



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

“VIABILIDAD DE *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* EN ESFERAS DE
QUITOSÁN-ALGINATO SOMETIDAS A CONDICIONES GASTRO-
INTESTINALES *IN VITRO*”

TESIS:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Alimentos

PRESENTA:

Blanca Estela Garduño Lozada

Asesora: Dra. Susana Patricia Miranda Castro.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad y apoyo incondicional, por haber sido parte de una de las mejores etapas en mi vida la escuela! por significar un gran apoyo, por el aprendizaje que me llevo de cada uno de mis amigos y compañeros a lo largo de todos estos años, por compartir a mi lado grandes y divertidos momentos. Hoy se cierra un ciclo, esperando abrir nuevos con mucha energía y paz, y sé que ahora se unen nuevas personas para ser parte de esa motivación diaria para sobrevivir en la carrera de la vida.

Hoy veo materializado un sueño, y por tanto quiero dedicar mi tesis a las personas más especiales en mi vida.

A mi Madre:

Por ser el mejor de los apoyos, tu cariño, comprensión y dedicación que siempre procuró mi salud y bienestar, a esa guía espiritual que me ha impulsado para culminar esta meta, ¡muchas gracias!

A mi Padre:

Quien siempre representó un ejemplo a seguir, por esa motivación día a día, por la educación brindada y por la oportunidad y confianza para lograr las metas planteadas, ¡muchas gracias!

A mis hermanos Lupita, Alicia, Fabián, Miguel que de alguna forma recibí apoyo de cada uno de ustedes en este largo camino.

A mi asesora, Doctora Paty mil gracias por todo su apoyo, su paciencia, tiempo invertido y por el espacio brindado para la culminación de este proyecto, eso es ¡Amor al arte!

A mis amigos de CCH una de mis mejores etapas, en la cual, pasamos momentos inolvidables, especialmente a ti Nelly por ser mi gran amiga y confidente.

A mis Amigas de las FESC, Elvis, Maggy, Tere, nadie mejor que ustedes para entender el reto que significó estudiar la Ingeniería, donde pasamos algunas noches de desvelo o días enteros en la escuela, como grandes guerreras y que pasamos momentos geniales, en especial a ti Elvis que fuiste el látigo de Maggy y mío, quién ejerció presión cuando aflojábamos el paso, gracias ¡Elvira!

A mis compañeras de laboratorio que permitieron un ambiente de trabajo genial, Lety, Eva, y sobre todo por su apoyo a Darney y Aimé para concluir este trabajo.

Y a esas nuevos elementos que forman parte de un nuevo ciclo de vida.....

A Danny siempre comprensivo y cariñoso, quien me ha motivado e impulsado para cerrar este proyecto para poder iniciar un nuevo ciclo juntos.

Y por supuesto mención especial a mi motor, esa nueva luz en mi vida, la cual ha venido a cambiar mi entorno y que espero con gran emoción, mi mayor motivación ¡mi bebe!

ÍNDICE

RESUMEN JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES

1.1.1 Alimentos funcionales	1
1.1.2 Productos lácteos funcionales	1
1.1.3 Productos lácteos fermentados: probióticos, prebióticos, simbióticos.	2

1.2 PROBIÓTICOS

1.2.1 Microflora del intestino humano	5
1.2.1.1 Composición de la flora	6
1.2.2 Funciones de la Microflora intestinal	6
1.2.3 Factores que afectan a la microflora intestinal	8
1.2.4 Microorganismos probióticos	8
1.2.4.1 Características de probióticos	9
1.2.4.2 Bacterias ácido lácticas	10
1.2.4.3. Taxonomía de las bacterias ácido lácticas	11
1.2.4.4. Metabolismo de azúcares	12
1.2.4.5. Producción de aromas	12
1.2.4.6. Metabolismo de proteínas	13
1.2.4.7 Bifidobacterias	13
1.2.4.8. Taxonomía de Bifidobacterium	14
1.2.5 Identificación y viabilidad de bacterias probióticas	14
1.2.6 Efectos de los probióticos en la salud	15
1.2.6.1 Repercusión de los probióticos en el estado nutricional	15
1.2.6.2 Alimentación y respuesta inmunitaria	16
1.2.6.3 Papel de los probióticos en la prevención de cáncer	17

1.3 DIGESTIÓN

1.3.1 Fases de la digestión	18
1.3.2 Saliva	19
1.3.3. Estómago	19
1.3.5 .Intestino	20

1.4 QUITOSÁN

1.4.1 Generalidades del quitosán	21
1.4.1.1 Proceso de manufactura	22

1.4.1.2 Diagrama de bloques	22
1.4.2 Aplicación del quitosán en la industria	23
1.4.3 Microencapsulación	24
1.4.3.1 Microencapsulación de probióticos en quitosán	25
2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
2.1 Objetivos	26
2.2 Cuadro metodológico	27
2.3 Descripción del cuadro metodológico	28
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CAPÍTULO 4. CONCLUSIÓN	46
REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lácteos funcionales	1
Figura 2. Cereal como prebiótico	3
Figura 3. Probióticos en yogurt	4
Figura 4. Productos Simbióticos	4
Figura 5. Flora intestinal	5
Figura 6. Efecto barrera	7
Figura 7. Microorganismos probióticos	9
Figura 8. Bacterias ácido lácticas	11
Figura 9. Fotografía de <i>bifidobacterium</i>	14
Figura 10. Esquema de la actuación de las células inmunocompetentes ante la llegada de un antígeno	16
Figura 11. Evolución del cáncer de colon	18
Figura 12. Boca, inicio de la digestión	19
Figura 13. Digestión intestinal	20
Figura 14. Estructura química de la quitina	21
Figura 15. Estructura química del quitosán	22
Figura 16. Diagrama de obtención del quitosán	23
Figura 17. Fotografía de una microcápsula	25
Figura 18. Esferas de Quitosán1%-Alginato 2%-0.05M CaCl ₂	34
Figura 19. Esferas sometidas a soluciones ácidas y básicas	34
Figura 20. Esferas formadas a la concentración Quitosán 1.5% + Alginato 2% +0.05M CaCl ₂ .	35
Figura 21. Esferas sometidas a soluciones ácidas y básicas	
Figura 22. Esferas sometidas en solución de pH=1	36
Figura 23. Esferas fragmentadas sometidas a la solución de pH=8	37
Figura 24. <i>Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus</i> en MRS	38
Figura 25. <i>Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus</i>	39
Figura 26. Tinción de Gram a una muestra de MRS	39
Figura 27. Esferas formadas conteniendo <i>Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus</i>	40
Figura 28. Esferas sometidas a la simulación “ <i>In vitro</i> ”	41
Figura 29. <i>Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus</i> después de la simulación gastrointestinal “ <i>In vitro</i> ”	42

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfica1. Cinética de crecimiento de <i>L. delbrueckii spp. bulgaricus</i> .	37
--	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de flora del colon	6
Tabla 2. Bacterias probióticas más utilizadas.	9
Tabla 3. Vías de fermentación de algunas bacterias lácticas	12
Tabla 4. Composición de los jugos que se vierten al intestino.	21
Tabla 5. Aplicaciones del quitosán.	23
Tabla 6. Aplicación de polímeros en la Microencapsulación.	24
Tabla 7. Variaciones en la concentración para cada polímero (quitosán y alginato).	28
Tabla 8. Características de calificación para la selección de esferas.	29
Tabla 9. Composición química de los fluidos gastro-intestinales	31
Tabla 10. Formación de esferas sin CaCl ₂	32
Tabla 11. Formación de esferas con CaCl ₂ al 0.05 M	33
Tabla 12. Conteo de <i>L. delbrueckii spp. bulgaricus</i>	38
Tabla 13. conteo de <i>L. delbrueckii spp. bulgaricus</i>	40
Tabla 14. Conteo de <i>Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus</i>	42

RESUMEN

Se desarrollaron esferas de quitosán en combinación con alginato conteniendo el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* para asegurar su supervivencia durante el pasó por el estómago y la viabilidad en el intestino “In vitro”. Para lo cual se utilizaron diferentes concentraciones de los dos polímeros partiendo de datos ya reportados. Las concentraciones utilizadas para el alginato fueron 1, 1.5 y 2 % y las mismas concentraciones para quitosán. Formándose 9 diferentes combinaciones entre los dos polímeros a los cuales se les añadió la variante de incorporar CaCl₂ al 0.02M, al 0.05M y sin la presencia de éste. Las esferas seleccionadas para la siguiente prueba fueron 1, 1.5 y 2% de quitosán, conteniendo esta solución CaCl₂ al 0.05M en combinación con 2 % de alginato. Se procedió a la evaluación “In Vitro” del microorganismo encapsulado *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, donde la supervivencia del microorganismo fue ascendente mientras se disminuía la concentración de quitosán, llegando al final de la simulación para la concentración: QN(1% + 0.05 M CaCl₂)-ALG (2%) con una viabilidad de 4×10^2 UFC/ml; QN(1.5% + 0.05M CaCl₂)-ALG (2%) 1×10^2 UFC/ml y QN(2% + 0.05M CaCl₂)-ALG (2%) concentración en la cual el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* fue nula.

JUSTIFICACIÓN

El interés en el desarrollo de los procedimientos de encapsulación de células, microorganismos, fármacos, colorantes, ha estado creciendo para aplicaciones en biotecnología, biomedicina y farmacia (Peniche et al., 2004). Estas técnicas de encapsulamiento son normalmente utilizadas para liberar de forma controlada los ingredientes activos (Chen et al., 2006). Las bacterias probióticas son microorganismos vivos que transitan el tracto intestinal ejerciendo beneficios en la salud del consumidor (Kailasapathy, 2006). Estos beneficios incluyen el control de las enfermedades intestinales, controlan los niveles de colesterol, tienen influencia benéfica en el sistema inmune, mejoran la utilización de la lactosa en personas intolerantes, además de atribuirle actividad anti-carcinogénica (Krasaekoopt et al., 2006). El Diario Internacional de la Federación ha recomendado que la bacteria probiótica debe ser activa y abundante en el producto, así como llegar al intestino 10^7 UFC/g como mínimo (Sultana et al., 2000). La razón principal de encapsular las bacterias probióticas es para realzar su supervivencia durante la producción y almacenamiento de los productos que los contienen así como protegerlos de rigores físicos y químicos del tracto intestinal. Un factor importante en el desarrollo de los microorganismos probióticos encapsulados, es escoger el material de encapsulación, el cual depende de las propiedades químicas y físicas deseadas y del proceso de formación de la microcápsula. La microcápsula debe ser estable y conservarse íntegra durante su paso a través del tracto digestivo hasta llegar a su destino, donde la cápsula debería romperse y liberar su contenido (Prakash y Jones, 2005). La protección de los probióticos por microencapsulación en geles de alginato es un método para mejorar la viabilidad, el uso de alginato es limitado debido a su baja estabilidad física en presencia de agentes quelantes como fosfato, lactato o citratos (Gäserød et al, 1999). Se ha reportado que a un pH muy bajo el alginato sufre una rápida degradación y liberación del ingrediente activo. Policaciones, como quitosán forman complejos fuertes con alginatos, los cuales son estables en presencia de quelantes de calcio. Así el recubrimiento de cuentas de alginato con el polímero quitosán puede mejorar la estabilidad química y mecánica, por consecuencia mejora la eficacia de la encapsulación (Krasaekoopt et al., 2004). El quitosán es un polisacárido catiónico obtenido de la N-desacetilación de la quitina; el segundo polímero más abundante en la naturaleza, es altamente biocompatible, no tóxico y biodegradable (Murakami y Takashima, 2003). El quitosán puede ser aislado de caparazones de crustáceos, de cutículas de insectos y de membranas de ciertos tipos de hongos. Sus propiedades varían según la fuente de obtención (Anal y Singh, 2007). Por lo que en este trabajo se pretende utilizar el quitosán como material encapsulante del *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* para que sobreviva durante su paso por el estómago y se asegure su viabilidad en el intestino de tal manera que llegue en la cantidad adecuada como para poder ejercer un beneficio en la salud del consumidor.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES

