de agua peptonada (dilución  $10^{-1}$ ), realizar diluciones seriadas hasta la dilución  $10^{-8}$ .

Inocular en placa 1.0 mL de las últimas 3 diluciones ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ) utilizando medio agar MRS, por medio de la técnica de placa vertida, para realizar el conteo. Incubar en condición de anaerobiosis 5% de  $\text{CO}_2$  de 48 a 72 horas a  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para el día 15 y 30 realizar el procedimiento anteriormente descrito por duplicado.

#### **4.3.5.7.2 Prueba preliminar de estabilidad para Formulación F2 (Ver Figura N° 57)**

En el día 0 del análisis, tomar una bolsa del alimento funcional formulado F2 y reconstituir en 250 mL de agua estéril, agitar hasta disolverlo completamente.

Tomar 10 mL del alimento funcional reconstituido y diluir con 90 mL de agua peptonada (dilución  $10^{-1}$ ), realizar diluciones seriadas hasta la dilución  $10^{-7}$ .

Inocular en placa 1.0 mL de las últimas 3 diluciones ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ) utilizar medio agar MRS, por medio de la técnica de placa vertida, para realizar el conteo. Incubar en condición de anaerobiosis 5% de  $\text{CO}_2$  de 48 a 72 horas a  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para el día 15 y 30 se realizará el procedimiento anteriormente descrito por duplicado.

#### **4.3.5.8 Evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares. (Ver Figura N°58) <sup>(26)(44)</sup>**

El procedimiento se realiza en caldo MRS ajustado a pH de 2.0 y en caldo MRS enriquecido con sales biliares de origen bovino al 0.3%. Se preparan 20mL de caldo MRS, y se reparten en cantidades de 10mL (Sistema A y Sistema B), luego se ajusta el pH del sistema "A" a pH de 2.0 con HCL 3M y NaOH 3M, se esterilizan los 2 sistemas en autoclave a 121°C por 15min a 15lbs de presión, seguidamente se prepararán las sales biliares de origen bovino al 0.3 %. Después de la esterilización se le adiciona 0.3mL de sales biliares al sistema "B".

##### **4.3.5.8.1 Resistencia a acidez.**

Transferir 1.0mL de la mezcla de probióticos en una concentración de  $10^6$ UFC/mL a 10.0mL de caldo MRS ajustado con HCl 3M a pH 2, incubar a 37°C x 2 horas en jarra de anaerobiosis al 5% de CO<sub>2</sub>, después de la incubación, tomar 1.0 mL de la mezcla de probióticos crecida en caldo MRS ajustado a pH 2 y se harán diluciones seriadas 1 en 10 e inocular en placa por duplicado 1.0mL de las últimas tres diluciones ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ), adicionar 20mL de agar MRS, incubar a 37°C por 48-72 horas en condiciones de anaerobiosis al 5%de CO<sub>2</sub>.

##### **4.3.5.8.2 Resistencia a sales biliares.**

Transferir 1.0mL de la mezcla de probióticos en una concentración de  $10^6$ UFC/mL a 10.0mL de caldo MRS enriquecido con sales biliares de origen bovino al 0.3%, incubar a 37°C x 2 horas en jarra de anaerobiosis al 5% de CO<sub>2</sub>, después de la incubación, tomar 1.0 mL de la mezcla de probióticos crecida en caldo MRS enriquecida con sales biliares y hacer diluciones seriadas

1 en 10 e inocular en placa por duplicado 1.0mL de las últimas tres diluciones ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ), adicionar 20mL de agar MRS, incubar a 37°C por 48-72 horas en condiciones de anaerobiosis al 5%de CO<sub>2</sub>.

#### **4.3.5.8.3 Determinación del porcentaje de células viables.** <sup>(26)</sup>

La supervivencia de las cepas probióticas se realizó por medio del método conteo en placa utilizando agar MRS, este porcentaje de supervivencia se calculó de la siguiente manera:

$$\% = (\text{Log UFC N1} / \text{Log UFC N2}) * 100$$



## **CAPITULO V**

### **RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 5.1. Pruebas de Identificación de *Escherichia coli*.

La bacteria *Escherichia coli* se identificó según la metodología que detalla el numeral 4.3.2. Los resultados de la identificación de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria confirman que efectivamente se trabajó en los análisis realizados con dicha bacteria patógena.

En primer lugar se realizó el Frotis bacteriano y tinción gram (Ver tabla N°3) en donde se observó que el patógeno era una bacteria del grupo de las Gram negativas y que el cultivo no estaba contaminado. Ver Figura N°11.

Tabla N°3 Resultados de frotis bacteriano y tinción gram.

Gram + o -	Morfología Microscópica
Bacteria Gram Negativa	Bacilos cortos color rosa



Figura N°11 Resultados frotis bacteriano y tinción gram.

En el análisis de las pruebas bioquímicas se hace constar que los resultados coinciden con los descritos en la literatura, <sup>(14)</sup> detallándolos en el Anexo N°13, Figura N°34 y Cuadro N°8.

Además cada 3 semanas se sembraba la bacteria patógena mantenida en caldo BHI hacia agar EMB, de esta manera se estaba verificando que el patógeno se encontraba puro y aislada de cualquier contaminante, tal como muestra la Figura N°12, ya que este patógeno crecía con una tonalidad verde metálico brillante en agar EMB.



Figura N°12 Resultados de mantenimiento de *Escherichia coli* y pruebas Bioquímicas.

Como última prueba de identificación del patógeno *Escherichia coli*, se realizó las pruebas API 20E, diseñada para bacterias Gram negativas, obteniendo un perfil numérico de 21 cifras que se debía introducir en el catálogo en línea API web, pero no se pudo tener la licencia de este, por ello se comparó el perfil obtenido con ejemplos del catálogo físico API 20E y obteniendo resultados similares a los reportados por la bibliografía. <sup>(13)</sup> Estos resultados se detallan en el Anexo N°13, Cuadro N°9.

Con todo lo anterior realizado, se verificó que los análisis en donde se ocuparía este patógeno serían más fidedignos.

## 5.2 Estandarización de la bacteria patógena *Escherichia coli*, cepa hospitalaria. <sup>(4)</sup>

La estandarización del patógeno utilizado se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología en el numeral 4.3.3. Los resultados obtenidos con esta estandarización se presentan en la Tabla N°4.

Tabla N°4 Resultados de la estandarización de la bacteria patógena *Escherichia coli*, cepa hospitalaria.

λ= 620 nm    absorbanca= 0.2-0.3			
Conteos entre 1.5-5x10 <sup>8</sup> UFC/mL			
Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL	Absorbancia obtenida	Conteo UFC/mL
0.278	2.2 E+08 UFC/mL	0.273	1.2 E+08 UFC/mL
0.274	1.7 E+08 UFC/mL	0.280	2.5 E+08 UFC/mL
0.273	1.5 E+08 UFC/mL	0.275	1.8 E+08 UFC/mL
0.271	1.1 E+08 UFC/mL	0.282	2.7 E+08 UFC/mL
0.295	3.8E+08 UFC/mL	0.272	1.4 E+08 UFC/mL

## 5.3 Pre-ensayo

### 5.3.1 Elaboración de la bebida a base de probióticos ABY-3

Para poder elaborar la bebida del pre-ensayo a base de probióticos, se debe obtener la relación entre el peso del producto ABY-3 y la cantidad de UFC

presentes en este, el análisis se realizó con la metodología descrita en el numeral 4.3.4.1 y 4.3.4.2.

Los conteos obtenidos se representan en la Tabla N°5, y se determinó que 1.00 gramos de ABY-3 equivale  $10^{10}$  UFC.

Los resultados de la Tabla N°5 están basados en la cantidad de 0.01 gramo de producto ABY-3. (Ver cálculos en anexo N°5).

Tabla N°5 Resultados de los conteos del probiótico ABY-3 para determinar UFC por cada gramo.

Dilución	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	$\Sigma$ UFC/mL	UFC/mL / 4
$10^{-7}$	74	100	53	64	291	7.30 E+08
$10^{-8}$	5	2	3	4	14	3.50 E+08
$10^{-9}$	1	1	0	0	0.5	5.00 E+08
<b>Media UFC/mL=5.3 E+08 UFC</b>						

Al tener en consideración experimentalmente que 1.0 gramo de producto ABY-3 tiene una concentración de  $10^{10}$  UFC se pudo elaborar las bebidas con las dos formulaciones como indica la metodología en los numerales 4.3.4.3 y 4.3.4.3 y de acuerdo a lo detallado en la Tabla N°6.

Tabla N°6 Cantidades utilizadas para la elaboración de las bebidas de las dos formulaciones de probióticos con ABY-3 en el pre-ensayo.

Formulación	Gramos de ABY-3	Caseína	Agua estéril
F1 Probiótico 10 <sup>7</sup> UFC/mL	0.10g $\approx$ 10 <sup>9</sup> UFC*	3.4% = 8.5g	250 mL
F2 Probiótico 10 <sup>6</sup> UFC/mL	0.01g $\approx$ 10 <sup>8</sup> UFC	3.4% = 8.5g	250 mL

\*El probiótico se inoculó 2 logaritmos arriba de la concentración deseada debido a que la concentración de UFC/mL se diluye estos 2 logaritmos con 250 mL de agua estéril. (Ver cálculo en Anexo N° 6)

La Figura N°13 muestra el proceso que se llevó a cabo para elaborar estas bebidas, desde el pesado del caseinato, la medición de los 250 mL de agua estéril y el llenado de los frascos que contienen la bebida.

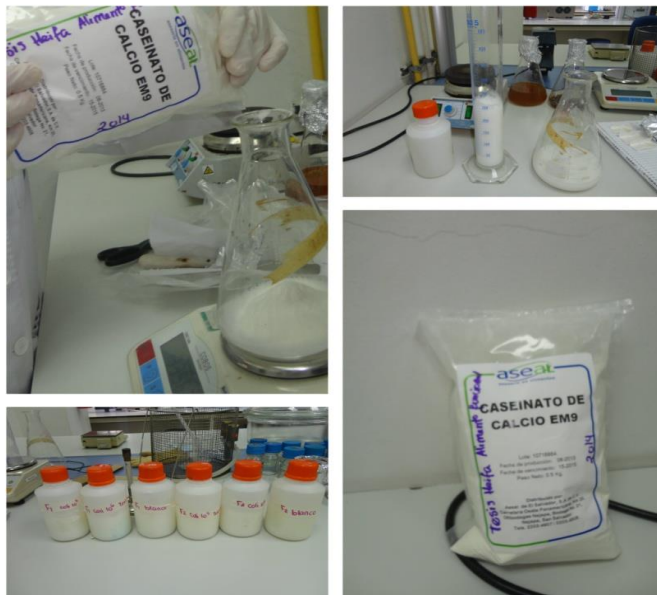


Figura N°13 Elaboración de las bebidas a base de probióticos ABY-3.

### 5.3.2 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 en F1 y F2 contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria.

La determinación del efecto inhibitorio fue comprobada al evaluar dos diferentes concentraciones de probióticos con dos diferentes concentraciones de la bacteria patógena (F1COL1, F1COL2, F2COL1 Y F2COL2) en donde F1 es el probiótico utilizado en una concentración de  $10^7$  UFC/mL y F2 con  $10^6$  UFC/mL. El patógeno COL1 a una concentración de  $10^5$  UFC/mL y COL2 a  $10^6$  UFC/mL. Los resultados de este análisis se detallan en el Anexo N°14.

El probiótico ABY-3 utilizado a una concentración logarítmica de  $10^7$  y  $10^6$  UFC/mL posee un efecto inhibitorio contra el patógeno *Escherichia coli*, disminuyendo 2 logaritmos de células viables en las dos concentraciones inoculadas de patógeno durante 4 días de análisis, tal como lo muestra la tabla N°7, en donde se detalla la media aritmética de los tiempos de cada combinación y su respectivo gráfico en la Figura N°14.

Tabla N°7 Promedio de resultados de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2.

Tiempo (Horas)	F1COL1 UFC/mL	F1COL2 UFC/mL	F2COL1 UFC/mL	F2COL2 UFC/mL
0	2.10E+05	1.60E+06	4.40E+05	3.40E+06
24	1.00E+05	6.80E+05	5.70E+04	2.50E+05
48	1.60E+04	1.20E+05	9.20E+03	1.10E+05
72	2.70E+03	3.80E+04	1.90E+03	3.50E+04

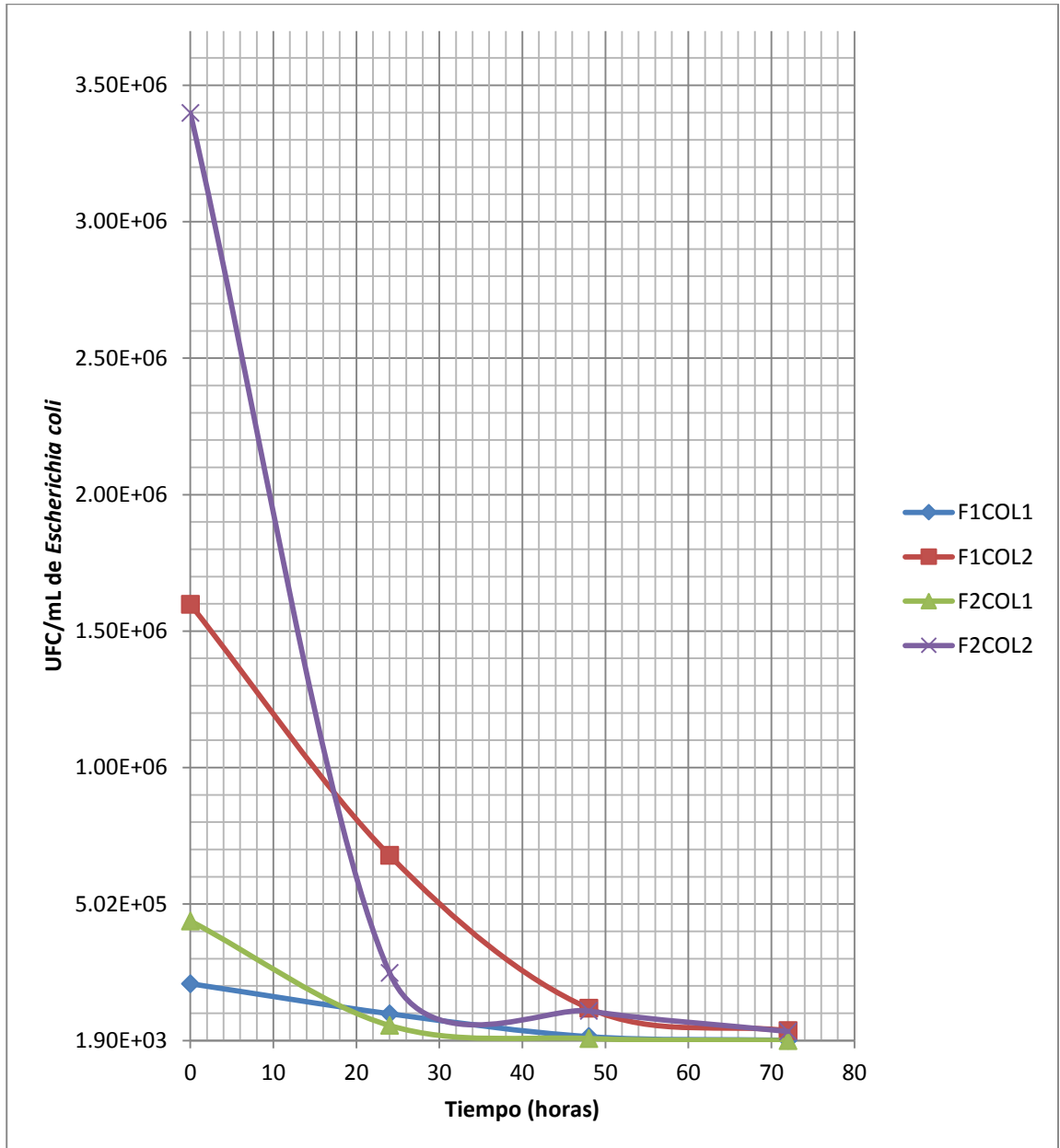


Figura N°14 Efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2.



La cinética de muerte de *Escherichia coli* para ambas formulaciones fue de Primer orden, dato obtenido de acuerdo a las gráficas Ln de concentración versus el tiempo al convertir las medias de UFC/mL de *Escherichia coli* de cada día al Ln de la concentración (Ln UFC/mL), como muestra la Tabla N°8 y así linealizar el gráfico, obteniendo la ecuación de la línea recta y con ello la pendiente de cada una, que en este caso es la rapidez de muerte del patógeno con una pendiente negativa debido a que la bacteria patógena ha sido inhibida.

La Figura N° 15 muestra la cinética de muerte del patógeno, con los promedios presentados en la tabla N°8.

Tabla N°8 Promedio de resultados de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2, convertido a Logaritmo natural (Ln).

Tiempo (Horas)	F1COL1 UFC/mL	F1COL2 UFC/mL	F2COL1 UFC/mL	F2COL2 UFC/mL
0	12.2548628	12.99453	14.2855142	15.039286
24	11.5129255	10.9508065	13.4298481	12.4292162
48	9.680344	9.12695876	11.695247	11.6082356
72	7.90100705	7.54960917	10.5453414	10.4631033

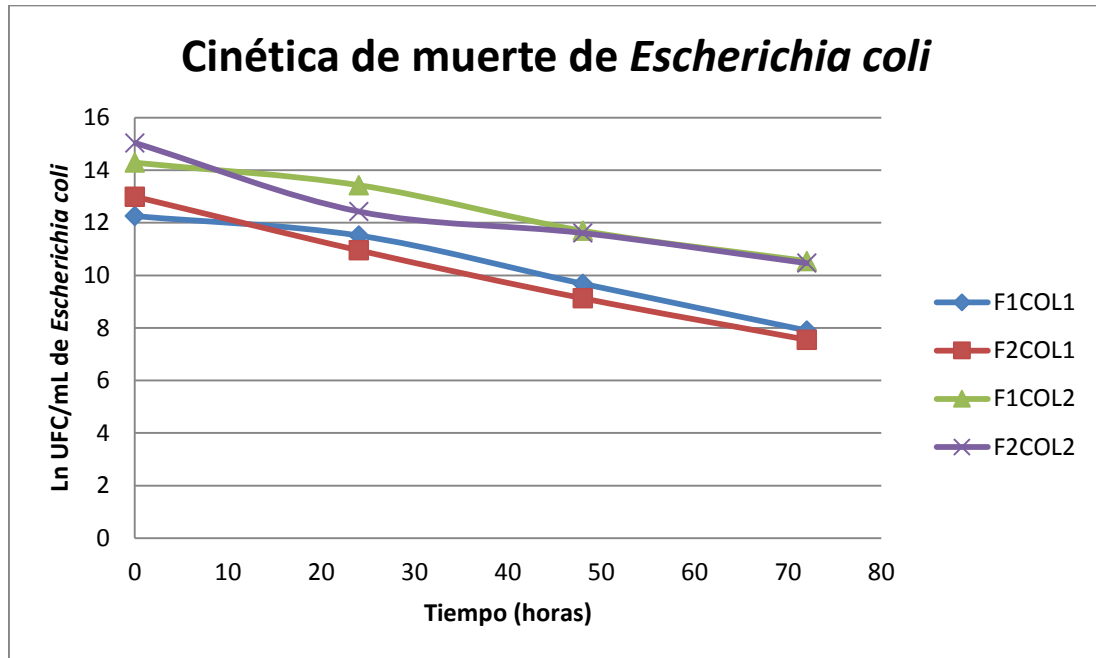


Figura N°15 Cinética de muerte de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en el pre-ensayo.

La Tabla N°9 muestra las pendientes obtenidas para cada combinación, las cuales surgen de la ecuación de la línea recta de cada uno. Esta pendiente es negativa debido a que la bacteria patógena ha sido inhibida.

A mayor pendiente mayor rapidez de muerte, resultando para el pre-ensayo que F2COL1 obtuvo una mayor rapidez de muerte, es decir donde el probiótico se encontraba en una concentración de  $10^6$  UFC/mL y el patógeno a  $10^5$  UFC/mL.

Tabla N°9 Ecuación de la línea recta y Cinética de muerte de *Escherichia coli* en el pre-ensayo.

Combinación	Ecuación de la línea recta	Cinética de muerte
F1COL1	$Y = -0.0621x + 12.571$	0.0621
F1COL2	$Y = -0.054x + 14.432$	0.054
F2COL1	$Y = -0.0757x + 12.879$	0.075
F2COL2	$Y = -0.0606x + 14.567$	0.0606

### 5.3.3 Determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F1

La concentración del probiótico se mantuvo en un logaritmo constante, es decir, concentración igual a la inoculada a la hora cero se mantuvo hasta el día 4 de análisis, habiendo una pequeña disminución del probiótico donde se encontraba en contacto con la *E. coli* y aumentando levemente en donde se encontraba solo el probiótico. La viabilidad del probiótico se evaluó durante 4 días consecutivos como indica la metodología en el numeral 4.3.4.5, haciendo conteos de este en la hora 0, 24 y 48 de análisis.

En los casos donde estuvo en contacto los probióticos junto al patógeno *Escherichia coli* hubo una pequeña disminución de las UFC/mL de probióticos. En el caso del análisis del blanco de probiótico, este se mantuvo dentro del mismo logaritmo de concentración ( $10^7$  UFC/mL). La tabla N° 10 muestra lo detallado anteriormente y se visualiza de una mejor manera en la Figura N°16, donde se grafica el promedio de la concentración de los probióticos a través del tiempo; los resultados de los conteos se encuentran en el Anexo N°14.

Tabla N°10 Comparación de resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F1.

Hora	UFC/mL probiótico blanco	UFC/mL de probiótico + <i>E. coli</i> 10 <sup>5</sup> UFC/mL	UFC/mL de probiótico+ <i>E. coli</i> 10 <sup>6</sup> UFC/mL
0	1.60E+07	1.50E+07	1.60E+07
24	1.70E+07	1.10E+07	1.50E+07
72	2.00E+07	6.70E+06	1.00E+07

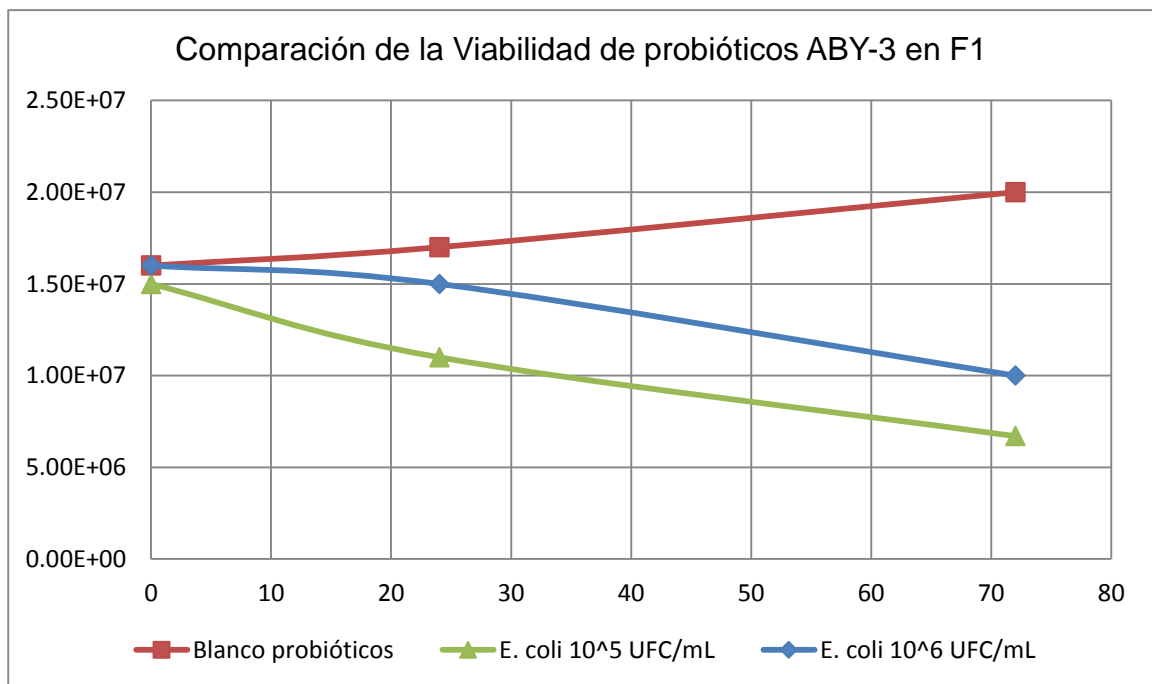


Figura N°16 Comparación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F1.

### 5.3.4 Determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F2

En el caso donde estuvo en contacto los probióticos junto al patógeno *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL hubo una pequeña disminución de las UFC/mL de

probióticos para la hora 24 pero aumentó nuevamente para la hora 72. Este dato puede estar afectado debido a que el producto ABY-3 no es adecuado para este tipo de matriz, sino que para elaboración de yogurt.

En donde *Escherichia coli* se encontraba en una concentración de  $10^6$  UFC/mL los probióticos disminuyeron su viabilidad en un logaritmo de concentración para la hora final de análisis. En el caso del análisis del blanco de probiótico, este se mantuvo dentro del mismo logaritmo de concentración ( $10^6$  UFC/mL).

La tabla N° 11 muestra lo detallado anteriormente y se visualiza de una mejor manera en la Figura N°17, donde se grafica el promedio de la concentración de los probióticos a través del tiempo; los resultados de los conteos se encuentran en el Anexo N°14.

Tabla N°11 Comparación de resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F2.

Hora	UFC/mL probiótico blanco	UFC/mL de probiótico + <i>E. coli</i> $10^5$ UFC/mL	UFC/mL de probiótico+ <i>E. coli</i> $10^6$ UFC/mL
0	1.90E+06	1.50E+06	1.40E+06
24	1.90E+06	1.10E+06	1.40E+06
72	1.00E+06	1.60E+06	4.90E+05

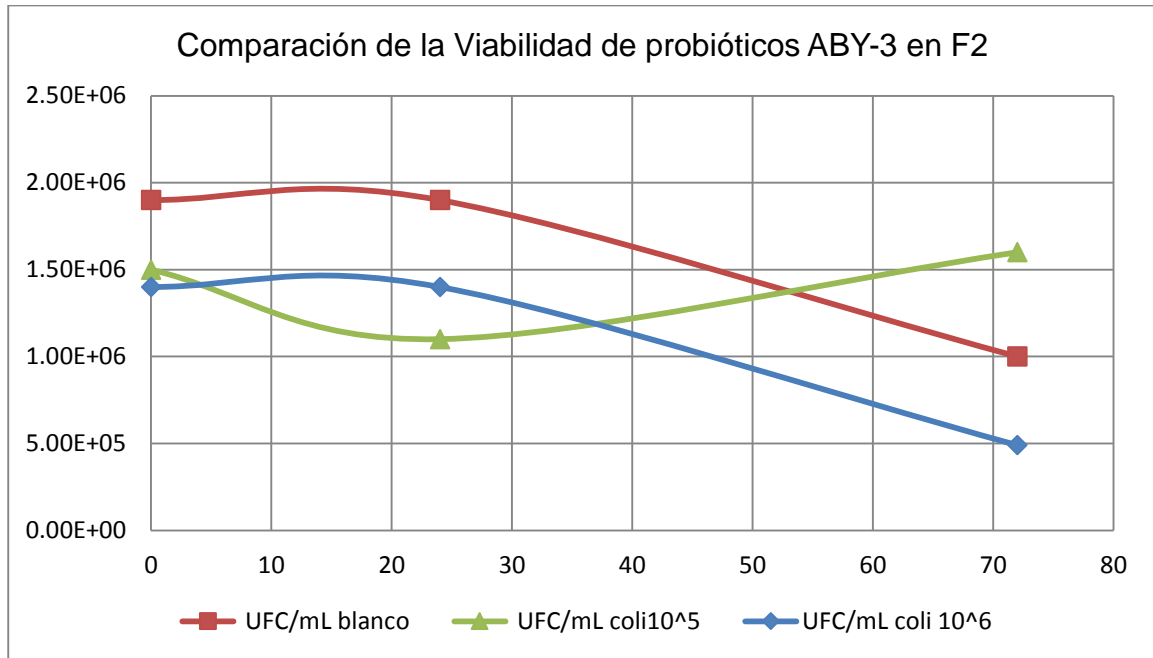


Figura N°17 Comparación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F2.

### 5.3.5 Blanco del patógeno *Escherichia coli*.

Este análisis se realizó de acuerdo a la metodología descrita en 4.3.4.6 en donde se evaluó el posible efecto inhibitorio que poseen los componentes del alimento funcional a excepción del probiótico sobre la bacteria patógena *Escherichia coli*. En el caso del pre-ensayo estos componentes incluían agua y caseína al 3.4%

El comportamiento de la viabilidad de la bacteria patógena, *Escherichia coli*, sin probióticos adicionados, se mantuvo constante en las primeras horas del análisis, sin embargo, en las horas siguientes hubo un aumento exponencial de un logaritmo de concentración; comprobando que el caseinato de calcio no es el responsable de la inhibición de éste patógeno en los análisis anteriormente realizados.

La Tabla N° 12 y N°13 muestran los promedios de los resultados del análisis del blanco del patógeno, y su respectivo gráfico en las Figuras N°18 y N°19.

Tabla N°12 Promedio de resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^5$  UFC/mL.

Hora	UFC/mL
0	1.80E+05
24	2.00E+05
48	1.10E+06
72	1.40E+06

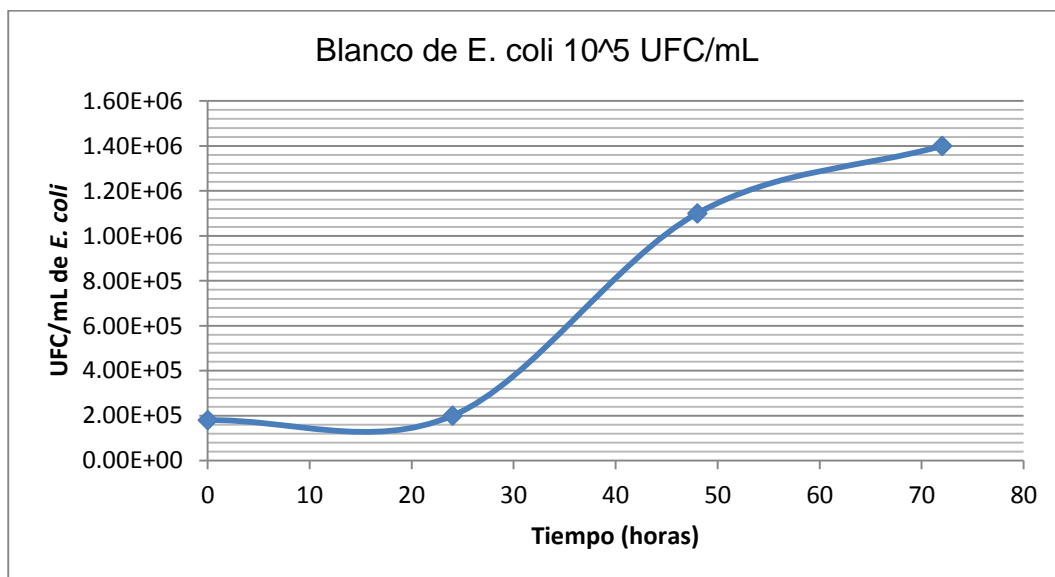


Figura N°18 Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^5$  UFC/mL.

Tabla N°13 Promedio de resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^6$  UFC/mL.

Tiempo (Horas)	UFC/mL
0	1.50E+06
24	3.20E+06
48	1.50E+07
72	2.70E+07

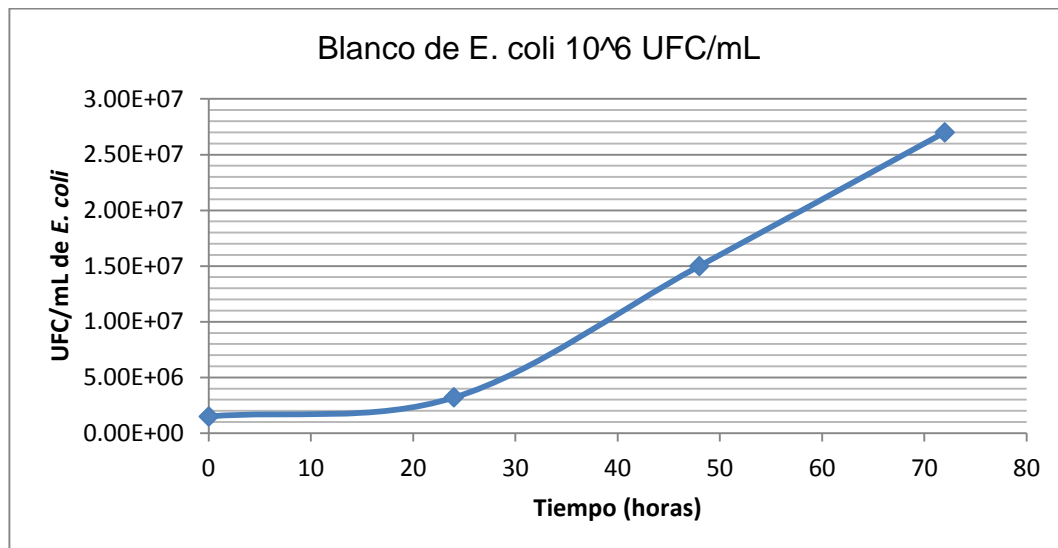


Figura N°19 Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^6$  UFC/mL.

### 5.3.6 Toma de pH inicial y final de Bebidas

El pH obtenido en las bebidas realizadas en el pre-ensayo mostraba un pH inicial y final de 5.0, según las tiras reactivas utilizadas. (Figura N°84).



## 5.4. Ensayo

### 5.4.1. Identificación morfológica

Se realizó la identificación morfológica de las dos cepas bacterianas utilizadas como probiótico en el alimento funcional.

La morfología macroscópica vista a partir del crecimiento bacteriano en medio agar MRS incluía dos tipos diferentes, un crecimiento en forma de hojuelas café tenue dentro del medio agar MRS y otras colonias en forma circular blanco lechoso por encima del medio agar MRS. (Ver Figura N° 20)

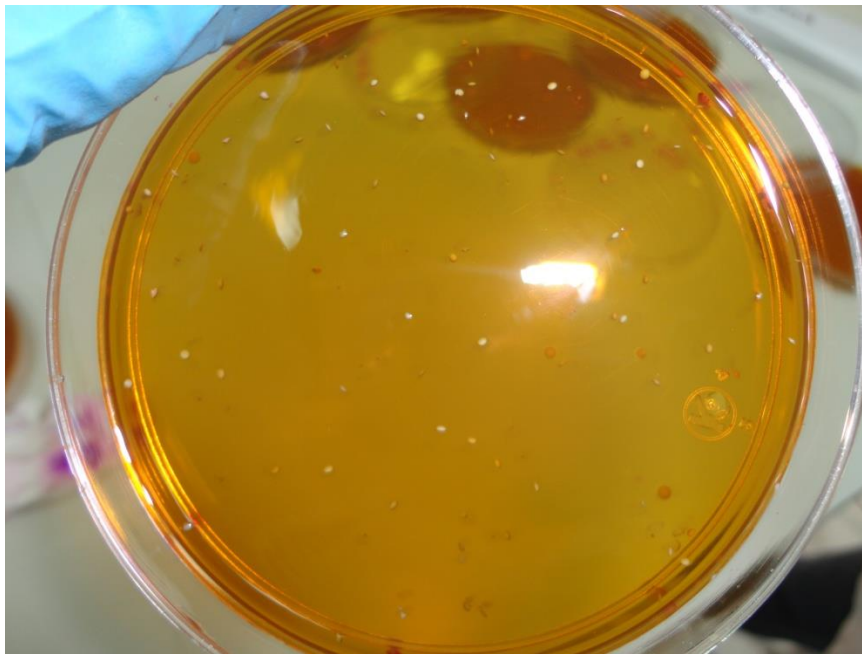


Figura N° 20 Morfología macroscópica de probióticos utilizados en el alimento funcional.

En el caso de la morfología microscópica, se le realizó una tinción al gram, en la cual se observaron los dos tipos diferentes de colonias obtenidas en el medio agar MRS. En el caso de la colonia circular lechosa presentaban una morfología de bacilos cortos gram positivo (Ver Figura N° 21). Las colonias en forma de hojuela no se lograron identificar microscópicamente debido a su disposición en el medio MRS.

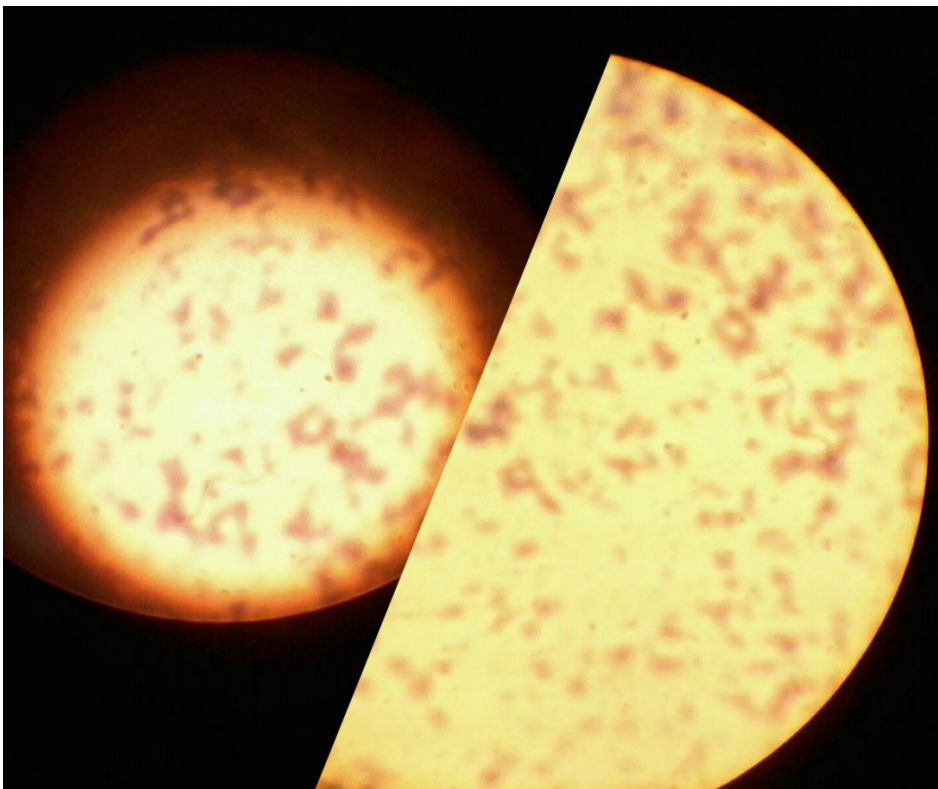


Figura N° 21 Morfología microscópica de probióticos utilizados en el alimento funcional (Colonia circular).

#### **5.4.2 Formulación del alimento nutricional.**

En el trabajo se formuló el alimento funcional con 2 sabores diferentes (fresa y naranja) para luego seleccionar solo uno de ellos dos y así realizar los ensayos descritos. Cabe destacar que las formulaciones se realizaron sin tomar en cuenta el peso del probiótico, ya que esta materia prima se incorporará al final a cada unidad de peso (bolsa individual) por la dificultad que se presenta en el mezclado de un microorganismo con los polvos y así poder asegurar que el microorganismo se encuentre en la dosis adecuada en cada bolsa; sin embargo en la Industria se cuenta con la maquinaria adecuada para mezclar estos polvos y no tener problemas de homogeneidad.

En cada formulación, se parte que el alimento debe llevar el 1% de caseinato de calcio y se sabe que un vaso es equivalente a 250 mL de bebida, por lo tanto en un vaso el contenido de caseinato debe ser de 2.5 gramos. Luego estos 2.5 gramos de Caseinato se debe convertir a un porcentaje de producto para poder formular de acuerdo a porcentajes de materia prima, lo que equivale al 16.66% de caseinato de calcio en la formulación (fórmula cuantitativa) (Ver cálculos en Anexo N° 8)

Otro punto a considerar es que el peso de cada bolsa es de 15 gramos y este surgió de experimentos sensoriales de sabor y olor de diferentes peso en un vaso con agua; es decir, que se probó con 8 gramos de producto, con 10 gramos y hasta llegar a 15 gramos disueltos en los 250 mL de agua que originó un sabor y olor agradable.

En el cuadro N°4 se detalla las materias primas utilizadas en la formulación y la función que esta realiza dentro de la fórmula, así como también en el Anexo N°15 se muestra las imágenes de las materias primas en sus empaques.