Los alimentos funcionales son expresiones que se pueden dar para referirse a alimentos o a ingrediente alimentarios aislados que proporcionan determinados efectos fisiológicos beneficiosos no nutricionales que pueden mejorar la salud (Mazza, 2000). Las enfermedades relacionadas con la alimentación (diabetes, osteoporosis, hipertensión, cáncer del tubo digestivo o de mama, obesidad, enfermedades cardiovasculares etc.), constituyen las mayores causas de mortalidad. Existen posibilidades de mejorar la salud a través de la nutrición (Ortega et.al. 2002). Los estudios realizados en Europa y en Estados unidos, denotan que existe una arraigada creencia de lo que se come influye en la salud. Esta creencia es la razón del presente aumento en la demanda de alimentos que mejoran la salud, llamados también “alimentos funcionales”. Por tanto, un alimento funcional puede definirse como un ingrediente o suplemento alimentario que aporta un beneficio funcional adicional específico (fisiológico o psicológico) a su valor nutricional básico (Ortega et.al, 2002).

1.1.1 PRODUCTOS LÁCTEOS FUNCIONALES

Muchos de los productos elaborados por la industria láctea pueden considerarse como alimentos con funcionalidad fisiológica. Se sabe desde hace mucho tiempo que los productos lácteos (figura 1) como la leche líquida, el queso, el yogurt y otros productos son excelente fuente de vitaminas y minerales importantes como la riboflavina, el fósforo y el calcio. En muchos países donde la dieta es “de tipo occidental”, los productos lácteos son la principal fuente de calcio aportando alrededor del 60-75% del consumo total de calcio. Aunque el calcio es poco soluble en sistemas acuosos, la caseína, principal proteína de la leche, contiene calcio fijado al fósforo en un estado accesible desde el punto de vista nutritivo y es por lo tanto uno de los alimentos naturales más funcionales desde el punto de vista fisiológico (Mazza, 2000).

Los científicos han estudiado los efectos beneficiosos para la salud de los productos lácteos fermentados como el yogurt, kéfir o varios tipos de leches fermentadas. En este tipo de funcionalidad fisiológica está ligada a las bacterias lácteas y los productos metabólicos que resultan de su interacción con el medio lácteo. Los primeros estudios de Metchnikoff se centraron en la longevidad asociada al consumo de yogurt y otros productos lácteos fermentados, y esta idea sigue siendo en gran parte responsable de la imagen que tienen los consumidores del yogurt como un alimentos saludable (Mazza, 2000).



Figura 1: Lácteos funcionales

La leche, diseñada por la naturaleza para constituir el primer alimento del mamífero recién nacido, contiene varios componentes con funcionalidad fisiológica, las cantidades y tipos de componentes fisiológicamente activos presentes en la leche de las diversas especies de mamíferos varía según las necesidades de la crías, especialmente en lo que se refiere a su estado inmunológico. La leche de vaca, la principal materia prima utilizada para la elaboración de productos lácteos en todo el mundo, contiene una concentración relativamente alta de inmunoglobulinas y otros compuestos fisiológicamente activos que son necesarios para la protección del ternero recién nacido. En este sentido es particularmente importante el calostro bovino, ya que es el primer alimento del ternero recién nacido, el cual no adquiere en su fase uterina de su desarrollo la capacidad inmunológica necesaria, como ocurre también en el caso de los neonatos humanos (Mazza, 2000).

Las técnicas tradicionales de fabricación de productos lácteos se desarrollaron en su mayor parte antes de que la funcionalidad fisiológica se convirtiera en un factor importante de la calidad nutritiva. En muchos casos, las técnicas actuales cumplen el propósito tradicional de elaborar productos lácteos con óptimas características sensoriales y no con una óptima funcionalidad fisiológico (Mazza, 2000).

Las líneas probióticas de diversos productos lácteos tradicionales serán probablemente uno de los principales tipos de productos lácteos con efectos fisiológicos beneficiosos. Hasta ahora los productos probióticos de mayor éxito han sido los productos fermentados, especialmente yogurt, probablemente debido a que en estos productos se produce un medio natural que contiene elevadas concentraciones de otras bacterias lácteas. Sin embargo, como los fermentos bacterianos probióticos se añaden normalmente como un ingrediente independiente una vez que ha terminado la fermentación primaria (Mazza, 2000).

1.1.2 PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS: PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS

Los productos lácteos fermentados tradicionales, como el yogur, el kéfir y el kumis han sido consumidos en Europa, Asia y África durante muchas generaciones. La identificación de los microorganismos responsables de la fermentación y la capacidad para preparar fermentos puros ha permitido el desarrollo de productos comerciales de características normalizadas, como la leche con *L. acidophilus* (lactobacilos), el yogur (lactobacilos y estreptococos), y la leche con *bifidus* (bifidobacterias). Desde 1908, año en que Metchnikoff expuso que los productos lácteos fermentados eran beneficiosos para aumentar la esperanza de vida, estos productos probióticos han sido considerados "saludables" por los consumidores (Mazza, 2000).

PREBIÓTICOS

El término prebiótico se ha utilizado para productos como los oligosacáridos que fomentan el crecimiento de microorganismos beneficiosos (figura 2). Desde la época de los 90's se han desarrollados muchos productos, especialmente bebidas, que se están comercializando por su contenido de oligosacáridos (Mazza, 2000).



Figura 2: Cereal como prebiótico

PROBIÓTICOS

En los pasados veinte años se ha incrementado el interés del rol que juegan los microorganismos probióticos en la salud humana (Sultana et.al.2000). Por lo que son tal vez, el ejemplo mejor caracterizado y más estudiado de los alimentos funcionales (Ortega, 2002).

La definición generalmente aceptada de un producto probiótico es la de que son suplementos alimentarios (para alimentación humana o animal, que contienen microorganismos vivos que mejoran el equilibrio microbiano en el intestino de las personas o animales (Mazza, 2000). También se definen de la siguiente manera: Son microorganismos vivos los cuales transitan en el tracto gastrointestinal y es beneficioso para la salud del consumidor (Kailasapathy, 2006).

Las principales cepas de bacterias utilizadas en productos probióticos son: *Lactobacillus acidophilus* y varias especies de *Bifidobacterium*, son los microorganismos predominantes en el intestino delgado y grueso, respectivamente, de las personas (Mazza, 2000).

Estos microorganismos podrían inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos mediante la producción de ácidos orgánicos y mediante la desconjugación de sales biliares. La concentración de estos microorganismos en los intestinos puede disminuir con la edad, los cambios en la dieta, el consumo de antibióticos y/o estrés, y la desaparición o baja la viabilidad de la flora intestinal puede ocasionar problemas digestivos de mayor o menor gravedad. En las últimas décadas se han investigado el efecto de consumo de cultivos activos para compensar dichas pérdidas (Mazza, 2000).

Los beneficios terapéuticos han conducido a incrementar la incorporación de probióticos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en los productos diarios, especialmente en yogur (figura 3). La eficiencia en la adición de probióticos depende del nivel de dosis y su viabilidad debe ser mantenida durante todo el almacenamiento en los productos, en su vida de anaquel y deben sobrevivir en el intestino. Por lo tanto la viabilidad del probiótico es de importancia superior en el mercado de estos basados en productos alimenticios. Distintos reportes han mostrado que la viabilidad y supervivencia de las bacterias probióticas es frecuentemente baja en yogur. Los resultados son menos de 10^8 - 10^9 diariamente recomendadas (Kailasapathy, 2005). Como una guía de el diario internacional de la federación ha recomendado que esta bacteria debe ser activa y abundante en el producto, mínimo 10^7 CFU/ g. Sin embargo estudios indican que la bacteria puede no sobrevivir en suficiente número, cuando son incorporados en productos diariamente. Por lo que para asegurar o aumentar la supervivencia y liberar los cultivos bacteriales se está aplicando la técnica de encapsulación (Sultana et.al, 2000).

La mayoría de los probióticos se hallan dentro del grupo de los organismos conocidos cocobacterias productoras de ácido láctico (BAL), y se consumen normalmente en forma de yogur o leches fermentadas, aunque también encontramos en el mercado preparados o cápsulas de organismos liofilizados (Ortega. etal, 2002).

El producto debe contener al menos 10^6 organismos viables por ml. Se debe consumir una cantidad mayor que 100 ml al menos dos veces por semana, y los cultivos deben producir en el tracto gastrointestinal ácidos orgánicos y otros compuestos con actividad biológica (Mazza, 2000).



Figura 3: Probióticos en yogurt

Los efectos beneficiosos de la presencia de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal dependen de su viabilidad y actividad metabólica, fomentadas por los hidratos de carbono complejos y otros factores bifidogénicos.

Los probióticos no son la panacea para todas las enfermedades que afectan a nuestra sociedad. Es importante recordar al considerar su efectividad o actividad biológica, que los probióticos se comportan como ingredientes alimentarios y no como productos farmacéuticos., es decir, son de carácter más preventivo que curativo (Ortega et.al., 2002).

SIMBIÓTICOS

A veces se llama productos simbióticos (figura 4) a los productos que contienen tanto prebióticos como probióticos (Mazza, 2000).



Figura 4: Productos simbióticos

1.2 PROBIÓTICOS

1.2.1 MICROFLORA DEL INTESTINO HUMANO

Los probióticos son microorganismos que estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo. Para ello es necesario que estas bacterias lleguen y permanezcan vivas en el tracto gastrointestinal (Martínez, 2005).

Para entender el mecanismo de acción, es importante comprender la microbiología y la fisiología del tracto gastrointestinal humano (Martínez, 2005).

El intestino humano es colonizado por un largo número de microorganismos que habitan en el tracto intestinal y son soporte de una variedad de funciones fisiológicas. El nombre que se le da al hábitat de los microorganismos es “flora intestinal o microbiota”, estos términos se definen como la colectividad de comunidades microbianas que pueblan las superficies mucosas (figura 5). Cada individuo alberga unos 100 billones de bacterias de unas 400 especies distintas. Más del 95% de esta población vive en la luz del colon (Ortega et.al, 2002).