Cuadro N°4 Función de materias primas dentro de la formulación.

Materia prima	Función en la formulación
Probiótico LA-5 + BB-12	Aporte Funcional al alimento
Caseinato de calcio	Aporte nutricional de proteína de la leche
Ácido cítrico	Regulador de acidez, potenciador de sabor
Color Carmín Color Annato	Modificador organoléptico de color
Sabor Fresa Sabor Naranja	Modificador organoléptico de sabor
Dextrosa anhidra	Edulcorante, vehículo

### **Probióticos**

La cantidad en gramos de probióticos utilizada en cada formulación (F1 y F2) depende de lo que el producto rotule de UFC, en este caso el proveedor del producto recomendó trabajar con los mismos pesos que el ABY-3, ya que son equivalentes.

### **Caseinato de calcio (Ver Figura N°68)**

El caseinato de calcio se utilizará al 1% para brindar el aporte nutricional debido a que es una proteína de alto valor biológico propia de la leche, se administra a

personas que por intolerancia a la lactosa no pueden ingerir ni leche, ni productos lácteos debido a su bajo contenido de lactosa. <sup>(1)</sup>

### **Ácido cítrico** <sup>(48)</sup> (Ver Figura N°69)

El ácido cítrico se inicio utilizando en las formulaciones al 0.1% como regulador de acidez, luego se encontró en la monografía que este al utilizarlo en una cantidad mayor al 0.3% <sup>(46)</sup> es utilizada para potenciar el sabor a bebidas, por lo que en los últimos experimentos se utilizó al 0.3% y en efecto el sabor de las bebidas aumentó.

### **Colorantes y Saborizantes** <sup>(9)</sup>

Los colorantes y saborizantes utilizados son de origen natural, se utilizan para resaltar las propiedades originales de los alimentos de forma natural, y de esa forma evitar el uso de pigmentos y sabores sintéticos. <sup>(9)</sup> Los utilizados en esta formulación son los siguientes:

#### **Colorante natural Annato** <sup>(7)</sup>(Ver Figura N°71 y N°75)

Se obtiene de las semillas del arbusto de *Bixa Orellana* (Achiote). Su rango de color va de anaranjado amarillento a anaranjado rojizo. Es utilizado en lácteos como una excelente opción para algunos tipos de queso. Tienen buena resistencia a la exposición de la luz y estables al calor. <sup>(7)</sup>

#### **Colorante natural Carmín** <sup>(8)</sup> (Ver figura N°70 y N°72)

El ácido carmínico se extrae de ciertos insectos de la familia Coccidae, que habitan en algunas especies de cactus. Confiere a los alimentos un color rojo muy agradable. Algunos ejemplos de aplicaciones son en los productos

cárnicos y lácteos, como el yogur, conservas vegetales, mermeladas, helados, y bebidas, tanto alcohólicas como no alcohólicas.<sup>(8)</sup>

### **Sabores Frutales**<sup>(10)</sup> (Ver Figura N°72 N°76 y N°77)

Se utilizó el sabor de fresa y el de naranja ya que estos son los más seleccionados por la población infantil a la hora de seleccionar bebidas.

### **Dextrosa Anhidra**<sup>(48)</sup> (Ver Figura N°73)

La monografía indica que la dextrosa es utilizada como un edulcorante en alimentos,<sup>(46)</sup> es decir, es una materia prima que aporta un sabor dulce al alimento. Además de dar esta ventaja de aportar dulzura, característica buscada para agradar a la población infantil, esta materia prima nos sirve como un vehículo el cual aporta peso al producto debido a que las otras materias primas son utilizadas en cantidades muy pequeñas.

El porcentaje utilizado de dextrosa anhidra en cada formulación se obtiene a partir de la resta del 100% menos la sumatoria de todas las materias primas.

Al final de la formulación se realizó un experimento que consistió en guardar las bebidas reconstituidas de la formulación definitiva en refrigeración durante un periodo de 5 días, para verificar que las materias primas no ocasionaran sedimento o sobrenadante.

A continuación, se detallan los dos diferentes sabores de bebidas formuladas en el trabajo, el pH obtenido en cada uno y su análisis organoléptico, hasta llegar a obtener el más aceptado sensorialmente.

#### 5.4.2.1 Formulación del alimento funcional sabor a fresa.

Para la formulación de la bebida con sabor a fresa se llevaron a cabo dos experimentos (ExpFr1 y ExpFr2), detallando el porcentaje de materia prima en la Tabla N°14. Las imágenes de las bebidas formuladas se encuentran en el Anexo N°15.

El ExpFr1 tuvo como resultado una bebida con un leve sabor y olor a fresa, color rosa muy tenue, apariencia lechosa, el cual no cumplía las especificaciones buscadas para el producto deseado.

El ExpFr2 fue una bebida con sabor agradable a fresa, color rosa, siempre con apariencia lechosa. El aumentar el porcentaje de ácido cítrico y el porcentaje de saborizante originó un mejor sabor de la bebida. Al igual que el aumento del porcentaje de colorante dio una mejor apariencia de bebida de fresa (Ver Tabla N°14, Porcentaje (%) ExpFr2).

Tabla N°14 Porcentajes de Materia Prima utilizada en la formulación del alimento funcional sabor fresa y pH obtenido.

Materia prima	Porcentaje (%) ExpFr1	Porcentaje (%) ExpFr2
Caseinato de calcio	16.66	16.66
Ácido cítrico	0.1	0.3
Color carmín	0.1	0.3
Sabor Fresa	0.5	0.7
Dextrosa	82.64	82.04
pH	4.5	4.5

#### 5.4.2.2 Formulación del alimento funcional sabor a naranja

Para la formulación de la bebida con sabor a naranja se llevaron a cabo tres experimentos (ExpNa1, ExpNa2 y ExpNa3), detallando el porcentaje de materia prima en la Tabla N°15. Las imágenes de las bebidas formuladas se encuentran en el Anexo N°15.

El ExpNa1 obtuvo como resultado una bebida con poco a nada sabor a naranja y color naranja adecuado para una bebida saborizada de naranja con apariencia lechosa.

Al ExpNa2 se le aumentó en un 0.1% el sabor a naranja obteniendo una bebida con sabor tenue a naranja y poco olor a esta. Siempre apariencia lechosa con color naranja, por lo que al ExpNa3 se le aumentó el porcentaje de ácido cítrico hasta el 0.3% para acentuar el sabor y el porcentaje de saborizante al 0.5% originando un mejor sabor de la bebida.

Tabla N°15 Porcentajes de Materia Prima utilizada en la formulación del alimento funcional sabor naranja y pH obtenido.

Materia prima	Porcentaje (%) ExpNa1	Porcentaje (%) ExpNa2	Porcentaje (%) ExpNa3
Caseinato de calcio	16.66	16.66	16.66
Ácido cítrico	0.1	0.1	0.3
Color annato	0.1	0.1	0.1
Sabor naranja	0.3	0.4	0.5
Dextrosa	82.74	82.74	82.44
pH	4.5	4.5	4.5



### **5.4.2.3 Elección de la formulación más adecuada.**

El Anexo N°15 muestra la Imagen que analiza si al guardar las bebidas reconstituidas de la formulación definitiva (ExpFr2 y ExpNa3) en refrigeración durante un periodo de 5 días, las materias primas utilizadas en la concentración descrita no ocasionan sedimento o sobrenadante, obteniendo el siguiente análisis:

#### **Bebida con sabor a naranja ExpNa3**

Esta formulación ocasionó que algunos de sus componentes formaran una capa de flóculos al cabo de unas horas, esto puede ser posible que el color o el sabor utilizado no fueron tan solubles en los porcentajes utilizados, pero no daban buenas características organolépticas en porcentajes más bajos.

#### **Bebida con sabor a fresa ExpFr2**

Esta formulación originó buenos resultados al cabo de reconstituir el polvo y almacenarlo durante 5 días, ya que no hubo presencia de sedimento ni flóculos durante este tiempo, reflejando que las materias primas utilizadas y su concentración eran las adecuadas, sin embargo el sabor agradable que presentaba en el quinto día había desaparecido notablemente.

Por lo tanto la formulación ExpFr2 es la de elección para continuar los siguientes pasos de la metodología.

### **5.4.3 Elaboración del alimento funcional en polvo para reconstituir.**

1. Limpieza de área de fabricación.
2. Sanitización de área de fabricación.
3. Pesado de las materias primas en bolsas plásticas estériles de capacidad adecuada.
4. Mezclado de los polvos en una bolsa plástica estéril de capacidad adecuada de la siguiente manera:
  - Agregar sobre la dextrosa el saborizante y mezclar durante 3 minutos.
  - Agregar sobre la mezcla anterior el colorante y mezclar por 3 minutos
  - Agregar sobre la mezcla anterior el ácido cítrico y mezclar por 3 minutos.
  - Agregar sobre la mezcla anterior el caseinato de calcio y mezclar por 5 minutos.
5. Una vez mezclados todos los polvos, se pesar el granel.
6. Dividir el granel en bolsas pequeñas estériles conteniendo 15 gramos cada una (cada bolsita representa la unidad de alimento para un vaso de 250 mL con agua).
7. Agregar a cada bolsita la cantidad requerida de probiótico según la formulación, es decir para F1 agregar 1.0g y para F2 0.1g.
8. Mezclar cada bolsita para que el probiótico se encuentre homogéneo en todo el contenido.
9. Guardar estas bolsitas protegidas de la luz con papel aluminio y con sílica para evitar humedad.
10. Para preparar el alimento se toma una bolsa del alimento funcional (unidad) y se reconstituye en 250 mL de agua estéril, luego se agita hasta la formación de un líquido libre de grumos.

#### 5.4.4 Determinación del efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12® en F1 y F2 contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria.

La determinación del efecto inhibitorio fue comprobada al evaluar dos diferentes concentraciones de probióticos con dos diferentes concentraciones de la bacteria patógena (F1COL1, F1COL2, F2COL1 Y F2COL2) en donde F1 es el probiótico utilizado en una concentración de  $10^8$  UFC/mL y F2 con  $10^7$  UFC/mL. El patógeno COL1 a una concentración de  $10^5$  UFC/mL y COL2 a  $10^6$  UFC/mL. Los resultados de este análisis se detallan en el Anexo N°16.

El probiótico ABY-3 utilizado a una concentración logarítmica de  $10^8$  y  $10^7$  UFC/mL posee un efecto inhibitorio contra el patógeno *Escherichia coli*, disminuyendo 2 logaritmos de células viables en las dos concentraciones inoculadas de patógeno durante 4 días de análisis, tal como lo muestra la Tabla N°16, en donde se detalla la media aritmética de los tiempos de cada combinación y su respectivo gráfico en la Figura N°22.

Tabla N°16 Promedio de resultados de la determinación del efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12® contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2.

Tiempo (Horas)	F1COL1 UFC/mL	F1COL2 UFC/mL	F2COL1 UFC/mL	F2COL2 UFC/mL
0	2.20E+05	2.30E+06	4.40E+05	2.50E+06
24	1.20E+05	1.00E+06	3.50E+05	2.40E+06
48	4.60E+04	5.10E+05	2.20E+05	5.00E+05
72	4.00E+03	3.70E+04	8.60E+03	7.90E+04

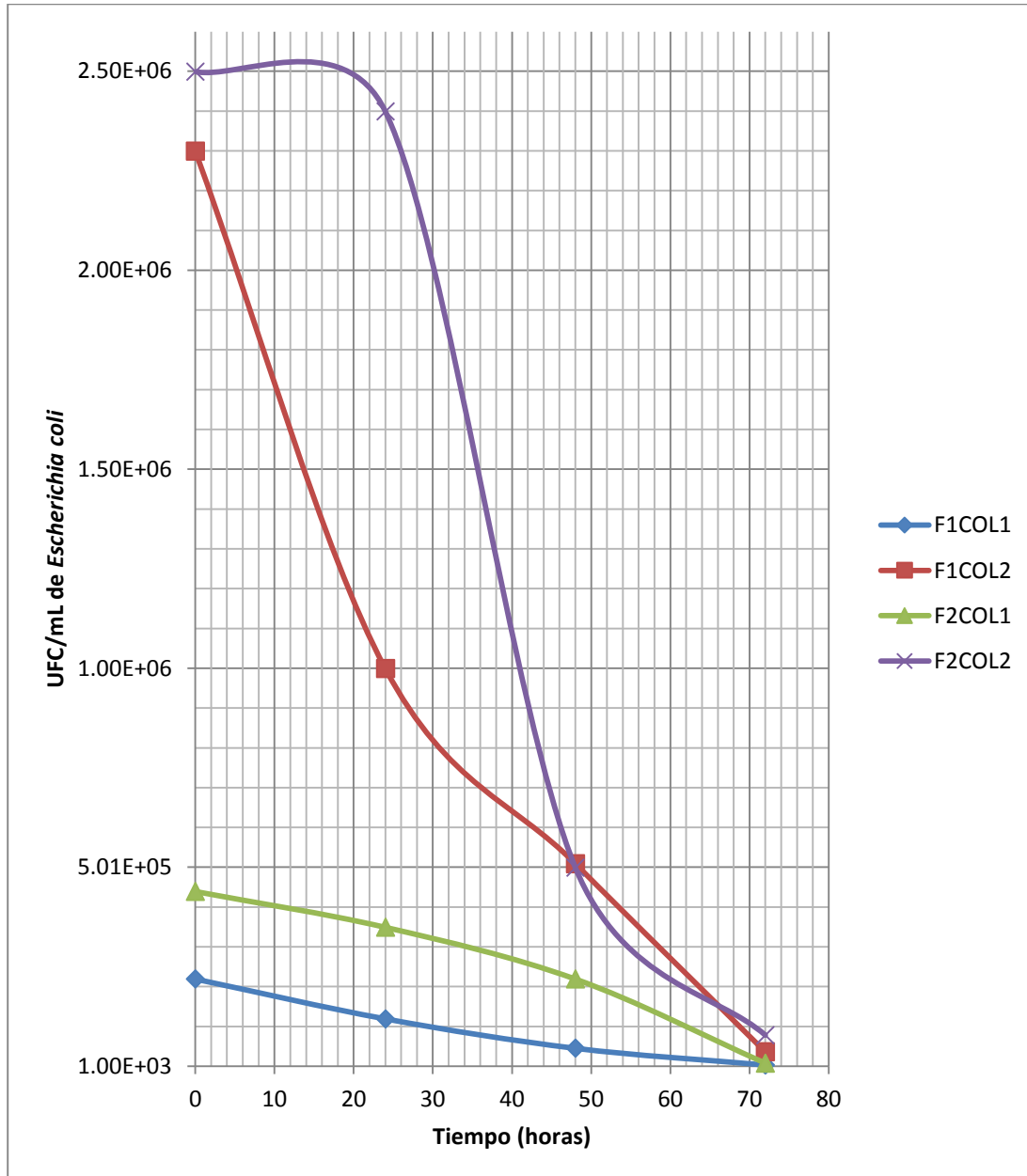


Figura N°22 Efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12® contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2.

La cinética de muerte de *Escherichia coli* para ambas formulaciones fue de Primer orden, dato obtenido de acuerdo a las gráficas Ln de concentración versus el tiempo al convertir las medias de UFC/mL de *Escherichia coli* de cada día al Ln de la concentración (Ln UFC/mL), como muestra la Tabla N°17 y así linealizar el gráfico, obteniendo la ecuación de la línea recta y con ello la pendiente de cada una, que en este caso es la rapidez de muerte del patógeno con una pendiente negativa debido a que la bacteria patógena ha sido inhibida.

La Figura N°23 muestra la cinética de muerte del patógeno, con los promedios de la tabla N°17.

Tabla N°17 Promedio de resultados de la determinación del efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12® contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en formulación F1 y F2, convertido a Logaritmo natural (Ln).

Tiempo (Horas)	F1COL1 UFC/mL	F1COL2 UFC/mL	F2COL1 UFC/mL	F2COL2 UFC/mL
0	12.3	12.99	14.65	14.73
24	11.7	12.77	13.81	14.69
48	10.74	12.3	13.14	13.12
72	8.3	9.06	10.52	11.28

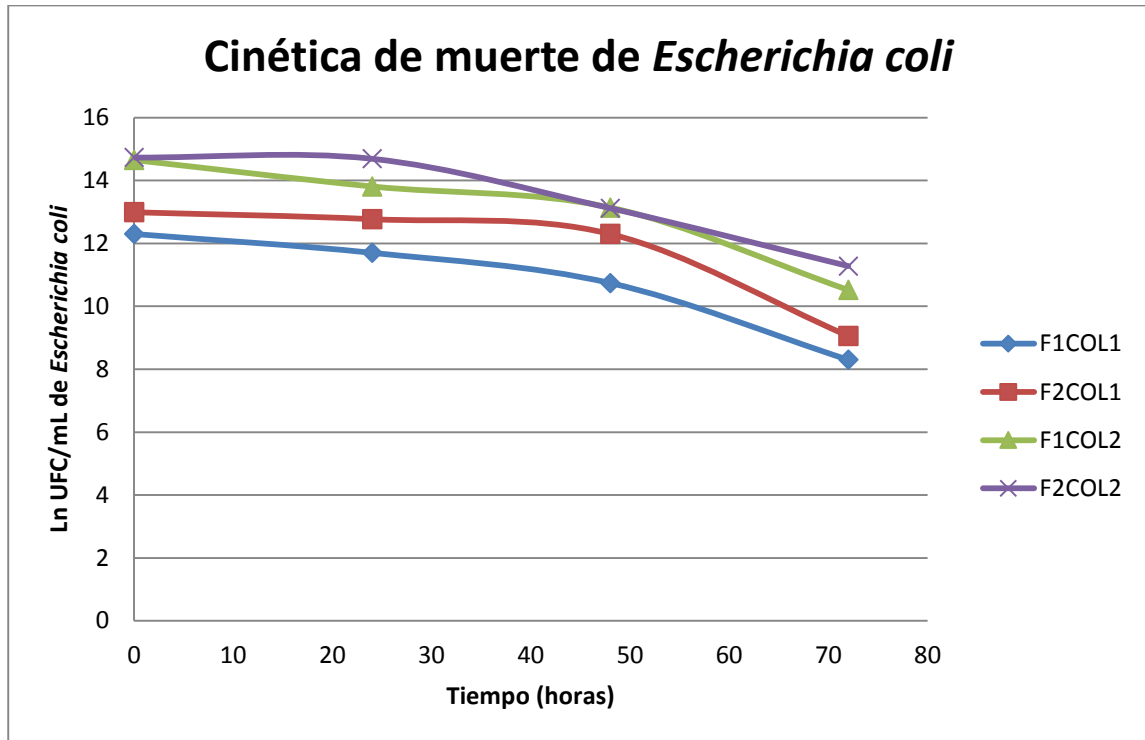


Figura N°23 Cinética de muerte de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria en el ensayo

La Tabla N°18 muestra las pendientes obtenidas para cada combinación, las cuales surgen de la ecuación de la línea recta de cada uno. Esta pendiente es negativa debido a que la bacteria patógena ha sido inhibida.

A mayor pendiente mayor rapidez de muerte, resultando para el ensayo que la cinética de muerte de *Escherichia coli* para F1COL1 Y F1COL2 poseen una cinética de muerte muy similar (0.0540 y 0.0544 respectivamente) como se detalla en la Tabla N°18. Es decir, que la cinética de muerte fue mucho mayor donde el probiótico estaba inoculado en una concentración de  $10^8$  UFC/mL (F1) que donde el probiótico se encontraba en una concentración de  $10^7$  UFC/mL (F2).

Tabla N°18 Ecuación de la línea recta y Cinética de muerte de *Escherichia coli* en el ensayo.

Combinación	Ecuación de la línea recta	Cinética de muerte
F1COL1	$Y = -0.054x + 12.704$	0.0540
F1COL2	$Y = -0.0544x + 14.989$	0.0544
F2COL1	$Y = -0.0511x + 13.619$	0.0511
F2COL2	$Y = -0.0497x + 15.243$	0.0497

#### 5.4.5 Análisis Estadístico ANOVA. <sup>(40)</sup>

En esta investigación se decidió utilizar el Análisis de Varianza Multifactorial (ANOVA), debido a que se buscaba evaluar la interacción de tres factores en los 384 conteos de UFC/mL realizados, los cuales son: la concentración del patógeno *Escherichia coli* como variable dependiente del tiempo y la formulación.

El modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$ : Valores individuales de UFC/mL de *Escherichia coli*.

$\mu$ : Media de los valores individuales de UFC/mL de *Escherichia coli*.

$\alpha_i$ : Efecto del tiempo sobre  $Y_{ijk}$ .

$\beta_j$ : Efecto de la formulación sobre  $Y_{ijk}$ .

$(\alpha\beta)_{ij}$ : Interacción de  $\alpha_i$  y  $\beta_j$  sobre  $Y_{ijk}$ .

$\varepsilon_{ijk}$ : Efecto del error aleatorio no controlado.

Planteamiento de la hipótesis según el modelo:

**Hipótesis nula.**

$H_0 = F1COL1 = F1COL2 = F2COL1 = F2COL2$  en el efecto inhibitorio contra *Escherichia coli*.

Las dos bebidas formuladas con probióticos no poseen una diferencia significativa en el efecto inhibitorio contra *Escherichia coli*.

**Hipótesis alternativa.**

$H_i = F1COL1 \neq F1COL2 \neq F2COL1 \neq F2COL2$  en el efecto inhibitorio contra *Escherichia coli*.

Las dos bebidas formuladas con probióticos poseen una diferencia significativa en el efecto inhibitorio contra *Escherichia coli*.

Se utilizó el método estadístico Análisis de Varianza Multifactorial (ANOVA), con la prueba Mínima Diferencia Significativa (LSD), debido a que la concentración del patógeno dependía de dos factores, los cuales son concentración de probiótico y tiempo. Para este caso solamente tomaremos en cuenta el análisis de Varianza Concentración.



Tabla N° 19 Análisis de Varianza, Concentración.

**Analysis of Variance for CONCENTRACIÓN - Type III Sums of Squares**

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:FORMULACIÓN	1.0221E14	3	3.40698E13	68.17	0.0000
B:TIEMPO	1.04797E14	3	3.49324E13	69.90	0.0000
RESIDUAL	1.88403E14	377	4.99744E11		
TOTAL (CORRECTED)	3.9541E14	383			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

En la tabla N° 19 se observa que el valor de “P-value” es menor a 0.05 lo cual indica que hay una diferencia significativa con un 95% de confianza con 3 grados de libertad entre las concentraciones del patógeno, *Escherichia coli*.

Se aplicó la prueba múltiple de rango para determinar en cual formulación existe una mayor inhibición del patógeno, obteniendo como resultado que la formulación F1 inhibió mayormente a la *Escherichia coli*, como se observa en la siguiente tabla:

Tabla N° 20 Prueba múltiple de rango

**Multiple Range Tests for CONCENTRACIÓN by FORMULACIÓN**

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
F1COL1 - F1COL2	*	-858430.	200631.
F1COL1 - F2COL1		-156324.	200631.
F1COL1 - F2COL2	*	-1.26675E6	200631.
F1COL2 - F2COL1	*	702106.	200631.
F1COL2 - F2COL2	*	-408322.	200631.
F2COL1 - F2COL2	*	-1.11043E6	200631.

\* denotes a statistically significant difference.

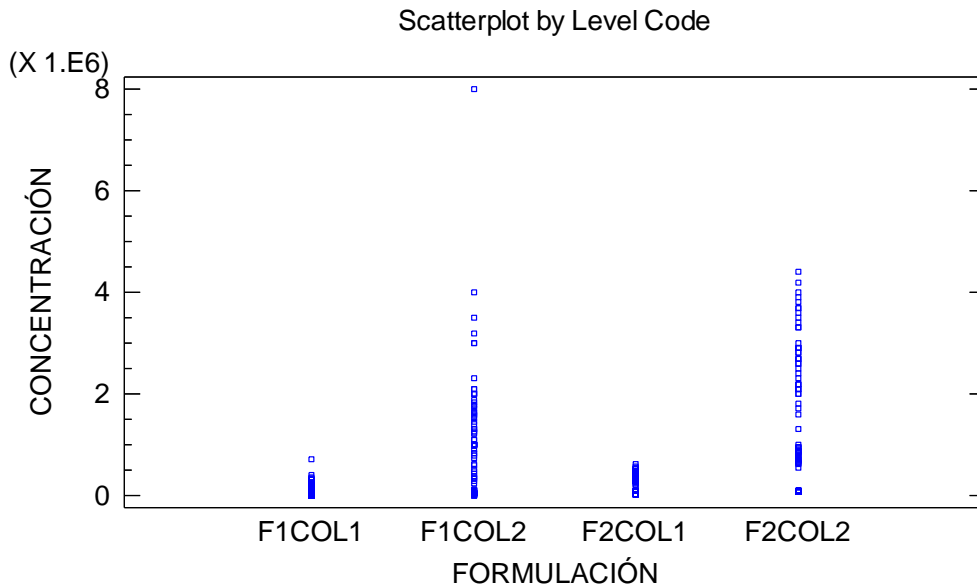


Figura N°24 Gráfico de Prueba Múltiple de rango.

En el gráfico anterior se puede observar las diferentes concentraciones de *Escherichia coli*, al estar en contacto con 2 concentraciones de probióticos. Se puede inferir que las concentraciones de probiótico afecta significativamente la inhibición de este patógeno y de la misma manera se puede verificar que hay una mayor inhibición en las formulaciones donde se ha inoculado el patógeno a menor concentración, es decir, COL1.

Por todo el análisis estadístico realizado se rechaza la hipótesis nula, debido a que existe una diferencia significativa en el efecto inhibitorio contra *Escherichia coli* en las dos bebidas formuladas con probióticos.

#### 5.4.6 Determinación de la viabilidad de probióticos en F1 y F2.

La concentración del probiótico se mantuvo en un logaritmo constante, es decir, concentración igual a la inoculada a la hora cero se mantuvo hasta la hora 72

de análisis, habiendo una pequeña disminución del probiótico donde se encontraba en contacto con la *E. coli*. La viabilidad del probiótico se evaluó durante 4 días consecutivos como indica la metodología en el numeral 4.3.5.5, haciendo conteos de este en la hora 0, 24 y 48 de análisis.

Para este análisis, caso diferente en el pre-ensayo el probiótico se mantuvo dentro del mismo logaritmo de concentración, tanto en el blanco de este y en las bebidas inoculadas con *Escherichia coli*. ( $10^8$  UFC/mL de probiótico).

La tabla N°21 muestra lo detallado anteriormente y se visualiza de una mejor manera en la Figura N°25, donde se grafica el promedio de la concentración de los probióticos a través del tiempo; los resultados de los conteos se encuentran en el Anexo N°16.

Tabla N° 21 Comparación de resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos en F1 y F2.

Hora	UFC/mL probiótico blanco	UFC/mL de probiótico + <i>E. coli</i> $10^5$	UFC/mL de probiótico+ <i>E. coli</i> $10^6$	UFC/mL probiótico blanco	UFC/mL de probiótico + <i>E. coli</i> $10^5$	UFC/mL de probiótico+ <i>E. coli</i> $10^6$
0	2.60E+08	2.60E+08	2.30E+08	2.90E+07	2.50E+07	2.60E+07
24	2.60E+08	2.60E+08	2.20E+08	2.90E+07	2.20E+07	1.90E+07
72	1.90E+08	1.30E+08	1.80E+08	2.80E+07	2.10E+07	1.90E+07

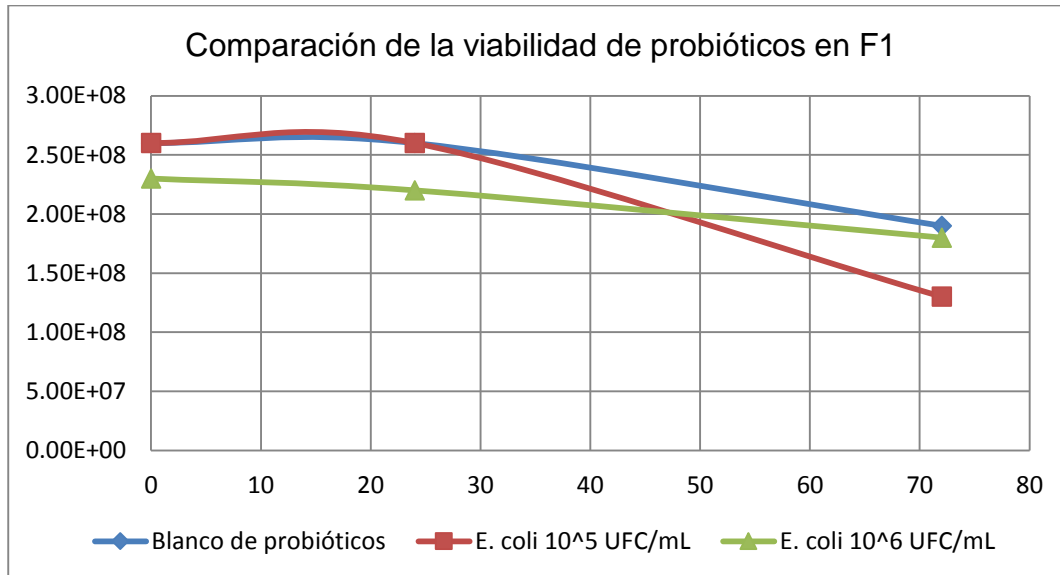


Figura N° 25 Comparación de la viabilidad de probióticos en F1.

En el análisis de la viabilidad de los probióticos en la formulación F2 se mantuvo en una concentración constante desde el momento de su reconstitución hasta la hora 72 de análisis en el caso del blanco mientras que donde se encontraba en contacto con el patógeno, las UFC/mL del probiótico disminuyeron ligeramente, siempre manteniéndose en el mismo logaritmo de concentración en el cual fueron inoculadas.

La tabla N° 21 muestra lo detallado anteriormente y se visualiza de una mejor manera en la Figura N°26, donde se grafica el promedio de la concentración de los probióticos a través del tiempo; los resultados de los conteos se encuentran en el Anexo N°16.

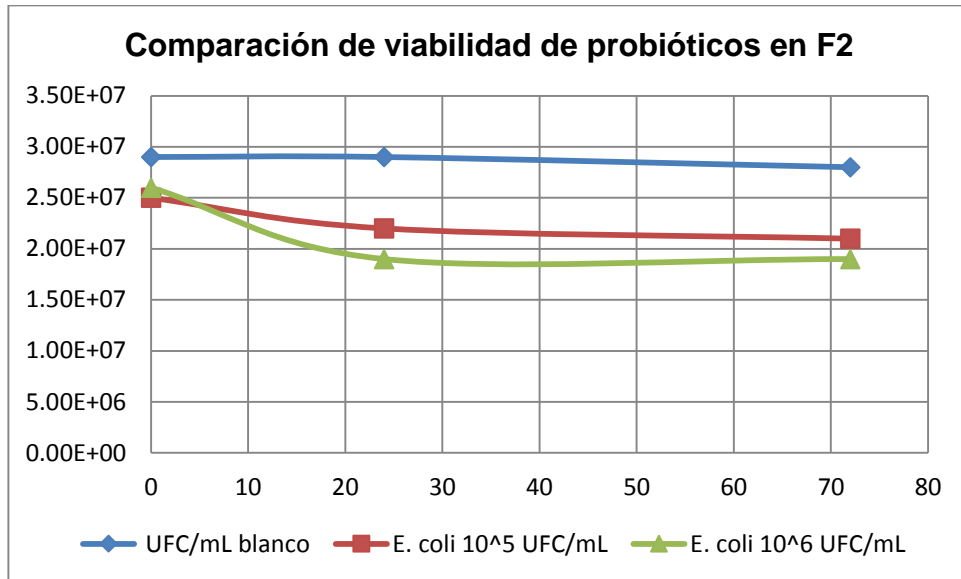


Figura N° 26 Comparación de la viabilidad de probióticos en F2.

#### 5.4.7 Blanco del patógeno *Escherichia coli*.

Este análisis se realizó de acuerdo a la metodología descrita en 4.3.5.6 en donde se evaluó el posible efecto inhibitorio que poseen los componentes del alimento funcional a excepción del probiótico sobre la bacteria patógena *Escherichia coli*. En este caso estos componentes incluyen los descritos en la Tabla N°14 en el ExpFr2.

El comportamiento de la viabilidad de la bacteria patógena, *Escherichia coli*, sin probióticos adicionados, se mantuvo constante en el mismo logaritmo durante las primeras horas del análisis, sin embargo, en las horas siguientes hubo un aumento exponencial de un logaritmo de concentración.

La Tabla N° 22 y N°23 muestran los promedios de los resultados del análisis del blanco del patógeno, y su respectivo gráfico en las Figuras N°27 y N°28.

Tabla N° 22 Promedio de resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^5$  UFC/mL.

Hora	UFC/mL
0	3.30E+05
24	7.80E+05
48	1.80E+06
72	5.10E+06

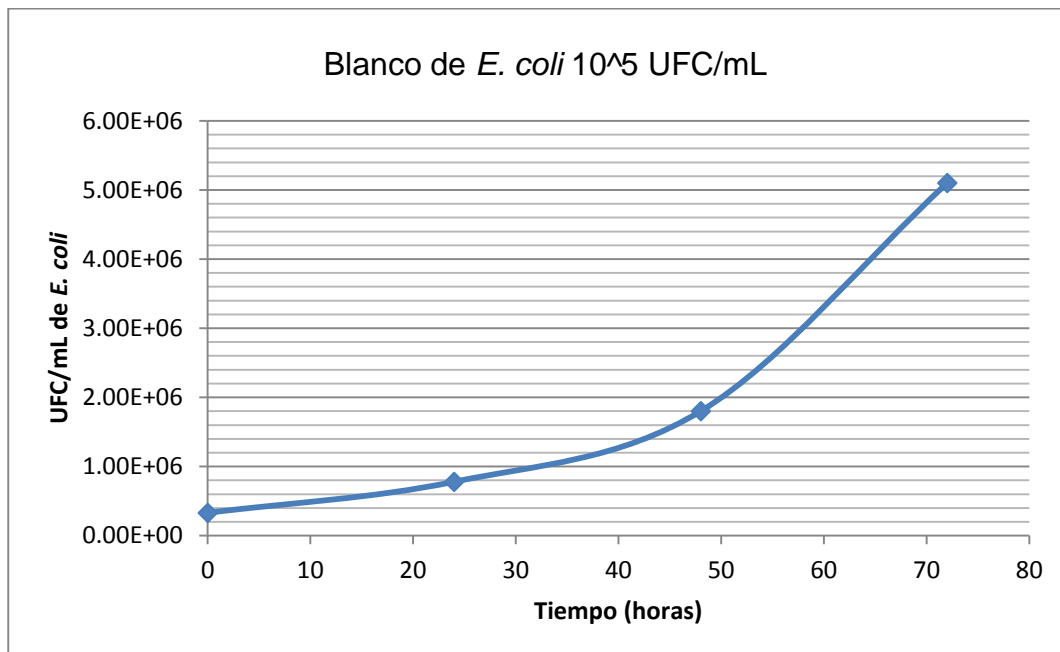


Figura N° 27 Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^5$  UFC/mL.

Tabla N° 23 Promedio de resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^6$  UFC/mL.

Tiempo (Horas)	UFC/mL
0	3.90E+06
24	5.90E+06
48	1.20E+07
72	6.30E+07

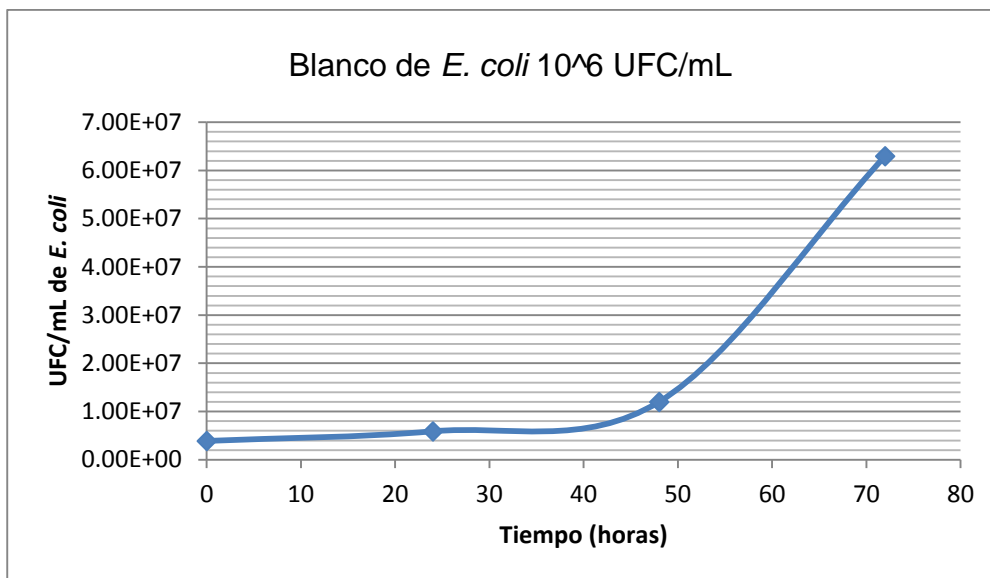


Figura N° 28 Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración  $10^6$  UFC/mL.

### 5.4.8 Prueba preliminar de estabilidad

Para poder evaluar la estabilidad del probiótico junto a la mezcla de materias primas que conforman el producto, se realizó el procedimiento que detalla la metodología en el numeral 4.3.5.7 en la cual define que al producto en polvo se le debe realizar un análisis de viabilidad de probióticos en los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.

Para ambas formulaciones se obtuvo como resultado que el probiótico se mantuvo en la misma concentración logarítmica a lo largo del mes de análisis, por lo que representa que los polvos con los que estuvo en contacto no constituyen un problema para la estabilidad del microorganismo probiótico.

Además se evaluó el pH al reconstituir el alimento y éste se mantuvo en 4.5.

#### 5.4.8.1 Prueba preliminar de estabilidad para F1.

Los resultados de los conteos para la Prueba preliminar de estabilidad para F1, se encuentran en el Anexo N°16, mostrando las medias de los resultados en la Tabla N°24, donde se observa que el probiótico se mantuvo en el mismo logaritmo de concentración desde el día cero hasta el día 30 de análisis.

Tabla N° 24 Promedio de la viabilidad de probióticos en F1 en los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.

Día de análisis	UFC/mL de probiótico
Cero	2.38E+08
15	1.65E+08
30	1.47E+08



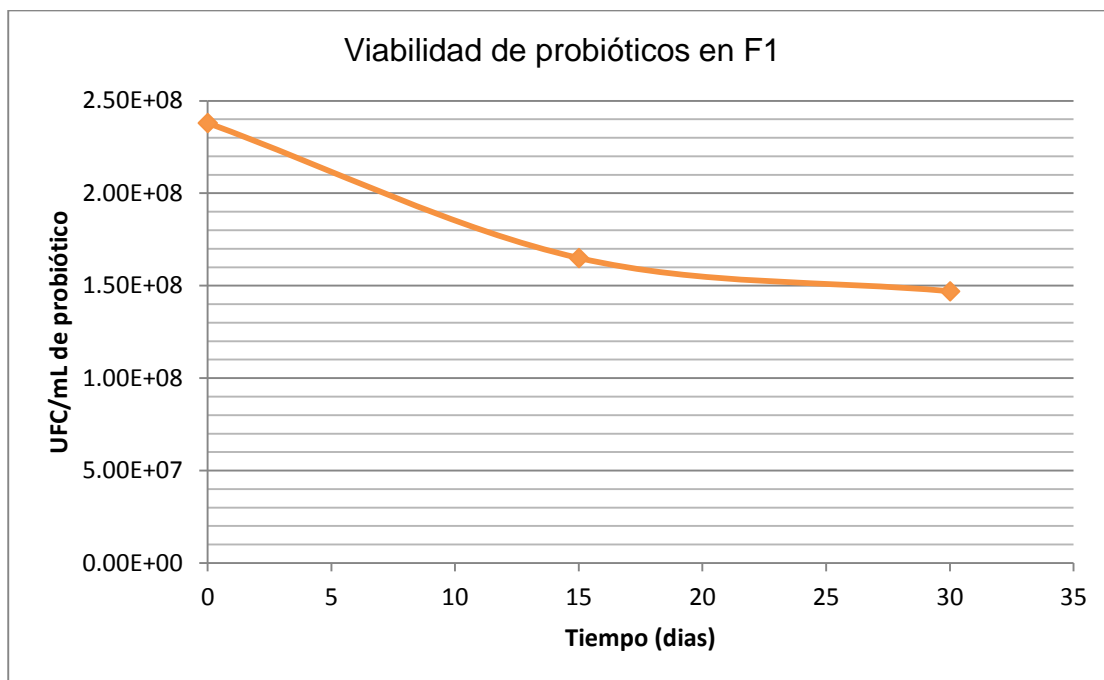


Figura N° 29 Viabilidad de probióticos en F1 en los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.

El gráfico anterior (Figura N°29) muestra como varía la concentración del probiótico a través de un periodo de 30 días, manteniéndose en el mismo logaritmo de concentración para F1, es decir, en un logaritmo de  $10^8$  UFC/mL.

#### 5.4.8.2 Prueba preliminar de estabilidad para F2.

Los resultados de los conteos para la Prueba preliminar de estabilidad para F2, se encuentran en el Anexo N°16, mostrando las medias de los resultados en la Tabla N°25, donde se observa que el probiótico se mantuvo en el mismo logaritmo de concentración desde el día cero hasta el día 30 de análisis.

Tabla N° 25 Promedio de la viabilidad de probióticos en F2 en los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.

Día de análisis	UFC/mL de probiótico
Cero	2.36E+07
15	1.75E+07
30	1.20E+07

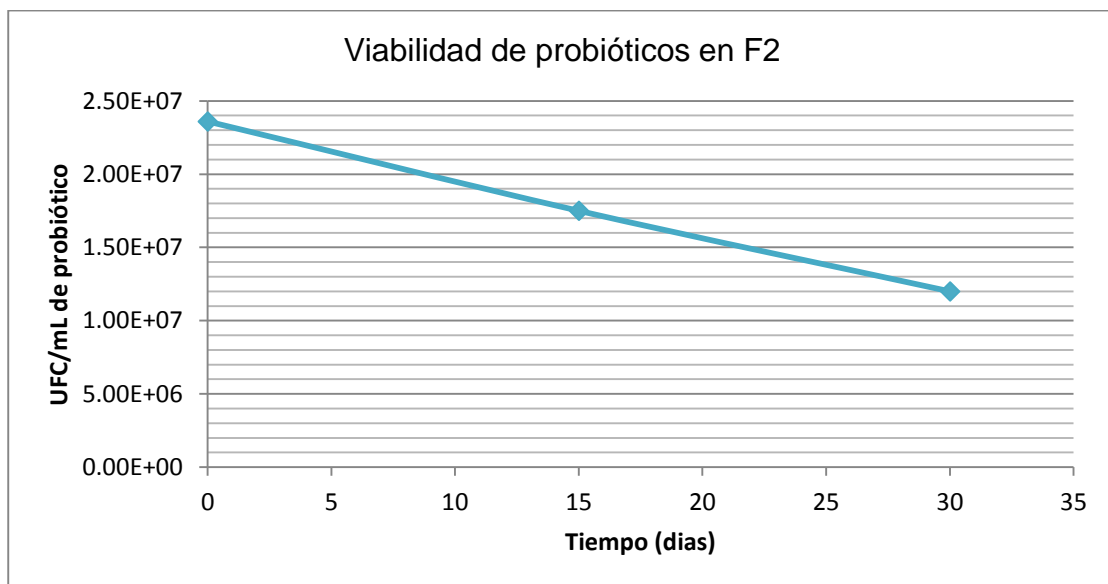


Figura N° 30 Viabilidad de probióticos en F2 en los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.

El gráfico anterior (Figura N°30) muestra como varía la concentración del probiótico a través de un periodo de 30 días, manteniéndose en el mismo logaritmo de concentración para F1, es decir, en un logaritmo de  $10^8$  UFC/mL.

#### **5.4.9 Evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares.**

Para poder evaluar si las cepas bacterianas utilizadas en la formulación del alimento funcional cumplen los requisitos establecidos por la OMS/FAO <sup>(42)</sup> para ser considerado probiótico se realizó el procedimiento de la metodología detallado en el numeral 4.3.5.8.

El porcentaje de sobrevivencia de las células se determinó mediante la fórmula detallada a continuación:

$$\% = (\text{Log UFC N1} / \text{Log UFC N2}) * 100$$

En donde:

N1 es el total de unidades formadoras de colonias obtenidas en el recuento después de la incubación en agar MRS

N2 es el Número inicial de Probióticos inoculados, es decir un blanco.

La Tabla N° 26 describe el conteo de UFC/mL de probióticos del blanco y luego de haber estado en contacto con un pH ácido (sistema A) y con sales biliares (sistema B) incubado a 37°C durante 2 horas en anaerobiosis al 5% de CO<sub>2</sub>, tomando como dato para realizar el cálculo el promedio de las UFC/mL de cada sistema.

Tabla N° 26 Conteo de UFC/mL de probióticos del blanco, sistema A (pH ácido) y Sistema B (sales biliares).

UFC/mL blanco	UFC/mL Sistema A	UFC/mL Sistema B	
4.10E+06	3.83E+05	2.35E+06	
3.80E+06	3.25E+05	2.42E+06	
3.60E+06	4.00E+05	1.90E+06	
4.00E+06	5.00E+05	1.80E+06	
4.00E+06	0.00E+00	1.00E+06	
3.00E+06	0.00E+00	2.00E+06	
3.75E+06	2.68E+05	1.91E+06	Promedio UFC/mL

La tabla anterior indica que el resultado del blanco (N2) fue de 3.75E+06 UFC/mL, es decir el número inicial de probióticos. También indica las UFC/mL de los probióticos luego de someterse a los dos factores de estrés, resultando 2.68E+05 UFC/mL, luego de estar en contacto con acidez y de 1.91E+06 UFC/mL luego de estar en contacto con las sales biliares.

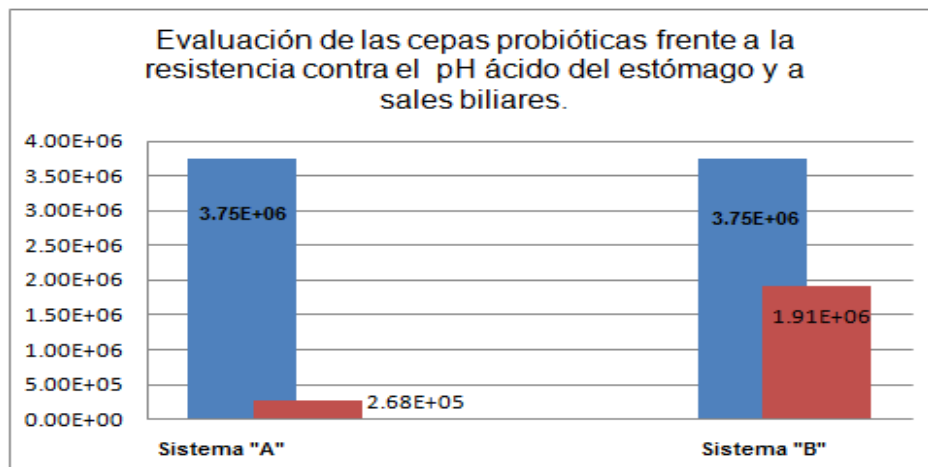


Figura N°31 Evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares.

La Figura N°31, especifica como se ve la diferencia entre la reducción de las UFC/mL en cada sistema, siendo el rectángulo azul el blanco con una concentración inicial de 3.75E+06 UFC/mL y el rectángulo rojo del sistema A, las UFC/mL luego de estar en contacto las cepas probióticas con ácido y por último el rectángulo rojo del sistema B, las UFC/mL luego de estar en contacto las cepas probióticas con las sales biliares.

Las siguiente fórmula representan la evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago, teniendo un porcentaje de sobrevivencia del probiótico del 82.57% y la resistencia frente a las sales biliares con un 95.54%

$$\frac{\text{LogUFCN1}}{\text{LogUFCNo}} \times 100$$

$$\frac{\text{Log } 2.68\text{E} + 05}{\text{Log } 3.75\text{E} + 06} \times 100$$

% Resistencia frente a acidez = 82.57%

$$\frac{\text{LogUFCN1}}{\text{LogUFCNo}} \times 100$$

$$\frac{\text{Log } 1.91\text{E} + 06}{\text{Log } 3.75\text{E} + 06} \times 100$$

% Resistencia frente a sales biliares = 95.54%

#### **5.4.10 Toma de pH inicial y final de Bebidas.**

Para realizar el alimento nutricional se debía contar con pH un poco más ácido que el obtenido en el pre-ensayo; para ello se utilizó la materia prima ácido cítrico que además ayudaba a resaltar el sabor.

El pH que tenía la bebida con probióticos era un pH que no afectara directamente la inhibición de la *Escherichia coli*, ya que este patógeno tiene un pH mínimo de crecimiento de 4.4 y un óptimo de 6-7<sub>(31)</sub>. En cambio los probióticos si pueden sobrevivir a pH ácido debido a sus características.

A cada bebida se le tomó el pH con tiras reactivas, las cuales indicaban un pH inicial y final de 4.5 para todas las bebidas. (Ver Figura N°97).

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. En el pre-ensayo en donde se evaluó la mezcla de probióticos termolábiles, *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12®, en la bebida con caseína, se disminuyó 2 logaritmos en las UFC/mL del patógeno *Escherichia coli* a dos diferentes concentraciones.
2. La formulación de la bebida a base de caseína y probióticos con color rojo carmín y saborizante fresa presentó mejores características organolépticas y mejor estabilidad al dejarlo reconstituido con agua durante 5 días en refrigeración (3°C), es por esto que ésta formulación fue la utilizada para los análisis realizados en el ensayo.
3. Todas las concentraciones de probióticos probadas en los análisis mostraron una inhibición de la bacteria patógena *Escherichia coli*, de dos logaritmo; haciéndola llegar a una concentración menor a la dosis infecciosa causante de diarrea en niños ( $10^3$  UFC/mL).
4. Al analizar el comportamiento de la bacteria patógena frente a la bebida formulada, sin la adición de probióticos, se pudo observar el aumento de la concentración de la bacteria patógena, *Escherichia coli*, concluyendo que los responsables directos de la inhibición del patógeno fueron los probióticos y no algún otro componente de la bebida.
5. En el caso de la prueba preliminar de estabilidad para ambas formulaciones el probiótico se mantuvo en la misma concentración logarítmica a lo largo de los 30 días de análisis, cumpliendo lo que dicta el Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 67.01.60:10 (2012). Etiquetado nutricional de productos alimenticios preenvasados para consumo humano para la población a partir de 3 años de edad.



6. El pH de las bebidas se mantuvo constante durante los 4 días de análisis, obteniendo como resultado un pH inicial y final de 4.5, al igual que en la prueba preliminar de estabilidad, este pH no afecta la viabilidad de los probióticos ni de la bacteria patógena, Siendo el idóneo para los análisis realizados en donde los probióticos se encontraban dentro del mismo medio con el patógeno.
7. Según los resultados de la evaluación de las cepas probióticas frente al pH ácido del estómago y las sales biliares, estas presentan una alta resistencia a estos, siendo del 82.57% y 95.54% respectivamente. Como consecuencia las cepas utilizadas en el ensayo (*Lactobacillus acidophilus* LA-5®, y *Bifidobacterium lactis* BB-12®) son consideradas cepas probióticas según las directrices de evaluación de la FAO/OMS, ya que los porcentajes de resistencia a los factores de estrés (pH ácido del estómago y a sales biliares) son relativamente altos.
8. La hipótesis nula planteada se rechaza ya que existe una diferencia significativa en las concentraciones de la bacteria patógena, *Escherichia coli*, lo que significa que el efecto inhibitorio que ejercieron los probióticos, no es el mismo, varía dependiendo de la concentración de probióticos utilizadas, así como también la concentración del patógeno con el cual esta en contacto. Se utilizó el método estadístico Análisis de Varianza Multifactorial (ANOVA) y la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para obtener los valores de “P-value” y rechazar la hipótesis
9. Con la prueba preliminar de estabilidad se logró comprobar que la concentración de probióticos, que inicialmente se utilizó para la

formulación de la bebida, se mantuvo constante durante un período de 30 días, por lo tanto su capacidad de inhibir a la bacteria patógena *Escherichia coli* se conservó durante este período de tiempo.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. Que el producto formulado en este trabajo de Investigación se le realice un estudio de estabilidad por un periodo mayor de tiempo, para poder evaluar más detalladamente la estabilidad que estas bacterias probióticas presentan a lo largo del tiempo junto a la mezcla de los demás polvos y de esta forma poder determinar la vida útil del producto y poder comercializarlo.
2. Realizar un control de calidad y una investigación del material de empaque primario, éste tiene que proteger las características del producto durante su almacenamiento, ya que es el que está en contacto directo con las cepas bacterianas probióticas. El presente trabajo no englobaba la evaluación del material de empaque que mejor se adecue al producto; Sin embargo las bolsas que contenían las mezclas de polvos, se protegieron de la luz directa y de la humedad con papel aluminio y sílica, respectivamente.
3. Que para la comercialización de este producto se le recomienda poner atención en el tipo de manufactura utilizada en este trabajo de investigación ya que se realizó de esta manera con fines didácticos y ya en la Industria se cuenta con los recursos necesarios para la manufactura correcta de este producto.
4. Dar a conocer a la población Salvadoreña por medio de Organismos Gubernamentales y no gubernamentales, que no solo el yogurt contiene probióticos sino que también otro tipo de alimentos que además proporcionan aporte nutricional, tal es el caso del producto formulado en este trabajo de investigación.

5. Que en futuros trabajos realicen una evaluación de las cepas probióticas investigadas en este trabajo con otros patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales y así determinar el efecto inhibitorio que estos presentan ante los microorganismos causantes de diarreas infantiles.

## BIBLIOGRAFIA

1. Agrobot. Composición de la leche y valor nutritivo. [on line] [Accedido el 20 de marzo de 2014]. Disponible en:  
[http://www.agrobot.com/Info\\_tecnica/Ganaderia/prod\\_lechera/GA000002p r.htm](http://www.agrobot.com/Info_tecnica/Ganaderia/prod_lechera/GA000002p r.htm)
2. Aguirre, M y Collins M.D. (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol*; 75:95-107
3. Alais, Charles (1985). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. España: Ed Reverté S.A. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en:  
[http://books.google.com/sv/books?id=bW\\_ULacGBZMC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/sv/books?id=bW_ULacGBZMC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
4. Álvarez Alcántara, Espigares Rodríguez y Gálvez Vargas. Valoración de desinfectantes. Método de dilución-neutralización. [Internet] Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina, Madrid España. 2001 [acceso 21 julio de 2014]. Disponible en:  
<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd27/higsand14.pdf>
5. An Introduction to Bacterial Identification. The API 20E E Identification System. (2010). [Accedido el 17 de agosto de 2014]. Disponible en: <http://www.jlindquist.net/generalmicro/102bactid2.html>
6. Arribas Arribas, M.B (2009) Probióticos: una estrategia en la modulación del sistema inmune. Tesis de Doctorado no publicada, Universidad de

Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacología, España.

7. Aseal, Asesoría en alimentos. Colorante Annato (2009). [Accedido el 17 de agosto de 2014]. Disponible en:  
<http://grupoaseal.com/productos/colorantes-naturales/annato-achiote>
8. Aseal, Asesoría en alimentos. Colorante Carmín (2009). [Accedido el 17 de agosto de 2014]. Disponible en:  
<http://grupoaseal.com/productos/colorantes-naturales/carmin>
9. Aseal, Asesoría en alimentos. Colorantes (2009). [Accedido el 17 de agosto de 2014]. Disponible en: <http://aseal.net/colorantes.html>
10. Aseal, Asesoría en alimentos. Sabores (2009) [Accedido el 17 de agosto de 2014]. Disponible en: <http://aseal.net/sabores.html>
11. BD Diagnostic Systems Europe. (2003), BD Bifidobacterium Agar, Modified. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en:  
<https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254546.pdf>
12. Bernet, M., Brassart, D., Neeser, J and A, Servin. (1993). Adhesion of Human Bifidobacterial Strains to Cultured Human Intestinal Epithelial Cells and Inhibition of Enteropathogen Cell Interactions. *Applied Environmental Microbiology*. 59: 4121 –4128.
13. BioMérieux, manual api ® 20 E™, Francia 2010.

14. Biota et Scientia. Pruebas microbiológicas para *E. coli*. (15 de Junio de 2011). [Accedido el 17 de agosto de 2014]. Disponible en: <http://biotaetscientia.wordpress.com/2011/06/15/pruebas-microbiologicas-para-e-coli/>
15. Bylund, Gösta (autor); Antonio Madrid Vicente, Antonio López Gómez (traducción). (2002). *Manual de industrias lácteas*. Madrid. Ed. Antonio Madrid Vicente. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://books.google.com/sv/books?id=xcaN14spLCcC&pg=PA25&lpg=PA25&dq=caseina&source=bl&ots=lqFLt85PsH&sig=eWx3HkErkTJLp442mQSfPkEbb9g&hl=es&sa=X&ei=x385U6utMovQsQSyqYCgBA&ved=0CGAQ6AEwDDgK#v=onepage&q=caseina&f=false>
16. Cabello, Raúl R. y Herrera Benavente, Ismael F. (2002). Síndrome diarreico infeccioso. Madrid: Ed. Médica Panamericana.
17. Cabezón Palominos, Patricia. (2010) Adición de cepas probióticas en leche en polvo 26% MG. Tesis de Magíster, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Graduados, Valdivia, Chile.
18. Calderón, Oscar et al. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. ALAN, Caracas, 57, n.1, marzo 2007. [Accedido el 25 de marzo de 2014]. Disponible en [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222007000100007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000100007&lng=es&nrm=iso).



19. Canganella F, Ovidi M, Paganini S, Vettraino A.M, Bevilacqua L, Trovatelli L D. (1998). Survival of undesirable micro-organisms in fruits yoghurts during storage at different temperatures. *Food Microbiol.* 15: 71-7
20. Casas, I. A and Dobrogosz, W. J. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus casei* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. *Microbial Ecology of Health Disease.* Vol.12 (2000); p. 47-285.
21. Chouraqui J.P, Van Egroo L.D and Fichot M.C. (2004) Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; 38(3): pp. 288-92.
22. ChromoCult Coliform Agar. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en: [http://www.proanalise.com.br/files/uploads/catalogos/Merck\\_Chromocult\\_coliform.pdf](http://www.proanalise.com.br/files/uploads/catalogos/Merck_Chromocult_coliform.pdf).
23. CODEX ALIMENTARIUS, leche y productos lácteos; norma del codex para los productos a base de caseína alimentaria. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/015/i2085s/i2085s00.pdf>
24. Collado Amores, M.C (2004), Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis doctorado no publicada,

Universidad politécnica de Valencia, escuela técnica superior de Ingenieros Agrónomos, España. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1907/tesisUPV2209.pdf?sequence=1>

25. Corrales A., Henderson, M., y Morales, I. (2007). Sobrevivencia de microorganismos probióticos en helado batido *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. Revista chilena de nutrición, 34(2), 157-163. [Accedido el 2 de febrero de 2014]. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071775182007002000008&lng=es&tlng=es.10.4067/S071775182007000200008](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182007002000008&lng=es&tlng=es.10.4067/S071775182007000200008).

26. Cueto Vigil, M.C., Acuña Monsalve, Y., y Valenzuela Riaño, J. (2010) Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Acta Biol 32(93): 129-138. [Accedido el 2 de febrero de 2014]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-35842010000200001&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842010000200001&lng=en).

27. Cuví Santiago, J.P. (2004) "Utilización de diferentes niveles de caseína de calcio para la producción de yogurt dietético", Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de ciencias pecuarias, Ecuador. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/915/1/27T055.pdf>

28. Del Miraglia, G.M, y De Luca, M.G. (2004) The role of probiotics in the clinical management of food allergy and atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol*
29. Food and Drug Administration (FDA) (2013), *Bad Bug Book (Second Edition) Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/default.htm>
30. Fuller, R. (1994) *History and development of probiotics*. Christian Hansen, Denmark.
31. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. *Escherichia coli* (28 de febrero de 2013). [Accedido el 10 de junio de 2014]. Disponible en: [http://www.elika.net/datos/pdfs\\_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf](http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf)
32. González, S.N, Apella, M.C, Romero, N.C, Nader de Macías, M.E, y Oliver, G. (1993) Inhibition of enteropathogens by *Lactobacilli* strains used in fermented milk. *J Food Protect*; 56:7736.
33. Himedia Labs (2014, febrero 14) [On line]. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M641.pdf>
34. Hoover, D. (1993) *Bifidobacteria: activity and potential benefits*. *J Food Technology*. 47 (6): 120-124
35. Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom. *Listado de Morbilidad por capítulos por sexo, Consultas de emergencia y egresos hospitalarios en*

el período del 01/01/2013 al 31/12/2013 y del período del 01/01/2014 al 31/01/2014. Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias, Sistema de morbilidad en línea MINSAL (SIMMOW). San Salvador, El Salvador 24 de febrero de 2014.

36. Juárez Manuela, O.A y Morais, F. (2005) Alimentos funcionales, Capítulo II. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología. España.
37. Lucassen, P.L., Assendelft, W. J., Gubbels, J.W., Van Eijk, J.T., y Douwes, A.C. (2000) Infantile colic: crying in time reduction with a whey hydrolysate: a double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Pediatrics* 106, 1349-1354.
38. 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. Tesis de Licenciatura, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, El Salvador.
39. MedlinePlus, (2012) Intolerancia a la lactosa. [Accedido el 8 marzo de 2014]. Disponible en:  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000276.htm>
40. Montgomery Douglas (1991). Diseño y Análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A de C.V. Tempe, Arizona.
41. Morrison, D.J., Mackay, W.G., Edwards, C.A., Preston, T., Dodson, B., y Weaver, L.T. (2006) Butyrate production from oligofructose fermentation

by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? Br J Nutr, 96: 570-577

42. Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt- denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. (2010, Noviembre 16) [On line] [Accedido el 28 de enero de 2014]. Disponible en:  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010)
43. Norma Venezolana COVENIN 2393:2001. Yogurt 3° revisión. (2001, Diciembre) [On line] [Accedido el 28 de enero de 2014]. Disponible en:  
<http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/2393-01.pdf>
44. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Informe del Grupo de Trabajo Conjunto FAO/OMS; Estudios FAO alimentación y nutrición.
45. Organización Mundial de la Salud, Enfermedades diarreicas (Abril de 2013) [On line] [Accedido el 10 de febrero de 2014]. Disponible en:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
46. Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 67.01.60:10 (2012). Etiquetado nutricional de productos alimenticios preenvasados para consumo humano para la población a partir de 3 años de edad.
47. Roldán, M.L., Otero, J.L., Villareal, F., Baroni, M.R., Carrasco, M.S., Álvarez, C., Russell White, K., Méndez, E., Simonetta A.C. (2001). Efecto

inhibidor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. [On line] [Accedido el 5 de marzo de 2014]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562011000100008](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000100008)

48. Rowe, Raymond; Sheskey Paul y Quinn Marian (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (6° edition).
49. Roy, D. (2005). Technological Aspects Related to the Use of Bifidobacteria in Dairy Products. *Le Lait* 85: 39 - 56.
50. Saavedra, J.M., Abi Hanna, A., Moore, N., y Yolken, R.H. (2004) Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety." *The American journal of Clinical Nutrition*; 79(2): pp. 261-7.
51. Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Perman, J.A., Yolken, R.H., y Oung, I. (1994) Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet*; 344(8929): pp. 1046-9.
52. Salud, Nutrición y Bienestar (Octubre de 2013) Cómo elegir un buen probiótico. [On line] [Accedido el 23 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.saludnutricionbienestar.com/como-elegir-un-buen-probiotico/>
53. Samaniego Fernández, L.M., y Sosa del Castillo, M. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Matanzas, Cuba. [Accedido el 5 de marzo de 2014]. Disponible en:

<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH011d/e18c5081.dir/doc.pdf>

54. Schmelzle, H., Wirth, S., Skopnik, H., Radke, M., Knol, J. J., Bockler, H. M., Bronstrup, A., Wells, J., y Fusch, C. (2003) Randomized double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high beta-palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides. *J. Pedriats. Gastroenterol. Nutr.* 36, 343-351.

55. Scielo, *Revista Española de Enfermedades Digestivas* ;(2006)  
Intolerancia a la lactosa. [Accedido el 8 de marzo de 2014]. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-01082006000200009](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082006000200009)

## GLOSARIO (6) (16) (17) (23) (25) (26) (29) (38) (44) (46)

- **Aerotolerante:** Bacterias del ácido láctico, aunque pueden CRECER en presencia de Oxígeno, no pueden utilizarlo, Sino Que obtienen Energía exclusivamente porción fermentación.
- **Anaerobios Facultativos:** Microorganismos aeróbicos, que pueden desarrollarse en ausencia de oxígeno, por medio de la fermentación.
- **Anaerobios:** Los organismos anaerobios o anaeróbicos son los que no utilizan oxígeno (O<sub>2</sub>) en su metabolismo, más exactamente que el aceptor final de electrones es otra sustancia diferente del oxígeno.
- **Bacterias ácido lácticas:** Microorganismos productores de ácido láctico como producto final de su metabolismo.
- **Bacteriocinas:** son péptidos biológicamente activos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos.
- **Cadena de frío:** Es una cadena de suministro de temperatura controlada. Una cadena de frío que se mantiene intacta garantiza al consumidor que el producto de consumo que recibe se ha mantenido dentro de un intervalo de temperaturas durante la producción, el transporte, el almacenamiento y la venta.



- **Caseína:** Principal proteína de la leche y sus derivados, y que presenta un elevado valor biológico por su composición en aminoácidos.
- **Cepa:** Unidad taxonómica. La cepa o clon puede considerarse como una población de características idénticas.
- **Diarrea:** Síndrome caracterizado por un incrementado en la frecuencia, el peso y/o el contenido de agua en las heces.
- **Enterocito:** Células epiteliales del intestino encargadas de absorber diversas moléculas alimenticias y transportarlas al interior del organismo (perteneciente en ser humano y en animales). Se encuentran en el intestino delgado, intestino grueso y en el colon.
- **Inmunoglobulina A:** Clase predominante de anticuerpo en las secreciones seromucosas del organismo como saliva, lágrimas, calostro, leche y secreciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias. Actúan como la defensa inicial contra los patógenos invasores (virus y bacterias) antes de que penetren en el plasma; identifican los antígenos patógenos e impiden que se instalen en las mucosas.
- **Microaerofilia:** Condiciones de baja y estricta concentración de oxígeno que requieren determinados organismos para su desarrollo, conocidos como microaerófilos.

- **Microorganismos Viables:** Aquellos que se encuentran en formas capaces de vivir y reproducirse.
- **pH:** Valor o escala de valores exponenciales (logaritmo negativo de la concentración de iones  $H^+$ ), utilizada para expresar la acidez (valores de 0 a 7) o alcalinidad (valores de 7 a 14) de un medio.

ANEXOS

**ANEXO N° 1**

**Datos Epidemiológicos del Hospital Nacional de Niños Benjamín**

**Bloom. (35)**

**A. CONSULTA DE EMERGENCIA**

Lista de Morbilidad por Capítulos por Sexo.

Período del 01/01/2013 al 31/12/2013

Todas las Consultas

**Emergencia**

Hospital Nacional San Salvador SS "Benjamin Bloom"

----- Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias (A00-B99)

Código	Diagnóstico	Consultas masculina	Consultas femenina	Total Consultas
A09	Diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso	776	617	1,393
A01.0	Fiebre tifoidea	19	22	41
A04.9	Infección intestinal bacteriana, no especificada	6	10	16
B82.9	Parasitosis intestinal, sin otra especificación	6	8	14
A02.0	Enteritis debida a Salmonella	3	3	6
A08.0	Enteritis debida a rotavirus	3	3	6
A08.4	Infección intestinal viral, sin otra especificación	2	4	6
A08.2	Enteritis debida a adenovirus	2	3	5
A07.1	Giardiasis [lambliasis]	1	2	3
B08.4	Estomatitis vesicular enteroviral con exantema	1	2	3
A06.9	Amebiasis, no especificada	3	0	3
A04.2	Infección debida a Escherichia coli enteroinvasiva	0	1	1
B39.4	Histoplasmosis debida a Histoplasma capsulatum, sin otra especificación	1	0	1
A06.1	Amebiasis intestinal crónica	1	0	1
A04.6	Enteritis debida a Yersinia enterocolitica	0	1	1

Lista de Morbilidad por Capítulos por Sexo.

Período del 01/01/2014 al 31/01/2014

Todas las Consultas

**Emergencia**

Hospital Nacional San Salvador SS "Benjamin Bloom"

----- Todos los Recursos ( excepto Odontologo ) -----

Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias (A00-B99)

Código	Diagnóstico	Consultas masculina	Consultas femenina	Total Consultas
A09	Diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso	72	67	139

Fuente: Sistema de Morbimortalidad en Línea MINSAL (SIMMOW)

Página 1

Figura N°32 Datos Epidemiológicos del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.

A04.9	Infección intestinal bacteriana, no especificada	0	1	1
A08.4	Infección intestinal viral, sin otra especificación	1	0	1

**B. EGRESOS HOSPITALARIOS**

Lista de Morbilidad por Capítulos por Sexo Utilizando DIAGNOSTICO PRINCIPAL Período del 01/01/2013 al 31/12/2013 Hospital Nacional San Salvador SS "Benjamin Bloom" Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias (A00-B99)														
Código	Diagnóstico	Masculino				Femenino				Total				
		Muer- tes	Egre- sos	Tasa Letali- dad	Tasa Mortali- dad	Muer- tes	Egre- sos	Tasa Letali- dad	Tasa Mortali- dad	Muer- tes	Egre- sos	Tasa Letali- dad	Tasa Mortali- dad	Días Estan- cia
A04.9	Infección intestinal bacteriana, no especificada	17	137	12.41	0.57	7	120	5.83	0.22	24	257	9.34	0.39	1,411
A08.4	Infección intestinal viral, sin otra especificación	2	114	1.75	0.07	2	106	1.89	0.06	4	220	1.82	0.06	797
B34.9	Infección viral, no especificada	0	42	0.00	0.00	0	30	0.00	0.00	0	72	0.00	0.00	193
A01.0	Fiebre tifoidea	0	14	0.00	0.00	0	15	0.00	0.00	0	29	0.00	0.00	145
B82.9	Parasitosis intestinal, sin otra especificación	0	6	0.00	0.00	0	4	0.00	0.00	0	10	0.00	0.00	73
A08.0	Enteritis debida a rotavirus	0	4	0.00	0.00	0	5	0.00	0.00	0	9	0.00	0.00	34
A02.0	Enteritis debida a Salmonella	0	3	0.00	0.00	0	4	0.00	0.00	0	7	0.00	0.00	29
A04.8	Otras infecciones intestinales	0	3	0.00	0.00	0	2	0.00	0.00	0	5	0.00	0.00	15

Figura N°32 Continuación de Datos Epidemiológicos del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom

	bacterianas específicas														
A41.8	Otras septicemias específicas	0	3	0.00	0.00	0	1	0.00	0.00	0	4	0.00	0.00	89	
B77.0	Ascariasis con complicaciones intestinales	0	1	0.00	0.00	0	3	0.00	0.00	0	4	0.00	0.00	35	
A18.2	Linfadenopatía periférica tuberculosa	0	2	0.00	0.00	0	1	0.00	0.00	0	3	0.00	0.00	51	
B01.1	Encefalitis debida a varicela (G05.1*)	0	0		0.00	0	3	0.00	0.00	0	3	0.00	0.00	16	
A09	Diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso	0	2	0.00	0.00	0	0		0.00	0	2	0.00	0.00	8	
A02.2	Infecciones localizadas debidas a Salmonella	0	0		0.00	1	1	100.00	0.03	1	1	100.00	0.02	2	
A06.0	Disentería amebiana aguda	0	0		0.00	0	1	0.00	0.00	0	1	0.00	0.00	3	

**Lista de Morbilidad por Capítulos por Sexo  
Utilizando DIAGNOSTICO PRINCIPAL  
Período del 01/01/2014 al 31/01/2014  
Hospital Nacional San Salvador SS "Benjamin Bloom"**

**Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias (A00-B99)**

Código	Diagnóstico	Masculino				Femenino				Total				
		Muertes	Egresos	Tasa Letalidad	Tasa Mortalidad	Muertes	Egresos	Tasa Letalidad	Tasa Mortalidad	Muertes	Egresos	Tasa Letalidad	Tasa Mortalidad	Días Estancia

Figura N°32 Continuación de Datos Epidemiológicos del Hospital Nacional Niños Benjamín Bloom

A04.9	Infección intestinal bacteriana no especificada	1	11	9.09	0.03	0	9	0.00	0.00	1	20	5.00	0.02	80
A08.4	Infección intestinal viral sin otra especificación	1	8	12.50	0.03	0	6	0.00	0.00	1	14	7.14	0.02	398
B34.9	Infección viral no especificada	0	1	0.00	0.00	0	3	0.00	0.00	0	4	0.00	0.00	13
A02.0	Enteritis debida a Salmonella	0	0		0.00	0	1	0.00	0.00	0	1	0.00	0.00	6


Figura N°32 Continuación de Datos Epidemiológicos del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom



## ANEXO N° 2

### Informe de análisis de identificación de cepa patógena *Escherichia coli* dada por el Laboratorio de Análisis Clínico, Departamento de Bacteriología del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.

HOSPITAL NACIONAL "BENJAMIN BLOOM" LABORATORIO DE ANALISIS CLINICOS DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGIA	
<b>Informe de paciente (Valor predeterminado)</b>	
Apellidos, Nombre: ,	Diagnostico: No tiene diagnostico
No. expediente: 01	Edad:
No. expediente:: 01	Loda. Responsable: Patricia Henriquez
Tipo de muestra: Cepa bacteriana	Procedencia:
Area corporal:	Servicio:
Fecha de recepcion: 11/02/2014 11:37 AM	Fecha de finalizado: 11/02/2014 11:37 AM
Comentario de la muestra: Serotipificacion E.coli O157 :H7 : NEGATIVO	Tipo de examen: Cepa Bacteriana : Eschericha coli
Número de muestra: 01	
Observacion directa: No realizada	

  
**Lic. Patricia Evelyn Henriquez**  
LICENCIADA EN LABORATORIO CLINICO  
J.V.P.L.C. No. 1523

Página 1 de 1 11/02/2014 11:43 AM

Figura N°33 Informe de análisis de identificación de la cepa patógena  
*Escherichia coli*.

### **ANEXO N° 3**

**Procedimientos a realizar para la identificación de la cepa patógena *Escherichia coli***

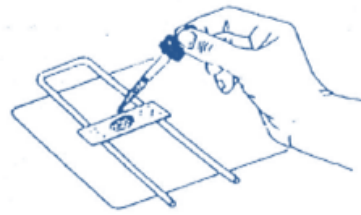
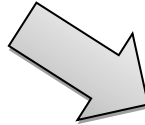
Tomar con un asa estéril una colonia aislada de *E. coli*, cepa hospitalaria.



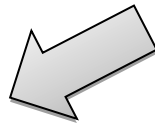
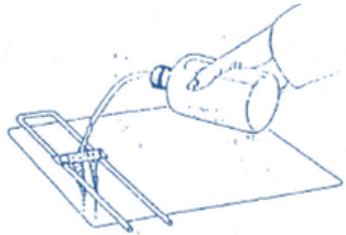
Extenderlo sobre una gota de solución salina en un porta objeto de vidrio, para formar una película.



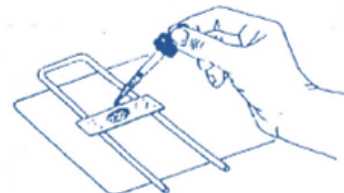
Flamear el frotis y luego deje secar cerca del mechero.



Aplicar al frotis unas cuantas gotas de solución de cristal violeta y dejar actuar durante un minuto.

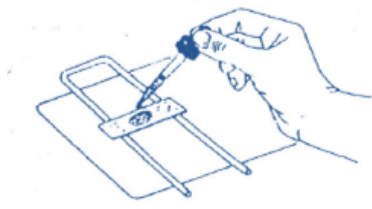


Enjuagar con agua destilada y agregar unas gotas de lugol, dejar actuar un minuto.

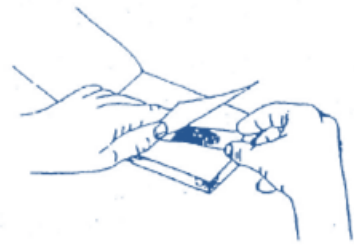


Enjuague con agua destilada y decolorar de inmediato con alcohol-acetona. Luego enjuague con agua destilada.

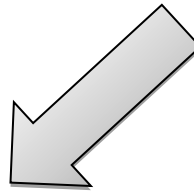
Figura N° 34 Frotis bacteriano y tinción gram.



Después adicione gotas de safranina hasta cubrir el frotis, espere 1 minuto y enjuague con agua destilada

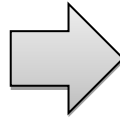
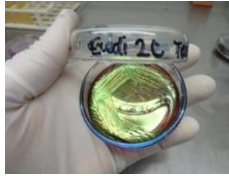


Elimine el exceso de agua y seque con papel toalla para quitar la humedad.



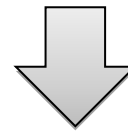
Observe al microscopio y determine la morfología

Figura N° 34 Continuación frotis bacteriano y tinción gram.

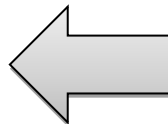
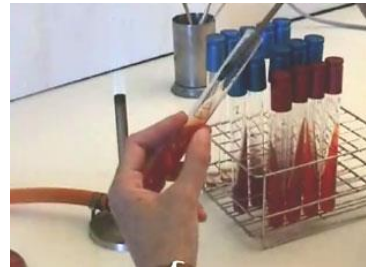


Inocular los tubos que contienen RM, VP, Indol con una colonia aislada con asa en anillo.

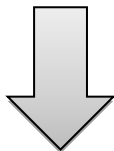
A partir de la *E. coli* previamente identificada en medio selectivo EMB, se inoculará en agar TSA y a partir de este realizarán las pruebas bioquímicas



Para la prueba de movilidad el microorganismo se inoculara por picadura hasta el fondo del tubo con el asa en punta.



Los tubos con agar TSI y Citrato se inocularan por picadura hasta el fondo del tubo y por estría en la superficie.



Incubar los tubos a  $37 \pm 2$  °C durante 24- 48 horas.



Realizar la lectura de los tubos mediante la comparación con tubos control, que contienen los mismos medios de cultivo pero sin microorganismo inoculado.

Figura N° 35 Pruebas bioquímicas.

Cuadro N° 8 Lectura de pruebas bioquímicas.

<b>Prueba</b>	<b>Procedimiento</b>
<b>Indol</b>	Agregue 5 gotas de éter etílico +5 gotas de reactivo de Erlich. Si es (+) color rojo a rojo violeta.
<b>Rojo de metilo</b>	Agregue 5 gotas de rojo de Metilo. Si es (+) color rojo.
<b>Voges Proskahuer</b>	Adicione 1 mL de KOH + 15 gotas de alfa-naftol. Si es (+) color rojo, rosado o violeta.
<b>Citrato</b>	Medio de color verde inicial .Cambia a azul si la prueba es (+) después de la incubación.
<b>Movilidad</b>	Observar el crecimiento del microorganismo.
<b>TSI</b>	Ver coloración de bisel y fondo. Observar producción de gas y H <sub>2</sub> S.