Las propiedades promotoras de salud han sido demostradas, especialmente en infantes, los efectos más significativos incluyen prevención y tratamientos de antibióticos asociados con diarrea, rotavirus y prevención de alergias. Las bifidobacterias parecen ser como los más promisorios de los probióticos, seguido por la bacteria ácido láctica. Estas especies son las más viables y sus propiedades probióticas deben ser enfatizadas (Salminen e Isolauri, 2006).

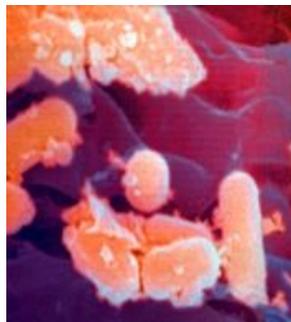


Figura 5: Flora intestinal

Ciertamente la presencia de bacterias vivas en la luz del colon tienen impacto en la fisiología del individuo, el hombre no podría vivir sin su flora. Los mamíferos criados en condiciones totales de asepsia y que, por tanto, no adquieren su flora natural, no se desarrollan normalmente. Por otra parte ciertos elementos de la flora bacteriana pueden ser fuente de infección e inducir distintas patologías, sobre todo cuando hay alteración física o funcional de la barrera mucosa intestinal. Sin embargo hay muchas evidencias de la flora a la fisiología normal del individuo humano (Ortega et.al., 2002).

La colonización microbiana del intestino empieza en el nacimiento y continúa en fases tempranas de la vida para formar la microflora intestinal que es diferente para cada individuo. Este proceso facilita la formación de barreras físicas e inmunológicas entre el huésped y el medio ambiente,

ayudando al tracto gastrointestinal a mantener un estado de libre enfermedad (Salminen e Isolauri, 2006).

1.2.1.1 COMPOSICIÓN DE LA FLORA INTESTINAL

La flora bacteriana se comienza a adquirir inmediatamente después del nacimiento. Inicialmente diversos géneros de aerobios colonizan el tubo digestivo, sobre todo enterobacterias tipo *Escherichia coli* y también diversas especies del género *Lactobacillus*. Estas consumen oxígeno del ambiente y progresivamente se establece un microsistema en el que hay un predominio abrumador de especies anaerobias obligadas, sobre todo *Bacteroides*, *Clostridia*, *Eubacteria* y *Bifidobacteria*. A los dos años de edad, la flora bacteriana establecida es ya prácticamente definitiva, en tanto que suele ser muy estable a lo largo de la vida del individuo.

En la flora del adulto predominan los géneros anaerobios. La tabla 1 muestra los géneros de bacterias predominantes y subdominantes.

Tabla 1. Composición de flora del colon

Géneros bacterianos predominantes (10^{10} – 10^{12} UFC por gramo)		Géneros bacterianos subdominantes (10^6 - 10^9 UFC por gramo)	
<i>Bacteroides</i>	Bacilo gram -	<i>Escherichia</i>	Bacilo gram -
<i>Eubacterium</i>	Bacilo gram +	<i>Klebsiella</i>	Bacilo gram -
<i>Bifidobacterium</i>	Bacilo gram +	<i>Proteus</i>	Bacilo gram -
<i>Peptostreptococcus</i>	Coco gram +	<i>Lactobacillus</i>	Bacilo gram +
<i>Clostridium</i>	Bacilo gram +	<i>Streptococcus</i>	Coco gram +
<i>Ruminococcus</i>	Coco gram +	<i>Staphylococcus</i>	Coco gram +
		<i>Fusobacterium</i>	Bacilo gram -

Fuente: Ortega et.al, 2002

1.2.2 FUNCIONES DE LA FLORA INTESTINAL

Se distinguen tres funciones primarias de la flora del colon:

- Funciones de nutrición y metabolismo, como resultado de la actividad bioquímica de la flora.
- Funciones de protección, previniendo la invasión de microorganismos patógenos.
- Funciones tróficas sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal.
- Desarrollo y modulación del sistema inmune.

La colonización de la luz del colon aporta un gran número de genes, que codifican proteínas y enzimas diversas, y proporcionan recursos bioquímicos que no están presentes en el genoma humano. Sus funciones no se producirían en ausencia de vida bacteria en el colon. Las bacterias del colon generan una gran actividad metabólica, de modo que en su conjunto el colon se constituye en un órgano metabólico, similar al hígado, donde las enzimas bacterianas operan sobre los sustratos de la luz intestinal y generan una gran diversidad de productos. Muchos autores consideran que la principal función metabólica de la flora es la fermentación de los residuos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio intestinal. Se recupera energía metabólica y se sintetizan algunas vitaminas. Sabemos que la fermentación de

carbohidratos da lugar a la generación de ácidos grasos de cadena corta que tienen efectos tróficos sobre el epitelio intestinal. La producción del ácido butírico constituye la principal fuente de energía para el epitelio del colon, la producción de ácido acético y propiónico interviene en la regulación del metabolismo hepático de la glucosa (Ortega et.al.2002).

La flora residente en el tubo digestivo protege de la invasión de microorganismos patógenos por el llamado “efecto barrera” (figura 6). Esta propiedad de la flora es muy relevante para la prevención de patologías infecciosas en el huésped. Hay una resistencia a la colonización por bacterias exógenas y también se impide el sobrecrecimiento de especies oportunistas que residen en el colon pero crecimiento está controlado por el equilibrio con otras especies. Así por ejemplo, el uso de determinados antibióticos pueden alterar en ecosistema y favorecer el predominio de especies subdominantes como el *Clostridium difficile*, asociado a una patología grave que es la colitis pseudomembranosa (Ortega et.al, 2002).

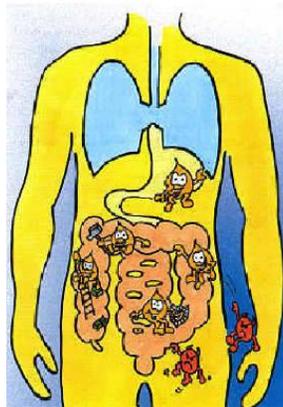


Figura 6: Efecto barrera

En primer lugar, el efecto barrera es consecuencia del hecho de que la flora residente ocupa los nichos ecológicos accesibles, y administra, consume y agota todos los recursos. Una publicación reciente ha ilustrado este fenómeno: el *Bacteroides thetaiotaomicron* consume fucosa producida por el epitelio del anfitrión, pero además existe una interacción de la bacteria con las células del epitelio, de modo que la bacteria puede controlar la expresión de genes en el epitelio y la producción de fucosa se regula para cubrir las necesidades de la bacteria, pero evitando la sobreproducción de este recurso que podría ser utilizado por otras bacterias patógenas o al menos oportunistas. Además las bacterias pueden inhibir el crecimiento de otras bacterias mediante la producción de bacteriocinas, que son sustancias naturales con efecto antimicrobiano. Numerosas especies del tracto gastrointestinal son capaces de producir bacteriocinas. Estas sustancias son sensibles a las proteasas del tracto digestivo, por lo que el individuo puede controlar su producción. La función principal es la de regular el crecimiento bacteriano en un nicho ecológico localizado (Ortega et.al, 2002).

La flora microbiana del tubo digestivo tiene importantes funciones sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal. Los animales criados en medio “germ - free” tienen un nivel bajo de replicación del epitelio colónico. Además, los experimentos con animales mono-asociados con una bacteria demuestran como algunas cepas influyen en la diferenciación de las células epiteliales; las funciones tróficas sobre el epitelio pueden ser importantes para entender el papel de la flora en la patogénesis del cáncer colorectal (Ortega et.al, 2002).

Además, la flora ejerce una influencia muy importante en el desarrollo y maduración del sistema inmune asociado al tubo digestivo. Los mamíferos criados en condiciones experimentales de asepsia no desarrollan su inmunidad normalmente. Tienen una deficiencia de inmunoglobulinas (anticuerpos) tanto en luz intestinal como en sangre periférica. Está claro que el sistema inmune madura alrededor del tubo digestivo que es la gran superficie de contacto con el mundo exterior; hay millones de interacciones entre bacterias, el epitelio y el tejido inmune subyacente, que poco a poco van programando y modulando los recursos de un sistema de defensa muy potente, muy completo y muy complejo. Por ejemplo, la falta de maduración del sistema inmune se detecta también porque en los animales “germ-free” no se desarrolla normalmente el fenómeno de la tolerancia. La exposición a antígenos a través de la vía digestiva induce normalmente tolerancia a esos antígenos. Esta propiedad del sistema inmune de las mucosas no se da, o aparece de modo deficiente, en animales criados en condiciones de “germ-free” (Ortega et.al, 2002).

1.2.3 FACTORES QUE AFECTAN A LA FLORA INTESTINAL

Una gran variedad de factores que se relacionan con el huésped, las bacterias y el medio ambiente, ayudan a mantener la composición y el funcionamiento adecuado de la microflora la desestabilización de cualquiera de estos elementos puede conducir a un crecimiento exagerado de bacterias y a problemas en la salud del huésped. El pH extremadamente bajo del estómago humano actúa como una barrera y previene la colonización de las bacterias que provienen de la boca; la mayoría de las bacterias son incapaces de sobrevivir a la acidez gástrica. En el intestino delgado, los cambios en los ácidos biliares o en el peristaltismo pueden cambiar los niveles de bacterias normalmente bajas. En el colon, donde existe una abundancia de bacterias, la competencia por el espacio y los nutrientes ayudan a mantener la integridad de la microflora (Martínez, 2005).

Aún cuando la composición de la flora intestinal es bastante estable en individuos saludables se puede alterar por muchos factores endógenos y exógenos como son los desórdenes peristálticos, el cáncer, operaciones con cirugía del estómago o intestino delgado, enfermedades del Hígado o de riñón, anemias perniciosas, terapia por radiaciones, estrés emocional, desórdenes del sistema inmunológico, administración de antibióticos y envejecimiento. Los disturbios o los cambios en la flora intestinal no son específicos (Martinez, 2005).

1.2.4. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

Algunas de las bacterias que colonizan el hombre pueden considerarse perjudiciales, en tanto que tienen capacidad de invadir, pueden producir toxinas o poseen otros factores de virulencia, pero la inmensa mayoría de las bacterias de la flora no se relacionan con ninguna patología (Ortega et.al. 2002).

Hay científicos como Pasteur y Metchnikoff, abogaron por el potencial beneficioso de algunas bacterias por su antagonismo biológico con los agentes infecciosos: las propias bacterias constituirían el procedimiento natural y más efectivo para combatir a los agentes patógenos.



Figura 7: Microorganismos probióticos

En las últimas décadas se han obtenido numerosas evidencias científicas que demuestran que las bacterias aportan grandes beneficios a la salud humana. Con ello se ha introducido un nuevo concepto: probióticos son microorganismos vivos que ingeridos en cantidades adecuadas producen efectos beneficiosos para la salud, que se añaden a su valor puramente nutricional (figura 7). Hay amplia documentación sobre el uso de numerosas cepas bacterianas (Ortega et.al. 2002).