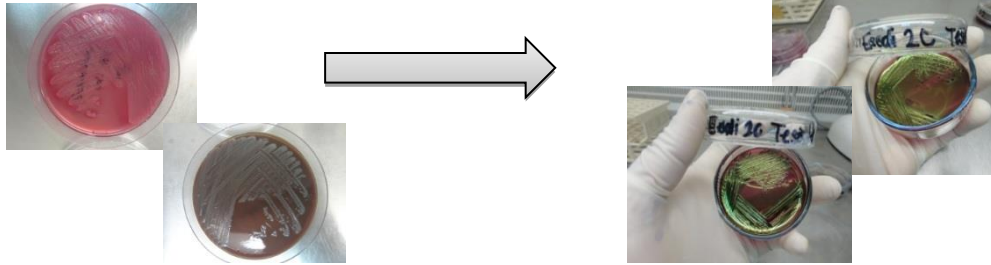
Cuadro N° 9 Lectura de pruebas api20E

PRUEBA	SUSTRATO	REACCIÓN PROBADA	RESULTADO NEGATIVO	RESULTADO POSITIVO
ONPG	ONPG	Beta-galactosidasa	Incoloro	Amarillo
ADH	Arginina	arginina deshidrolasa	Amarillo	Rojo-anaranjado
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Rojo-anaranjado
ODC	Ornitidina	Ornitidina descarboxilasa	Amarillo	Rojo-anaranjado
CIT	Citrato	Utilización de citrato	Verde palido	Azul- azul verdoso
H <sub>2</sub> S	Tiosulfato Na	Producción de H <sub>2</sub> S	Incoloro-grisáceo	Deposito negro
URE	Urea	Hidrolisis de urea	Amarillo	Rojo-anaranjado
TDA	Triptófano	Desaminasa	Amarillo	Marrón-rojizo
IND	Triptófano	Producción de indol	Incoloro- verde pálido-amarillo	Rosa
VP	Piruvato Na	Producción de acetoina	Incoloro-rosa pálido	Rosa-rojo
GEL		Gelatinasa	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	Glucosa	Fermentación/ oxidación	Azul- azul verdoso	Amarillo grisáceo
MAN	Manitol	Fermentación/ oxidación	Azul- azul verdoso	Amarillo
INO	Inositol	Fermentación/ oxidación	Azul- azul verdoso	Amarillo
SOR	Sorbitol	Fermentación/ oxidación	Azul- azul verdoso	Amarillo
RHA	Ramnosa	Fermentación/ oxidación	Azul- azul verdoso	Amarillo
SAC	Sucrosa	Fermentación/ oxidación	Azul- azul verdoso	Amarillo
MEL	Melibiosa	Fermentación/ oxidación	Azul- azul verdoso	Amarillo
AMY	Amigdalina	Fermentación/ oxidación	Azul- azul verdoso	Amarillo
ARA	Arabinosa	Fermentación/ oxidación	Azul- azul verdoso	Amarillo
OX	Oxidasa	Citocromo oxidasa	Incoloro-amarillo	Violeta

## **ANEXO N° 4**

**Procedimientos a realizar para el mantenimiento y estandarización de la cepa patógena *Escherichia coli***

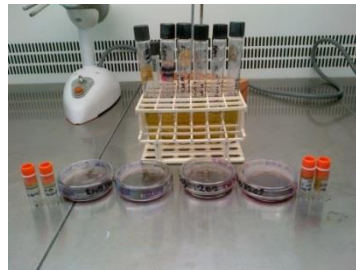




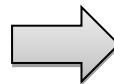
Cepa patógena *Escherichia coli*, se obtuvo a partir de un coprocultivo de niño con diarrea del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.

Se comprobó la presencia de *E. coli* sembrando colonias aisladas en el medio agar EMB, dando un resultado positivo, el cual se manifiesta con un color verde metálico.

A partir de colonias en EMB, se inoculó *E. coli* en tubos y crioviales con caldo BHI dejándolos incubar por 24 horas a 37°C.



Luego de su crecimiento se colocaron los tubos con BHI en refrigeración a 3°C y los crioviales en congelación a -18°C.



A las tres semanas de refrigeración, la bacteria crecida en caldo BHI se procederá a su reanimación.

Figura N° 36 Mantenimiento de la bacteria patógena *Escherichia coli*.

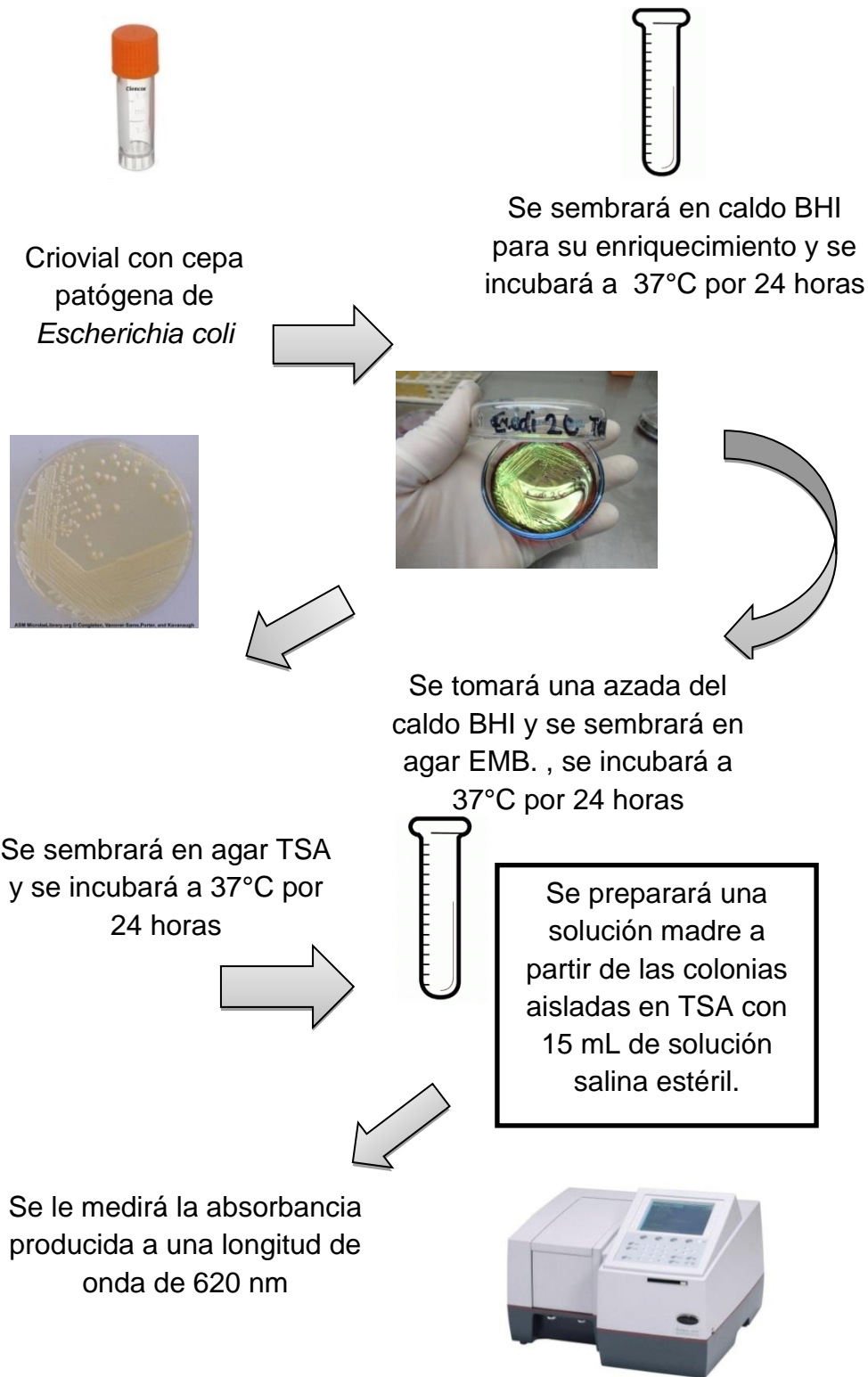


Figura N° 37 Estandarización de la bacteria patógena *Escherichia coli*.

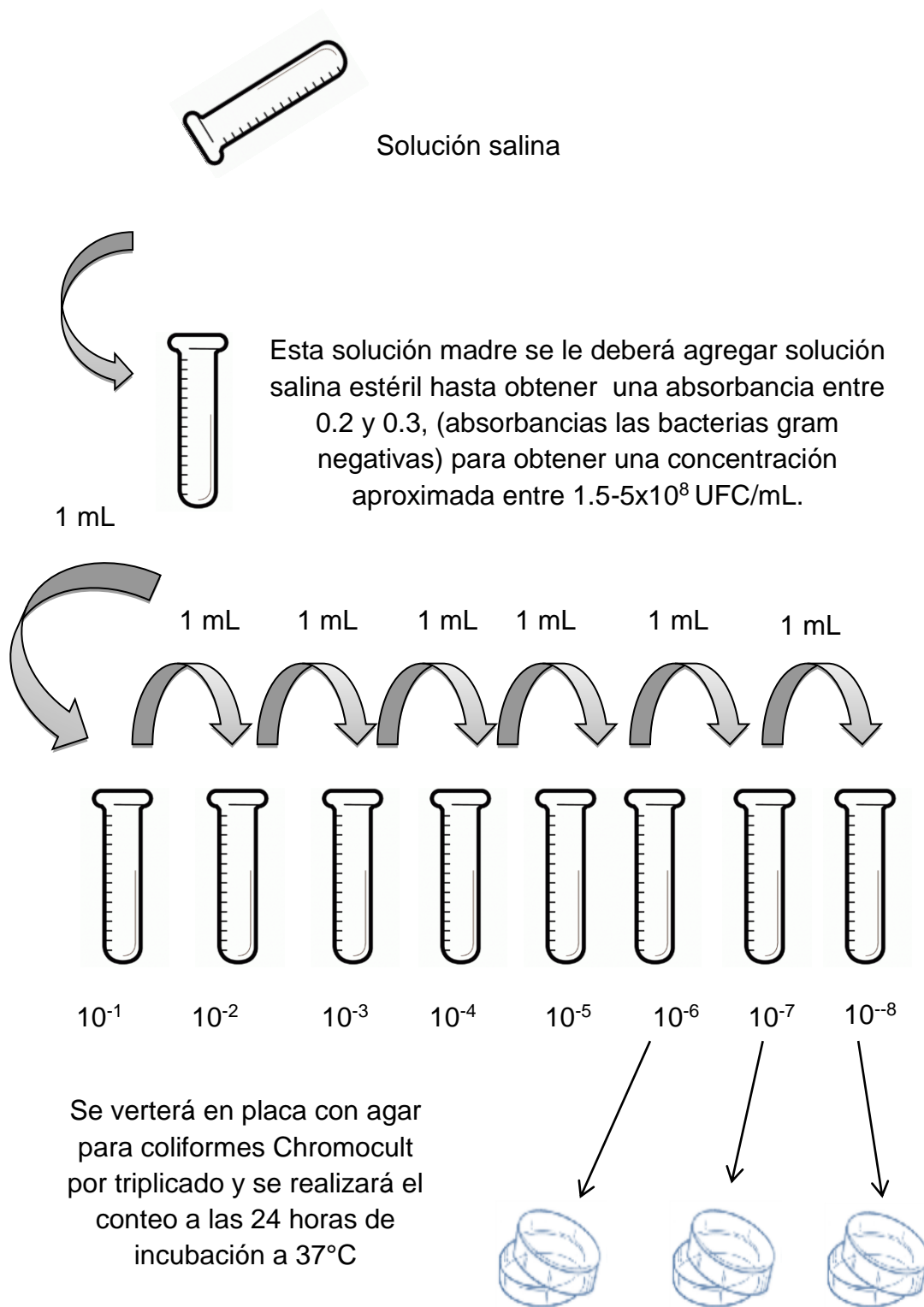


Figura N° 37 Continuación de estandarización de la bacteria patógena *Escherichia coli*.

## Anexo N°5

### Resultados de los conteos del probiótico ABY-3 que se utilizaron para determinar UFC por cada gramo.

Para realizar esta determinación se llevó a cabo la metodología del numeral 3.3.4.1., en la cual describe que se pesó 1.0g de producto ABY-3 y se mezcló con 100.0mL de caldo MRS, luego se tomó una alícuota de 1.0mL para el inicio de la determinación, es decir, que al tomar 1.0mL tomamos el equivalente de 0.01g de producto ABY-3.

1.0 gramos de ABY-3 ----- 100mL de caldo MRS  
X gramos de ABY-3 ----- 1.0mL de caldo MRS

$$X = 0.01 \text{ gramos de ABY-3}$$

Entonces según los resultados de la Tabla N° 7

0.01 gramos de ABY-3  $\approx 10^8$  UFC

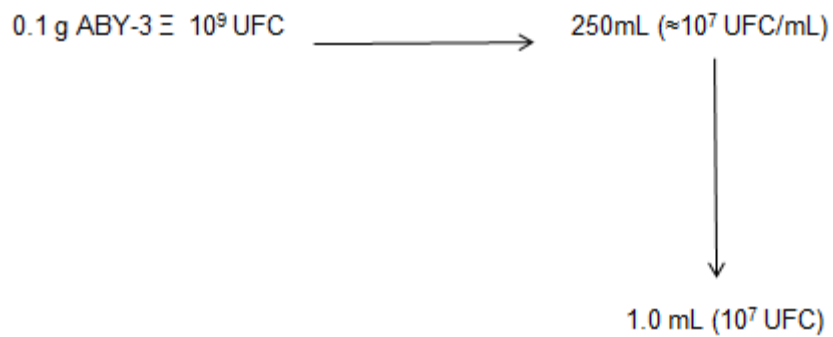
0.10 gramos de ABY-3  $\approx 10^9$  UFC

1.00 gramos de ABY-3  $\approx 10^{10}$  UFC

## Anexo N° 6

**Cálculos utilizados para determinar la cantidad de ABY-3 equivalente a las concentraciones de probióticos requeridas.**

A continuación se presentan las cascadas de dilución utilizadas para la formulación F1, la cual es una bebida de 250 mL con una concentración de probióticos de  $10^7$  UFC/mL..



## **ANEXO N° 7**

**Procedimientos de los análisis a realizar en el pre-ensayo.**

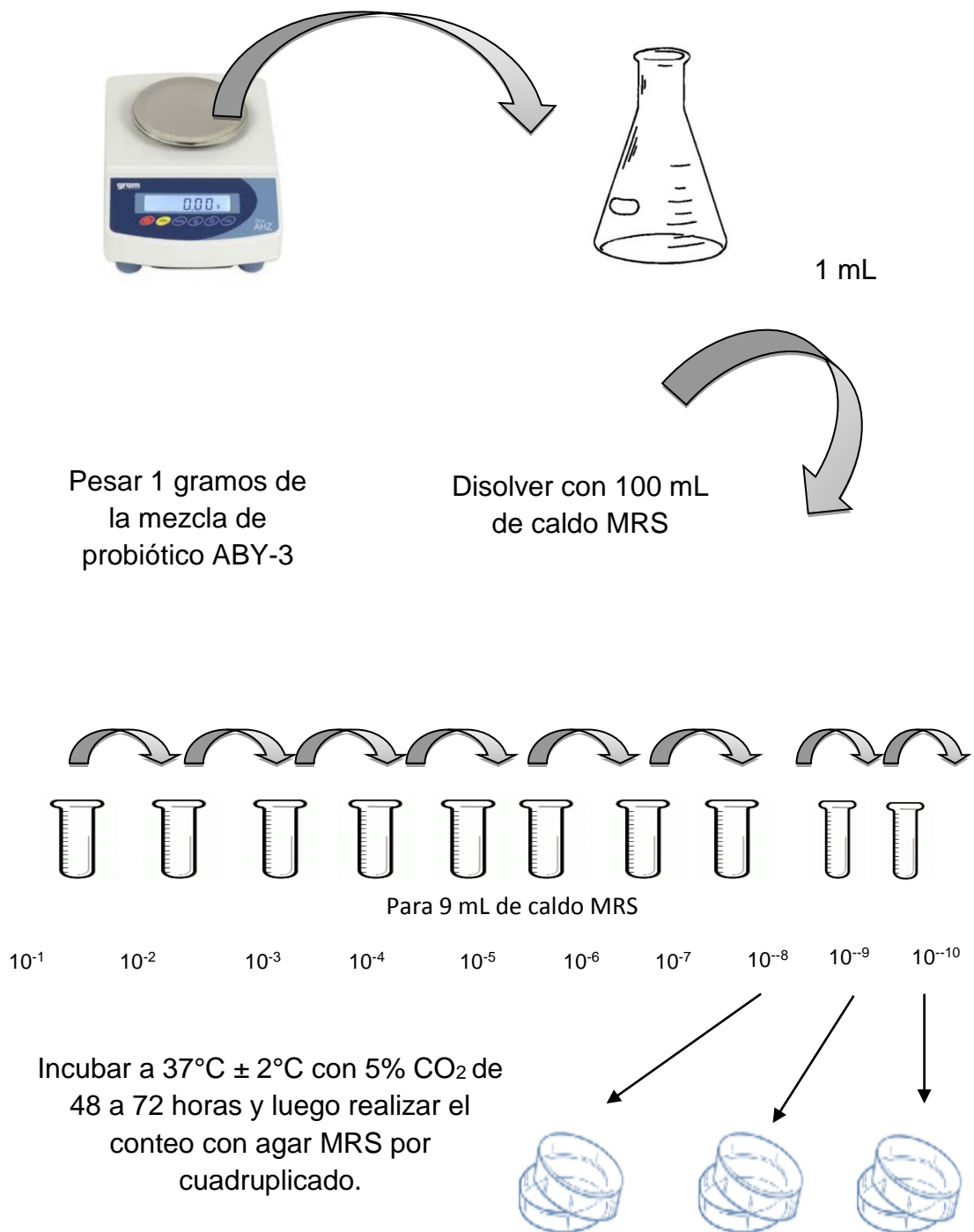
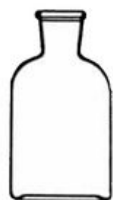


Figura N° 38 Tratamiento de la mezcla de probióticos ABY-3



F1

Agregar a un frasco de vidrio estéril con tapón de rosca:

- ✓ 250 mL Agua estéril
- ✓ Caseinato de calcio al 3.4%
- ✓ Cantidad de probióticos equivalente a  $10^7$  UFC/mL



F2

Agregar a un frasco de vidrio estéril con tapón de rosca:

- ✓ 250 mL Agua estéril.
- ✓ Caseinato de calcio al 3.4%
- ✓ Cantidad de probióticos equivalente a  $10^6$  UFC/mL

Figura N° 39 Preparación de las Formulaciones F1 y F2



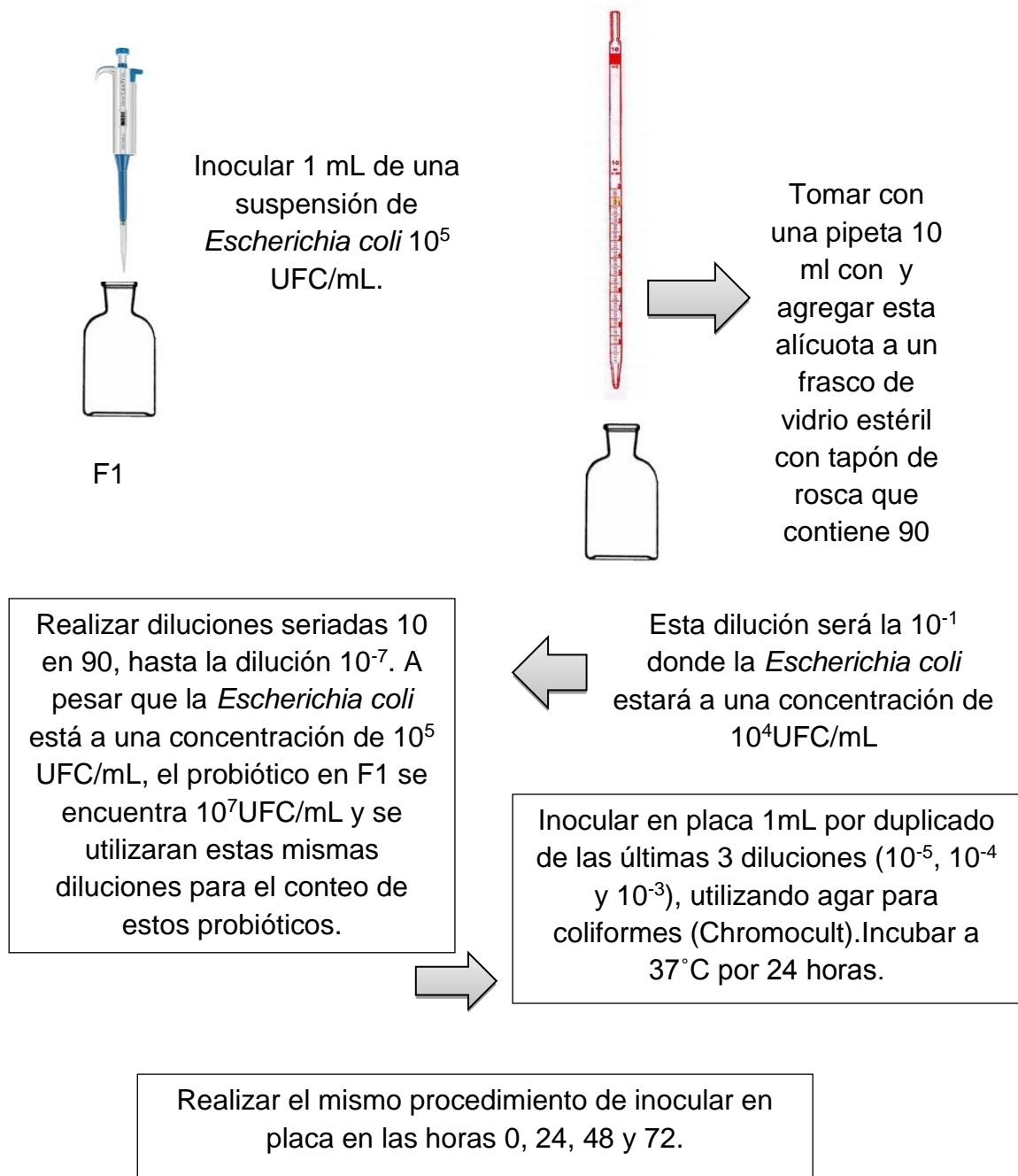


Figura N° 40 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 en F1 contra *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL.

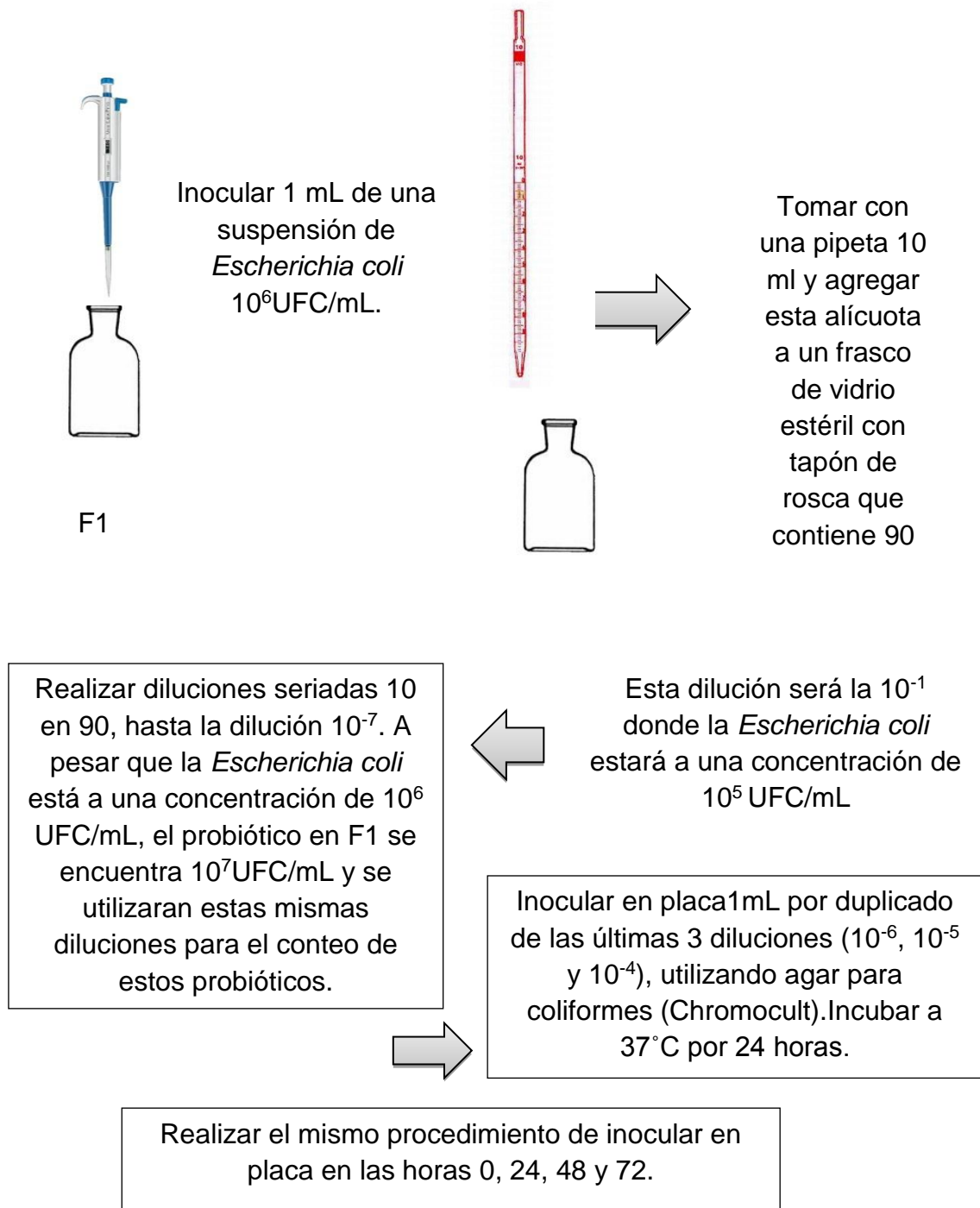


Figura N° 41 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3en F1 contra *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL.

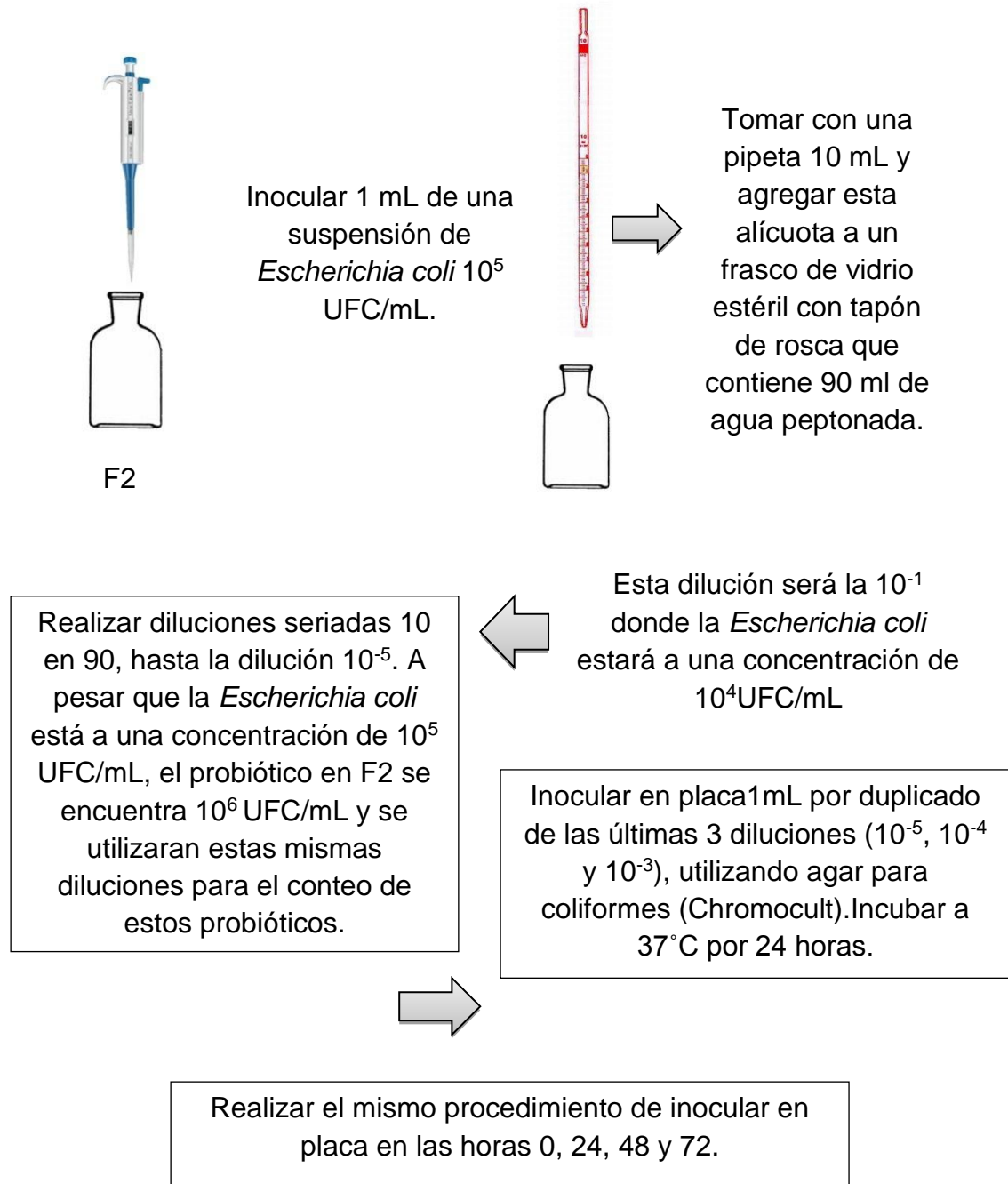


Figura N° 42 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 en F2 contra *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL.

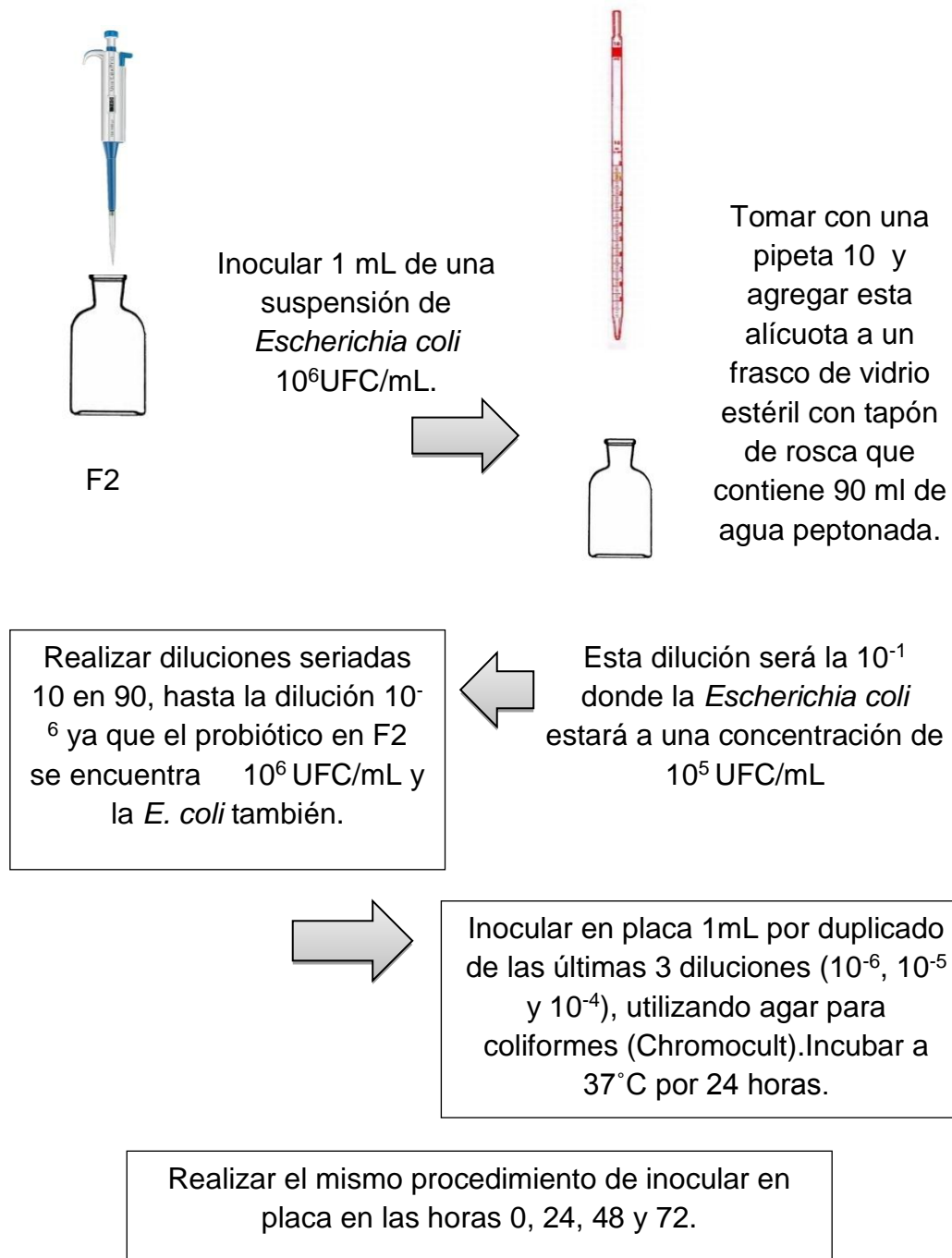


Figura N° 43 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 en F2 contra *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL.

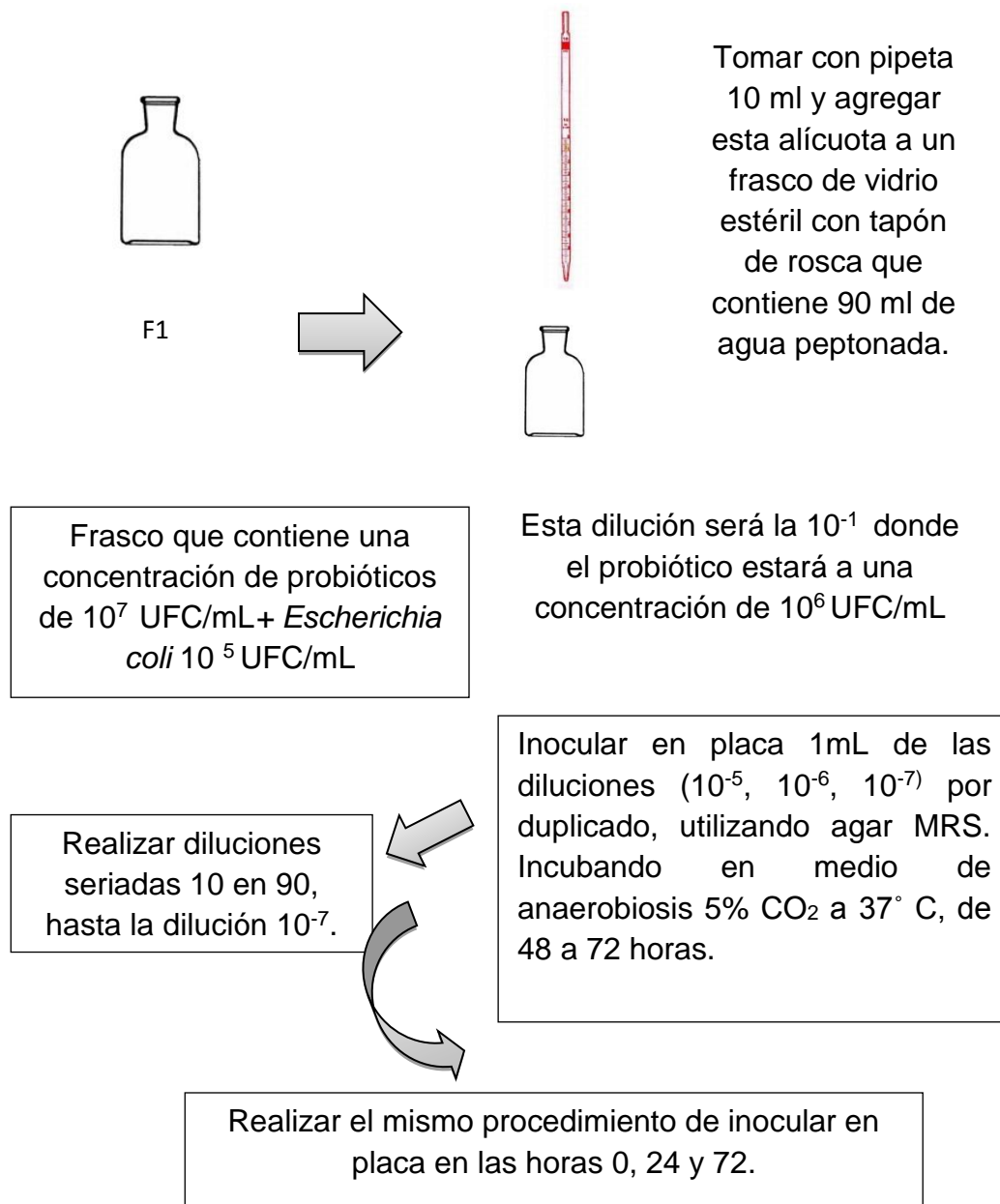


Figura N° 44 Conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad en F1, donde se inocula *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL

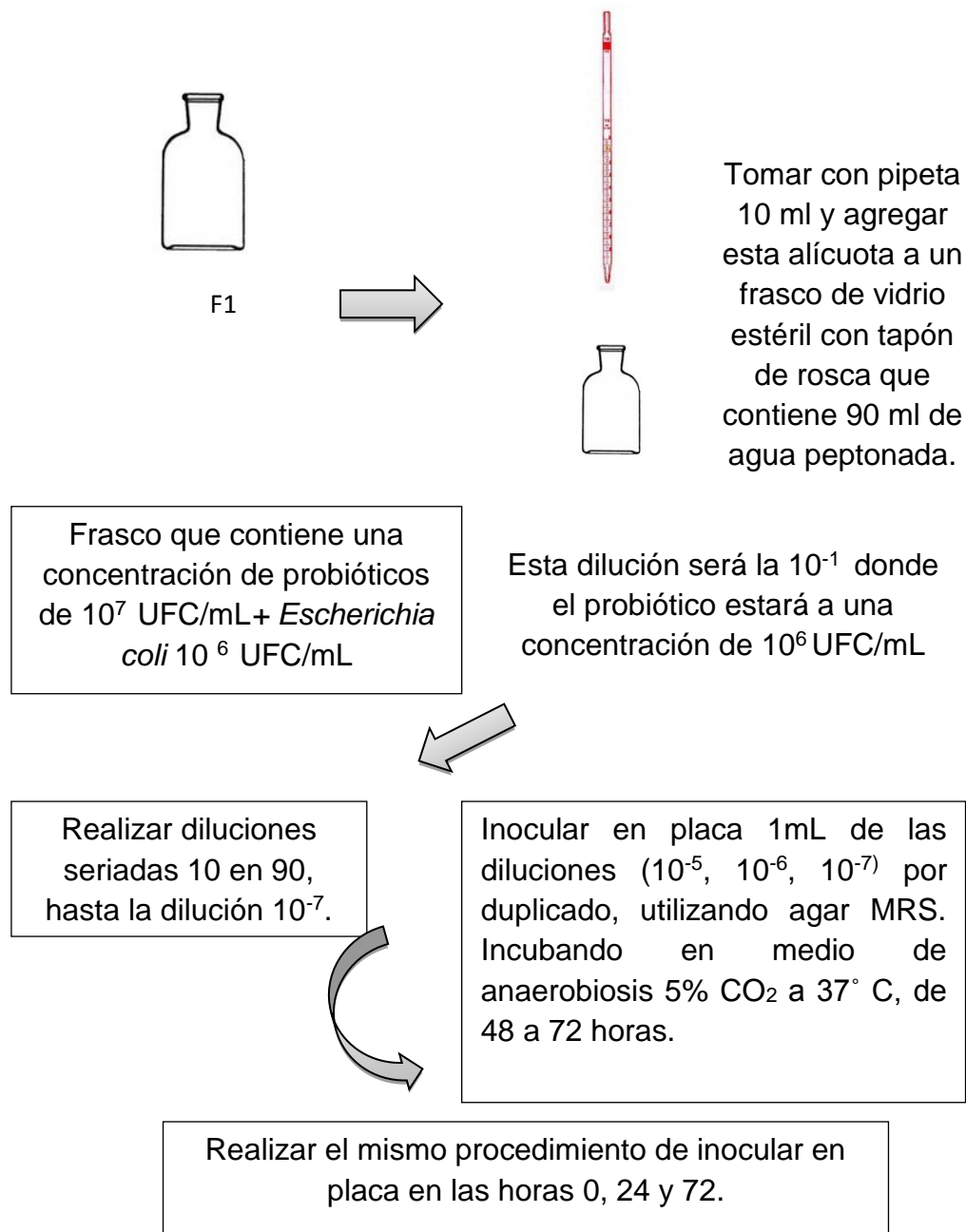


Figura N° 45 Conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad en F1, donde se inocula *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL

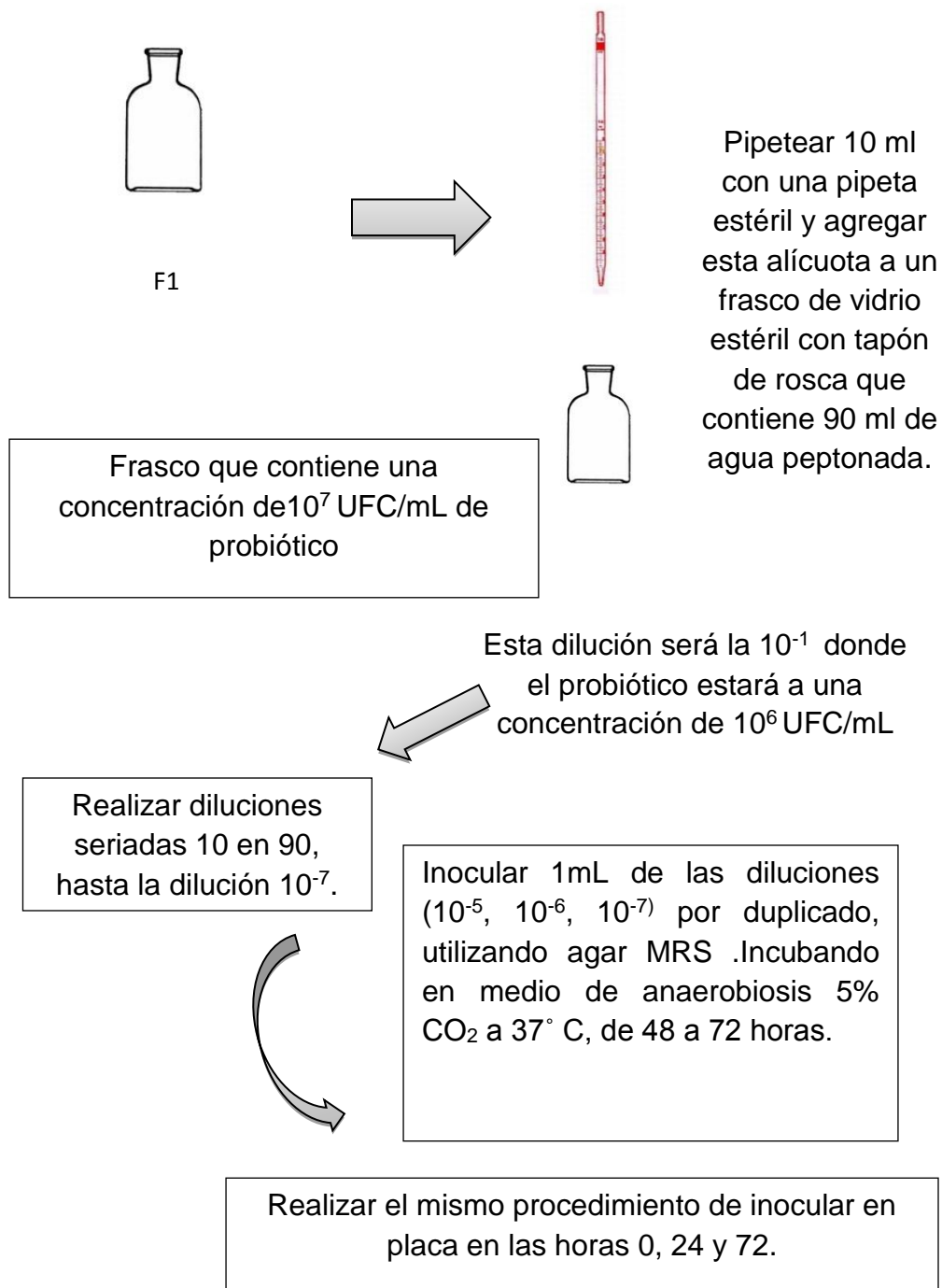


Figura N° 46 Conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad en F1, blanco.

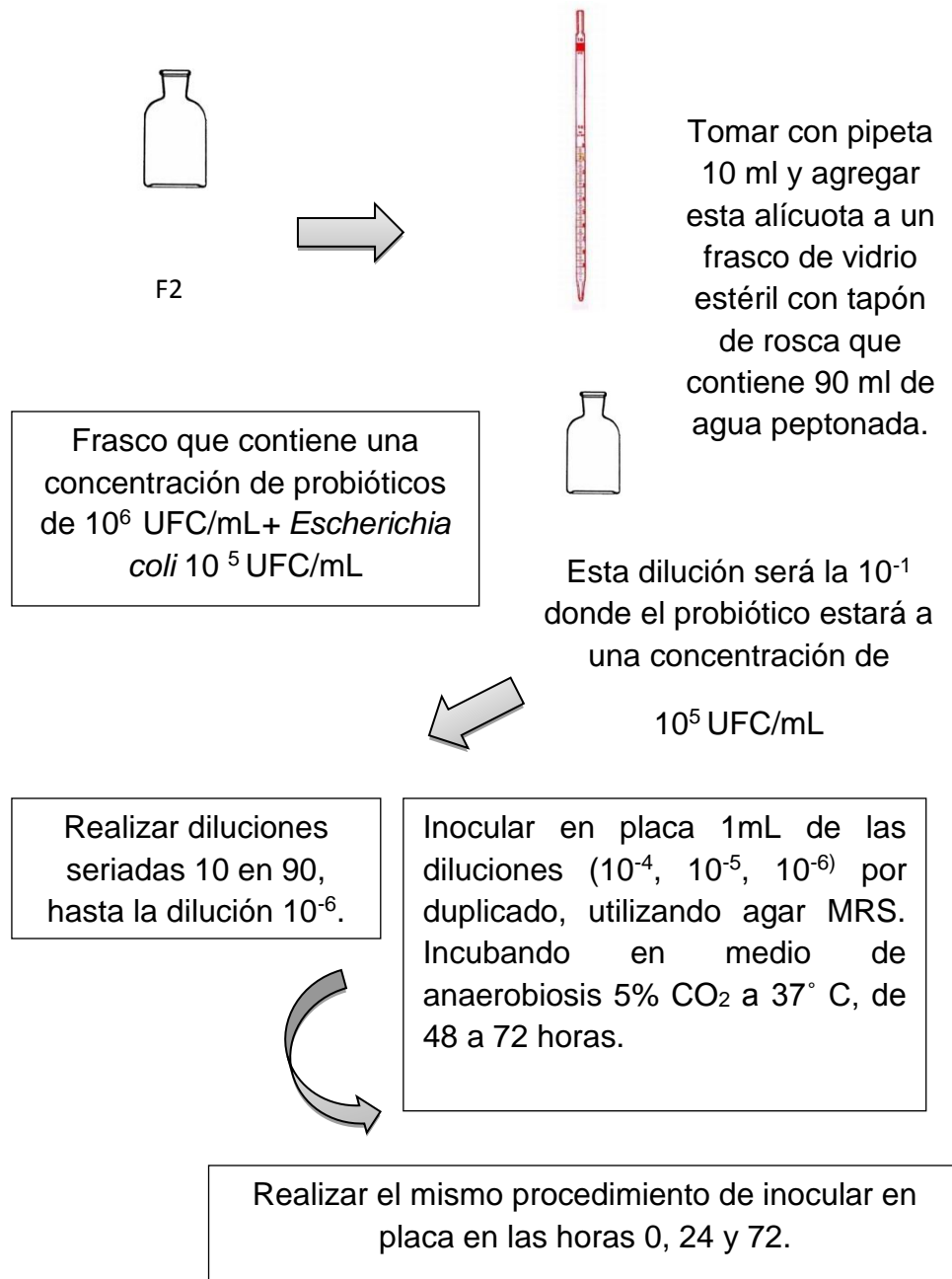


Figura N° 47 Conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad en F2, donde se inocula *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL



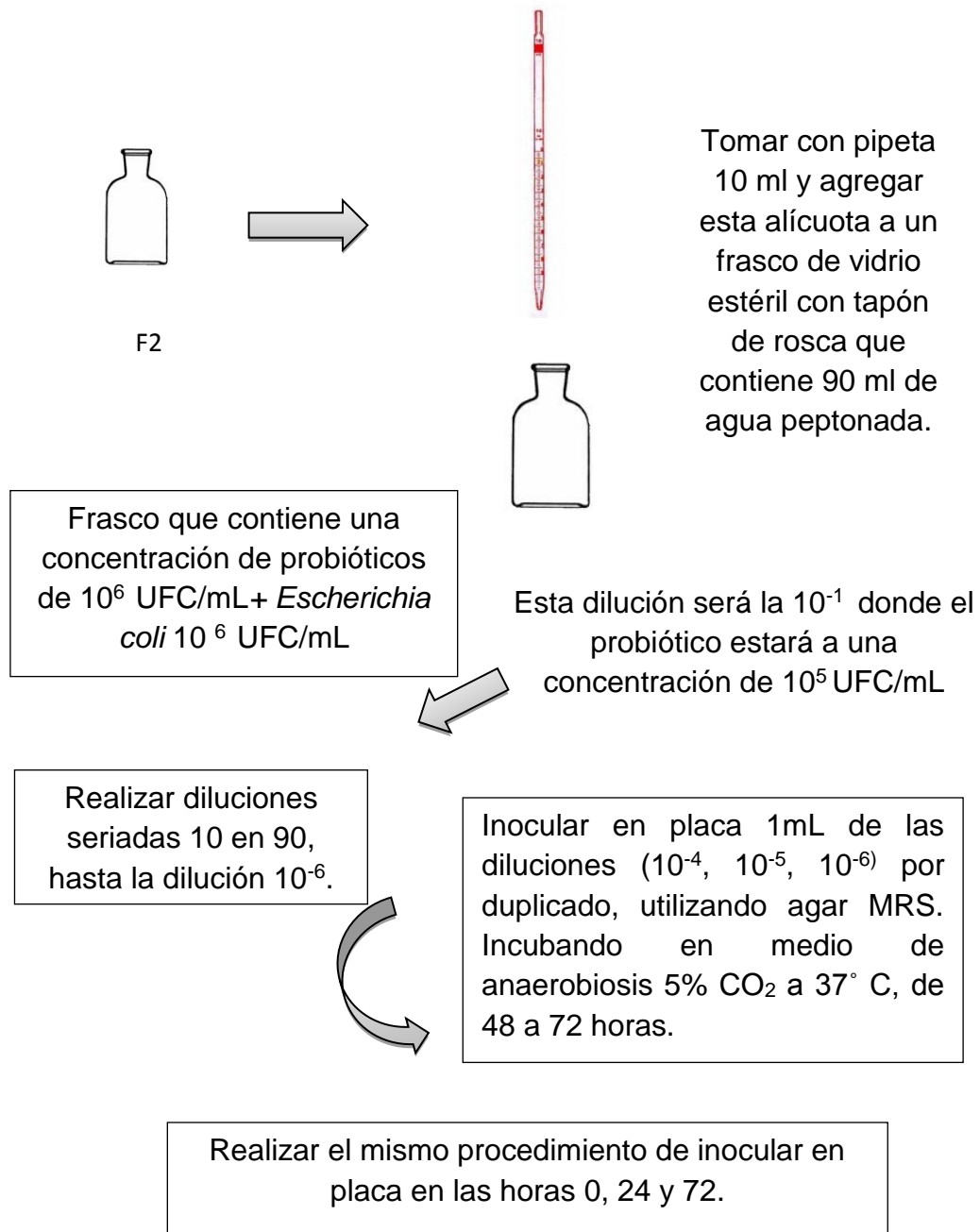


Figura N° 48 Conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad en F2, donde se inocula *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL

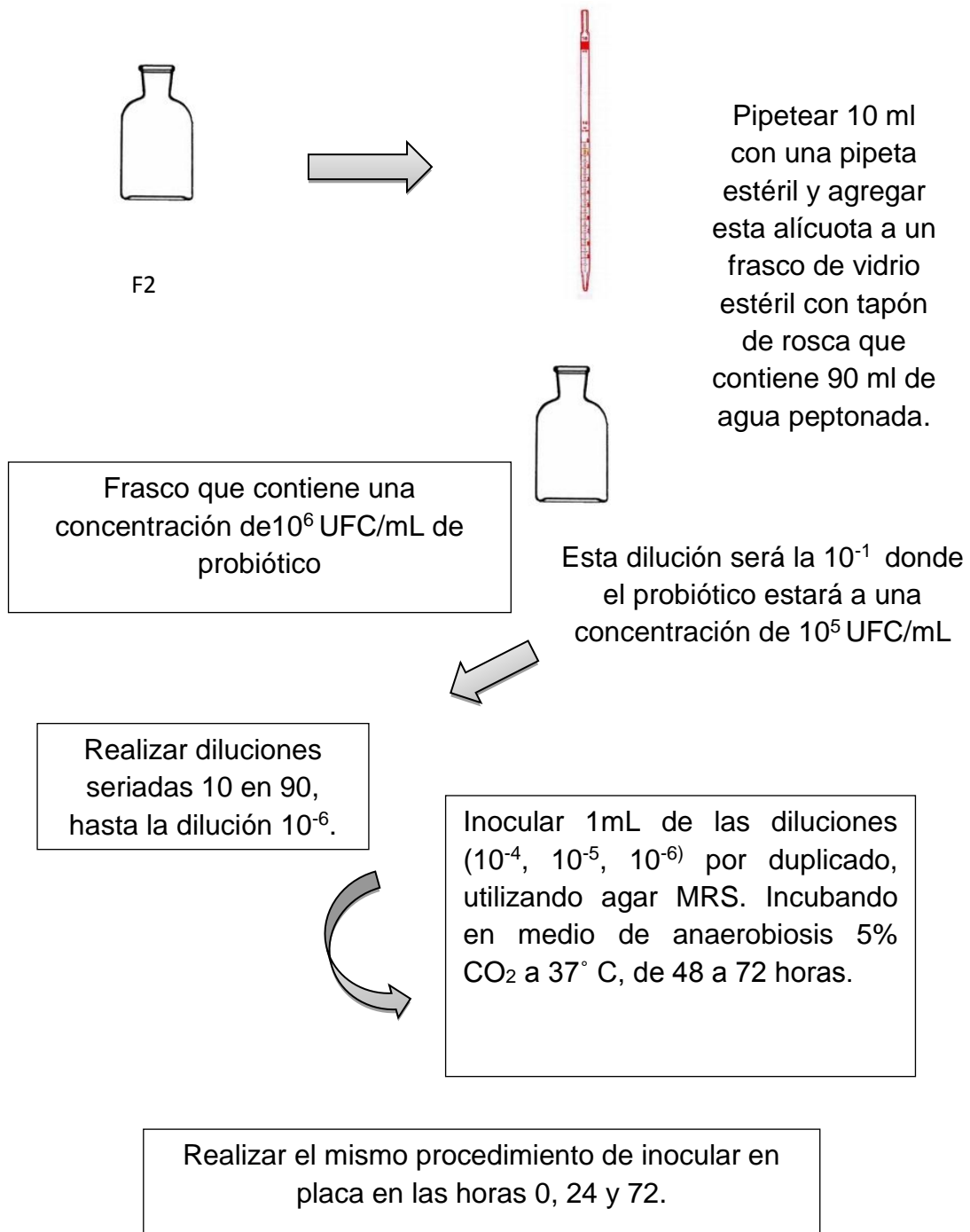


Figura N° 49 Conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad en F2, blanco.

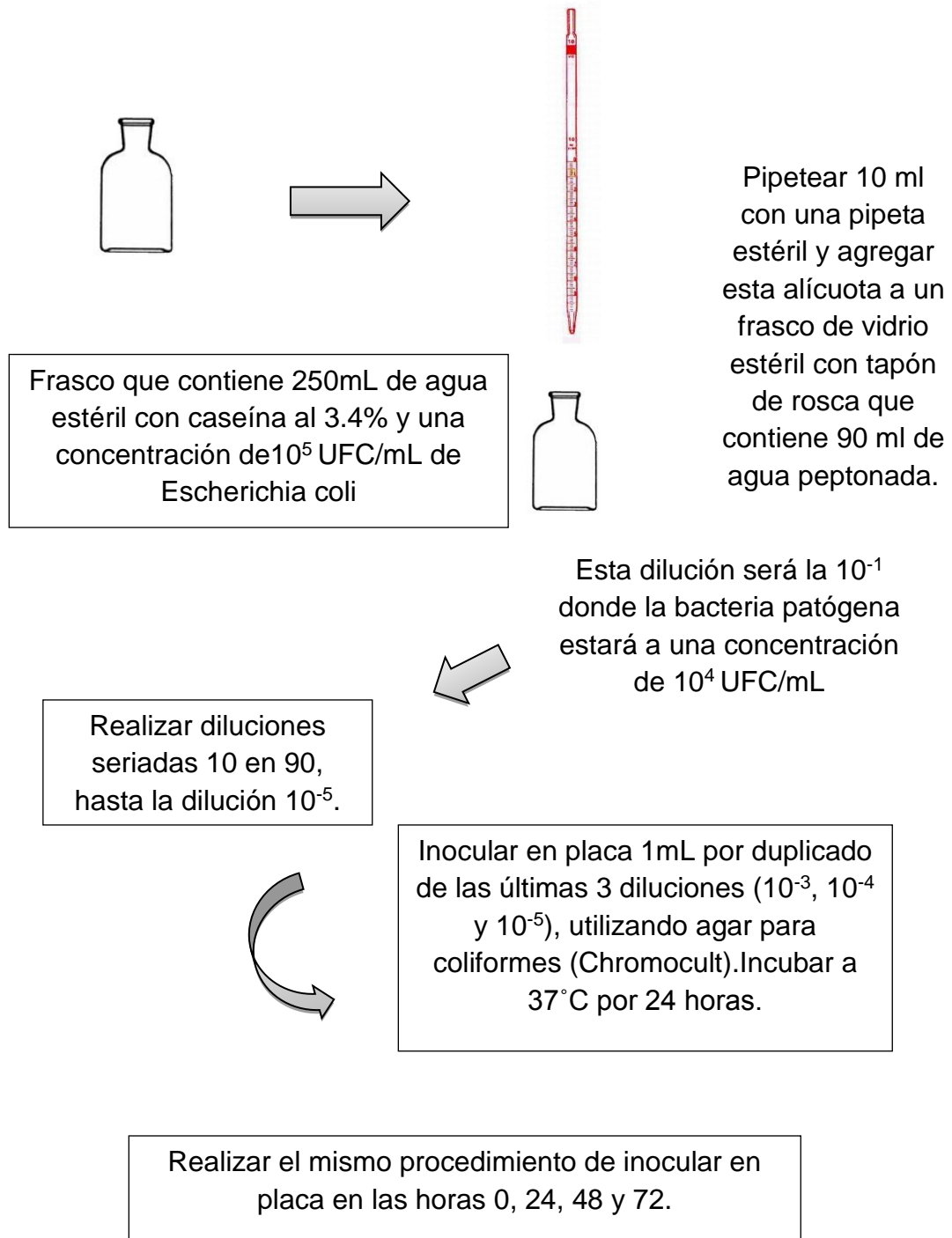


Figura N° 50 Blanco de bacteria patógena *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL

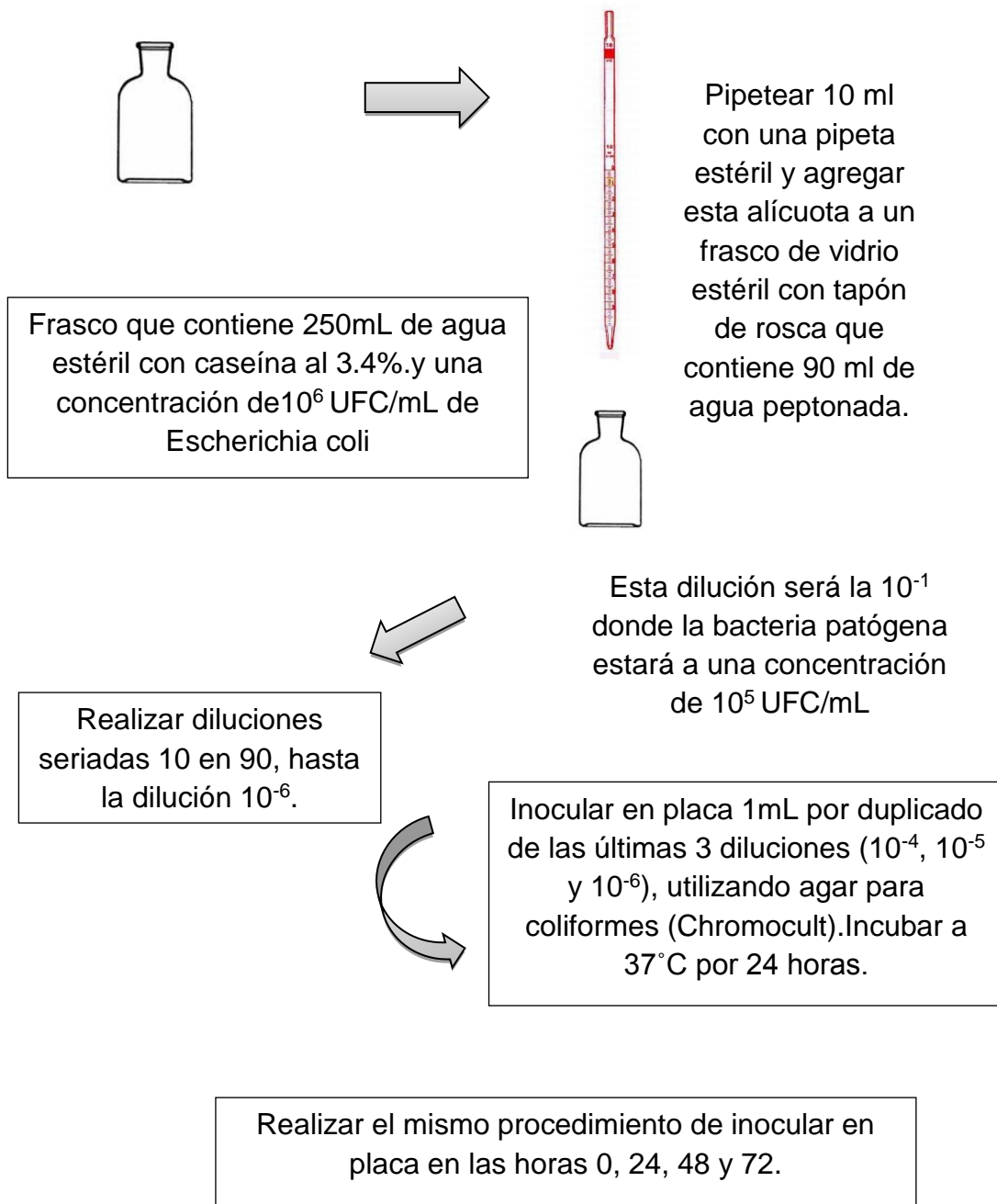


Figura N° 51 Blanco de bacteria patógena *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL

## Anexo N° 8

### Cálculos utilizados en la formulación del Alimento Funcional

Cantidad de Caseinato al 1% utilizada en un vaso de agua

1 gramo ----- 100 mL

X ----- 250 mL

X= 2.5 gramos

Porcentaje de Caseinato utilizada en la fórmula cuantitativa.

2.5 g ----- 15 g

X ----- 100 g

X= 16.66%

## **Anexo N° 9**

**Procedimientos de los análisis a realizar en el ensayo.**

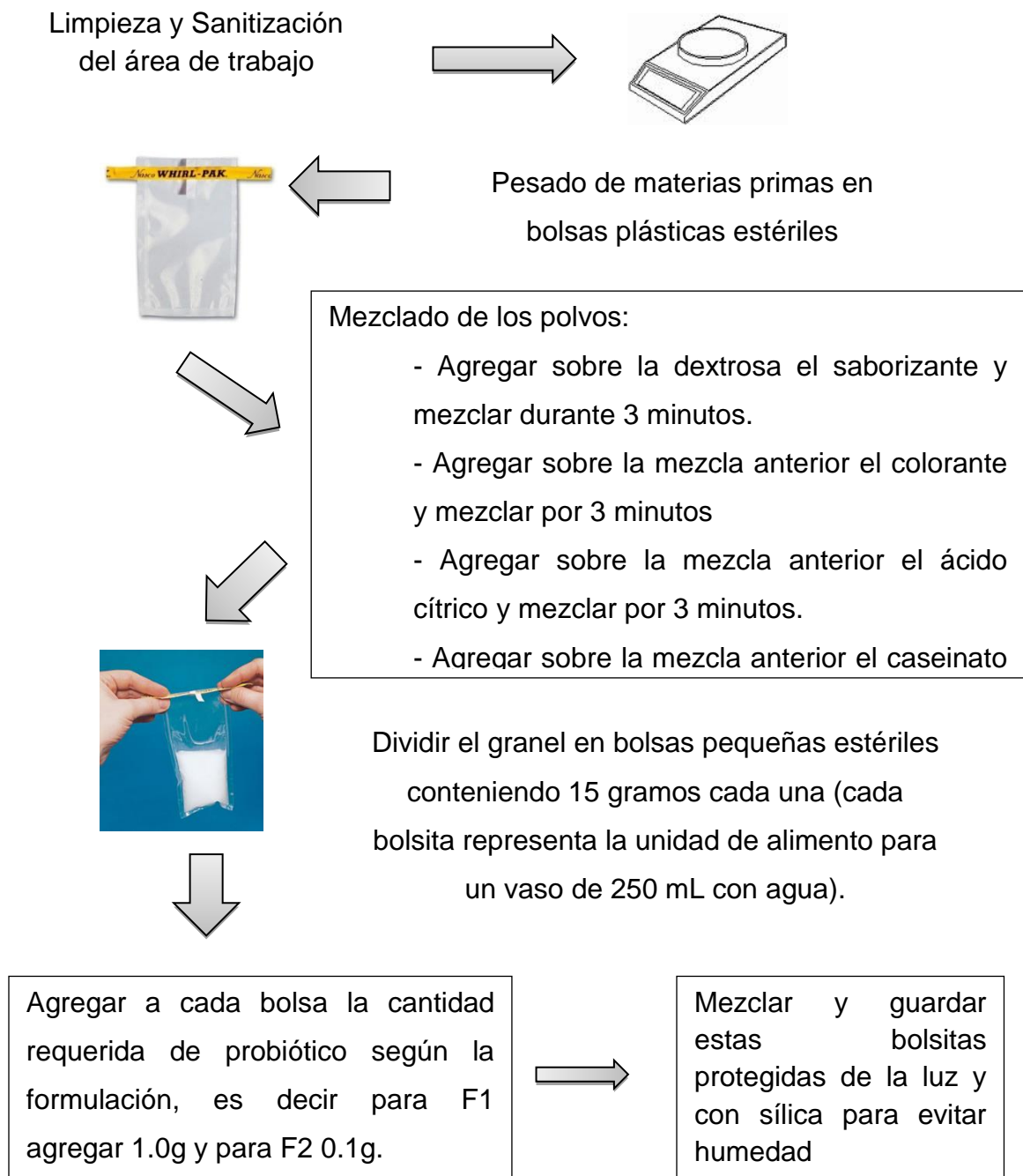
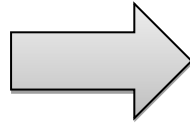


Figura N° 52 Elaboración del alimento funcional en polvo para reconstituir.



Unidad de alimento  
funcional para un vaso  
de 250 mL



Reconstituir en  
250mL de agua  
estéril



Agitación mecánica,  
hasta disolver todos los  
grumos.

Figura N°53 Preparación del alimento funcional en polvo para reconstituir



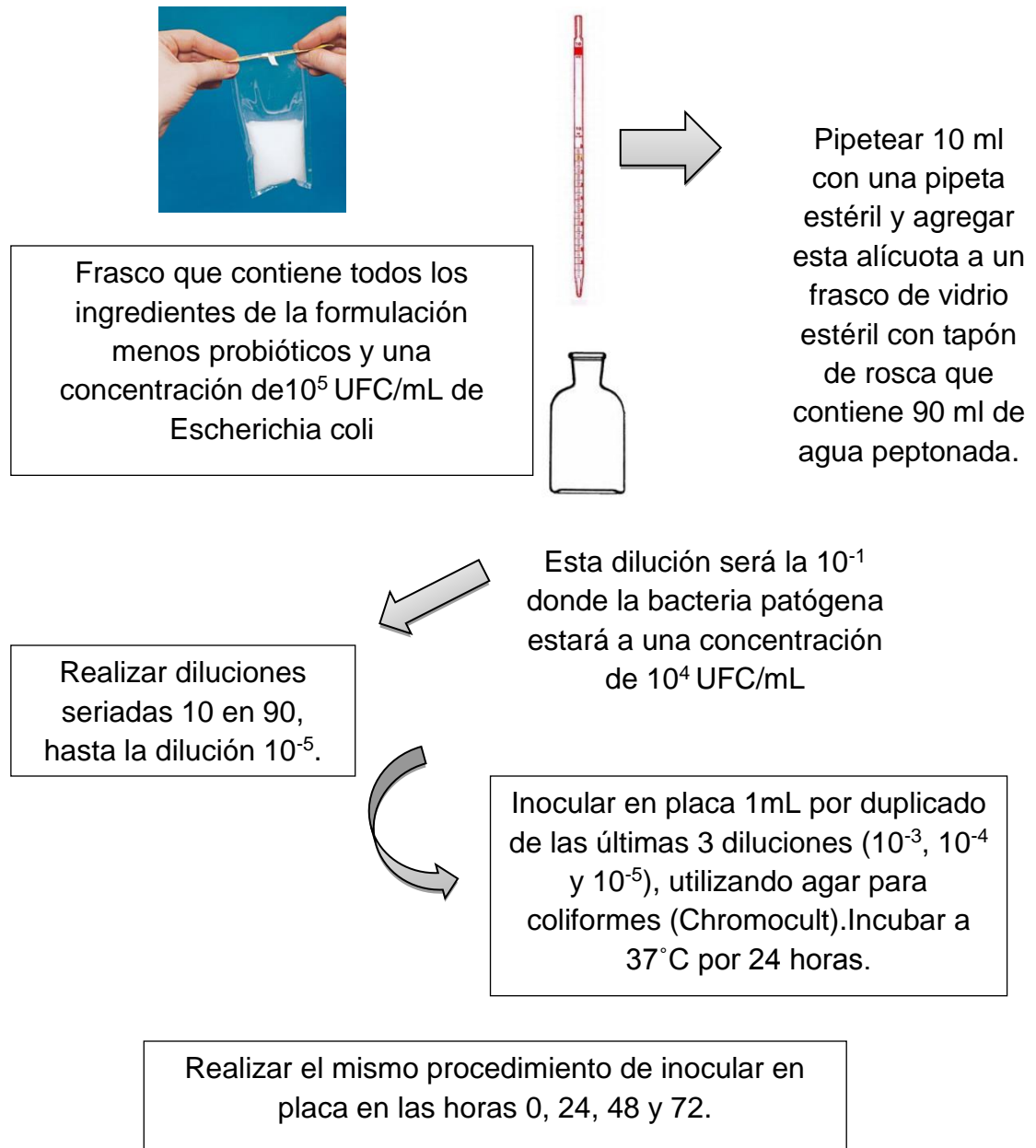


Figura N° 54 Blanco de bacteria patógena *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL, ensayo.

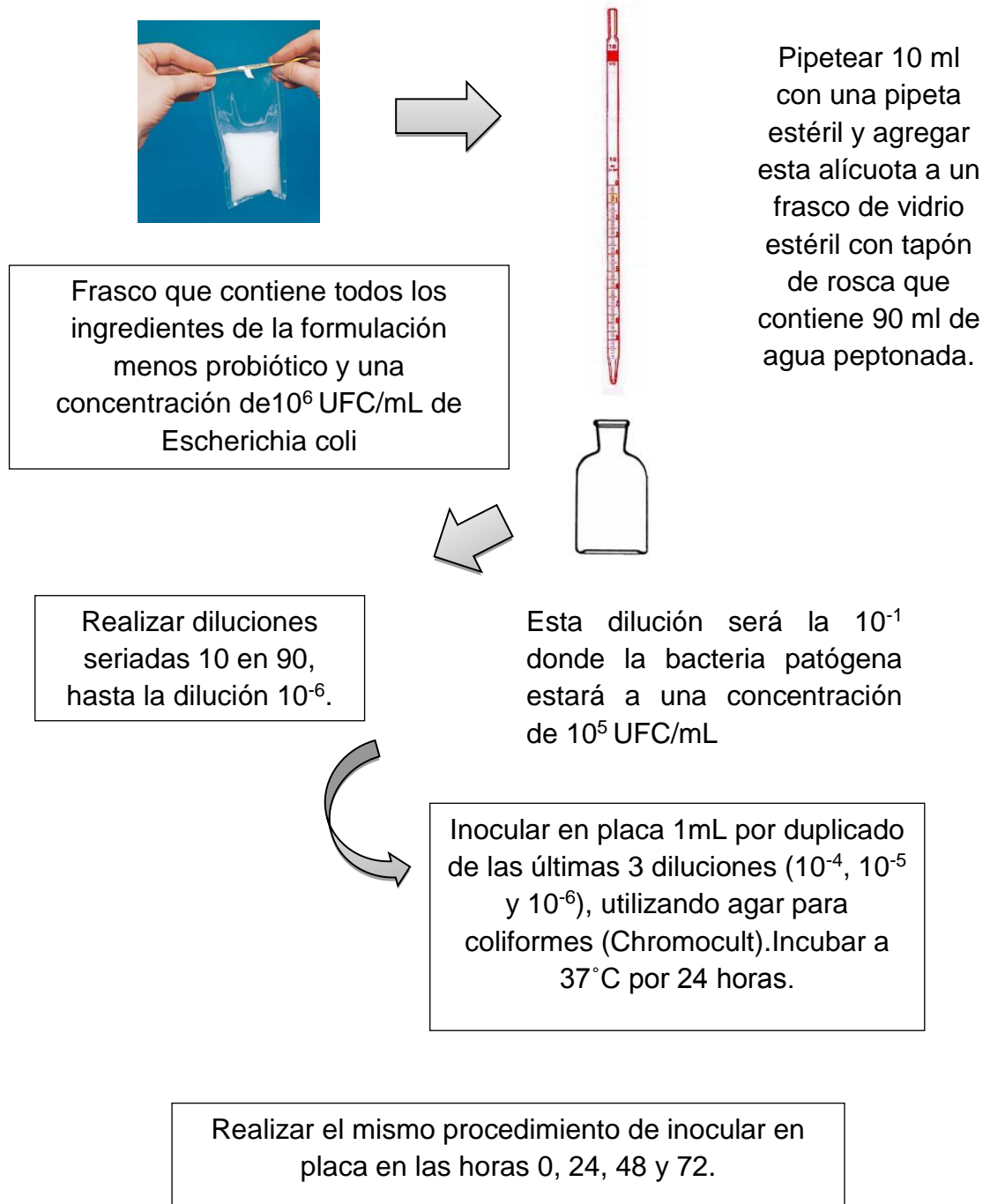
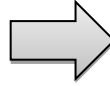


Figura N° 55 Blanco de bacteria patógena *Escherichia coli* de  $10^6$  UFC/mL, ensayo.



Reconstituir el contenido de la bolsa en 250mL.



Tomar con pipeta 10 ml y agregar esta alícuota a un frasco de vidrio estéril con tapón de rosca que contiene 90 ml de agua peptonada.

F1



Realizar diluciones seriadas 10 en 90, hasta la dilución  $10^{-8}$ .

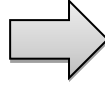
Esta dilución será la  $10^{-1}$  donde el probiótico estará a una concentración de  $10^7$  UFC/mL



Durante un período de 30 días se realizarán conteos de viabilidad de probióticos en el día 0, 15 y 30 de almacenamiento. Los conteos se efectuarán por duplicado analizando un total de 6 bolsas.

Inocular en placa 1mL de las diluciones ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) por duplicado, utilizando agar MRS. Incubando en medio de anaerobiosis 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , de 48 a 72 horas.

Figura N° 56 Prueba preliminar de estabilidad para F1.



Reconstituir el contenido de la bolsa en 250mL.



Tomar con pipeta 10 ml y agregar esta alícuota a un frasco de vidrio estéril con tapón de rosca que contiene 90 ml de agua peptonada.

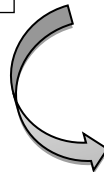


F2



Realizar diluciones seriadas 10 en 90, hasta la dilución  $10^{-7}$ .

Esta dilución será la  $10^{-1}$  donde el probiótico estará a una concentración de  $10^6$  UFC/mL



Durante un período de 30 días se realizarán conteos de viabilidad de probióticos en el día 0, 15 y 30 de almacenamiento. Los conteos se efectuarán por duplicado analizando un total de 6 bolsas.

Inocular en placa 1mL de las diluciones ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) por duplicado, utilizando agar MRS. Incubando en medio de anaerobiosis 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ \text{C}$ , de 48 a 72 horas.

Figura N° 57 Prueba preliminar de estabilidad para F2

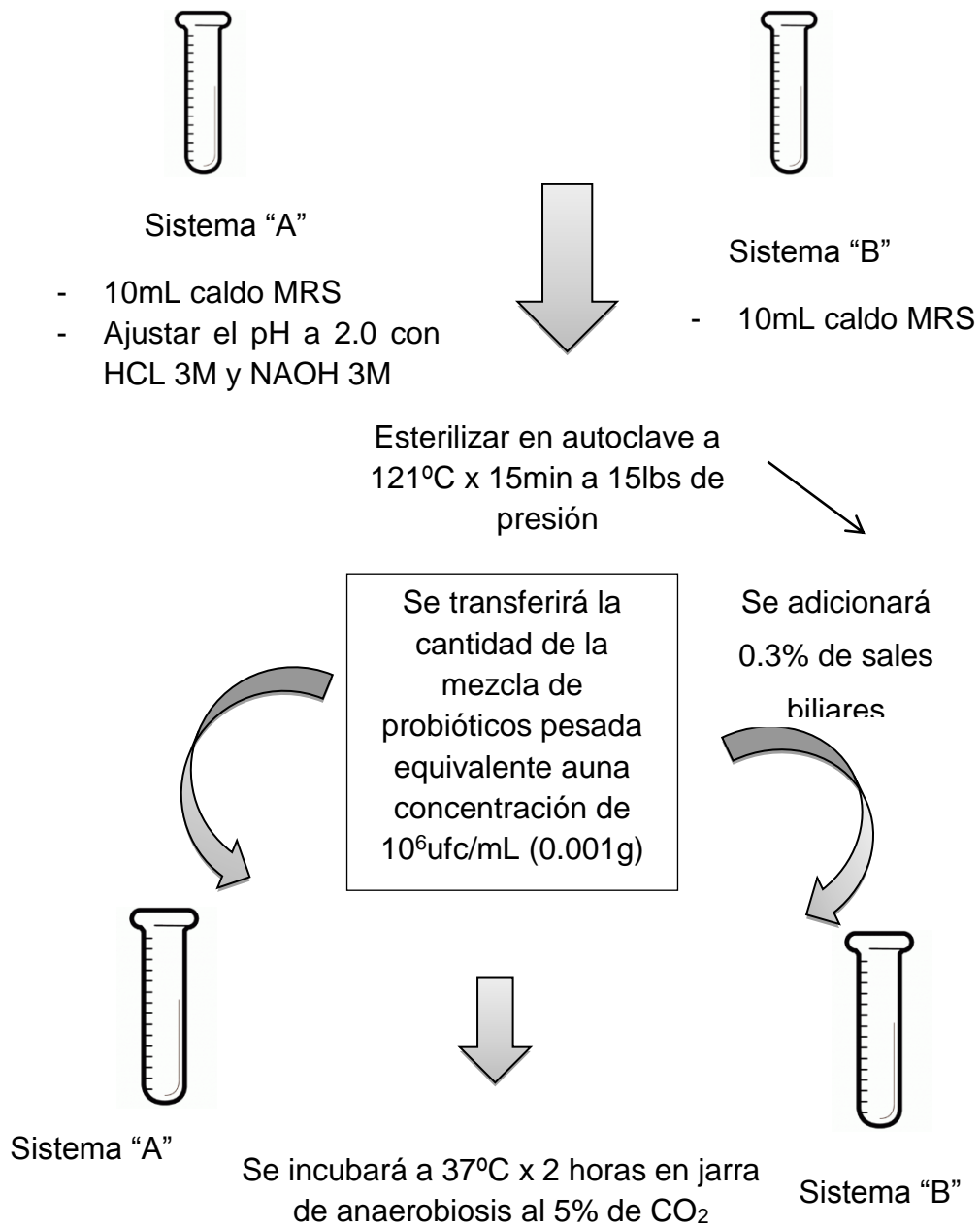


Figura N° 58 Evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra la acidez estomacal y a sales biliarias.