Los probióticos actúan para modificar el proceso de desarrollo de la microflora intestinal o de la composición y actividad, pueden actuar directamente en contacto con las mucosas intestinales, facilitando la interacción del sistema inmune y los microorganismos (tabla 2). Los probióticos han demostrado efectos benéficos en salud de infantes, incluyendo el mantener sano el desarrollo sano de la microbiota intestinal (Salminen, Isolauri. 2006).

Tabla 2. Bacterias probióticas más utilizadas.

BACTERIAS PROBIÓTICAS

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Esteptococcus salivaris therm</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Esteptococcus diacetyllactis</i>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentes</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>
<i>Saccharomyces boulardi</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>

Fuente: Ortega et.al, 2002

1.2.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS

Las bacterias probióticas son usualmente seleccionadas de bacterias que normalmente habitan en el sistema gastrointestinal y pertenecen a especies que son conocidas como inofensivas. Estas bacterias son purificadas, crecen en grandes cantidades, concentradas a dosis altas y conservadas (Martínez, 2005).

Un probiótico puede ser usado exógenamente o endógenamente para realzar una categoría nutricional y/o a la salud del hospedero. En el caso de uso exógeno estos microorganismos son usados comúnmente para fermentar varios alimentos, por este proceso pueden preservar y hacer sus nutrientes más biodisponibles. En el caso de uso endógeno es la producción de sustancias que pueden ser antibióticos, anticancerígenos o tener otras propiedades farmacéuticas (Martínez, 2005).

Un microorganismo probiótico debe poseer las siguientes características tales como:

- Ser habitante normal del intestino.
- No patógeno, no tóxico.
- Ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución del alimento que los contenga para que pueda estar vivo en el intestino.
- Ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar en intestino.

Leches o productos lácteos son portadores excelentes de estos organismos probióticos. La mayoría puede utilizar lactosa como fuente de energía durante la fermentación y ganar energía para el crecimiento. Así, un requerimiento importante para el crecimiento en el tracto intestinal es proporcionado por la leche (Martínez, 2005).

Mientras los cultivos iniciadores tradicionales usados en la industria láctea se seleccionan por su habilidad de exaltar cualidades sensoriales deseables en los productos, las bacterias probióticas deben ser seleccionadas por el potencial de suministrar beneficios a la salud específicos o nutricionales seguidos a su consumo. (Martínez, 2005).

1.2.4.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se conocen en todo el mundo más de 20 especies diferentes de microorganismos probióticos en humanos. La mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y son utilizadas por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados. La mayoría de los productos probióticos contienen bacterias del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* (Martínez, 2005).

Las bacterias lácticas son Gram- positivas no forman esporas, es fermentativa y son tradicionalmente aplicados en una gran variedad de productos alimenticios fermentados (Vries, 2006).

El largo número de bacterias lácticas pertenecen al género de *Lactobacillus* que comprende más de 50 especies diferentes. En algunos casos, estos *Lactobacillus* son también usados como cultivos iniciadores en la industria alimentaria y artesanal de la fermentación, estos contribuyen a la conservación, sabor, textura y diversidad de alimentos fermentados. Mientras la conversión fermentativa de azúcar presente en los materiales crudos con ácido láctico es significado de su función (Vries, 2006).

Además las especies de *Lactobacillus* son encontradas en el intestino de humanos y animales; el número puede variar según la especie, la edad del huésped etc. Sin embargo pocas especies de

Lactobacillus contienen representativas que son involucradas en fermentaciones industriales y tradicionales, además de residir en el intestino humano (Vries, 2006).

1.2.4.3. TAXONOMÍA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las Bacterias ácido lácticas pertenecen a varios géneros las cuales son divididas en especies. Las especies pueden ser divididas en varias subespecies y cepas, como en el caso de *Lactococcus lactis ssp. var lactis. diacety/actis* (referida como *L. diacetylactis*). Su habilidad para fermentar azúcares específicos, la temperatura óptima para su crecimiento, los nutrientes necesarios y la presencia de enzimas especiales son características de las bacterias ácido lácticas.

Los métodos por clasificar entre género, especies o cepas han desarrollado la apariencia morfológica y las condiciones de crecimiento y el comportamiento fisiológico, así como las vías metabólicas y enzimas. Las técnicas más exactas involucran estructura molecular y la información genética. Ha habido recientes cambios y futuras revisiones son probables. En la taxonomía de las BAL, por ejemplo, bacterias mesofílicas que fueron clasificadas originalmente como *Streptococcus* se ha cambiado al género *Lactococcus*. Es importante tener los métodos de identificación de las BAL usadas en la fermentación de alimentos para estar de acuerdo con las regulaciones y asegurar que las cepas pertenecen a las especies reconocidas como GRAS. Las bacterias ácido lácticas se clasifican según su morfología y el tipo de fermentación de ácido láctico. (Martínez, 2005).

Las bacterias ácido- lácticas mediante la fermentación utilizan varios azúcares como la glucosa y la lactosa para la producción de ácido acético (figura 8). Algunas bacterias conocidas como anaerobias facultativas y otras como anaerobias obligadas, pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal, además por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del huésped (Martínez, 2005).



Figura 8: Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias lácticas homofermentativa pueden convertir el 85% de los carbohidratos utilizados en ácido láctico, produciendo dos moles de ácido láctico y dos moles de ATP a partir de un mol de monosacárido. Las bacterias heterofermentativas producen ácido láctico, CO₂ y etanol o ácido acético, con formación de un mol de ATP por cada mol de ácido láctico o acético producido Ver tabla 3 (Ortega et.al.2002).

Tabla 3. Vías de fermentación de algunas bacterias lácticas

BACTERIA	VÍA DE FERMENTACIÓN	ALGUNAS APLICACIONES
<i>Lactobacillus</i>	Microaerófilos. Homofermentativos	Algunas especies como <i>L. casei</i> o <i>L. acidophilus</i> , tienen mucho interés probiótico.
<i>Streptococcus</i>	Facultativamente anaerobios. Homofermentativos	La especie más utilizada es <i>S. thermophilus</i> . En simbiosis con <i>L. delbrueckii Subsp. Bulgaricus</i> , se utiliza para elaborar yogur
<i>Lactococcus</i>	Microaerófilos	
<i>Leuconostoc</i>	Mesófilos heterofermentativos	Cultivo iniciador, producción de aromas
<i>Pediococcus</i>	Mesófilos homofermentativos	Cultivo iniciador
<i>Bifidobacterium</i>	Anaerobios Heterofermentativos	Cultivo de interés probiótico
<i>Acetobacter</i>	Aerobios obligados heterofermentativos	Kéfir
<i>Saccharomyces,</i> <i>Cándida,</i> <i>Kluyveromyces,</i> <i>Torula</i>	Levaduras	Kéfir, Kumis

Fuente: Ortega et.al.,2002

1.2.4.4 METABOLISMO DE AZÚCARES

Uno de los mayores problemas para el crecimiento de las bacterias lácticas en la leche es la utilización de la lactosa. La mayoría de bacterias lácticas toman la lactosa mediante una permeasa y la hidrolizan en su interior mediante la β – galactosidasa en glucosa y galactosa fermentadas (Ortega et.al, 2002).

Las fermentaciones industriales deben llevarse a cabo en determinadas condiciones de anaerobiosis o de microaerofilia (con muy poco oxígeno) técnicamente eficaces. Una consecuencia del metabolismo de la lactosa es la producción de ácido láctico. El ácido láctico contribuye a dar el típico sabor ácido y textura de las leches fermentadas (Ortega et.al, 2002).

1.2.4.5 PRODUCCIÓN DE AROMAS

Determinados estreptococos, *Leuconostoc* y otras bacterias lácticas mesófilas son capaces de producir aromas como el diacetilo o la acetoina desde el ácido cítrico o el piruvato. Las bacterias de yogur producen acetaldehído desde los aminoácidos mediante la treonina, la utilización de glucosa vía Acetil CoA y la utilización de ácidos nucleicos (Ortega et.al, 2002).

1.2.4.6 METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS

Las bacterias lácticas son débilmente proteolíticas si las comparamos con otras bacterias. Sin embargo, sus sistemas proteolíticos están compuestos por un buen número de proteinasas y péptidos localizados en la pared bacteriana, en la membrana celular y en el citoplasma. El grado de proteólisis conseguido es importante porque (Ortega et.al. 2002):

- La liberación de péptidos y aminoácidos pueden afectar la estructura física del producto.
- Muchos aminoácidos producidos mediante la hidrólisis de proteínas son esenciales para el crecimiento de ciertos microorganismos.
- Los aminoácidos y los péptidos son precursores de muchas reacciones que dan lugar a compuestos aromáticos.

1.2.4.7 BIFIDOBACTERIAS

En 1900, Tissier describió por primera vez a las bifidobacterias. Desde ese momento, su clasificación ha evolucionado continuamente, y actualmente incluye alrededor de treinta especies. En general, son bastones Gram positivos y anaerobios estrictos, que frecuentemente tienen necesidades nutricionales especiales y crecen lentamente en la leche. Muy pocas cepas se han adaptado lo suficientemente bien a la leche y pueden crecer en número suficiente como para sobrevivir durante la vida de anaquel de las Leches Fermentadas. Las bifidobacterias producen tanto ácido láctico como ácido acético como productos finales más importantes de su metabolismo (heterofermentativo), muchos microbiólogos las consideran como bacterias ácido lácticas, exceptuando algunos casos (Martínez, 2005).

Su nombre viene de la observación la cual, estas bacterias Gram positivas existen a menudo en bastones en forma de Y o forma "bífida". Las bifidobacterias son anaerobias con una ruta metabólica especial que permite, producir tanto ácido láctico como acético. Requieren frecuentemente necesidades nutritivas especiales, por lo que es a menudo difícil aislar y crecer en laboratorio a estas bacterias. El pH de crecimiento es 6-7, la temperatura óptima de crecimiento es 37-41°C, con una temperatura máxima de crecimiento de 43-45°C (Martínez, 2005).

Las bifidobacterias (figura 9) son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano y están presentes durante toda la vida, apareciendo a los pocos días después del nacimiento, la población parece ser relativamente estable hasta la edad avanzada. Constituyen una de las diversas especies predominantes de microflora del colon, junto con *Peptostreptococcus*, *Eubacterias*, *Clostridia*, y *Bacteroides*. Las cuales se encuentran presentes en niveles que van de 10^8 - 10^{11} bacterias/g de material del colon. Las bifidobacterias difieren de las bacterias ácido lácticas en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido (Martínez, 2005).



Figura 9: *Bifidobacterium*.

1.2.4.8 TAXONOMÍA DE LAS BIFIDOBACTERIAS

La taxonomía de las bifidobacterias ha cambiado continuamente desde que fueron aisladas por primera vez. Se le ha asignado a los géneros *Bacillus*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus* y *Corynebacterium* entre otros, antes de que reconociera como un género separado en 1974 (Martínez, 2005).

No hay ninguna prueba que permita la determinación del origen de una cepa, el origen es arbitrario basado en la taxonomía de la cepa. Muchas especies están presentes en animales y humanos, la flora humana se ha estudiado extensivamente (Martínez, 2005).