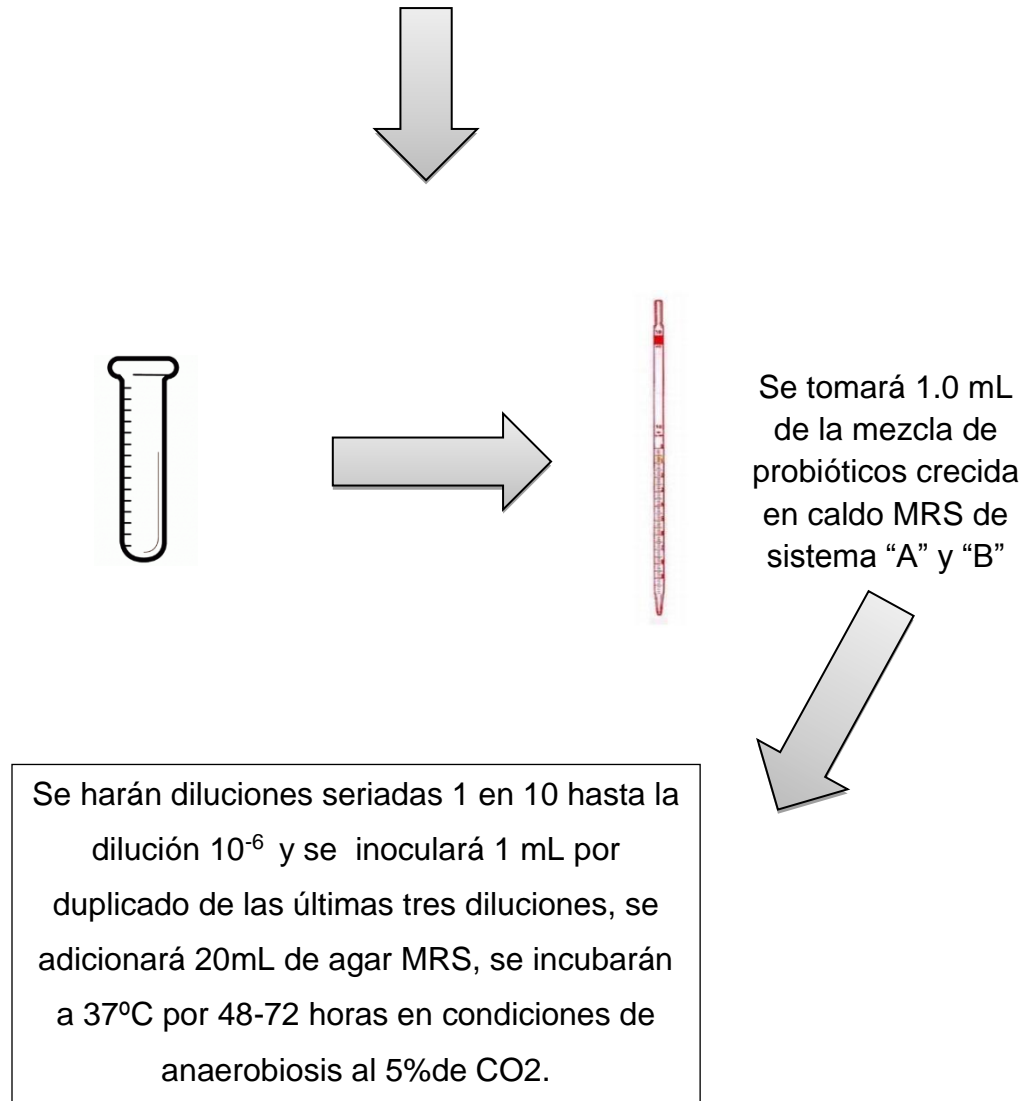
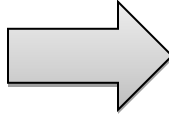
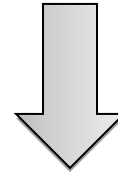
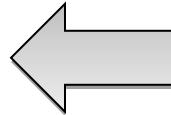
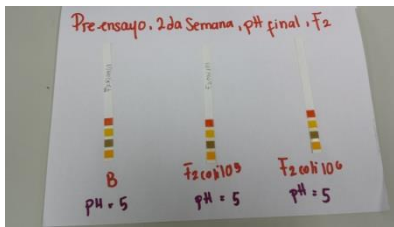


Figura N° 58 Continuación evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra la acidez estomacal y a sales biliares.

Introducir la tira reactiva en el contenedor de la bebida reconstituida.



Comparar la tira reactiva con los posibles resultados plasmados en la caja contenedora de las tiras.



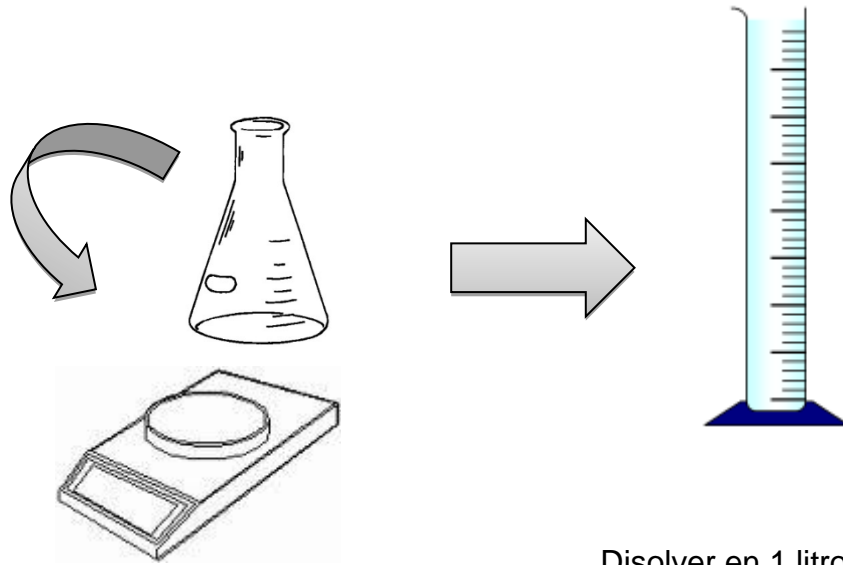
Tomar nota del resultado.

Figura N° 59 Toma de pH.

**Anexo N° 10**

**Preparación de medios de cultivo.**



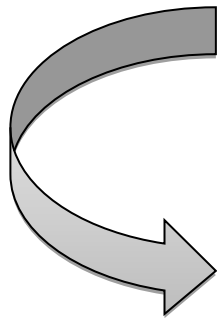


Pesar 36 g de medio agar  
EMB en un erlenmeyer  
estéril

Disolver en 1 litro de  
agua desmineralizada

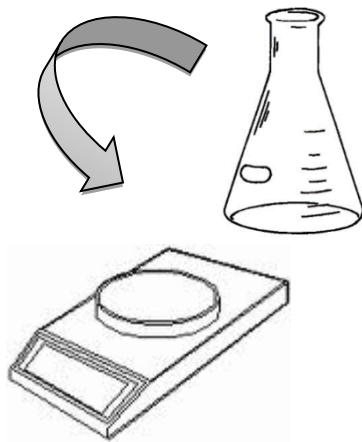


Calentar en baño de agua  
hirviendo o en corriente de vapor

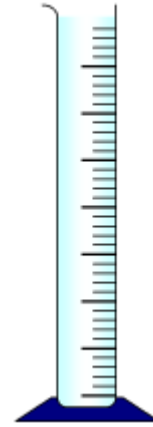


Tratar en autoclave 15  
minutos a 121 °C

Figura N° 60 Preparación del medio agar EMB



Pesar 37 g de medio  
caldo cerebro-corazón en  
un erlenmeyer estéril

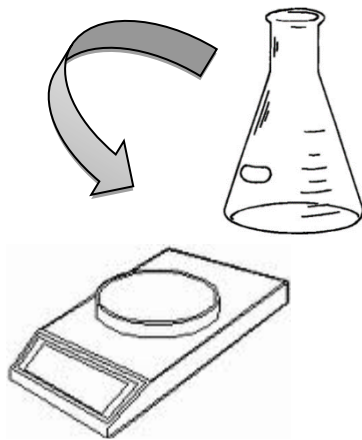


Disolver en 1 litro de  
agua desmineralizada

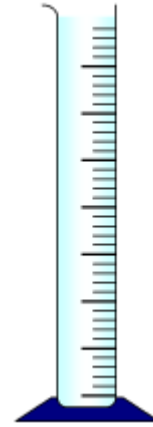
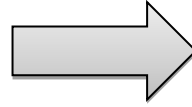


Tratar en autoclave 15  
minutos a 121 °C

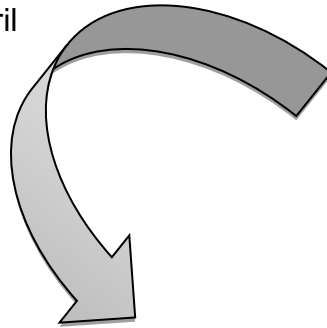
Figura N° 61 Preparación del medio caldo BHI.



Pesar 55 g de medio  
caldo MRS en un  
erlenmeyer estéril

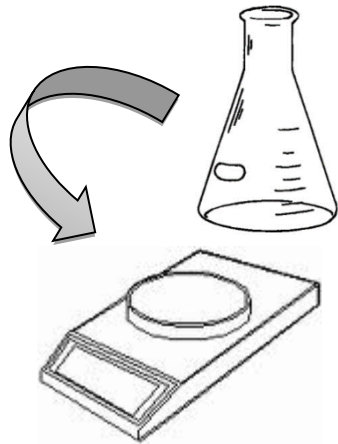


Disolver en 1 litro de  
agua desmineralizada

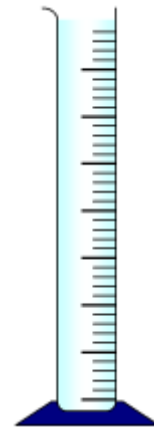
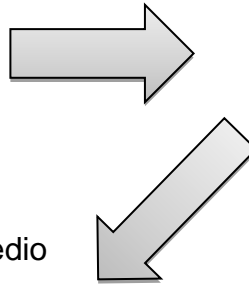


Tratar en autoclave 15  
minutos a 121 °C

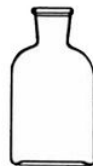
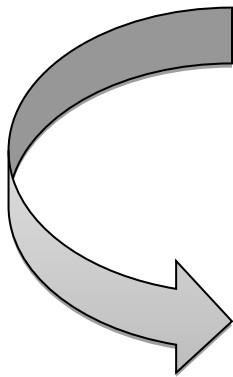
Figura N° 62 Preparación del medio caldo MRS.



Pesar 25.5g g de medio  
agua peptonada en un  
erlenmeyer estéril



Disolver en 1 litro de  
agua desmineralizada



Introducir 90 mL en frascos  
de vidrio con tapón de  
rosca.



Tratar en autoclave 15  
minutos a 121 °C

Figura N° 63 Preparación de agua peptonada.

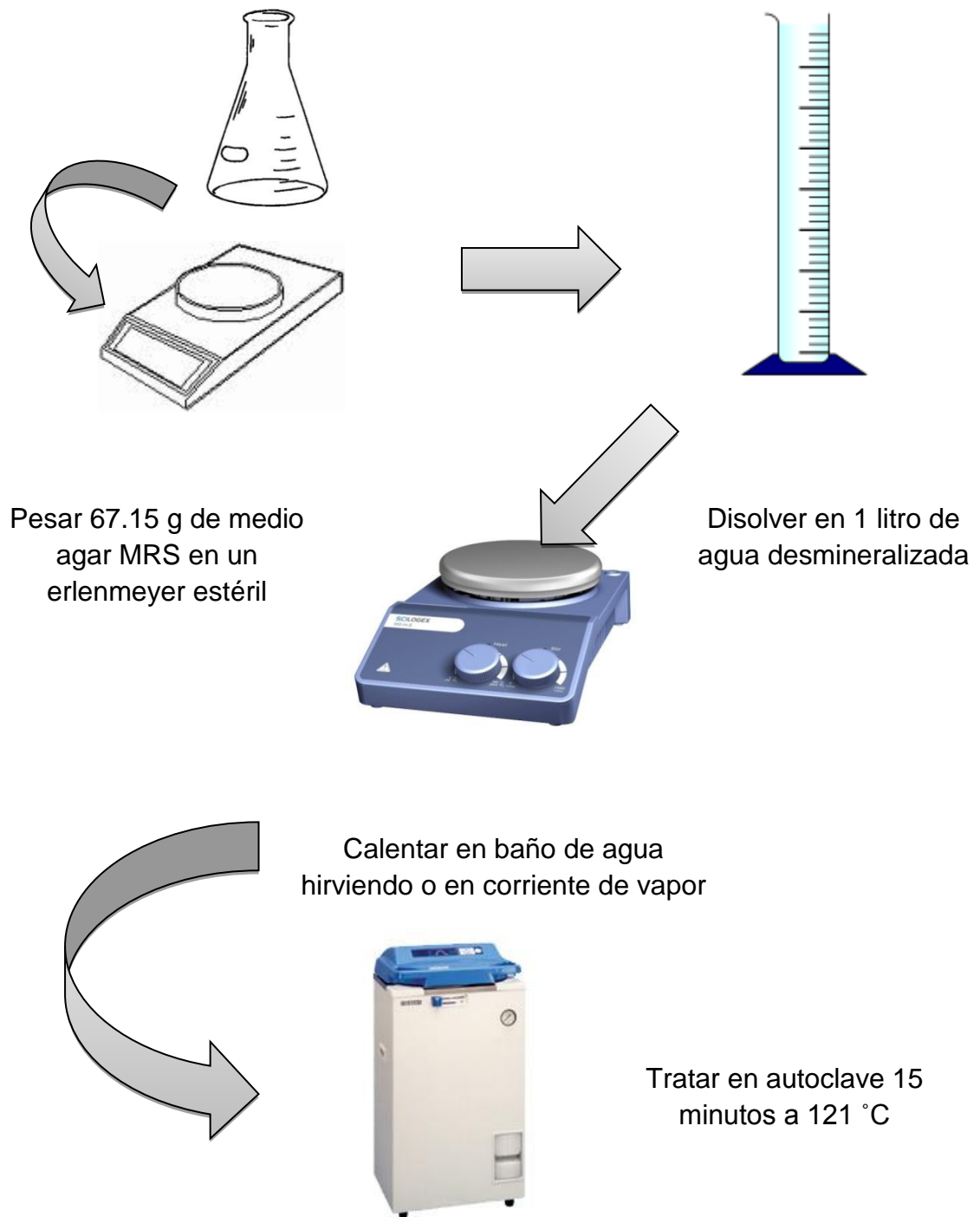


Figura N° 64 Preparación del medio agar MRS.



## Technical Data

### Lactobacillus MRS Agar

M641

Lactobacillus MRS Agar is recommended for cultivation of all *Lactobacillus* species.

#### Composition\*\*

Ingredients	Gms / Litre
Proteose peptone	10.000
Beef extract	10.000
Yeast extract	5.000
Dextrose	20.000
Polysorbate 80	1.000
Ammonium citrate	2.000
Sodium acetate	5.000
Magnesium sulphate	0.100
Manganese sulphate	0.050
Dipotassium phosphate	2.000
Agar	12.000
Final pH ( at 25°C)	6.5±0.2

\*\*Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

#### Directions

Suspend 67.15 grams in 1000 ml distilled water. Heat to boiling to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes. Mix well and pour into sterile Petri plates.

#### Principle And Interpretation

Lactobacilli MRS medium is based on the formulation of deMan, Rogosa and Sharpe (1) with slight modification. It supports luxuriant growth of all Lactobacilli from oral cavity (1), dairy products (2), foods (3), faeces (4) and other sources (5).

Proteose peptone and beef extract supply nitrogenous and carbonaceous compounds. Yeast extract provides vitamin B complex and dextrose is the fermentable carbohydrate and energy source. Polysorbate 80 supplies fatty acids required for the metabolism of Lactobacilli. Sodium acetate and ammonium citrate inhibit Streptococci, moulds and many other microorganisms. Magnesium sulphate and manganese sulphate provide essential ions for multiplication of lactobacilli. Phosphates provide good buffering action in the media.

Lactobacilli are microaerophilic and generally require layer plates for aerobic cultivation on solid media. When the medium is set, another layer of un-inoculated MRS Agar is poured over the surface to produce a layer plate (5). Lactobacilli isolated on MRS Agar should be further confirmed biochemically.

#### Quality Control

##### Appearance

Cream to light yellow homogeneous free flowing powder

##### Gelling

Firm, comparable with 1.2% Agar gel.

##### Colour and Clarity of prepared medium

Medium to dark amber coloured, clear to slightly opalescent gel forms in Petri plates

##### Reaction

Reaction of 6.71% w/v aqueous solution at 25°C. pH : 6.5±0.2

##### pH

6.30-6.70

##### Cultural Response

Cultural characteristics observed after an incubation at 35-37°C for 18-24 hours or longer.(with 5% CO<sub>2</sub>)

Figura N° 65 Hoja de seguridad del medio agar MRS.

### Cultural Response

Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Recovery
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 9595	50-100	luxuriant	≥50%
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	50-100	luxuriant	≥50%
<i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 7830	50-100	luxuriant	≥50%
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	50-100	luxuriant	≥50%

### Storage and Shelf Life

Store below 30°C in tightly closed container and the prepared medium at 2 - 8°C. Use before expiry date on the label.

### Reference

1. deMan J., Rogosa M. and Sharpe M., 1960, J. Appl. Bacteriol., 23:130.
2. Marshall R.T. (Ed.), 1992, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th ed., APHA, Washington, D.C.
3. Downes F. P. and Ito K., (Eds.), 2001, Compendium of Methods For the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed., APHA, Washington, D.C.
4. Sabine and Vaselekos, 1965, Nature, 206:960.
5. MacFaddin J., 1985, Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore.

Revision : 1 / 2011



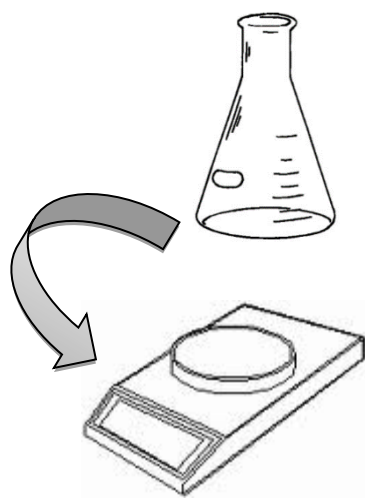
#### Disclaimer :

User must ensure suitability of the product(s) in their application prior to use. Products conform solely to the information contained in this and other related HiMedia™ publications. The information contained in this publication is based on our research and development work and is to the best of our knowledge true and accurate. HiMedia™ Laboratories Pvt Ltd reserves the right to make changes specifications and information related to the products at any time. Products are not intended for human or animal or therapeutic use only, unless otherwise specified. Statements contained herein should be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for infringement of any patents.

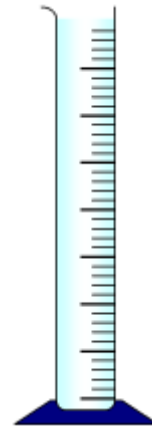
---

HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Business Park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India. Customer care No.: 022-61471919 Email: techhelp@himedialabs.com

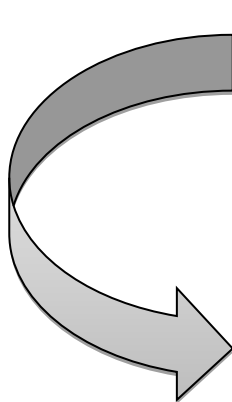
Figura N° 65 Continuación hoja de seguridad del medio agar MRS.



Pesar 26.5 g de medio agar Chromocult en un erlenmeyer estéril



Disolver en 1 litro de agua desmineralizada



Calentar en baño de agua hirviendo o en corriente de vapor hasta que el medio de cultivo se haya disuelto completamente

No tratar en autoclave

Figura N°66 Preparación del medio agar para coliformes Chromocult.





## Chromocult® Coliform Agar

Selective agar for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in drinking water and processed food samples.

### Intended Use

Chromocult® Coliform Agar is a selective and differential chromogenic culture medium intended for use in microbiology laboratories analyzing food and water. Within 24 hours this medium enables the detection, differentiation and enumeration of *E. coli* and coliforms from drinking water and processed food matrices such as frankfurters, cooked chicken and non-fat dried milk.

The manufacturing process for food and water often result in metabolic injury to the microorganisms and/or reduction of microbial members. Sub lethal microbial injury is caused by chemical or heat treatment as well as storage under frozen, dried or chilled conditions.

Traditional culture media used for the detection of coliforms/ *E. coli* often contain ox bile or bile salts to inhibit Gram-positive bacteria. These strong inhibitors however may limit the growth of the targeted microorganisms if they are already sub lethally damaged.

A careful selection of inhibitors used in the selective media is required to ensure the growth and recovery of these damaged microorganisms.

Chromocult® Coliform Agar contains Tergitol®7 as an inhibitor of Gram-positive bacteria which has no negative effect on the growth of the targeted coliforms/ *E. coli*. Chromocult® Coliform Agar is therefore the ideal medium for the detection of coliforms/ *E. coli* in drinking water and processed foods.

Chromocult® Coliform Agar has been validated by the AOAC™ Research Institute under the Performance Tested MethodsSM program for the analysis of frankfurters, cooked chicken and non-fat dried milk.

The most probable number (MPN) method for coliform bacteria and *E. coli* (AOAC™ official method 966.24) was used for method comparison testing.

The Chromocult® Coliform Agar method was found to be equivalent to the AOAC™ official method.

### Mode of Action

The interaction of selected peptones, pyruvate, sorbitol and phosphate buffer promotes rapid colony growth, even for sub lethally injured coliforms. The growth of Gram-positive bacteria as well as certain Gram-negative bacteria is inhibited by the presence of Tergitol®7, which has no negative effect on the growth of the coliform bacteria.

Further, the combination of two chromogenic substrates permits the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli*.

The addition of antibiotic supplements is recommended if sample material is known to have high level of background flora (especially if *Aeromonas* species are expected).

#### Coliform identification

The substrate Salmon-GAL is used for the identification of  $\beta$ -D-galactosidase, which is characteristic for coliforms. This interaction results in a salmon to red color of the coliform colonies.

#### *E. coli* identification

The substrate X-glucuronide is used for the identification of  $\beta$ -D-glucuronidase, which is characteristic for *E. coli*.

*E. coli* cleaves both Salmon-GAL and X-glucuronide, so that positive colonies take on a dark-blue to violet color. These are easily distinguished from other coliform colonies, which have a salmon to red color.

Figura N°67 Hoja de seguridad de medio agar para coliformes Chromocult.

## Typical Composition (g/litre)

Peptone 3.0; sodium chloride 5.0; sodium dihydrogen phosphate 2.2; di-sodium hydrogen phosphate 2.7; sodium pyruvate 1.0; tryptophan 1.0; agar-agar 10.0; Sorbitol 1.0; Tergitol® 7 0.15; 6-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside 0.2; 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronic acid 0.1; isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside 0.1.

## Preparation

### Preparation of agar medium

Suspend 26.5 g in 1000 ml of purified water and heat to boiling with frequent agitation until completely dissolved (approx. 35 min).

Do not autoclave! Do not overheat!  
Immediately cool the medium in the water bath at 45-50 °C.

pH: 6.8 ± 0.2 at 25°C.

### Preparation of optional antibiotic supplements (for water testing)

Cefsulodin solution: Dissolve 10 mg of cefsulodin in 5 ml of purified water and sterilize by membrane filtration (0.2 µm nominal pore size). Aseptically add the solution (5 ml per liter of medium) to one liter of liquefied medium.

For processed food samples the agar medium base can be used without the addition of antibiotic supplements (as in the AOAC™ study). For fresh food samples with a higher microbial load, Chromocult® Coliform Agar ES (EMD cat. no. 1.00850) is recommended.

Chromocult® Coliform Agar is usually inoculated by the pour plate method.

Using a sterile pipette, transfer 1 ml of the liquid test sample (or 1 ml from the appropriate dilution) to a sterile Petri dish.

Pour into each Petri dish approximately 15 ml of the Chromocult Coliform Agar while the medium is still liquefied but only after the medium has been cooled to 45-50°C in a water bath. Carefully swirl the plate until the inoculum is thoroughly mixed with the medium. Allow the mixture to solidify on a cool horizontal surface.

Incubate the inoculated dishes aerobically at 35-37°C in an inverted position (agar side up) for 24 hours.

After incubation, examine the plates for the presence of typical colonies of **E. coli** and other coliforms.

## Results

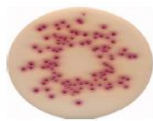
Count the dark blue to violet colonies as **E. coli** and the salmon to red colonies as other coliforms.

The total of all red and blue colonies is the total coliform count.

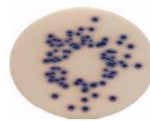
Figura N°67 Continuación hoja de seguridad de medio agar para coliformes

## Quality control

Test strains	Inoculum (CFU/plate)	% Recovery rate	Colony colour	Salmon-GAL	X-Glucuronide
Escherichia coli ATCC 11775	10-100	≥ 70	dark-blue to violet		
Escherichia coli DSMZ 502	10-100	≥ 70	blue to violet		
Citrobacter freundii ATCC 8090	10-100	≥ 70	salmon to red		-
Enterobacter aerogenes ATCC 13408	10-100	≥ 70	salmon to red		-
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883	10-100	≥ 70	salmon to red		-
Salmonella enteritidis ATCC 13076	10-100	not limited	colourless	-	-
Enterococcus faecalis ATCC 19433	1000-2000	≤ 0.01			
Bacillus cereus ATCC 11778	1000-2000	≤ 0.01			



Citrobacter freundii ATCC 8090



Escherichia coli ATCC 11775

Figura N°67 Continuación hoja de seguridad de medio agar para coliformes Chromocult

## **Anexo N° 11**

**Monografías y hojas de Especificaciones de Materias primas  
utilizadas en la formulación del alimento nutricional.**

**Product information.**  
EM 9N

**DMV International**  
The ingredients of success




**Description**

EM 9N is a roller dried milk protein type fresh curd calcium caseinate, prepared from fresh skimmed milk.

**Ingredients declaration (EU conform)**

Milk protein.

**Applications**

EM 9N is used in a wide range of food products like nutritional beverages, powdered dietetic formula, protein bars but also in processed cheese, imitation cheese and a range of processed meat and poultry products.

Solutions of EM 9N are characterised by a relatively low viscosity and a rather opaque appearance. In nutritional applications EM 9N is used as emulsifier/stabiliser, structure improver or simply as a highly nutritious protein and calcium source.

In processed cheese and imitation cheese EM 9N works beneficial in achieving certain structural and melting features. Concentrated EM 9N solutions attain a high jelly-like viscosity if 1-2% salt is added: those salted jellies are widely used in meat products to improve firmness, sliceability and process yields.

**Range of products**

Within the EM range DMV International supplies a range of functional roller dried milk proteins for the food industry. Next to that DMV International supplies a range of spray dried milk proteins.

**Packaging**

Multi layer paper bag with a polythene inner bag; content is 25kg. Palletised/wrapped to units of 1000kg. Alternatively EM 9N can be supplied in big bags.

**Typical analysis**

<b>Chemical</b>	
Protein (Nx6.38)	90.50%
Moisture	5.00%
Ash (825°C)	3.50%
Fat	0.80%
pH (10% sol. 20°C)	6.80
Scorched particles (ADPI)	Disc A

<b>Physical/Organoleptic</b>	
Colour	white/cream
Taste/odour	neutral
Bulk density (tapped)	475g/L
Particle size (<800µm)	100%

<b>Microbiological</b>	
Standard plate count	500/g
Aerobic spore count	10/g
Anaerobic spore count	10/g
Sulphite reducing Clostridia	10/g
Yeasts	<10/g
Moulds	<10/g
Enterobacteriaceae	<1/g
Staphylococcus aureus	neg. in 1g
Salmonella	neg. in 50g

<b>Nutritional</b>	
Energy value	1550kJ/100g

Figura N°68 Monografía del Caseinato de Calcio.

# Citric Acid Monohydrate

## 1 Nonproprietary Names

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

## 2 Synonyms

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

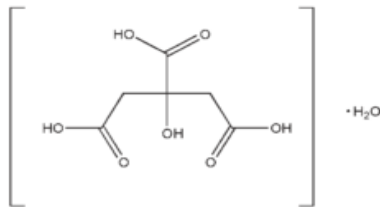
## 3 Chemical Name and CAS Registry Number

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

## 4 Empirical Formula and Molecular Weight

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  210.14

## 5 Structural Formula



## 7 Applications in Pharmaceutical Formulation or Technology

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

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

**Table I:** Uses of citric acid monohydrate.

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

## 8 Description

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

## 9 Pharmacopeial Specifications

See Table II. See also Sections 17 and 18.

**Table II:** Pharmacopeial specifications for citric acid monohydrate [and anhydrous].

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

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

## 10 Typical Properties

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

**Dissociation constant**

$pK_{a1}$ : 3.128 at 25°C;

$pK_{a2}$ : 4.761 at 25°C;

$pK_{a3}$ : 6.396 at 25°C.

**Density** 1.542 g/cm<sup>3</sup>

**Heat of combustion** -1972 kJ/mol (-471.4 kcal/mol)

**Heat of solution** -16.3 kJ/mol (-3.9 kcal/mol) at 25°C.

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

# Carmín

[<< Volver a Colorantes Naturales >>](#)

El tono de color de carmín varía de rosa a púrpura.

El tono de color de carmín varía de rosa a púrpura.

Las principales aplicaciones:

- Embutidos
- Productos de confitería
- Mermeladas
- Bebidas
- Helados
- Productos lácteos.

El carmín se extrae de la costa seca del insecto hembra *Dactylopius coccus*, comúnmente conocida como la cochinilla. El tono de color es dependiente del pH. La capacidad del ácido carmínico para formar complejos con metales (aluminio, calcio) se utiliza en el fabricación del pigmento rojo.

Figura N°70 Monografía de Color Carmín.



**aseal**  
asesoría en alimentos

HOME PROVEEDORES NOSOTROS INDUSTRIAS PRODUCTOS NOTICIAS CONTACTO

# Annato (Achiote)

[<< Volver a Colorantes Naturales >>](#)

Su rango de color va de anaranjado amarillento a anaranjado rojizo.

Las principales aplicaciones:

- Quesos
- Snacks (mejor conocido como churros)
- Pastas frescas y congeladas
- Arroces saborizados
- Mantecas y margarinas
- Confitería
- Pastas de relleno
- Cremas lácteas

Se obtiene de las semillas del arbusto Bixa Orellana L. Tiene una especie de pulpa que la rodea y es de allí de donde se obtiene la sustancia colorante. Tienen buena resistencia a la exposición de la luz y estables al calor.

Figura N°71 Monografía de Color Annato.





info@aseal.net



**PRODUCTOS**



### Sabores

ASEAL cuenta con una extensa colección de sabores respaldados por marcas de gran trayectoria y reconocimiento a nivel mundial. Podemos suministrarle sabores que cumplan con el perfil deseado y que se adapten a las condiciones de proceso tales como pH, temperatura, solubilidad, legislación, etc. La selección correcta del sabor puede hacer de su producto un éxito en el mercado...

**NOTICIAS**

Razones por las cuales usar sabores

- Caracterización, estandarización y mejoramiento de un producto
- Mejora de costos
- Diferenciación en el mercado
- Standard microbiológico

Algunos de los sabores que podrá encontrar dentro de nuestra colección son:

**Sabores Cárnicos y marinos:** Carne de res, cerdo, pollo, pavo, costilla, tocineta, mariscos.

**Sabores Frutales:** Colección tanto de frutas tropicales como de otras latitudes; sabores naturales y artificiales de fresa, durazno, maracuyá, guanabaná, tamarindo, arándano, mora, uva, naranja, limón, menta entre otros.

**Sabores Dulces:** *Vainilla, chocolate, dulce de leche, caramelo, avena, ...*

**Sabores Fantasía:** Chicle, brownie, kola champagne, cola, ...

**Sabores Salados:** Hierbas finas, cebolla frita, ajo, guacamole, ...

**Sabores Lácteos:** Parmesano, cheddar, cuatro quesos, queso azul, crema dulce, crema ácida o natilla, mantequilla, leche, ...

Ideales para utilizar en panes, galletas, bebidas, lácteos, cárnicos, snacks, dulces, aderezos o cualquier producto alimenticio. Consulte con nuestros asesores técnicos que con gusto atenderán a sus consultas y proyectos.



QUIENES SOMOS | PROVEEDORES | PRODUCTOS | INDUSTRIA | INFORMACION | CONTACTO  
 Email info@aseal.net © 2009 Derechos Reservados www.aseal.net Tel. 506.2589.41.41

Figura N°72 Monografía de Saborizantes.

# Dextrose

## 1 Nonproprietary Names

BP: Glucose  
JP: Glucose  
PhEur: Glucose Monohydrate  
USP: Dextrose

## 2 Synonyms

Blood sugar; *Caridex*; corn sugar; *C\*PharmDex*; *Dextrofin*; D-(+)-glucopyranose monohydrate; glucosum monohydricum; grape sugar; *Lycadex PF*; *Roferose*; starch sugar; *Tabfine D-100*.

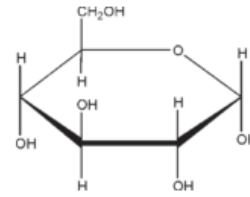
## 3 Chemical Name and CAS Registry Number

D-(+)-Glucose monohydrate [5996-10-1]  
See also Section 17.

## 4 Empirical Formula and Molecular Weight

$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$  198.17 (for monohydrate)  
See also Section 17.

## 5 Structural Formula



Anhydrous material shown.

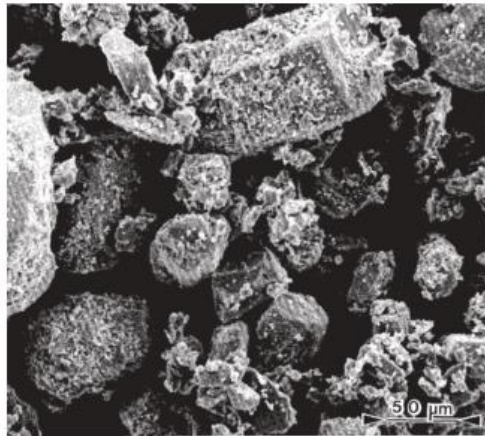
## 6 Functional Category

Tablet and capsule diluent; therapeutic agent; tonicity agent; sweetening agent.

## 7 Applications in Pharmaceutical Formulation or Technology

Dextrose is widely used in solutions to adjust tonicity and as a sweetening agent. Dextrose is also used as a wet granulation diluent and binder, and as a direct-compression tablet diluent and binder.

**SEM 1:** Excipient: dextrose anhydrous {granular}; manufacturer: Mallinckrodt Specialty Chemicals Co.; lot no.: KLKZ; magnification: 180x.



**Table 1:** Pharmacopeial specifications for dextrose.

Test	JP XV	PhEur 6.3	USP 32
Identification	+	+	+
Characters	—	+	—
Color of solution	+	+	+
Specific optical rotation	—	+52.5° to +53.3°	+52.6° to +53.2°
Acidity or alkalinity	+	+	+
Water			
for monohydrate	—	7.0–9.5%	7.5–9.5%
for anhydrous	≤ 1.0%	≤ 1.0%	≤ 0.5%
Residue on ignition	≤ 0.1%	≤ 0.1%	≤ 0.1%
Chloride	≤ 0.018%	≤ 125 ppm	≤ 0.018%
Sulfate	≤ 0.024%	≤ 200 ppm	≤ 0.025%
Arsenic	≤ 1.3 ppm	≤ 1 ppm	≤ 1 ppm
Barium	—	—	—
Calcium	—	≤ 200 ppm	—
Heavy metals	≤ 4 ppm	—	≤ 5 ppm
Lead	—	≤ 0.5 ppm	—
Dextrin	+	+	+
Soluble starch, and sulfites	+	+	+
Pyrogens <sup>[1]</sup>	—	+	—
Assay (dried basis)	≥ 99.5%	—	—

(a) If intended for large volume parenteral use.

primarily in chewable tablets. Although dextrose is comparable as a tablet diluent to lactose, tablets produced with dextrose monohydrate require more lubrication, are less friable, and have a tendency to harden.<sup>(1–3)</sup> The mildly reducing properties of dextrose may be used when tableting to improve the stability of active materials that are sensitive to oxidation.

Dextrose is also used therapeutically and is the preferred source of carbohydrate in parenteral nutrition regimens.

## 8 Description

Dextrose occurs as odorless, sweet-tasting, colorless crystals or as a white crystalline or granular powder. The JP XV describes dextrose as dextrose anhydrous; the PhEur 6.3 specifies dextrose as either dextrose anhydrous or dextrose monohydrate; and the USP 32 specifies dextrose as dextrose monohydrate.

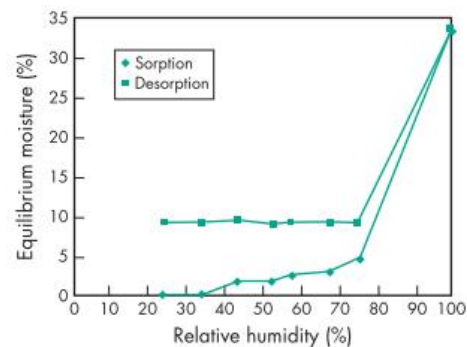


Figura N°73 Monografía de la Dextrosa.

## Natural Colorant Cochineal Carmine CWS-20/K

### Technical Data Sheet

<b>Product Description:</b>	CWS-20/K is a water soluble colorant obtained from the calcium aluminum lake of the carminic acid from cochineal ( <i>Dactylopius coccus</i> Costa).	
<b>Presentation:</b>	5 kg packing GIN 685899	
<b>Ingredients:</b>	Carmine, Maltodextrin, Potassium Hydroxide	
<b>Specification:</b>	<b>Physical and chemical characteristics</b>	
	Specific weight (g/ml) :	0.67 (+/- 0.1)
	Carminic Acid concentration (%):	20.0 (+/- 1.0)
	pH 1% :	More than 10
	<b>Microbiological characteristics</b>	
	Total Viable Count :	Max. 5,000 / g
	Total Yeasts and Moulds :	Max. 100 / g
	E. Coli :	Absent / 10g
	<i>Salmonella sp</i> :	Absent / 25 g
<b>Storage And Shelf Life:</b>	Store at room temperature, below 25°C, in dry and close environment; away from direct sunlight. Protect from freezing. Its shelf life is 12 months in sealed containers under the recommended storage conditions.	
<b>Stability:</b>	Light	Excellent
	Heat	Excellent
<b>Applications:</b>	Meat products, soups, sausages, sweets, dairy products, baking and retorted protein products.	
<b>Dosage:</b>	0.01 to 0.20 %	
<b>Usage:</b>	The application will depend upon each specific case.	
<b>Legal Aspect:</b>	Cochineal Carmine EU N° E-120 FDA: 21 CFR 73.100 N°- C. I. 75470 Natural Red 4	

Figura N°74 Hoja de Especificación de color carmín.

## COR URUCUM PÓ ANNATTO 15 WS P

Especificação de Produto

### Descrição:

Corante em pó hidrossolúvel, obtido pelo tratamento do pigmento extraído a partir da semente de urucum (*Bixa orellana*, L.), em solução alcali-aquosa, ao qual é adicionado maltodextrina e desidratado em aquecimento tipo " spray-dryer" .

### Apresentação:

Embalagem externa de papel Kraft com saco interno de polietileno de 10 kg.  
GIN: 678057

### Dados Técnicos:

Características Organolépticas	
* Aparência	Pó homogêneo
* Cor	Laranja a vermelha
* Odor	Característico
* Sabor	Característico
* Matérias estranhas	Ausência

Características Físico-químicas	
* (%) Norbixina	15,0 ± 1,0
* (%) Umidade	Máx. 5,0
* Solubilidade em água	Solúvel

Características Microbiológicas	
** <i>Salmonella</i> sp/25g	Ausente

\* Análises obrigatórias nos certificados

\*\* Análise semestral

### Conservação:

Em temperatura ambiente e isento de luz solar direta.

### Validade:

O produto pode ser mantido por um período de doze meses na embalagem original.

### Estabilidade:

Estável à luz e à ampla faixa de pH. Estável na faixa de temperatura entre - 20° C e 130° C.

Figura N°75 Hoja de Especificación de color Annato.

1525 Brook Drive  
Downers Grove, IL. 60515



For information Call 800-323-1301  
In Illinois Call 630-932-8100  
During Transportation Call 800-535-5053

PAGE 1

**SPECIFICATIONS SHEET**

Attention: Quality Control Department  
CORP.ASEAL DE CENTROAMERICA SA

SPRAY DRIED STRAWBERRY N&A FL.  
Customer Part#: 87.119SD

Flavorchem Part#: 87.119SD

---

Shelf Life: 36 Months minimum under recommended conditions.

Storage Conditions: Store/Ship in closed container in a cool dry place  
away from direct sunlight at 60 - 85 deg F.

Physical Form: Powder  
Appearance: WHITE TO OFF WHITE POWDER

Organoleptic: STRAWBERRY-LIKE FLAVOR AND ODOR.

SPECIFICATION	STANDARD
Loss drying % (Computrac)	2.00 - 6.00
Yeast / Mold (AOAC)	< 000100 cfu/g
Coliform (AOAC)	< 010 cfu/g
Standard Plate Count (AOAC)	< 5000 cfu/g
S. Aureus (AOAC)	Negative
E. Coli (AOAC)	<10 cfc/g
Salmonella (AOAC)	Negative
Gluten	< 20 ppm
Solubility	Water Soluble

Contains:  
DEXTRIN, GUM ARABIC, NATURAL AND ARTIFICIAL FLAVORS.

Figura N°76 Hoja de Especificación de sabor fresa.

1525 Brook Drive  
Downers Grove, IL. 60515



For Information Call 800-323-1301  
In Illinois Call 630-932-8100  
During Transportation Call 800-535-5053

PAGE 1

SPECIFICATIONS SHEET

Attention: Quality Control Department  
CORP.ASEAL DE CENTROAMERICA SA

SPRAY DRIED ORANGE FLAVOR, N&A  
Customer Part#:

Flavorchem Part#: 66.290SD

Shelf Life: 12 Months minimum under recommended conditions.

Storage Conditions: Store/Ship in closed container in a cool dry place  
away from direct sunlight at 60 - 85 deg F.

Physical Form: Powder  
Appearance: FINE, PALE YELLOW POWDER

Organoleptic: CITRUS, ORANGE LIKE FLAVOR AND ODOR

SPECIFICATION	STANDARD
Loss drying %(Computrac)	1.50 - 5.50
Solubility	Water Soluble

Contains:  
DEXTRIN, GUM ARABIC, NATURAL AND ARTIFICIAL FLAVORS.

Figura N°77 Hoja de Especificación de sabor naranja.

**Anexo N° 12**

**Muestras procesadas.**

### Muestras Procesadas.

Cuadro N°10 Muestras a procesar para la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria.

Muestras	Pre- ensayo	Ensayo
Frascos	4	4
Veces al día	1	1
Días	4	4
Semanas	4	4
Subtotal	64	64
Total	128	

Cuadro N°11 Muestras a procesar para el conteo de las bacterias probióticas para determinar la viabilidad.

Muestras	Pre- ensayo	Ensayo
Frascos	6	6
Veces al día	1	1
Días	3	3
Semanas	4	4
Subtotal	72	72
Total	144	



Cuadro N°12 Muestras a procesar para blanco de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria, sin presencia de probióticos.

Muestras	Pre-Ensayo	Ensayo
Frascos	2	2
Veces al día	1	1
Días	4	4
Semanas	4	4
SubTotal	32	32
Total	64	

Cuadro N°13 Muestras a procesar para la prueba preliminar de estabilidad de los probióticos en la mezcla de polvos del ensayo.

Día	Muestra
Día 0	2
Día 15	2
Día 30	2
Total	6

Cuadro N°14 Total de muestras a procesar para el pre- ensayo y para el ensayo

Muestras totales	342
------------------	-----

## **Anexo N° 13**

**Resultados de Identificación del patógeno *Escherichia coli***

Tabla N°27 Resultados de pruebas Bioquímicas

<b>Prueba</b>	<b>Resultado esperado</b>	<b>Resultado obtenido</b>	<b>Observación</b>
<b>Catalasa</b>	Positivo	Positivo	En la colonia hubo efervescencia.
<b>Movilidad</b>	Positivo	Positivo	Se observa crecimiento hacia los extremos
<b>TSI</b>	Producción de oxígeno A/A	Producción de oxígeno A/A	Hubo producción de oxígeno.
<b>Citrato</b>	Negativo	Negativo	La coloración se mantuvo azul.
<b>Voges-Proskauer</b>	Negativo	Negativo	No hubo cambio de color.
<b>Rojo de metilo</b>	Positivo	Positivo	Formación de anillo rojo.
<b>Indol</b>	Positivo	Positivo	Formación de anillo violeta.

Tabla N°28 Resultados de pruebas api 20E.

PRUEBA	REACCIÓN PROBADA	RESULTADO ESPERADO	RESULTADO OBTENIDO MX1	RESULTADO OBTENIDO MX2
ONPG	Beta-galactosidasa	+ Amarillo	Amarillo	Amarillo
ADH	arginina deshidrolasa	- Amarillo	Amarillo	Amarillo
LDC	Lisina descarboxilasa	+ Rojo-anaranjado	Rojo-anaranjado	Rojo-anaranjado
ODC	Ornitidina descarboxilasa	+ Rojo-anaranjado	Rojo-anaranjado	Rojo-anaranjado
CIT	Utilización de citrato	-Verde pálido	Verde pálido	Verde pálido
H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S	-Incoloro-grisáceo	Incoloro-grisáceo	Incoloro-grisáceo
URE	Hidrolisis de urea	-Amarillo	Amarillo	Amarillo
TDA	Desaminasa	-Amarillo	Amarillo	Amarillo
IND	Producción de indol	+ Rosa	Rosa	Incoloro- verde pálido-amarillo
VP	Producción de acetoina	-Incoloro-rosa pálido	Incoloro-rosa pálido	Incoloro-rosa pálido
GEL	Gelatinasa	-No difusión	No difusión	No difusión
GLU	Fermentación/oxidación	+ Amarillo grisáceo	Amarillo grisáceo	Amarillo grisáceo
MAN	Fermentación/oxidación	+ Amarillo	Amarillo	Amarillo
INO	Fermentación/oxidación	-Azul- azul verdoso	Azul- azul verdoso	Azul- azul verdoso
SOR	Fermentación/oxidación	+ Amarillo	Amarillo	Amarillo
RHA	Fermentación/oxidación	+ Amarillo	Amarillo	Amarillo
SAC	Fermentación/oxidación	+ Amarillo	Amarillo	Amarillo
MEL	Fermentación/oxidación	+ Amarillo	Amarillo	Amarillo
AMY	Fermentación/oxidación	-Azul- azul verdoso	Azul- azul verdoso	Azul- azul verdoso
ARA	Fermentación/oxidación	+ Amarillo	Amarillo	Amarillo
OX	Citocromo oxidasa	N/A	N/A	N/A

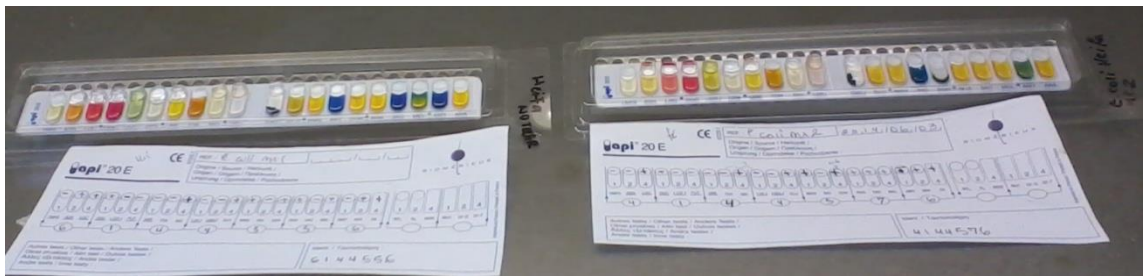
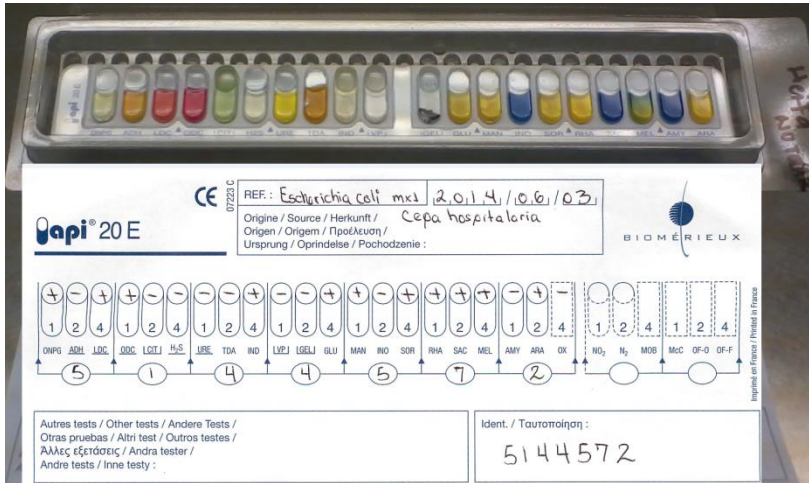


Figura N°78 Resultados Pruebas API 20E

## **Anexo N° 14**

### **Resultados del Pre-ensayo.**

Tabla N°29 Resultados de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra *Escherichia coli* 10<sup>5</sup>UFC/mL cepa hospitalaria en formulación F1

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	1.34E+05*	24	7.80E+04	48	9.10E+03	72	3.00E+03
	0	1.31E+05	24	9.10E+04	48	7.80E+03	72	2.72E+03
	0	1.40E+05	24	1.10E+05	48	1.10E+04	72	6.70E+03
	0	1.30E+05	24	1.20E+05	48	1.20E+04	72	7.40E+03
	0	2.00E+05	24	0.00E+00	48	0.00E+00	72	2.00E+03
	0	3.00E+05	24	0.00E+00	48	0.00E+00	72	6.00E+03
2° semana	0	1.19E+05	24	1.30E+05	48	1.00E+04	72	5.00E+03
	0	1.13E+05	24	1.41E+05	48	1.30E+04	72	4.80E+03
	0	1.10E+05	24	1.20E+05	48	1.00E+04	72	1.00E+03
	0	8.00E+05	24	1.40E+05	48	2.00E+04	72	2.00E+03
	0	2.00E+05	24	1.00E+05	48	0.00E+00	72	0.00E+00
	0	5.00E+05	24	3.00E+05	48	0.00E+00	72	0.00E+00
3° semana	0	1.20E+05	24	9.00E+04	48	1.00E+04	72	1.00E+03
	0	1.12E+05	24	8.00E+04	48	7.30E+03	72	7.30E+02
	0	1.20E+05	24	1.00E+05	48	3.30E+04	72	3.80E+03
	0	1.20E+05	24	8.00E+04	48	7.70E+04	72	7.70E+03
	0	2.00E+05	24	1.00E+05	48	0.00E+00	72	0.00E+00
	0	4.00E+05	24	0.00E+00	48	0.00E+00	72	0.00E+00
4° semana	0	1.40E+05	24	8.20E+04	48	3.10E+04	72	4.70E+03
	0	1.15E+05	24	1.12E+05	48	2.50E+04	72	3.20E+03
	0	1.20E+05	24	9.00E+04	48	7.00E+04	72	1.00E+03
	0	1.50E+05	24	1.00E+05	48	3.00E+04	72	1.00E+03
	0	1.00E+05	24	0.00E+00	48	0.00E+00	72	0.00E+00
	0	5.00E+05	24	2.00E+05	48	0.00E+00	72	0.00E+00

Tabla N°30 Resultados de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra *Escherichia coli* 10<sup>6</sup>UFC/mL, cepa hospitalaria en formulación F1.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	1.46E+06	24	5.00E+05	48	1.30E+05	72	5.24E+04
	0	1.36E+06	24	4.00E+05	48	0.00E+00	72	5.00E+04
	0	1.60E+06	24	1.00E+06	48	1.00E+06	72	5.80E+04
	0	1.20E+06	24	5.00E+05	48	2.00E+05	72	6.10E+04
	0	6.00E+06	24	1.00E+06	48	0.00E+00	72	4.00E+04
	0	2.00E+06	24	1.00E+06	48	0.00E+00	72	5.00E+04
2° semana	0	1.06E+06	24	6.10E+05	48	6.90E+04	72	7.80E+03
	0	9.80E+05	24	7.20E+05	48	7.00E+04	72	4.70E+03
	0	1.60E+06	24	8.00E+05	48	5.00E+04	72	4.60E+04
	0	1.60E+06	24	3.00E+05	48	4.00E+04	72	4.40E+04
	0	1.00E+06	24	0.00E+00	48	1.00E+04	72	4.00E+04
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	48	1.00E+04	72	4.00E+04
3° semana	0	1.30E+06	24	5.30E+05	48	5.00E+04	72	1.10E+04
	0	1.15E+06	24	4.00E+05	48	4.80E+04	72	1.20E+04
	0	1.00E+06	24	9.00E+05	48	3.00E+04	72	5.00E+04
	0	1.50E+06	24	5.00E+05	48	6.00E+04	72	6.20E+04
	0	3.00E+06	24	0.00E+00	48	1.00E+05	72	3.00E+04
	0	2.00E+06	24	1.00E+06	48	1.00E+05	72	2.00E+04
4° semana	0	1.08E+06	24	6.20E+05	48	1.50E+05	72	8.00E+03
	0	1.12E+06	24	7.50E+05	48	1.00E+05	72	1.20E+04
	0	1.20E+06	24	9.00E+05	48	2.00E+05	72	4.90E+04
	0	1.10E+06	24	8.00E+05	48	5.00E+05	72	7.90E+04
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	48	0.00E+00	72	6.00E+04
	0	3.00E+06	24	1.00E+06	48	0.00E+00	72	3.00E+04



Tabla N°31 Resultados de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL, cepa hospitalaria en formulación F2.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	1.16E+05	24	2.20E+04	48	8.12E+03	72	1.95E+03
	0	1.22E+05	24	3.00E+04	48	1.16E+04	72	2.19E+03
	0	1.10E+05	24	6.00E+04	48	1.10E+04	72	2.10E+03
	0	1.00E+05	24	7.00E+04	48	1.07E+04	72	2.00E+03
	0	0.00E+00	24	0.00E+00	48	1.30E+04	72	6.00E+03
	0	0.00E+00	24	0.00E+00	48	1.80E+04	72	3.00E+03
2° semana	0	3.84E+05	24	6.40E+04	48	2.00E+03	72	1.98E+03
	0	4.72E+05	24	7.80E+04	48	0.00E+00	72	2.05E+03
	0	8.30E+05	24	6.00E+04	48	1.00E+04	72	2.00E+03
	0	8.80E+05	24	8.00E+04	48	0.00E+00	72	1.50E+03
	0	7.00E+05	24	1.00E+05	48	0.00E+00	72	2.00E+03
	0	5.00E+05	24	1.00E+05	48	0.00E+00	72	0.00E+00
3° semana	0	3.83E+05	24	3.00E+04	48	2.00E+03	72	1.95E+03
	0	4.00E+05	24	4.00E+04	48	1.00E+03	72	2.00E+03
	0	8.00E+05	24	5.00E+04	48	1.00E+04	72	1.80E+03
	0	8.50E+05	24	3.00E+04	48	0.00E+00	72	1.30E+03
	0	5.00E+05	24	1.00E+05	48	0.00E+00	72	2.00E+03
	0	3.00E+05	24	0.00E+00	48	0.00E+00	72	1.00E+03
4° semana	0	3.60E+05	24	5.00E+04	48	2.00E+03	72	1.89E+03
	0	3.82E+05	24	5.70E+04	48	2.00E+03	72	1.92E+03
	0	8.10E+05	24	7.00E+04	48	1.00E+04	72	2.00E+03
	0	8.60E+05	24	8.00E+04	48	1.00E+04	72	1.80E+03
	0	4.00E+05	24	1.00E+05	48	1.00E+05	72	1.00E+03
	0	2.00E+05	24	1.00E+05	48	0.00E+00	72	0.00E+00

Tabla N°32 Resultados de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 contra *Escherichia coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL, cepa hospitalaria en formulación F2.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	8.70E+06	24	5.10E+05	48	1.32E+05	72	3.72E+04
	0	9.20E+06	24	5.30E+05	48	1.74E+05	72	1.92E+04
	0	6.00E+06	24	4.00E+05	48	4.00E+04	72	4.80E+04
	0	7.00E+06	24	4.00E+05	48	8.00E+04	72	6.10E+04
	0	0.00E+00	24	0.00E+00	48	2.00E+05	72	8.00E+04
	0	1.00E+06	24	0.00E+00	48	1.00E+05	72	4.00E+04
2° semana	0	8.00E+05	24	4.80E+05	48	3.10E+05	72	1.44E+04
	0	9.30E+05	24	4.60E+05	48	1.00E+04	72	1.49E+04
	0	5.00E+06	24	1.00E+05	48	1.00E+05	72	7.40E+04
	0	3.00E+06	24	2.00E+05	48	3.00E+05	72	7.70E+04
	0	1.00E+06	24	0.00E+00	48	0.00E+00	72	2.00E+04
	0	1.00E+06	24	0.00E+00	48	0.00E+00	72	1.00E+04
3° semana	0	7.00E+06	24	4.90E+05	48	1.30E+05	72	1.57E+04
	0	7.20E+06	24	5.60E+05	48	1.55E+05	72	1.60E+04
	0	5.00E+06	24	2.00E+05	48	5.00E+04	72	6.00E+04
	0	6.00E+06	24	2.00E+05	48	3.00E+04	72	6.20E+04
	0	1.00E+06	24	0.00E+00	48	1.00E+05	72	1.00E+04
	0	0.00E+00	24	0.00E+00	48	1.00E+05	72	0.00E+00
4° semana	0	8.30E+05	24	5.10E+05	48	1.60E+05	72	1.63E+04
	0	8.00E+05	24	5.80E+05	48	1.70E+05	72	1.70E+04
	0	3.00E+06	24	2.00E+05	48	8.00E+04	72	5.80E+04
	0	5.00E+06	24	3.00E+05	48	3.00E+04	72	6.50E+04
	0	1.00E+06	24	0.00E+00	48	1.00E+05	72	1.00E+04
	0	1.00E+06	24	0.00E+00	48	0.00E+00	72	1.00E+04

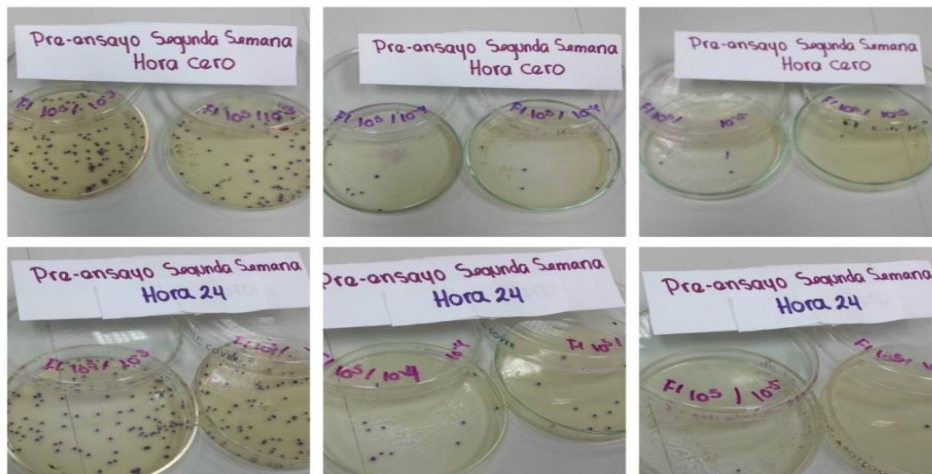


Figura N°79 Imágenes de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 en F1 contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria.

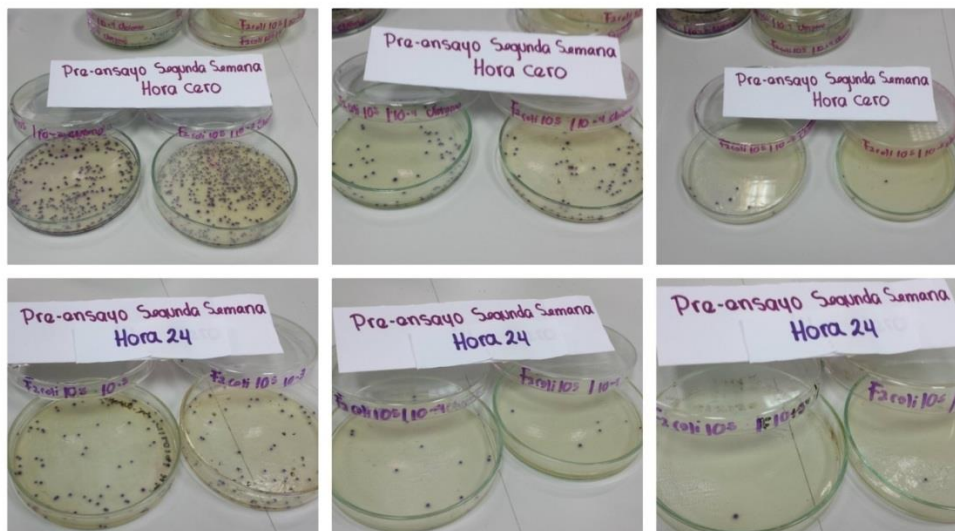


Figura N°80 Imágenes de la determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos ABY-3 en F2 contra *Escherichia coli*, cepa hospitalaria

Tabla N°33 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos  
 ABY-3 en F1, donde se inoculó *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	9.40E+07	24	5.60E+06	72	6.52E+06
	0	1.01E+07	24	5.80E+06	72	7.60E+06
	0	1.10E+07	24	8.00E+06	72	1.26E+07
	0	0.00E+00	24	8.00E+06	72	1.06E+07
	0	2.00E+07	24	4.00E+07	72	1.20E+07
	0	0.00E+00	24	1.00E+07	72	1.00E+07
2° semana	0	1.33E+07	24	1.00E+07	72	1.02E+07
	0	1.26E+07	24	1.15E+07	72	1.20E+07
	0	1.30E+07	24	8.00E+06	72	1.00E+07
	0	1.00E+07	24	9.00E+06	72	8.00E+06
	0	2.00E+07	24	1.00E+07	72	0.00E+00
	0	1.00E+07	24	1.00E+07	72	0.00E+00
3° semana	0	1.15E+07	24	1.08E+07	72	9.80E+06
	0	1.20E+07	24	1.08E+07	72	9.70E+06
	0	1.20E+07	24	1.00E+07	72	7.00E+06
	0	1.00E+07	24	1.00E+07	72	6.00E+06
	0	1.00E+07	24	1.00E+07	72	0.00E+00
	0	1.13E+07	24	1.00E+07	72	0.00E+00
4° semana	0	9.80E+06	24	9.00E+06	72	8.00E+06
	0	1.30E+07	24	1.00E+07	72	9.70E+06
	0	1.20E+07	24	1.00E+07	72	5.00E+06
	0	3.00E+07	24	1.10E+07	72	7.00E+06
	0	1.00E+07	24	2.00E+07	72	0.00E+00
	0	1.00E+07	24	1.00E+07	72	0.00E+00

Tabla N°34 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos  
 ABY-3 en F1, donde se inoculó *Escherichia coli* 10<sup>6</sup>UFC/mL.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	1.01E+07	24	3.40E+06	72	1.04E+07
	0	1.02E+07	24	3.90E+06	72	1.16E+07
	0	1.00E+07	24	3.00E+06	72	1.40E+07
	0	1.40E+07	24	2.00E+06	72	1.30E+07
	0	1.00E+07	24	2.00E+07	72	2.00E+07
	0	4.00E+07	24	2.00E+07	72	2.00E+07
2° semana	0	1.11E+07	24	9.80E+06	72	1.02E+07
	0	1.19E+07	24	8.00E+06	72	9.20E+06
	0	2.30E+07	24	8.00E+07	72	1.20E+07
	0	1.10E+07	24	3.00E+07	72	1.10E+07
	0	2.00E+07	24	1.00E+07	72	1.00E+07
	0	2.00E+07	24	2.00E+07	72	0.00E+00
3° semana	0	1.05E+07	24	1.02E+07	72	4.44E+06
	0	1.10E+07	24	1.05E+07	72	6.92E+06
	0	2.00E+07	24	2.00E+07	72	9.10E+06
	0	1.50E+07	24	1.00E+07	72	7.40E+06
	0	1.00E+07	24	0.00E+00	72	1.70E+07
	0	2.00E+07	24	2.00E+07	72	2.00E+06
4° semana	0	1.20E+07	24	1.10E+07	72	9.80E+06
	0	1.11E+07	24	1.03E+07	72	1.00E+07
	0	1.00E+07	24	1.00E+07	72	1.50E+07
	0	1.50E+07	24	8.00E+06	72	1.10E+07
	0	2.00E+07	24	2.00E+07	72	0.00E+00
	0	3.00E+07	24	1.00E+07	72	1.00E+07

Tabla N°35 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos  
 ABY-3 en F1, blanco.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1	Tiempo	F1	Tiempo	F1
1° semana	0	1.80E+07	24	1.61E+07	72	1.14E+07
	0	1.97E+07	24	1.79E+07	72	1.15E+07
	0	1.70E+07	24	1.40E+07	72	1.70E+07
	0	2.10E+07	24	9.00E+06	72	1.20E+07
	0	1.00E+07	24	3.00E+07	72	1.30E+08
	0	2.00E+07	24	2.00E+07	72	2.00E+07
2° semana	0	1.65E+07	24	1.65E+07	72	1.35E+07
	0	1.50E+07	24	1.26E+07	72	1.33E+07
	0	1.80E+07	24	1.00E+07	72	1.60E+07
	0	2.00E+07	24	1.60E+07	72	1.20E+07
	0	2.00E+07	24	3.00E+07	72	4.00E+07
	0	1.00E+07	24	1.00E+07	72	0.00E+00
3° semana	0	1.70E+07	24	1.50E+07	72	1.15E+07
	0	1.60E+07	24	1.41E+07	72	1.13E+07
	0	1.50E+07	24	1.70E+07	72	1.50E+07
	0	1.30E+07	24	2.20E+07	72	1.30E+07
	0	1.00E+07	24	1.00E+07	72	3.00E+07
	0	1.00E+07	24	2.00E+07	72	2.00E+07
4° semana	0	1.71E+07	24	1.51E+07	72	1.17E+07
	0	1.25E+07	24	1.20E+07	72	1.20E+07
	0	1.50E+07	24	2.20E+07	72	1.40E+07
	0	1.70E+07	24	2.30E+07	72	1.20E+07
	0	1.00E+07	24	1.00E+07	72	2.00E+07
	0	2.00E+07	24	2.00E+07	72	1.00E+07

Tabla N°36 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos  
 ABY-3 en F2, donde se inoculó *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	1.63E+06	24	2.12E+05	72	9.72E+05
	0	1.66E+06	24	3.03E+05	72	9.56E+05
	0	2.00E+06	24	2.00E+06	72	1.67E+06
	0	2.20E+06	24	1.00E+06	72	1.65E+06
	0	1.00E+06	24	1.10E+06	72	2.30E+06
	0	0.00E+00	24	1.00E+06	72	2.20E+06
2° semana	0	1.70E+06	24	2.00E+05	72	9.70E+05
	0	1.67E+06	24	2.70E+05	72	9.63E+05
	0	2.50E+06	24	1.12E+06	72	1.59E+06
	0	2.10E+06	24	1.20E+06	72	1.63E+06
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	72	2.30E+06
	0	1.00E+06	24	1.20E+06	72	2.00E+06
3° semana	0	1.69E+06	24	3.06E+05	72	9.88E+05
	0	1.73E+06	24	3.10E+05	72	9.70E+05
	0	2.30E+06	24	2.20E+06	72	1.60E+06
	0	1.80E+06	24	2.00E+06	72	1.58E+06
	0	1.00E+06	24	1.50E+06	72	2.10E+06
	0	0.00E+00	24	2.00E+06	72	1.80E+06
4° semana	0	1.69E+06	24	3.13E+05	72	9.70E+05
	0	1.75E+06	24	3.20E+05	72	9.64E+05
	0	2.40E+06	24	2.02E+06	72	1.63E+06
	0	2.20E+06	24	2.08E+06	72	1.55E+06
	0	1.00E+06	24	1.30E+06	72	2.40E+06
	0	1.00E+06	24	1.60E+06	72	1.60E+06

Tabla N°37 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos  
 ABY-3 en F2, donde se inoculó *Escherichia coli* 10<sup>6</sup>UFC/mL.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	1.43E+06	24	9.50E+05	72	6.36E+05
	0	1.42E+06	24	9.70E+05	72	6.60E+05
	0	1.20E+06	24	2.10E+06	72	7.90E+05
	0	3.70E+06	24	2.20E+06	72	7.70E+05
	0	0.00E+00	24	2.00E+06	72	3.00E+05
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	72	3.00E+05
2° semana	0	1.42E+06	24	9.30E+05	72	5.00E+05
	0	1.38E+06	24	9.20E+05	72	6.30E+05
	0	1.10E+06	24	2.00E+06	72	6.00E+05
	0	3.00E+06	24	1.80E+06	72	5.00E+05
	0	1.00E+06	24	2.00E+06	72	0.00E+00
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	72	0.00E+00
3° semana	0	1.33E+06	24	9.10E+05	72	6.30E+05
	0	1.40E+06	24	9.40E+05	72	6.20E+05
	0	1.00E+06	24	2.10E+06	72	7.00E+05
	0	1.80E+06	24	1.50E+06	72	7.50E+05
	0	2.00E+06	24	1.00E+06	72	2.00E+05
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	72	1.00E+05
4° semana	0	1.38E+06	24	8.80E+05	72	6.03E+05
	0	1.43E+06	24	9.60E+05	72	6.10E+05
	0	1.30E+06	24	1.80E+06	72	7.30E+05
	0	1.40E+06	24	2.20E+06	72	6.50E+05
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	72	2.00E+05
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	72	2.00E+05



Tabla N°38 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos  
 ABY-3 en F2, blanco.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2	Tiempo	F2	Tiempo	F2
1° semana	0	1.74E+06	24	1.50E+06	72	1.17E+06
	0	2.06E+06	24	1.60E+06	72	1.06E+06
	0	2.40E+06	24	3.00E+06	72	1.20E+06
	0	2.20E+06	24	2.50E+06	72	1.30E+06
	0	2.00E+06	24	2.00E+06	72	0.00E+00
	0	3.00E+06	24	2.00E+06	72	1.00E+06
2° semana	0	1.70E+06	24	1.62E+06	72	1.10E+06
	0	2.00E+06	24	1.48E+06	72	1.19E+00
	0	2.30E+06	24	2.30E+06	72	1.10E+06
	0	1.80E+06	24	2.10E+06	72	1.00E+06
	0	2.00E+06	24	2.00E+06	72	1.00E+06
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	72	1.00E+06
3° semana	0	1.78E+06	24	1.51E+06	72	1.13E+06
	0	2.01E+06	24	1.49E+06	72	1.15E+06
	0	2.10E+06	24	3.50E+06	72	1.00E+06
	0	1.60E+06	24	2.80E+06	72	1.20E+06
	0	1.00E+06	24	2.00E+06	72	1.00E+06
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	72	2.00E+06
4° semana	0	1.79E+06	24	1.47E+06	72	1.16E+06
	0	2.03E+06	24	1.53E+06	72	1.18E+06
	0	2.30E+06	24	2.30E+06	72	1.20E+06
	0	1.50E+06	24	2.00E+06	72	1.60E+06
	0	2.00E+06	24	1.00E+06	72	1.00E+06
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	72	0.00E+00

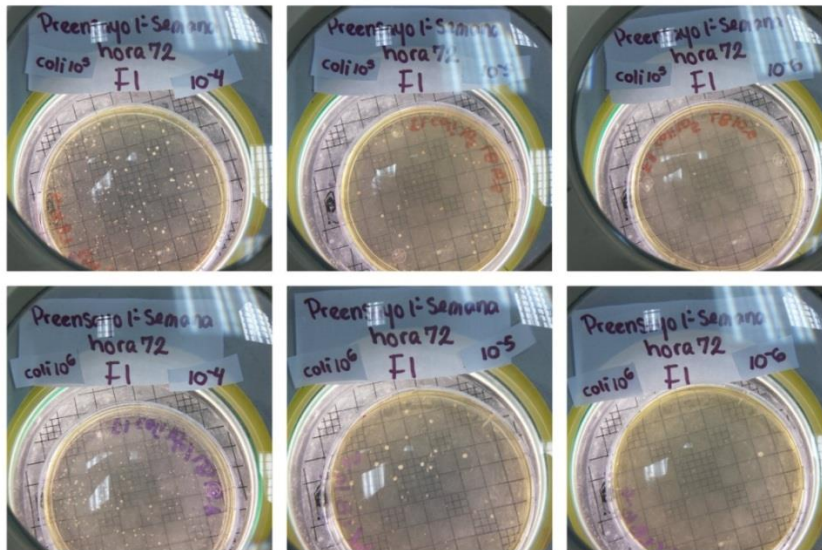


Figura N° 81 Imágenes sobre la determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F1.

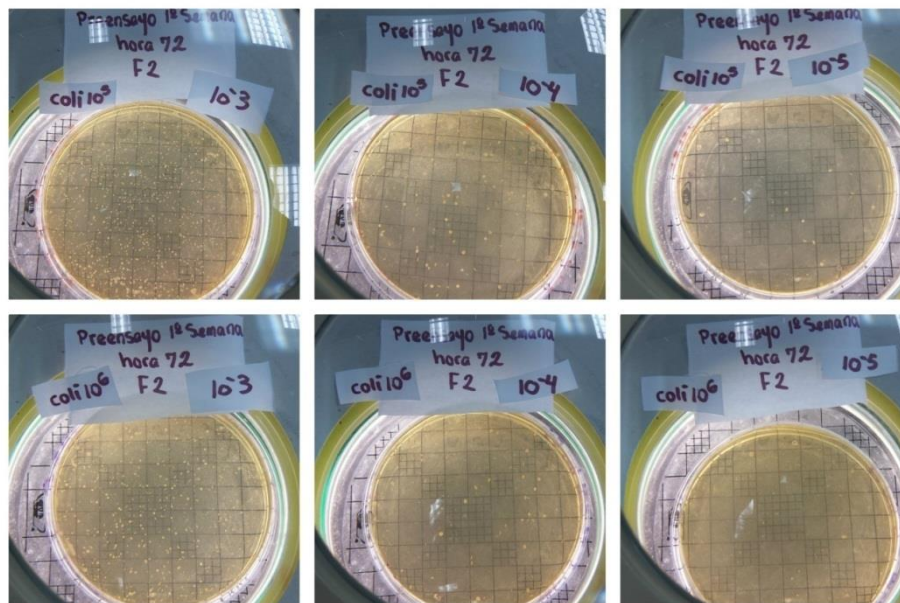


Figura N° 82 Imágenes sobre la determinación de la viabilidad de probióticos ABY-3 en F2.

Tabla N°39 Resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración 10<sup>5</sup> UFC/mL.

UFC/mL tiempo	Tiempo	coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	2.00E+05	24	3.00E+05	48	1.10E+06	72	2.00E+06
	0	3.00E+05	24	4.00E+05	48	1.08E+06	72	3.00E+06
	0	1.20E+05	24	1.50E+05	48	1.00E+06	72	1.30E+06
	0	1.30E+05	24	1.20E+05	48	8.50E+05	72	1.20E+06
	0	1.20E+05	24	1.25E+05	48	7.98E+05	72	1.03E+06
	0	1.33E+05	24	1.30E+05	48	1.30E+06	72	1.06E+06
2° semana	0	5.00E+05	24	3.00E+05	48	1.80E+06	72	2.00E+06
	0	2.00E+05	24	2.00E+05	48	1.02E+06	72	1.00E+06
	0	1.50E+05	24	1.20E+05	48	1.03E+06	72	1.00E+06
	0	1.10E+05	24	1.50E+05	48	5.30E+05	72	1.10E+06
	0	1.04E+05	24	1.22E+05	48	5.80E+05	72	1.00E+06
	0	1.08E+05	24	1.18E+05	48	2.00E+06	72	9.80E+05
3° semana	0	3.00E+05	24	1.00E+05	48	1.80E+06	72	1.00E+06
	0	1.00E+05	24	5.00E+05	48	1.00E+06	72	0.00E+00
	0	1.50E+05	24	1.80E+05	48	1.04E+06	72	1.20E+06
	0	1.20E+05	24	1.70E+05	48	6.20E+05	72	1.00E+06
	0	1.02E+05	24	1.22E+05	48	5.80E+05	72	1.02E+06
	0	1.05E+05	24	1.15E+05	48	2.20E+06	72	1.05E+06
4° semana	0	2.00E+05	24	6.00E+05	48	1.80E+06	72	3.00E+06
	0	6.00E+05	24	2.00E+05	48	1.00E+06	72	5.00E+06
	0	1.60E+05	24	1.70E+05	48	1.07E+06	72	1.30E+06
	0	1.30E+05	24	1.30E+05	48	6.30E+05	72	1.20E+06
	0	1.04E+05	24	1.38E+05	48	5.15E+05	72	1.03E+06
	0	1.03E+05	24	1.27E+05	48	1.20E+06	72	1.05E+06

Tabla N°40 Resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración 10<sup>6</sup> UFC/mL

UFC/mL tiempo	Tiempo	coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	1.05E+06	24	1.15E+06	48	8.70E+06	72	1.02E+07
	0	1.08E+06	24	1.25E+06	48	8.40E+06	72	1.08E+07
	0	1.20E+06	24	1.80E+06	48	2.06E+07	72	1.40E+07
	0	1.40E+06	24	2.00E+06	48	2.09E+07	72	1.90E+07
	0	2.00E+06	24	5.00E+06	48	1.30E+07	72	3.00E+07
	0	1.00E+06	24	8.00E+06	48	1.60E+07	72	6.00E+07
2° semana	0	1.03E+06	24	1.18E+06	48	8.60E+06	72	1.01E+07
	0	1.09E+06	24	1.20E+06	48	8.50E+06	72	1.05E+07
	0	1.10E+06	24	1.70E+06	48	2.07E+07	72	1.60E+07
	0	1.30E+06	24	1.90E+06	48	2.06E+07	72	1.80E+07
	0	3.00E+06	24	8.00E+06	48	1.40E+07	72	7.00E+07
	0	2.00E+06	24	7.00E+06	48	1.60E+07	72	8.00E+07
3° semana	0	1.07E+06	24	1.21E+06	48	8.70E+06	72	1.06E+07
	0	1.05E+06	24	1.20E+06	48	8.68E+06	72	1.07E+07
	0	1.60E+06	24	1.80E+06	48	2.07E+07	72	1.90E+07
	0	1.50E+06	24	1.60E+06	48	2.05E+07	72	1.60E+07
	0	2.00E+06	24	6.00E+06	48	1.60E+07	72	3.00E+07
	0	2.00E+06	24	5.00E+06	48	1.80E+07	72	5.00E+07
4° semana	0	1.07E+06	24	1.23E+06	48	8.53E+06	72	1.05E+07
	0	1.08E+06	24	1.19E+06	48	8.58E+06	72	1.06E+07
	0	1.20E+06	24	1.50E+06	48	2.03E+07	72	1.50E+07
	0	1.10E+06	24	1.60E+06	48	2.06E+07	72	1.70E+07
	0	2.00E+06	24	8.00E+06	48	1.90E+07	72	5.00E+07
	0	3.00E+06	24	6.00E+06	48	1.60E+07	72	6.00E+07

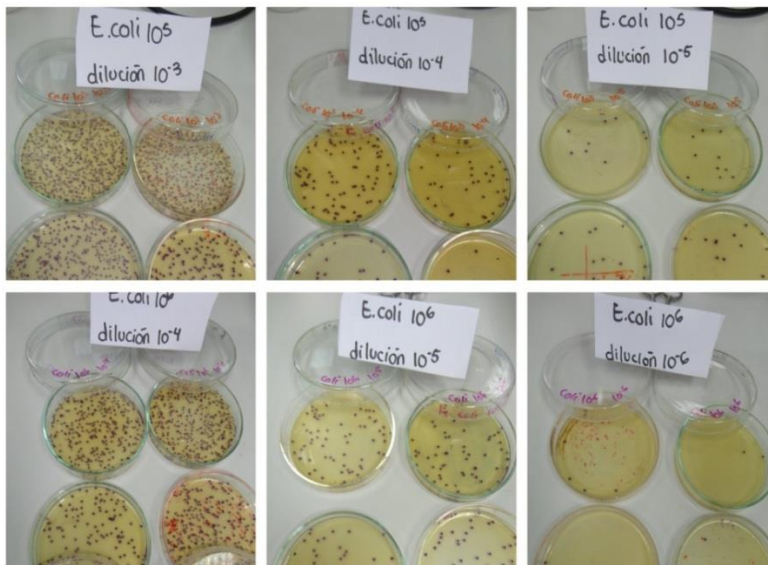


Figura N°83 Blanco del patógeno *Escherichia coli* en el pre-ensayo.