En la manufactura de productos lácteos fermentados, *B. bifidum* es la especie más utilizada seguida se encuentran *B. longurrt* y *B.breve*. Las bifidobacterias son usualmente utilizadas en combinación con otras bacterias ácido lácticas por su lenta producción de ácido (Martínez, 2005).

Existen diferencias marcadas: entre cepas en cuanto a su habilidad para tolerar las sales y ácidos biliares, hecho que hace que su supervivencia sea un criterio de selección importante. Una vez que las bifidobacterias alcanzan su sitio de acción, deben ser capaces de ejercer el efecto deseado; la función es esencial. Esta capacidad sólo se puede reconocer a través de estudios in vivo e in vitro, utilizando a los microorganismos específicos en cuestión. En cualquier proporción, las cepas de bifidobacterias en los intestinos humanos en particular, varían enormemente de un individuo a otro, y todas las bifidobacterias ingeridas se pueden considerar como "extrañas" en el consumidor. Por lo tanto, el origen en sí, no es un criterio significativo de selección (Martínez, 2005).

1.2.5 IDENTIFICACIÓN Y VIABILIDAD DE BACTERIAS PROBIÓTICAS

Las bacterias lácticas (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* poseen características probióticas y por ello son incluidas en diversos productos lácteos comerciales como yogures y otras leches fermentadas. Estos probióticos contienen un número elevado de microorganismos vivos que deben sobrevivir primero a su almacenamiento en el producto y más tarde a la acción de los jugos gástricos e intestinales. Para que ejerzan un efecto beneficioso sobre la salud se estima que deben alcanzar vivos en el intestino en una concentración de 10^7 por gramo. Entre los efectos beneficiosos se han descrito el alivio y prevención de diarrea, la mejora en la digestión de lactosa y la reducción de riesgo de cáncer de

colon y de los niveles de colesterol en la sangre. Debido a sus múltiples beneficiosos sobre la salud las BAL son cada vez más utilizadas en la elaboración industrial de productos probióticos, por lo que se hace necesaria la identificación precisa de estas bacterias, lo que además implica una ventaja para el consumidor que se encuentra así perfectamente informado del contenido de los productos probióticos (Martínez, 2005).

Los métodos de identificación de estas bacterias ácido lácticas han sufrido una gran evolución desde sus comienzos. Tradicionalmente, especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* se han clasificado de acuerdo a sus estudios fenotípicos; como la observación de su morfología celular, análisis de sus productos fermentados, sus actividades enzimáticas o la capacidad de utilizar diversos carbohidratos. Estos métodos se encuentran claramente descontinuados hoy en día, debido principalmente a su falta de reproductibilidad en ensayos interlaboratorios y su incapacidad para identificar con precisión la gran diversidad de cepas que forman el grupo de bacterias ácido lácticas. Estos problemas quedan subsanados con la aparición de los métodos moleculares. Entre ellos cabe destacar los de hibridación ADN-ADN, análisis RFLP, los derivados de la PCR como los RAPD y los basados en el uso de sondas basadas en secuencias del gen 16S del ARNr marcadas con fluorocromos con la hibridación *in situ*. Estos métodos han sido aplicados mayoritariamente en la identificación de especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, y en mucha menor medida en el caso de *Bifidobacterium* (Martínez, 2005).

1.2.6 EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS EN LA SALUD

Las bacterias lácticas se consideran microorganismos capaces de sobrevivir a través del tracto gastrointestinal, con un efecto inmodulador y beneficioso sobre la función intestinal. Sin embargo, aún son necesarios estudios bien diseñados con marcadores que puedan definir el efecto saludable de estos probióticos (Ortega et.al, 2002).

Todavía está por resolver como se lleva a cabo la interacción de las bacterias lácticas con las células linfoides del intestino para conseguir la activación del sistema inmunitario de la mucosa, así como el mecanismo por el cual estas bacterias beneficiosas pueden ejercer su efecto coadyuvante (Ortega et.al, 2002).

En distintos estudios se mencionan posibilidades diversas que involucran tanto a la inmunidad específica como inespecífica para explicar la actuación de las BAL (Ortega et.al, 2002).

1.2.6.1 REPERCUSIÓN DE LOS PROBIÓTICOS EN EL ESTADO NUTRICIONAL

Uno de los factores con más influencia en el mantenimiento y mejora de la salud y calidad de vida de los individuos es la alimentación. Esta es la razón por la que hoy en día la sociedad demanda alimentos que, además de ser apetecibles, promuevan un beneficio sanitario (Ortega et.al, 2002).

Los probióticos más utilizados en la actualidad son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y se encuentran especialmente en yogures y otras leches fermentadas. En concreto, estos alimentos presentan unas características organolépticas muy agradables, son fáciles de consumir y digerir y proporcionan cantidades importantes de nutrientes en forma

altamente disponible para el organismo, por lo que su consumo regular puede tener grandes ventajas, no solo sanitarias, sino también nutricionales. Todo esto ha llevado a un notable aumento en el consumo de estos alimentos en los últimos años (Ortega et.al, 20002).

Los lácteos son alimentos valiosos desde el punto de vista nutricional, pues proporcionan elevadas cantidades de nutrientes en una baja cantidad de energía. Aportan, a la dieta media, proteínas de alta calidad, vitaminas A y D, magnesio, zinc; nutrientes que son, además, de elevada bioutilización. Especialmente destacan por su riqueza en calcio y riboflavina, por lo que es difícil conseguir una situación adecuada en relación con estos nutrientes tomando menos de dos o tres raciones diarias de productos lácteos (Ortega et.al, 2002).

En concreto para un adulto medio, con el consumo de un yogur se cubre entre el 13 y 17% de las ingesta diaria recomendada para la riboflavina, el 10% de las establecidas para proteínas y vitamina B12 y el 22% de las marcadas para el calcio. También se consigue aproximadamente el 5% de la cantidad diaria recomendada (Ortega et.al, 2002).

1.2.6.2 ALIMENTACIÓN Y RESPUESTA INMUNITARIA

El papel principal de la dieta es aportar los nutrientes suficientes para hacer frente a los requerimientos metabólicos de nuestro organismo y, al mismo tiempo, proporcionar bienestar físico y psíquico. En la actualidad se fomenta el uso de alimentos en la promoción del estado de salud, con la intención de prevenir el riesgo de enfermedades. De hecho, la investigación actual está encaminada a determinar como pequeños déficits nutricionales pueden producir alteraciones sobre el sistema inmunitario, influyendo a su vez en otros sistemas de organismo como endocrino y el nervioso (Ortega et.al, 2002).

El sistema inmunitario se encarga de la defensa del organismo, poniendo en marcha una serie de mecanismo para hacer frentes a la invasión masiva de sustancias extrañas (antígenos) al mismo. El tipo de respuesta inmunitaria depende de la naturaleza del antígeno (virus, bacterias, parásitos, hongos, pólenes, determinadas proteínas alimentarias), así como de su vía de entrada al organismo (piel, sangre, mucosa respiratoria, epitelio del tracto gastrointestinal). Se dan principalmente tres fases en la respuesta inmunitaria: identificación de la partícula extraña, destrucción de la misma y regulación de la respuesta inmunitaria mediante diversos mecanismos de retroalimentación o “feedback” (figura 10) (Ortega et.al, 2002).

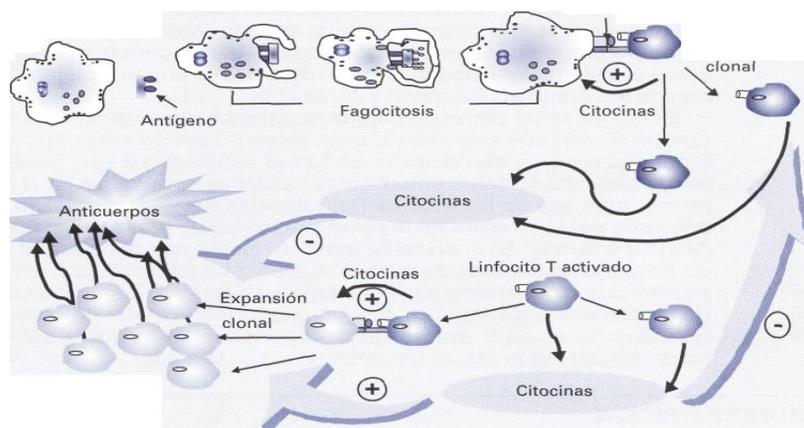


Figura 10: Esquema de la actuación de las células inmunocompetentes ante la llegada de un antígeno. (Ortega et.al, 2002)

1.2.6.3 PAPEL DE LOS PROBIÓTICOS EN LA PREVENCIÓN DEL CÁNCER

Se desconocen los mecanismos precisos por los cuales las bacterias ácido- lácticas (BAL) pueden inhibir el cáncer de colon. Los posibles mecanismos potenciales se enumeran a continuación (figura 11) (Ortega et.al, 2002).

- **Unión/ adsorción de carcinógenos:** Hay varios estudios “in vitro” que demuestran que la adsorción o unión de carcinógenos (aminas heterocíclicas, aflatoxina B1 y benzopirenos), a las bacterias ácido-lácticas y otras bacterias disminuye su mutagenicidad.
- **Efectos sobre las enzimas bacterianas; producción de metabolitos:** la administración de algunos probióticos y prebióticos a animales y a seres humanos, conduce a reducciones en ciertos metabolitos bacterianos y en otras enzimas bacterianas que se supone están implicadas en la síntesis o activación de carcinógenos, mutágenos y otros promotores de tumores (α - glucuronidasa, β -glucuronidasa, nitrato-reductasas y amoniaco).
- **Estímulo de las enzimas del huésped implicadas en la inactivación cancerígena:** hay estudios que demuestran la administración de BAL, que producen un incremento en la actividad enzimática o de procesos que protegen a las células contra la lesión inducida por carcinógenos. Estos incluyen la glutatión-transferasa (inducida por el *B. Longum*, lactulosa y el almidón resistente), las uridinas hepáticas difosfo-glucuronil-transferasas, la reductasa colónica NADPH-citocromo P450 (inducida por varias BAL), y la eliminación de la O⁶-metilguanina de la mucosa colónica en ratas tratadas con AOM a las que se les dio BAL. Tales mecanismos de protección podrían ser eficaces contra una amplia gama de carcinógenos presentes en la dieta, que posiblemente pueden promover varios focos de cáncer.
- **Alteración de la apoptosis (muerte celular programada) y la proliferación celular.** La administración de inulina/fructooligo-sacáridos a las ratas tratados con AOM incrementó la apoptosis en el colon, especialmente el colon distal. Las BAL inhibieron la hiperproliferación de células inducidas por el AOM y la actividad de la ornitín-decarboxilasa en ratas.
- **Modulación de la respuesta inmunológica/inflamatoria.** La supresión del crecimiento de tumores mediante yogur en ratones tratados con DMH, se asocia a la supresión de la respuesta inmunológica inflamatoria (24). Sin evidencia que lo avale, se ha propuesto un mecanismo inmunológico que explica el incremento de tiempo antes de la reaparición del tumor en los pacientes de cáncer de vejiga que toman *L. casei*.
- **Otros mecanismos posibles.** Se han propuesto varios mecanismos adicionales, generalmente con pocos datos que los apoyan. Estos incluyen la aparición de productos por la fermentación colónica, (por ejemplo, butiratos, lactatos), presencia de componentes bioactivos producidos por las leches fermentadas (péptidos funcionales, nisina, bacteriocinas), mayor producción de mucosidad o cambios en la composición del mucus, actividad del calcio sobre la mucosa epitelial y el lumen, reducción del tiempo de tránsito intestinal, etcétera. A continuación se muestra un ejemplo de la evolución de cáncer de colon (ver figura 11):

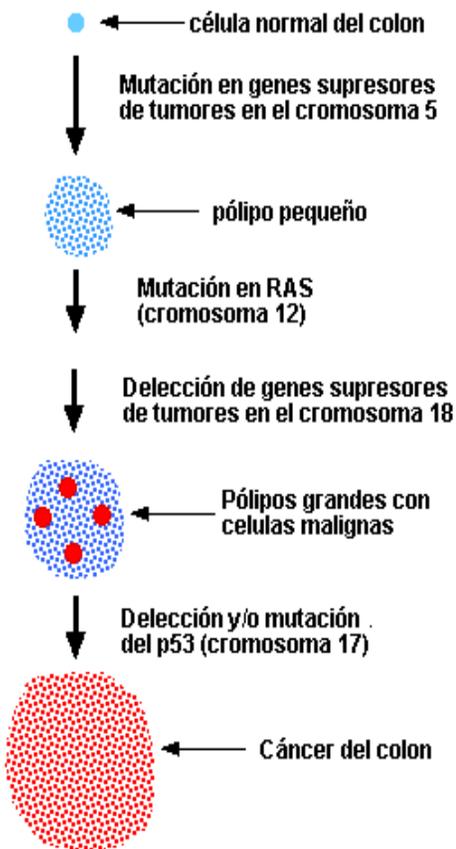


Figura 11: Evolución del cáncer de colon

1.3. DIGESTIÓN

1.3.1. FASES DE LA DIGESTIÓN

El conjunto de órganos cuya función correlativa consiste en convertir los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas de los alimentos en sustancias aprovechables por el organismo es el sistema digestivo, llamado también tubo digestivo, porque es, en realidad un tubo de casi once metros de longitud, a lo largo del cual, el alimento sufre varias transformaciones (es digerido) a través de una fase mecánica y una fase química (www.sistemadigestivo.com).

Fase mecánica consiste en la reducción del alimento que ingerimos en partículas lo bastante pequeñas para que lo podamos tragar fácilmente y para que pueda "viajar" por el tubo digestivo. Como ya sabes, esta fase mecánica tiene lugar básicamente en la boca. Los dientes cortan, desgarran y trituran los alimentos, con la ayuda de la lengua, para que todos los dientes intervengan en la masticación (www.sistemadigestivo.com).

Fase química de la digestión, consiste en la transformación de los alimentos en sustancias asimilables por el organismo. Esta transformación se realiza por la acción de varios jugos, llamados jugos digestivos, segregados por diversas glándulas, situadas unas en la boca y en el estómago, y otras (el hígado y el páncreas) situadas fuera del tubo digestivo, pero conectados a él a través de diversos conductos (www.sistemadigestivo.com).

Los *órganos del tubo digestivo*, son: la boca, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso y el recto. A continuación se describen:

1.3.1.1. SALIVA

La desintegración mecánica y química de la comida inicia en la boca (figura 12). Los dientes la trituran, convirtiéndola paulatinamente en partículas cada vez más pequeñas, y con ayuda de la lengua y los músculos del mentón la mezclan con saliva. El moco y los líquidos de la saliva la humedecen y la lubrican. Una enzima la amilasa salival (o ptialina), comienza el desdoblamiento químico del almidón. Gracias a la actividad de esta enzima en la boca, la comida se convierte en una masa blanda, llamada bolo, que luego es llevado hacia la parte posterior de la boca y allí se deglute.

Al desplazarse a ese sitio, los músculos de la faringe originan un reflejo de deglución. La lengua se impulsa hacia arriba contra el paladar, evitando con ello la expulsión de la comida, los músculos de la faringe se contraen para hacer que la comida llegue al esófago. Este es un tubo muscular que conduce al alimento hacia el estómago. Este es un tubo muscular que conduce el alimento hacia el estómago.

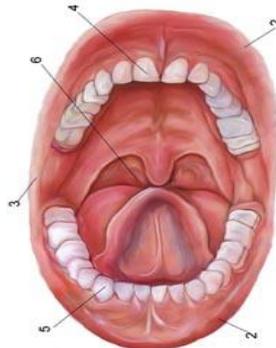


Figura 12. Boca; inicio de la digestión

1.3.1.2 ESTÓMAGO

La presencia del bolo estimula. En el estómago este tubo adopta forma de una bolsa muscular que se estira para recibir grandes cantidades de alimento. La presencia de este estimula las glándulas de las paredes para que segreguen una hormona, **gastrina**, hacia la sangre. La gastrina hace que otras células del estómago produzcan jugo gástrico, que contiene ácido clorhídrico, enzimas digestivas y moco. A continuación esta se mezcla con la comida en virtud de las contracciones de la pared del estómago. Un anillo muscular, el esfínter cardiaco impide que esas contracciones empujen la comida hacia el esófago.

La mezcla de comida y jugo gástrico se denomina quimo, en el estómago el quimo es extremadamente ácido de este estado que desactiva la amilasa salival, es esencial para la actividad de la pepsina, la principal enzima del estómago. Ella inicia la digestión, las proteínas se

desintegran las en pequeños fragmentos llamados polipéptidos. Como la pepsina digiere las proteínas en las células que las elaboran, deben ser sintetizadas en una forma inactiva denominada pepsinógeno, el cual se convierte en pepsina por acción del ácido clorhídrico antes de ser segregada en el estómago. En seguida activa otras moléculas del pepsinógeno. El moco protege la pared estomacal contra la actividad del ácido y de la pepsina. El desdoblamiento de proteínas es el sitio principal de la digestión y absorción. Parcial de las proteínas constituye la actividad digestiva más importante que tiene lugar en el estómago.

1.3.1.3 INTESTINO

El estómago poco a poco envía sus contenidos hacia el intestino delgado, sitio principal de la digestión y absorción. Su enorme longitud le da mucho tiempo para realizar ambos procesos. Su pared interna posee amplios pliegues cubiertos con millones de protuberancias más diminutas: las vellosidades intestinales, también ellas tienen un contorno irregular; cientos de microvellosidades se encuentran en la superficie de cada célula. Este pliegue tan extenso aumenta el área de absorción del intestino delgado unas 600 veces más de la que correspondería a un cilindro sin rugosidades (www.monografías.com)



Figura 13: Digestión intestinal.

El intestino en mamíferos y en humanos se divide en dos segmentos: intestino delgado e intestino grueso.

- Intestino grueso: Se limita a absorber las vitaminas que son liberadas por bacterias que habitan en el colon y el agua, compacta las heces y almacena la materia fecal hasta que es expulsada.
- Intestino delgado: Formado por tres porciones: Duodeno, Yeyuno Y Íleon

Se realizan dos funciones distintas: La digestión química total de los alimentos y la absorción de éstos. En este tramo desembocan: El hígado, que segrega la bilis, El páncreas que segrega el jugo pancreático, además en las paredes de la mucosa intestinal existen otras glándulas como las glándulas de Brünner que segregan mucus y las glándulas de Lieberkühn, que segregan jugo intestinal (tabla 4). El resultado de la acción de estos jugos es conseguir que: los glúcidos se transformen en monosacáridos, las grasas se rompan en ácidos grasos y glicerina, y las proteínas se rompan en aminoácidos (figura13) (www.monografías.com).

Al finalizar la digestión el quimo se transforma en un líquido lechoso llamado quilo formado por agua, glicerina, monosacáridos, bases nitrogenadas, aminoácidos y productos no digeridos.

Los productos de la digestión deben traspasar la pared intestinal (absorción) para ingresar en el torrente circulatorio y ser transportados a todas las células del cuerpo.

Tabla 4. Composición de los jugos que se vierten al intestino.

BILIS	JUGO INTESTINAL	JUGO PANCREÁTICO
Agua	Agua	Agua
Sales Inorganicas	Iones inórganicos	Iones inórganicos
Sales Biliares	Mucina	Peptidasas inactivas
Pigmentos biliares	Lactasa, maltasa, sacarasa	Carboxipeptidasas
Ácidos biliares	Lipasa intestinal	Amilasa Pancreática
Grasas	Peptidasas	Lipasa Pancreática
Colesterol	Enteroquinasas	Nucleasas Pancreáticas
Fosfatasa alcalina		

Fuente: www.profesorenlinea.cl

1.4 QUITOSÁN

1.4.1 GENERALIDADES DEL QUITOSÁN

Por su amplia distribución en la naturaleza la quitina es el segundo polisacárido en abundancia, después de la celulosa. Fue descubierta por Braconnot en 1811 cuando estudiaba las sustancias derivadas del *Agaricus volvaceus* y otros hongos. Posteriormente Odier, en un artículo sobre insectos reportó que había encontrado en algunos insectos la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola “quitina” (del griego *tunic*, envoltura). Payen, en 1943, inició una controversia que duró mas de cien años sobre las diferencias entre la quitina y la celulosa, en parte porque se pensaba que la presencia de nitrógeno reportada en algunas investigaciones se debía a residuos de proteínas que no podían ser completamente eliminados de las muestras (Larez, 2003).

El nombre sistemático de la quitina es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. Se encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas. La quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido (figura 14). Su estructura química es la siguiente:

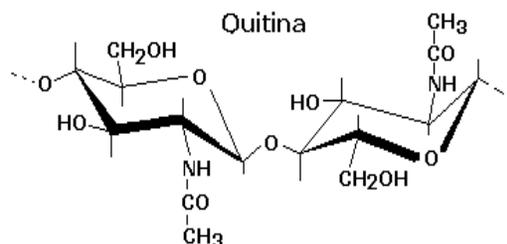


Figura 14: Estructura química de la quitina

Por su parte, el quitosano es también un polisacárido que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente hidróxido de sodio o de potasio, a altas temperaturas. El quitosán fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “quitina modificada”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Mas tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó “quitosán” (también se conoce como quitosano en algunos lugares, chitosan en inglés (Lárez, 2003).

La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como quitosán (figura 15); sin embargo, cuando la desacetilación del material de partida es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades $\beta(1-4)$ - 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que, obviamente, genera materiales con distintas propiedades denominados quitosán. La diferencia en las propiedades de estos materiales puede llegar a ser notable, como por ejemplo la distinta solubilidad en medio acuoso que pueden llegar a tener. Las estructura química del quitosán se muestra a continuación (Lárez, 2003):

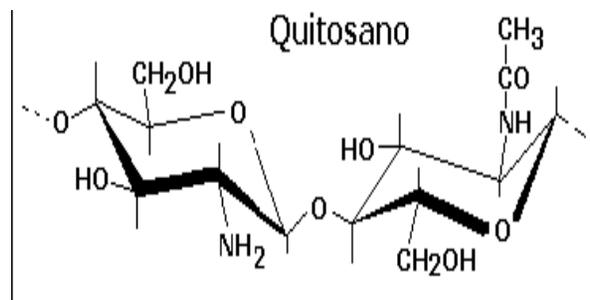


Figura 15: Estructura del quitosán

1.4.1.1. PROCESO DE MANUFACTURA DEL QUITOSAN

La quitina es tratada con hidróxido de sodio fuerte y se hidroliza en N –acetil la unión del acetil, se enjuaga, y se ajusta el pH. En este estado, el quitosán puede ser deshidratado para dar lo que se llama e “chitosan en hojuelas”. Éste es un producto en polvo de malla tosca cuyo tamaño de partícula puede ser reducida moliendo para dar un polvo de malla más fino. Quitosán en polvo a su vez puede ser mezclado en seco con un ácido orgánico, como el ácido adípico, para dar mezcla ácida que se pueda disolver. Debe recordarse que el quitosán en su forma de amina libre normalmente no es soluble en agua a pH’s sobre 6.5 y requiere del ácido para preparar las soluciones acuosas (figura 16).

1.4.1.2. DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA OBTENCIÓN DEL QUITOSÁN



Figura 16: Diagrama de obtención del Quitosán (Peral y Garzia, 2002)

1.4.2. APLICACIÓN DEL QUITOSÁN EN LA INDUSTRIA

Dado el gran número de trabajos que existen sobre este versátil material es conveniente realizar una clasificación por área sobre las aplicaciones que se le han ido dando. A continuación se presentan algunas de ellas, aunque la lista no pretende ser exhaustiva (tabla5) (Skjak-Braek, 1989)

Tabla 5. Aplicaciones del quitosán.

APLICACIÓN	EJEMPLO
Tratamiento de agua	Remueve los iones de metal, floculante de proteínas, aminoácidos, filtración.
Industria del papel	Tratamiento de superficie, papel para fotografía Papel carbón
Medicina	Control de colesterol en la sangre Membranas, control de la liberación de activos Lentes de contacto, inhibición de tumores
Cosméticos	Cremas para manos , cara y cuerpo, pasta de dientes
Agricultura	Controlador de liberación de agroquímicos
Alimentos	Conservadores Aditivos para la alimentación animal Remueve colores, sólidos, ácidos
Membranas	Osmosis inversa, control de permeabilidad, preparación de solventes
Biotecnología	Inmovilización de enzimas, separación de proteínas Cromatografía, inmovilización y recuperación de células

Fuente: Goseen, 1997

1.4.3. MICROENCAPSULACIÓN

Microencapsulación se define como una tecnología de empaquetar sólidos, líquidos o materiales gaseosos en cápsulas miniatura, selladas, que pueden soltar sus volúmenes a las proporciones controladas bajo influencias de condiciones específicas. Una microcápsula consta de una membrana semipermeable, esférica, delgada, y fuerte que rodea un centro del sólido o líquido, con un diámetro que varía de unas micras a 1 mm. Una descripción breve de técnicas del Microencapsulación para la encapsulación de microorganismos probióticos se da en la tabla 6 que se muestra a continuación. (Anal y Singh, 2007)

La encapsulación pueden usarse en un amplio sentido para muchas aplicaciones en la industria alimentaria, proporcionando sustancias, estabilizando el material del encapsulado y controlando reacciones de oxidación, proporcionando las sustancias o controlando la liberación, ocultando colores y olores, extendiendo la vida de anaquel y protegiendo los componentes contra la pérdida nutritiva. Los polímeros alimenticios como el alginato, quitosán CMC, carragenina, pectina son principalmente aplicados usando varias tecnologías de Microencapsulación. (Anal y Singh, 2007)

Tabla 6. Aplicación de polímeros en la Microencapsulación.

TÉCNICA DE ENCAPSULACIÓN	TIPO DE MATERIAL	PASOS IMPORTANTES
Secado Por aspersión	Polímeros solubles en agua	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación de la solución incluyendo el microorganismo 2. Atomización de la alimentación dentro del spray 3. Evaporación 4. Separación del producto o en forma seca
Congelado Por aspersión	Ceras, ácidos grasos, polímeros soluble e insolubles en agua	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación de la solución que contiene el problema (probiótico) 2. Solidificación de la capa mediante la congelación del material fundido
Suspensión De aire	Polímeros lípidos y ceras	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación de las soluciones 2. Fluidización de las partículas del centro 3. Recubrimiento de las partículas a encapsular con una solución protectora
Extrusión	Polímeros solubles e insolubles en agua	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación de materiales para la solución protectora 2. Dispersión del material encapsulado 3. Enfriar o pasar el centro a través de una mezcla de líquidos deshidratadores
Técnica de Separación de fase	Polímeros soluble en agua	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se dispersa el material a encapsular en una solución de material protector (el material que va a formar esa capa protectora) 2. Aumentar la rigidez del material mediante un tratamiento terminado

Fuente: Anal y Sigh, 2007

1.4.3.1. ENCAPSULACION DE PROBIOTICOS EN QUITOSAN

El biopolímero quitosán producto de la N-deacetilación de el polisacárido quitina, ha ganado gran importancia en el campo farmacéutico es un polímero de carácter cationico, de buena compatibilidad, no tóxico y biodegradable. El quitosán puede ser aislado de caparazones de crustáceos y cutículas de insectos. Las propiedades del quitosán varían según la fuente de obtención. Los términos de quitina y quitosán se refieren a dos tipos de copolímeros, conteniendo el residuo de dos monómeros anhídrido-acetil-D-glucosamina y anhídrido-D-glucosamina respectivamente. La quitina es un polímero de β (1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopiranososa y es uno de los mas abundantes materiales orgánicos en la tierra después de la celulosa y la mureína. Para poder ejecutar suficiente estabilidad las esferas de quitosán pueden ser iónicamente unidas con fosfatos o alginatos (Anal y Singh, 2007).



Figura 17: Microcápsula.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y caracterizar microbiológicamente esferas de quitosán-alginato con el microorganismo probiótico *L. delbrueckii spp. bulgaricus* encapsulado que aseguren su paso por el estómago y la viabilidad en el intestino “*in vitro*”.

OBJETIVO PARTICULAR 1

Evaluar la resistencia y desintegración de esferas quitosán-alginato, producidas a partir de diferentes concentraciones de los dos polímeros en sistemas amortiguadores a diferentes pH's.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Evaluar la viabilidad del *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* en condiciones gástricas e intestinales “*In Vitro*”.

2.2 CUADRO DE METODOLÓGICO

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y caracterizar microbiológicamente esferas de quitosán-alginato para encapsular el microorganismo probiótico *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* que aseguren su paso por el estómago y la viabilidad en el intestino "in vitro".

OBJETIVO PARTICULAR 1

Evaluar la resistencia y desintegración de esferas quitosán-alginato, producidas a partir de diferentes concentraciones de los dos polímeros en sistemas de diferentes pH's.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Evaluar la viabilidad del *L. bulgaricus* en condiciones gástricas e intestinales "in Vitro".

ACTIVIDAD 1

Preparación de las esferas alginato-quitosán. Con el siguiente arreglo

QUITOSÁN (%)	ALGINATO (%)	CaCl ₂ (M)	CaCl ₂ (M)
1	1.5	0.05	-
1.5	2	0.05	-
2	1.5	0.05	-
2	2	0.05	-

ACTIVIDAD 2

Someter las esferas formadas en sistemas de pH 1 y pH 8 para evaluar su desintegración y resistencia de cada una de las concentraciones de acuerdo al siguiente criterio:

Presenten forma esférica ligeramente ovoide	o Semiduras (Al ejercer presión con los dedos se fragmenten).
Al deshidratarse conserven su forma esférica	Tamaño de partícula a 3mm de diámetro
Sin burbujas en la superficie	

ACTIVIDAD 3

Realizar la siembra del *L. bulgaricus* En MRS (Man, Rogosa y Sharpe).

ACTIVIDAD 6

Encapsular el *L. bulgaricus* en esferas Quitosán-alginato por técnica de goteo.

ACTIVIDAD 4

Realizar la cinética del *L. bulgaricus* En MRS (Man, Rogosa y Sharpe).

ACTIVIDAD 7

Conteo inicial de m.o viables por esfera

ACTIVIDAD 5

Conteo de m.o viables antes de encapsulamiento

ACTIVIDAD 8

Someter la esferas a la actividad "In Vitro" de los fluidos gastrointestinales

ACTIVIDAD 9

Conteo de m.o viables por esfera, después de la actividad "in Vitro"

ANÁLISIS DE RESULTADOS

CONCLUSIONES

2.3 DESCRIPCIÓN DEL CUADRO METODOLÓGICO

Los polímeros utilizados para la experimentación tienen las siguientes características:

- Quitosán de cangrejo de peso molecular 52, 800 g/mol; Grado de desacetilación de 99%. Obtenido en el laboratorio de biotecnología (Miranda Castro, 2000)
- Alginato Keltone alto peso molecular.

Las concentraciones de cada polímero se definieron en base a estudios ya realizados (Chen et. al 2006; Krasaekoopt et.al. 2006), sin embargo debido al tipo de quitosán utilizado se tuvo variantes por lo cual se propusieron otros rangos de concentración para cada polímero los cuales se muestran a continuación:

Tabla 7. Variaciones en la concentración para cada polímero.

QUITOSÁN (%)	ALGINATO (%)	CaCl ₂ (M)	CaCl ₂ (M)
1	1	0.05	-
	1.5		
	2		
1.5	1	0.05	-
	1.5		
	2		
2	1	0.05	-
	1.5		
	2		

Las soluciones en las cuales se sometieron las esferas formadas para evaluar su resistencia, son a PH=1(esta solución conteniendo pepsina) y pH=8 simulando los pH's del estómago e intestino respectivamente.

Preparación de las soluciones

Para la preparación de la solución de quitosán al 1%, 1.5% y 2%, se pesaron 1g, 1.5g, 2g respectivamente de quitosán para 100ml de agua destilada, a la solución se le agregó 0.5 ml de ácido acético para disolver mediante un agitador magnético. Posteriormente se procedió a ajustar el pH. (krasaekoopt et.al. 2006).

El valor de pH requerido para la formación de esferas es de 5 el cual se realizó mediante la adición de una solución de NaOH al 12% utilizando el potenciómetro VWR Scientific.

Para la preparación de 100 ml de solución de alginato al 1%, 1.5% y 2%, se pesaron 1, 1.5, y 2g, respectivamente, de alginato Keltone de alto peso molecular, el cual se disolvió en agua destilada mediante un agitador magnético.

Preparar la solución de CaCl_2 al 0.05M. De la cual solo se le incorporó 20ml de solución de CaCl_2 a la solución de quitosán (Ik-keun Yoo et.al. 1996).

Formación de esferas

La formación de esferas se llevó a cabo por medio de la técnica de goteo en la cual la solución de alginato se goteó dentro de la solución de quitosán a una distancia de 20 cm aproximadamente empleando un gotero con orificio de 2 - 3 mm de diámetro, en reposo durante 24 horas para fortalecer la esfera. Para las variaciones de la concentración de los polímeros propuesta en la (tabla 7). Se realizó una prueba incorporando a la solución de quitosán CaCl_2 al 0.05M, y en ausencia de CaCl_2 para evaluar la resistencia y desintegración de las esferas a cada una de las condiciones.

La selección de esferas se llevó a cabo mediante el criterio reportado en la tabla 8.

Tabla 8. Características de calificación para la selección de esferas.

Presenten forma esférica o ligeramente ovoide	Semiduras (Al ejercer presión con los dedos se fragmenten).
Al deshidratarse conserven su forma esférica	Tamaño de partícula 2 mm a 3mm de diámetro
Sin burbujas en la superficie	

ACTIVIDAD 2

Evaluación de esferas en pH ácido y básico

Las esferas formadas a cada una de las concentraciones dadas en la tabla 7, se sometieron a evaluación de resistencia en soluciones de pH 1 (equivalente a pH gástrico), en 100 ml de agua destilada conteniendo HCl. Para el caso de la simulación a pH 8 (pH intestinal), de la misma manera en 100 ml de agua destilada se incorporó NaOH al 12% hasta obtener el pH deseado, ambas pruebas se realizaron con agitación.

Se colocaron cada una de las soluciones en tubos de 10 ml con 1 g de esferas en agitación, durante 1h, las esferas que se mantuvieron íntegras frente a pH 1, se filtraron y se traspasaron al los tubos conteniendo la solución a pH de 8 en agitación esta etapa de evaluación de esferas se llevó a temperatura ambiente.

De todas las esferas formadas para cada una de las concentraciones se seleccionaron aquellas que cumplieron con las siguientes características:

- Las esferas deben conservarse íntegras durante su estadía en pH ácido, suavizándose solo un poco.

- Durante su estadía en pH alcalino la esfera deberá disolverse por completo o fragmentarse lo más posible para poder liberara las células atrapadas.

Preparación del inóculo

Se preparó agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y se esterilizó el medio a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente se inoculó 1g de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* (CHR-HANSEN) y se incubó a 37°C durante 3 días.(www.difcomanual.com).

Cinética de crecimiento del *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*

Se realizó la cinética del microorganismo *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* en leche, con 12% de sólidos de acuerdo a las indicaciones de la marca Svelty.

Se prepararon 10 matraces erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de leche, en cada matraz se incorporó 10 ml de inóculo, y se incubó durante 20 h, se enumeraron los matraces de 1 al 10. Cada 2 horas se filtró 1 matraz para evaluar el peso de las células. Una vez registrado el peso del papel filtro los residuos que quedaron sobre el papel se llevaron a peso constante. Posteriormente los datos obtenidos se graficaron en función del tiempo.

Encapsulación de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*

Una vez esterilizada las soluciones de alginato y de quitosán (conteniendo (CaCl₂)). La biomasa determinada por la cinética de crecimiento, se incorporo a la solución de alginato en condiciones estériles y se homogenizó. Por técnica de goteo se obtuvieron las esferas y se dejaron en reposo a temperatura de 37°C durante 24 h para polimerización en la solución de quitosán, se lavaron las esferas con agua estéril para eliminar residuos de iones de calcio y las células que no quedaron atrapadas.

Viabilidad

Conteo inicial de microorganismos viables por esfera. El conteo se llevó a cabo mediante diluciones decimales. Se realizaron diluciones desde 10¹- 10⁸, en el primer tubo, se incorporó 1g del microorganismo obtenido por centrifugación y homogenizó. Posteriormente se sembraron las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ y se incubó a 37°C por 3 días. Una vez hecho el conteo de microorganismos, Se realizó una tinción de gram y se observó en el microscopio para asegurar su pureza.

Simulación “*In vitro*” de los fluidos gastrointestinales

Se sometieron las esferas a la actividad de los fluidos gastrointestinales “*in Vitro*”. La composición de dichos fluidos se realizó de acuerdo a los datos reportados en la tabla 9.

1. Se preparó una solución con los componentes que integran el fluido gástrico de acuerdo a la tabla 9.
2. Se preparó una solución con los componentes que integran el fluido intestinal de acuerdo a la tabla 9.

Tabla 9. Composición química de los fluidos gastro-intestinales.

CLASIFICACIÓN	JUGO GÁSTRICO	JUGO DUODENAL
Inorgánica (g/L)	NaCl (5.50) NaH ₂ PO ₄ (1.80) KCl (1.65) CaCl ₂ (0.80) NH ₄ Cl (0.70)	NaCl (14.00) NaHCO ₃ (6.80) KH ₂ PO ₄ (0.016) KCl (0.72) MgCl ₂ (0.01) CaCl ₂ (0.39)
Ácido (ml/L)	37% HCl (15.0) Glucosa (1.30) Ácido glucorónico (0.04) Urea (0.20) Glucosamina (0.70) Mucina (6.00) BSA (2.00)	37% HCl (1.00) Urea (0.20) BSA (2.00)
Enzima (g/L)	Pepsina (2.00)	Pancreatina (6.00) Lipasa (1.00) Bilis

Fuente: Hurdzan, 2008

Viabilidad después de la actividad “*In vitro*”

Conteo de microorganismos viables por esfera, posterior a la actividad “*in Vitro*”

El conteo se realizó de la misma manera que para el conteo inicial, el cual consistió en diluciones porcentuales. La variante es que el tubo donde se realizó la prueba de simulación intestinal fue la dilución 1, y de ésta se tomó 1ml para el siguiente tubo y así sucesivamente hasta la dilución 10⁻⁶.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de esferas

De acuerdo a la variación en la concentración de los polímeros alginato y quitosán reportadas en la tabla 7. Se obtuvieron los siguientes datos:

Para la formación de esferas, se realizó, la combinación de cada una de las concentraciones planteadas para cada polímero quitosán y alginato. Así como la presencia de CaCl_2 en la solución de quitosán cuando la solución lo haya requerido.

La tabla 10 que se muestra a continuación corresponde a 9 diferentes combinaciones obtenidas a partir de las concentraciones planteadas para cada polímero, la cual describe si se logró o no la formación de esferas. Esta prueba se realizó sin CaCl_2 en la solución de quitosán.

Tabla 10. Formación de esferas sin CaCl_2

Quitosán- alginato(%)	Sin CaCl_2	Características
1 - 1	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
1 - 1.5	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
1 - 2	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
1.5 - 1	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
1.5 - 1.5	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
1.5 - 2	Si hubo formación	Esfera débil, al tacto se desintegraba
2 - 1	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
2 - 1.5	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
2 - 2	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie

Como se muestra en la tabla 10, en la mayoría de las combinaciones quitosán-alginato no tuvo formación de esferas, ya que al realizar la formación por técnica de goteo el alginato se aglomeraba en la superficie. Solo se obtuvo formación de esferas para la combinación quitosán 1.5% + alginato 2%, sin embargo, las esferas estaban muy frágiles y al tacto se desintegraban. Por lo que se procedió a evaluar estas mismas condiciones pero ahora con CaCl_2 en la solución de quitosán.

La tabla 11 muestra los datos obtenidos, incorporando CaCl_2 en la solución de quitosán al 0.05 M.

Tabla 11. Formación de esferas con CaCl₂ al 0.05 M

Qitosán-alginato	0.05 M CaCl ₂	Características
1 - 1	Si hubo formación	Esferas débiles, muy pequeñas al perder agua se desintegraba la esfera
1 - 1.5	Si hubo	Esferas débiles, muy pequeñas al perder agua se desintegraba la esfera, poca esfericidad, con burbujas
1 - 2	Si hubo formación	Esferas fuertes, esféricas y mantenían su forma aún secas.
1.5 - 1	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
1.5 - 1.5	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
1.5 - 2	Si hubo formación	Esfera fuerte, esférica y al deshidratarse mantenía su forma.
2 - 1	No hubo formación	El alginato se aglomeró en la superficie
2 - 1.5	Si hubo formación	Poca esfericidad, pequeñas y amorfas al secarse.
2 - 2	Si hubo formación	Esfera fuerte, al deshidratarse mantenía la esfericidad

Como se puede observar en la tabla 11 para las nueve combinaciones de quitosán-alginato, hubo formación de esferas para 6 combinaciones; sin embargo, para la combinación de quitosán 1% + alginato 1% así como para la combinación de quitosán 1% + alginato 1.5%, se obtuvieron esferas débiles y al secarse se desintegraban por completo, presentaban burbujas en la superficie y tenían poca esfericidad. Por el contrario en lo referente a la combinación quitosán 1% + alginato 2% se obtuvieron esferas resistentes al tacto, esféricas y aún cuando se deshidrataban quedaban esféricas. Para el caso de quitosán 1.5% + alginato 1%, quitosán 1.5% + alginato 1.5%, quitosán 2% + alginato 1% no se obtuvo formación de esferas ya que al gotearse la solución de alginato sobre la solución de quitosán se quedaba en la superficie, debido a que la solución de quitosán tenía mayor densidad. La combinación de quitosán 1.5% + alginato 2%, quitosán 2% + alginato 2%, presentaron características deseables ya que de éstas concentraciones se obtienen esferas resistentes al tacto y al deshidratarse mantenían su forma esférica.

De las 6 combinaciones de quitosán – alginato solo 3 de ellas presentaron esferas con las características deseadas (ver tabla 8) por lo que solo estas tres combinaciones fueron aptas para continuar a la siguientes prueba de resistencia en soluciones de pH ácido y básico. pH correspondiente a estómago e intestino.

Evaluación de esferas en en pH ácido y básico

Combinación Quitosán 1%-Alginato 2% +0.05M CaCl₂

La combinación de Quitosán 1%-Alginato 2% +0.05M CaCl_2 produjo esferas resistentes al tacto y al ejercer presión con los dedos se fragmentaban, las cuales se muestran en la figura 18.



Figura 18: Esferas de Quitosán 1%-Alginato 2%-0.05M CaCl_2

Una vez obtenidas las esferas se procedió a evaluarlas en solución de HCl a pH 1 de tal forma que simule el pH estomacal, esta prueba se realizó con agitación. (Chen et.al., 2006).

Durante esta etapa la esfera solo se suaviza, más del 80 % aproximadamente de las esferas conservaron la forma y se mantuvieron íntegras, por lo que se procedió a someterlas en NaOH de pH 8 durante 1 hora, ésta alcalinidad es semejante a la del intestino (ver figura 19).



Figura 19: La figura de lado izquierdo de la Fotografía corresponde a las esferas que fueron sometidas a solución de pH 1, las esferas que se mantuvieron íntegras se sometieron a la solución de pH 8 donde se puede observar en la figura de lado derecho, al término de 1 hora las esferas se