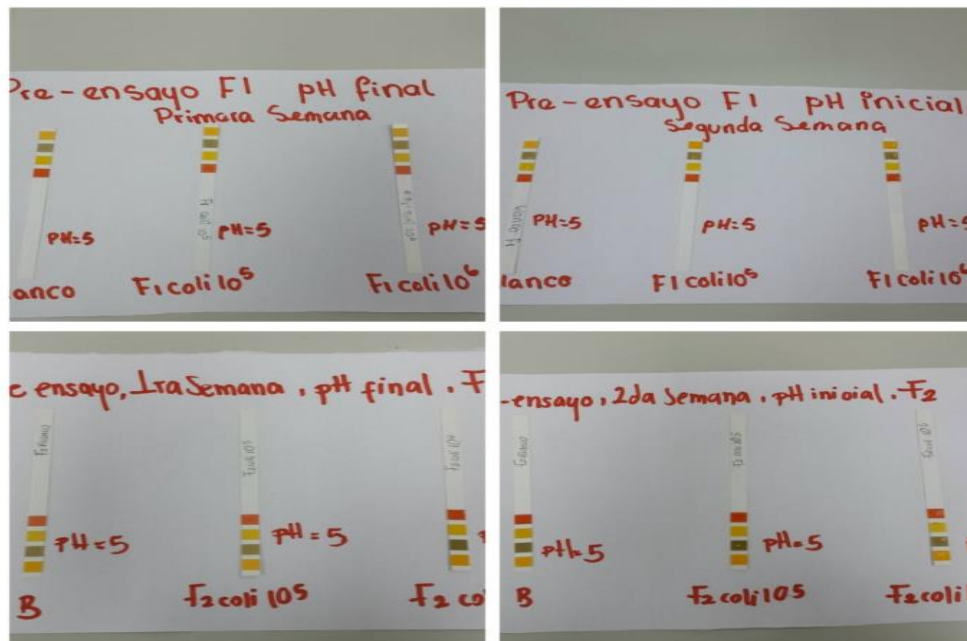


Figura N° 84 pH inicial y final de las bebidas en el pre-ensayo.

## **Anexo N° 15**

### **Formulación del Alimento Funcional.**



Figura N° 85 Materias primas utilizadas para la formulación del alimento funcional.



Figura N°86 Bebida del experimento sabor fresa ExpFr1 y ExpFr2.



Figura N°87 Bebida del experimento sabor naranja ExpNa1, ExpNa2 y ExpNa3.



Figura N°88 Bebidas ExpFr2 y ExpNa3 almacenadas en un periodo de 5 días.





Figura N°89 Elaboración del alimento funcional en polvo para reconstituir



Figura N°90 Empacado de alimento funcional en bolsitas individuales y producto terminado.



Figura N°91 Bebida reconstituida lista para consumir.

**Anexo N° 16**

**Resultados del Ensayo.**

Tabla N° 41 Resultados de la determinación del efecto inhibitorio de probióticos contra *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL cepa hospitalaria en formulación F1.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	1.16E+05	24	1.52E+05	48	1.17E+05	72	3.70E+03
	0	1.84E+05	24	1.30E+05	48	1.33E+05	72	2.50E+03
	0	1.70E+05	24	7.00E+05	48	1.70E+05	72	1.80E+03
	0	3.30E+05	24	1.10E+05	48	1.80E+05	72	1.35E+03
	0	4.00E+05	24	0.00E+00	48	0.00E+00	72	2.30E+03
	0	3.00E+05	24	1.00E+05	48	0.00E+00	72	1.40E+03
2° semana	0	1.25E+05	24	1.15E+05	48	1.00E+05	72	5.15E+04
	0	1.30E+05	24	1.25E+05	48	3.78E+04	72	2.30E+03
	0	1.78E+05	24	6.70E+04	48	3.51E+04	72	1.75E+03
	0	1.83E+05	24	5.80E+04	48	3.00E+04	72	1.25E+03
	0	3.00E+05	24	1.00E+05	48	2.00E+04	72	1.50E+03
	0	2.00E+05	24	1.00E+05	48	2.80E+04	72	1.00E+03
3° semana	0	1.70E+05	24	1.28E+05	48	2.78E+04	72	2.85E+03
	0	2.35E+05	24	1.25E+05	48	2.25E+04	72	2.78E+03
	0	1.84E+05	24	8.00E+04	48	3.00E+04	72	1.83E+03
	0	3.28E+05	24	5.70E+04	48	1.00E+04	72	2.58E+03
	0	1.00E+05	24	6.30E+04	48	2.35E+04	72	1.00E+03
	0	2.00E+05	24	3.70E+04	48	2.75E+04	72	2.00E+03
4° semana	0	2.48E+05	24	1.18E+05	48	2.28E+04	72	2.78E+03
	0	2.35E+05	24	1.28E+05	48	3.00E+04	72	2.83E+03
	0	1.78E+05	24	1.30E+05	48	1.00E+04	72	2.75E+03
	0	3.50E+05	24	1.30E+05	48	2.30E+04	72	1.25E+03
	0	3.00E+05	24	6.38E+04	48	2.40E+04	72	1.00E+03
	0	2.00E+05	24	7.50E+04	48	1.20E+04	72	1.00E+03

Tabla N° 42 Resultados de la determinación del efecto inhibitorio de probióticos contra *Escherichia coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL, cepa hospitalaria en formulación F1.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	1.89E+06	24	9.80E+05	48	1.00E+06	72	4.85E+04
	0	1.30E+06	24	1.24E+06	48	1.10E+06	72	5.35E+04
	0	4.00E+06	24	1.40E+06	48	1.30E+06	72	3.00E+04
	0	1.00E+06	24	1.70E+06	48	2.10E+06	72	3.21E+04
	0	8.00E+06	24	1.00E+06	48	0.00E+00	72	2.00E+04
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	48	0.00E+00	72	2.10E+04
2° semana	0	1.75E+06	24	8.30E+05	48	1.00E+06	72	4.30E+04
	0	1.46E+06	24	7.40E+05	48	1.10E+06	72	3.30E+04
	0	3.20E+06	24	1.20E+06	48	3.80E+05	72	3.80E+04
	0	2.30E+06	24	1.60E+06	48	3.50E+05	72	2.80E+04
	0	1.00E+06	24	1.00E+06	48	1.00E+05	72	2.30E+04
	0	2.00E+06	24	1.00E+06	48	1.00E+05	72	3.40E+04
3° semana	0	1.83E+06	24	7.80E+05	48	5.80E+05	72	5.20E+04
	0	1.53E+06	24	6.20E+05	48	4.30E+05	72	3.80E+04
	0	3.00E+06	24	1.30E+06	48	3.30E+05	72	4.30E+04
	0	2.10E+06	24	1.62E+06	48	2.80E+05	72	4.30E+04
	0	3.00E+06	24	0.00E+00	48	1.00E+05	72	3.50E+04
	0	2.00E+06	24	0.00E+00	48	1.20E+05	72	3.20E+04
4° semana	0	1.78E+06	24	8.90E+05	48	5.30E+05	72	5.80E+04
	0	1.58E+06	24	8.20E+05	48	4.80E+05	72	4.30E+04
	0	3.50E+06	24	1.25E+06	48	3.20E+05	72	3.80E+04
	0	2.00E+06	24	1.00E+06	48	2.30E+05	72	3.50E+04
	0	2.00E+06	24	1.00E+06	48	1.20E+05	72	3.20E+04
	0	1.00E+06	24	1.63E+06	48	1.00E+05	72	3.30E+04

Tabla N°43 Resultados de la determinación del efecto inhibitorio de probióticos contra *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL, cepa hospitalaria en formulación F2.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	4.50E+05	24	6.10E+05	48	2.80E+05	72	9.60E+03
	0	4.60E+05	24	5.20E+05	48	3.20E+05	72	9.80E+03
	0	5.10E+05	24	3.10E+05	48	2.60E+05	72	8.30E+03
	0	5.20E+05	24	2.70E+05	48	3.30E+05	72	8.40E+03
	0	4.20E+05	24	4.10E+05	48	8.80E+04	72	7.80E+03
	0	3.90E+05	24	3.90E+05	48	8.70E+04	72	7.90E+03
2° semana	0	4.30E+05	24	4.30E+05	48	2.90E+05	72	9.90E+03
	0	4.60E+05	24	3.70E+05	48	3.10E+05	72	9.60E+03
	0	5.30E+05	24	2.80E+05	48	2.80E+05	72	8.80E+03
	0	5.40E+05	24	3.20E+05	48	2.60E+05	72	8.70E+03
	0	2.90E+05	24	4.20E+05	48	8.10E+04	72	7.80E+03
	0	2.70E+05	24	3.90E+05	48	8.20E+04	72	7.60E+03
3° semana	0	5.10E+05	24	3.08E+05	48	2.70E+05	72	8.90E+03
	0	5.20E+05	24	1.50E+05	48	3.20E+05	72	9.10E+03
	0	4.80E+05	24	2.70E+05	48	2.90E+05	72	8.60E+03
	0	4.70E+05	24	2.70E+05	48	2.80E+05	72	9.10E+03
	0	3.20E+05	24	4.00E+05	48	9.10E+04	72	8.20E+03
	0	3.40E+05	24	4.00E+05	48	9.30E+04	72	8.10E+03
4° semana	0	5.60E+05	24	2.90E+05	48	2.70E+05	72	9.30E+03
	0	5.30E+05	24	3.20E+05	48	2.90E+05	72	9.10E+03
	0	4.70E+05	24	2.70E+05	48	2.10E+05	72	8.30E+03
	0	4.50E+05	24	4.20E+05	48	2.30E+05	72	8.60E+03
	0	3.10E+05	24	3.90E+05	48	8.90E+04	72	7.80E+03
	0	3.40E+05	24	2.80E+05	48	8.80E+04	72	7.60E+03

Tabla N° 44 Resultados de la determinación del efecto inhibitorio de probióticos contra *Escherichia coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL, cepa hospitalaria en formulación F2.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	2.20E+06	24	3.90E+06	48	6.60E+05	72	8.90E+04
	0	2.90E+06	24	4.00E+06	48	7.80E+05	72	9.70E+04
	0	2.70E+06	24	2.80E+06	48	6.50E+05	72	7.90E+04
	0	3.40E+06	24	2.70E+06	48	5.40E+05	72	6.80E+04
	0	3.30E+06	24	9.60E+05	48	8.70E+04	72	7.70E+04
	0	2.10E+06	24	8.70E+05	48	9.80E+04	72	8.80E+04
2° semana	0	2.10E+06	24	3.50E+06	48	6.70E+05	72	8.70E+04
	0	2.10E+06	24	3.80E+06	48	8.80E+05	72	9.20E+04
	0	3.70E+06	24	3.00E+06	48	6.40E+05	72	6.80E+04
	0	2.50E+06	24	2.90E+06	48	6.20E+05	72	7.80E+04
	0	1.60E+06	24	9.20E+05	48	9.20E+04	72	8.90E+04
	0	4.20E+06	24	8.60E+05	48	9.40E+04	72	7.90E+04
3° semana	0	2.80E+06	24	3.60E+06	48	6.90E+05	72	7.80E+04
	0	2.00E+06	24	3.70E+06	48	8.10E+05	72	8.90E+04
	0	2.60E+06	24	2.90E+06	48	7.00E+05	72	6.60E+04
	0	1.00E+06	24	2.40E+06	48	6.90E+05	72	6.90E+04
	0	2.30E+06	24	8.80E+05	48	8.40E+04	72	6.30E+04
	0	4.40E+06	24	8.60E+05	48	8.30E+04	72	6.40E+04
4° semana	0	1.70E+06	24	3.30E+06	48	7.20E+05	72	8.80E+04
	0	1.80E+06	24	2.90E+06	48	8.20E+05	72	8.40E+04
	0	1.30E+06	24	2.20E+06	48	7.60E+05	72	7.60E+04
	0	2.70E+06	24	2.00E+06	48	7.70E+05	72	7.80E+04
	0	2.20E+06	24	9.60E+05	48	9.30E+04	72	6.80E+04
	0	2.60E+06	24	9.40E+05	48	9.10E+04	72	6.90E+04

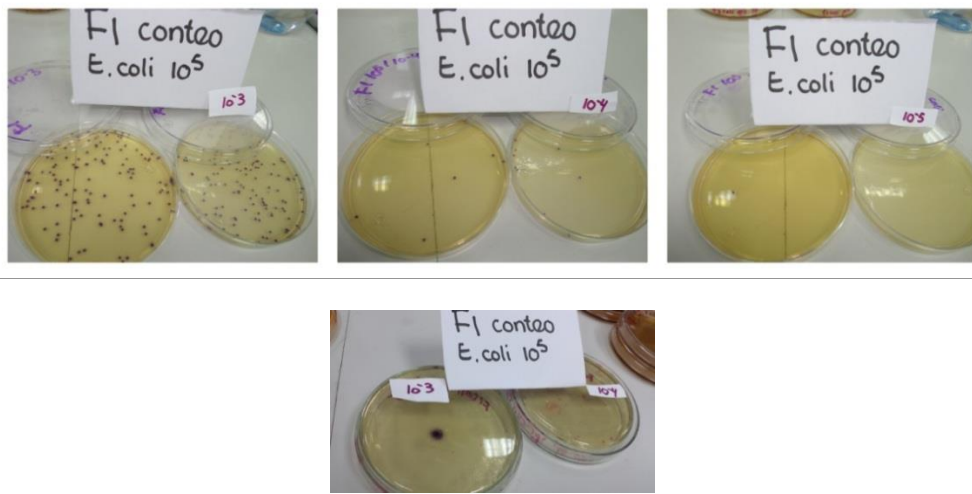


Figura N° 92 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos LA-5 BB-12 en F1 contra *Escherichia coli*  $10^5$  UFC/mL, cepa hospitalaria.

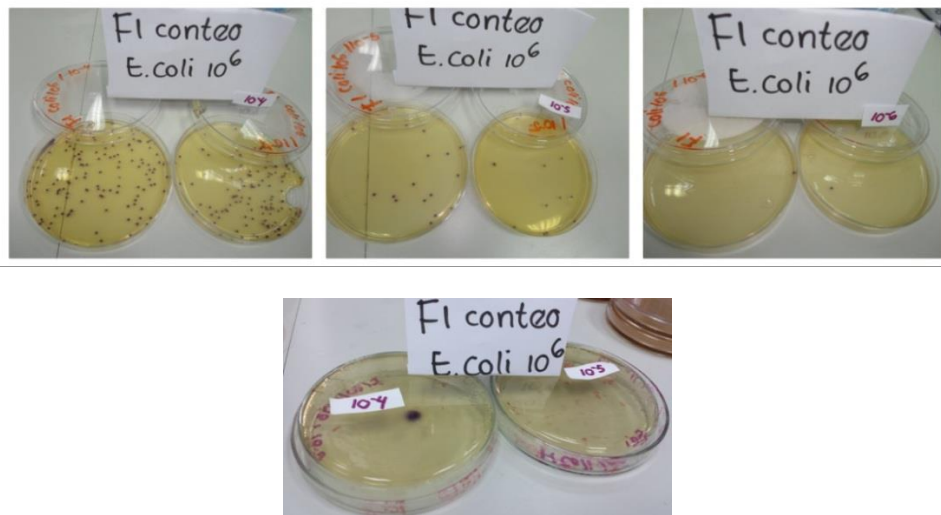


Figura N° 93 Determinación del efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos LA-5 BB-12 en F2 contra *Escherichia coli*  $10^6$  UFC/mL, cepa hospitalaria.



Tabla N° 45 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos en F1, donde se inoculó *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	2.60E+08	24	2.30E+08	72	1.43E+08
	0	2.55E+08	24	2.10E+08	72	1.30E+08
	0	3.50E+08	24	2.40E+08	72	1.00E+08
	0	3.30E+08	24	3.50E+08	72	1.50E+08
	0	3.00E+08	24	2.00E+08	72	2.00E+08
	0	3.00E+08	24	2.00E+08	72	1.00E+08
2° semana	0	2.55E+08	24	3.22E+08	72	1.45E+08
	0	2.62E+08	24	3.57E+08	72	1.35E+08
	0	3.50E+08	24	3.30E+08	72	1.00E+08
	0	3.20E+08	24	3.20E+08	72	1.20E+08
	0	3.00E+08	24	2.00E+08	72	2.00E+08
	0	1.00E+08	24	1.00E+08	72	1.00E+08
3° semana	0	2.57E+08	24	3.25E+08	72	1.48E+08
	0	2.65E+08	24	3.65E+08	72	1.28E+08
	0	3.40E+08	24	3.40E+08	72	1.50E+08
	0	3.10E+08	24	2.80E+08	72	1.10E+08
	0	2.00E+08	24	1.00E+08	72	1.00E+08
	0	1.00E+08	24	1.00E+08	72	1.00E+08
4° semana	0	2.60E+08	24	3.54E+08	72	1.50E+08
	0	2.60E+08	24	3.62E+08	72	1.27E+08
	0	3.40E+08	24	3.20E+08	72	1.30E+08
	0	3.20E+08	24	2.70E+08	72	1.60E+08
	0	2.00E+08	24	2.00E+08	72	2.00E+08
	0	1.00E+08	24	2.00E+08	72	1.00E+08

Tabla N° 46 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos en F1, donde se inoculó *Escherichia coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F1 coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	3.48E+08	24	2.30E+08	72	1.78E+08
	0	3.92E+08	24	3.20E+08	72	1.85E+08
	0	2.70E+08	24	3.10E+08	72	2.20E+08
	0	2.60E+08	24	1.00E+08	72	2.00E+08
	0	2.00E+08	24	2.00E+08	72	1.00E+08
	0	1.50E+08	24	2.32E+08	72	1.00E+08
2° semana	0	3.52E+08	24	3.20E+08	72	1.82E+08
	0	2.98E+08	24	3.20E+08	72	1.81E+08
	0	1.72E+08	24	1.50E+08	72	2.30E+08
	0	1.63E+08	24	1.00E+08	72	2.20E+08
	0	2.00E+08	24	2.00E+08	72	1.00E+08
	0	1.00E+08	24	2.31E+08	72	2.00E+08
3° semana	0	3.54E+08	24	2.50E+08	72	1.85E+08
	0	2.97E+08	24	3.10E+08	72	1.77E+08
	0	1.74E+08	24	1.70E+08	72	2.40E+08
	0	1.65E+08	24	1.00E+08	72	1.70E+08
	0	2.00E+08	24	3.00E+08	72	1.00E+08
	0	1.00E+08	24	2.28E+08	72	3.00E+08
4° semana	0	3.47E+08	24	2.80E+08	72	1.84E+08
	0	2.91E+08	24	3.00E+08	72	1.79E+08
	0	3.74E+08	24	1.30E+08	72	2.50E+08
	0	1.62E+08	24	2.00E+08	72	1.60E+08
	0	1.00E+08	24	1.00E+08	72	1.00E+08
	0	1.00E+08	24	1.50E+08	72	1.00E+08

Tabla N° 47 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos en F1, blanco.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F1	Tiempo	F1	Tiempo	F1
1° semana	0	2.72E+08	24	2.80E+08	72	1.10E+08
	0	1.66E+08	24	2.50E+08	72	1.60E+08
	0	2.20E+08	24	3.20E+08	72	1.60E+08
	0	2.60E+08	24	2.80E+08	72	2.50E+08
	0	4.00E+08	24	2.00E+08	72	2.00E+08
	0	4.00E+08	24	2.00E+08	72	3.00E+08
2° semana	0	2.80E+08	24	2.85E+08	72	1.10E+08
	0	2.75E+08	24	2.55E+08	72	1.55E+08
	0	2.30E+08	24	3.10E+08	72	1.50E+08
	0	2.50E+08	24	2.20E+08	72	2.30E+08
	0	4.00E+08	24	2.00E+08	72	2.00E+08
	0	3.00E+08	24	1.00E+08	72	4.00E+08
3° semana	0	2.30E+08	24	3.75E+08	72	1.50E+08
	0	2.75E+08	24	3.54E+08	72	1.55E+08
	0	2.35E+08	24	3.20E+08	72	1.60E+08
	0	2.50E+08	24	3.00E+08	72	2.40E+08
	0	3.00E+08	24	3.00E+08	72	2.00E+08
	0	1.00E+08	24	1.00E+08	72	1.00E+08
4° semana	0	2.55E+08	24	3.63E+08	72	1.20E+08
	0	3.85E+08	24	2.85E+08	72	1.50E+08
	0	2.40E+08	24	2.20E+08	72	1.50E+08
	0	2.30E+08	24	2.10E+08	72	2.40E+08
	0	2.00E+08	24	2.00E+08	72	2.00E+08
	0	1.00E+08	24	2.00E+08	72	3.00E+08

Tabla N° 48 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos en F2, donde se inoculó *Escherichia coli* 10<sup>5</sup> UFC/mL.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	3.30E+07	24	3.00E+07	72	3.20E+07
	0	3.66E+07	24	2.80E+07	72	3.00E+07
	0	3.20E+07	24	2.60E+07	72	2.70E+07
	0	2.60E+07	24	2.50E+07	72	2.60E+07
	0	2.30E+07	24	1.20E+07	72	2.50E+07
	0	2.00E+07	24	1.00E+07	72	2.30E+07
2° semana	0	2.40E+07	24	2.80E+07	72	1.20E+07
	0	2.30E+07	24	2.70E+07	72	2.80E+07
	0	2.30E+07	24	1.40E+07	72	2.50E+07
	0	2.10E+07	24	1.80E+07	72	2.30E+07
	0	3.30E+07	24	1.30E+07	72	2.00E+07
	0	3.00E+07	24	1.20E+07	72	1.70E+07
3° semana	0	2.60E+07	24	3.00E+07	72	1.90E+07
	0	2.70E+07	24	2.80E+07	72	1.70E+07
	0	2.40E+07	24	2.60E+07	72	2.30E+07
	0	2.20E+07	24	2.30E+07	72	2.10E+07
	0	1.20E+07	24	1.90E+07	72	1.50E+07
	0	3.00E+07	24	1.70E+07	72	1.30E+07
4° semana	0	2.90E+07	24	2.90E+07	72	1.80E+07
	0	3.70E+07	24	2.80E+07	72	1.60E+07
	0	2.20E+07	24	2.20E+07	72	2.40E+07
	0	2.00E+07	24	2.10E+07	72	1.80E+07
	0	1.60E+07	24	1.50E+07	72	1.60E+07
	0	1.20E+07	24	1.70E+07	72	1.90E+07

Tabla N° 49 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos en F2, donde se inoculó *Escherichia coli* 10<sup>6</sup> UFC/mL.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	F2 coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	2.20E+07	24	2.50E+07	72	2.70E+07
	0	2.60E+07	24	2.40E+07	72	2.50E+07
	0	2.40E+07	24	2.20E+07	72	2.10E+07
	0	2.20E+07	24	1.70E+07	72	1.80E+07
	0	1.00E+07	24	1.30E+07	72	1.20E+07
	0	1.00E+07	24	1.60E+07	72	1.00E+07
2° semana	0	2.80E+07	24	2.60E+07	72	2.90E+07
	0	2.50E+07	24	2.30E+07	72	2.40E+07
	0	2.30E+07	24	1.70E+07	72	2.10E+07
	0	1.00E+07	24	1.40E+07	72	2.00E+07
	0	1.00E+08	24	1.20E+07	72	1.40E+07
	0	1.00E+08	24	1.00E+07	72	1.60E+07
3° semana	0	2.60E+07	24	2.70E+07	72	2.70E+07
	0	2.40E+07	24	2.40E+07	72	2.50E+07
	0	2.20E+07	24	2.20E+07	72	2.20E+07
	0	2.00E+07	24	2.10E+07	72	1.70E+07
	0	1.40E+07	24	1.30E+07	72	1.00E+07
	0	1.30E+07	24	1.50E+07	72	1.10E+07
4° semana	0	2.70E+07	24	2.80E+07	72	2.70E+07
	0	2.40E+07	24	2.50E+07	72	2.40E+07
	0	2.00E+07	24	2.10E+07	72	1.30E+07
	0	1.90E+07	24	1.70E+07	72	1.00E+07
	0	1.50E+07	24	1.20E+07	72	1.60E+07
	0	1.30E+07	24	1.10E+07	72	1.30E+07

Tabla N° 50 Resultados de la determinación de la viabilidad de probióticos en F2, blanco.

UFC/mL tiempo	Tiempo	F2	Tiempo	F2	Tiempo	F2
1° semana	0	3.20E+07	24	3.00E+07	72	4.90E+07
	0	3.00E+07	24	3.70E+07	72	5.00E+07
	0	3.20E+07	24	3.40E+07	72	4.40E+07
	0	3.00E+07	24	3.00E+07	72	4.00E+07
	0	2.00E+07	24	2.00E+07	72	2.50E+07
	0	2.00E+07	24	2.00E+07	72	2.70E+07
2° semana	0	2.00E+07	24	3.30E+07	72	4.20E+07
	0	3.60E+07	24	3.80E+07	72	4.60E+07
	0	2.90E+07	24	3.30E+07	72	3.50E+07
	0	2.60E+07	24	3.00E+07	72	3.70E+07
	0	2.00E+07	24	2.30E+07	72	2.10E+07
	0	2.00E+07	24	2.20E+07	72	2.00E+07
3° semana	0	2.70E+07	24	2.90E+07	72	4.80E+07
	0	3.80E+07	24	2.30E+07	72	1.30E+07
	0	3.50E+07	24	3.50E+07	72	1.70E+07
	0	3.10E+07	24	3.80E+07	72	2.20E+07
	0	2.00E+07	24	2.40E+07	72	2.30E+07
	0	2.40E+07	24	2.70E+07	72	1.90E+07
4° semana	0	5.20E+07	24	2.70E+07	72	2.60E+07
	0	4.90E+07	24	2.90E+07	72	1.30E+07
	0	4.50E+07	24	2.70E+07	72	1.30E+07
	0	3.30E+07	24	2.90E+07	72	1.40E+07
	0	2.00E+07	24	2.20E+07	72	1.00E+07
	0	2.00E+07	24	2.60E+07	72	1.00E+07

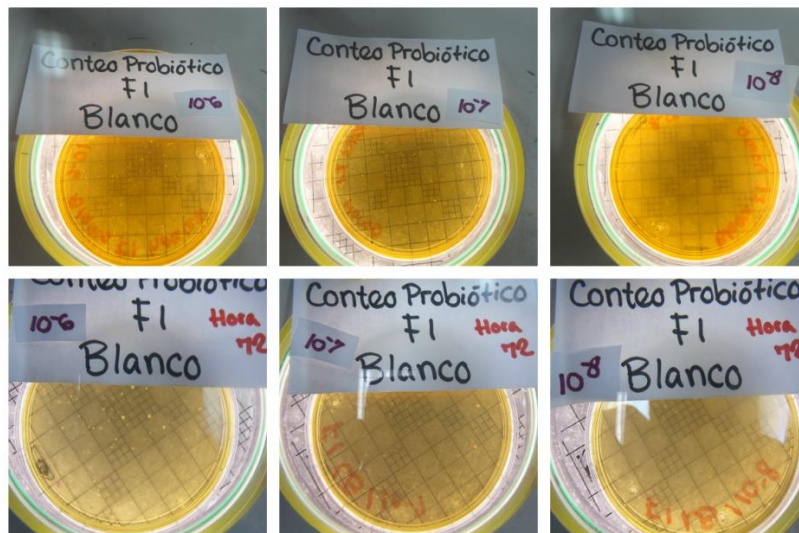


Figura N° 94 Determinación de la viabilidad de la mezcla de probióticos LA-5 BB-12 en F1, Blanco



Figura N° 95 Determinación de la viabilidad de la mezcla de probióticos LA-5 y BB-12 en F2, Blanco.

Tabla N° 51 Resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración 10<sup>5</sup>UFC/mL.

UFC/mL tiempo	Tiempo	coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	coli10 <sup>5</sup>	Tiempo	coli10 <sup>5</sup>
1° semana	0	4.68E+05	24	1.07E+06	48	8.00E+05	72	5.80E+06
	0	4.16E+05	24	7.40E+05	48	6.40E+05	72	4.70E+06
	0	3.30E+05	24	9.50E+05	48	2.30E+06	72	5.30E+06
	0	2.50E+05	24	5.10E+05	48	2.50E+06	72	3.20E+06
	0	1.00E+05	24	1.30E+05	48	2.00E+06	72	4.00E+06
	0	3.00E+05	24	1.40E+05	48	2.00E+06	72	5.00E+06
2° semana	0	3.36E+05	24	6.92E+05	48	2.13E+06	72	6.30E+06
	0	4.24E+05	24	2.24E+05	48	2.80E+06	72	6.10E+06
	0	4.30E+05	24	3.80E+05	48	1.60E+06	72	5.80E+06
	0	4.40E+05	24	1.80E+05	48	1.60E+06	72	4.00E+06
	0	1.00E+05	24	2.20E+06	48	2.00E+06	72	2.00E+06
	0	3.00E+05	24	1.80E+06	48	1.00E+06	72	6.00E+06
3° semana	0	3.50E+05	24	7.80E+05	48	1.80E+06	72	5.30E+06
	0	4.15E+05	24	5.00E+05	48	2.10E+06	72	5.40E+06
	0	3.80E+05	24	4.30E+05	48	2.10E+06	72	5.40E+06
	0	4.00E+05	24	6.30E+05	48	2.30E+06	72	5.30E+06
	0	1.00E+05	24	1.20E+06	48	2.00E+06	72	4.00E+06
	0	2.00E+05	24	1.30E+06	48	2.00E+06	72	5.00E+06
4° semana	0	4.00E+05	24	7.10E+05	48	2.30E+06	72	6.10E+06
	0	4.00E+05	24	6.30E+05	48	7.80E+05	72	5.10E+06
	0	3.90E+05	24	5.30E+05	48	1.60E+06	72	5.50E+06
	0	3.70E+05	24	7.20E+05	48	1.60E+06	72	5.80E+06
	0	3.00E+05	24	1.20E+06	48	1.00E+06	72	6.00E+06
	0	4.00E+05	24	1.10E+06	48	2.00E+06	72	5.00E+06



Tabla N° 52 Resultados del Blanco del patógeno *Escherichia coli* en concentración 10<sup>6</sup>UFC/mL

UFC/mL tiempo	Tiempo	coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	coli10 <sup>6</sup>	Tiempo	coli10 <sup>6</sup>
1° semana	0	3.16E+06	24	4.48E+06	48	5.48E+06	72	3.80E+07
	0	3.28E+06	24	5.08E+06	48	5.32E+06	72	7.20E+07
	0	3.60E+06	24	6.00E+06	48	1.02E+07	72	6.30E+07
	0	3.90E+06	24	7.80E+06	48	9.70E+06	72	6.90E+07
	0	7.00E+06	24	2.00E+06	48	1.70E+07	72	7.30E+07
	0	2.00E+06	24	5.00E+06	48	1.20E+07	72	5.90E+07
2° semana	0	2.80E+06	24	4.40E+06	48	1.15E+07	72	6.30E+07
	0	2.84E+06	24	3.60E+06	48	7.00E+06	72	6.30E+07
	0	3.60E+06	24	8.00E+06	48	1.23E+07	72	7.00E+07
	0	5.10E+06	24	1.00E+07	48	1.38E+07	72	5.30E+07
	0	8.00E+06	24	1.00E+07	48	1.00E+07	72	3.80E+07
	0	4.00E+06	24	7.00E+06	48	1.70E+07	72	7.80E+07
3° semana	0	2.50E+06	24	4.30E+06	48	1.25E+07	72	6.00E+07
	0	3.38E+06	24	3.89E+06	48	9.00E+06	72	7.20E+07
	0	3.50E+06	24	4.00E+06	48	1.00E+07	72	6.50E+07
	0	3.80E+06	24	7.00E+06	48	9.80E+06	72	5.30E+07
	0	5.00E+06	24	7.00E+06	48	1.70E+07	72	6.30E+07
	0	4.00E+06	24	8.00E+06	48	1.90E+07	72	7.50E+07
4° semana	0	3.18E+06	24	4.47E+06	48	1.35E+07	72	4.00E+07
	0	2.73E+06	24	4.38E+06	48	1.30E+07	72	5.30E+07
	0	3.80E+06	24	5.30E+06	48	1.28E+07	72	6.80E+07
	0	4.10E+06	24	6.80E+06	48	1.50E+07	72	6.50E+07
	0	6.00E+06	24	6.00E+06	48	1.80E+07	72	6.80E+07
	0	3.00E+06	24	7.00E+06	48	1.50E+07	72	8.00E+07

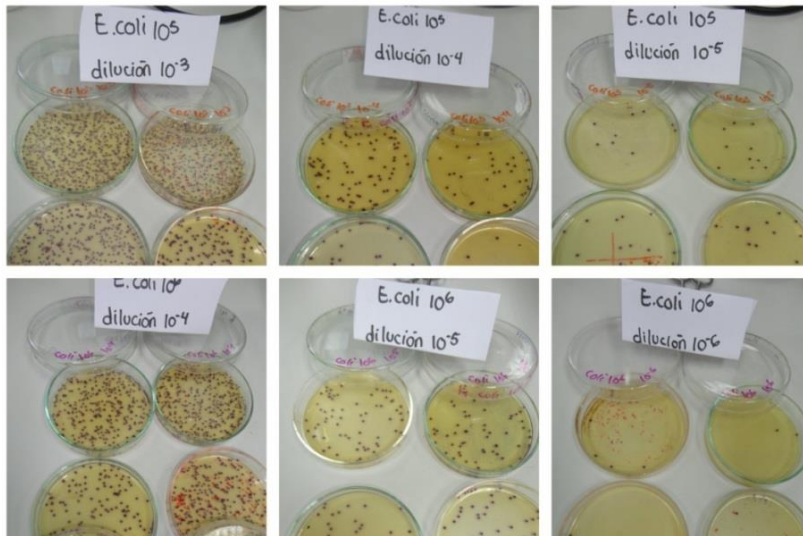


Figura N° 96 Blanco del patógeno *Escherichia coli* en el ensayo.

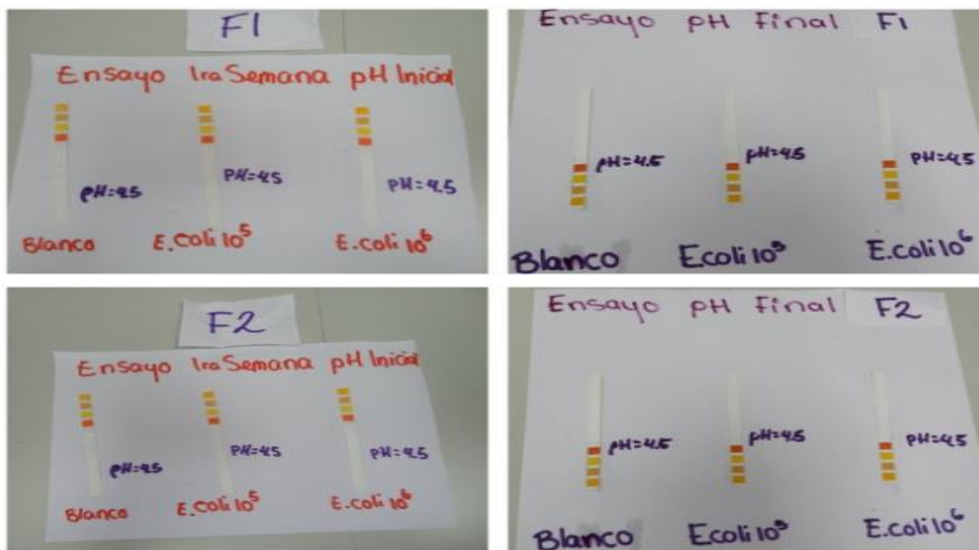


Figura N° 97 pH inicial y pH final de las bebidas en el ensayo

Tabla N° 53 Prueba preliminar de estabilidad, viabilidad de probióticos en F1 en los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.

día	UFC/mL	día	UFC/mL	día	UFC/mL
0	3.35E+08	15	1.72E+08	30	1.87E+08
0	3.37E+08	15	1.32E+08	30	1.13E+08
0	2.30E+08	15	2.30E+08	30	1.90E+08
0	2.50E+08	15	2.50E+08	30	1.70E+08
0	2.00E+08	15	2.00E+08	30	1.00E+08
0	1.00E+08	15	1.00E+08	30	1.00E+08
0	3.28E+08	15	1.83E+08	30	1.83E+08
0	3.23E+08	15	1.29E+08	30	1.74E+08
0	1.90E+08	15	2.10E+08	30	1.80E+08
0	2.60E+08	15	1.70E+08	30	1.70E+08
0	2.00E+08	15	1.00E+08	30	1.00E+08
0	1.00E+08	15	1.00E+08	30	1.00E+08

Tabla N°54 Prueba preliminar de estabilidad, viabilidad de probióticos en F2 en los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.

día	UFC/mL	día	UFC/mL	día	UFC/mL
0	2.83E+07	15	1.85E+07	30	1.36E+07
0	2.75E+07	15	1.72E+07	30	1.11E+07
0	2.30E+07	15	1.60E+07	30	1.20E+07
0	2.50E+07	15	1.80E+07	30	1.60E+07
0	3.00E+07	15	1.00E+07	30	1.00E+07
0	2.00E+07	15	2.00E+07	30	1.00E+07
0	2.85E+07	15	1.93E+07	30	1.42E+07
0	2.23E+07	15	1.84E+07	30	1.15E+07
0	1.70E+07	15	1.70E+07	30	1.30E+07
0	2.10E+07	15	1.50E+07	30	1.20E+07
0	3.00E+07	15	1.00E+07	30	1.00E+07
0	1.00E+07	15	3.00E+07	30	1.00E+07

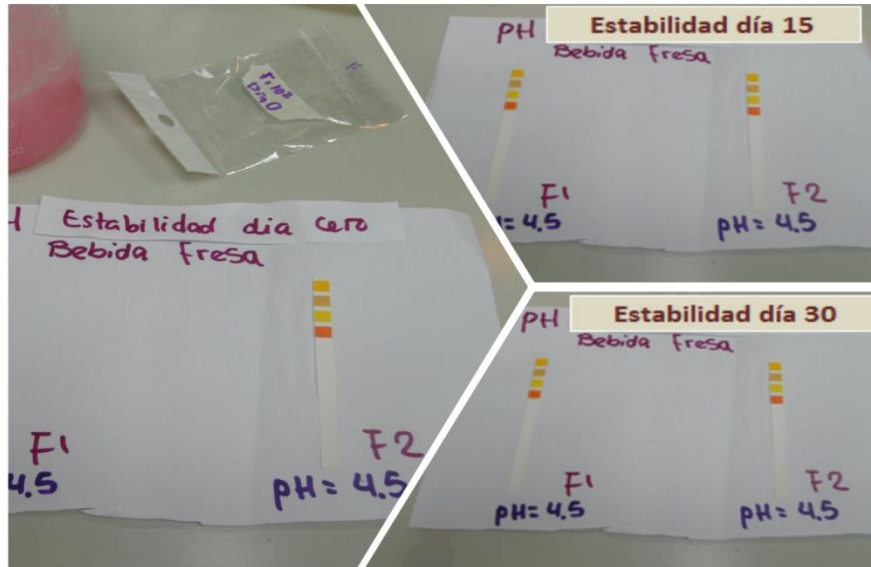


Figura N°98 Estabilidad, pH.

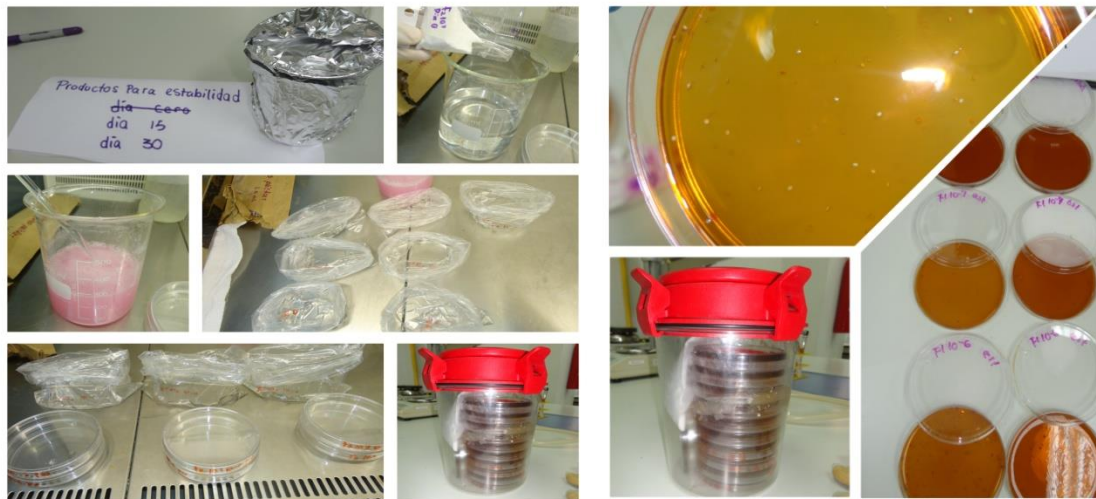


Figura N° 99 Estabilidad, proceso y conteo.



Figura N° 100 Procedimiento de la evaluación de las cepas probióticas frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares.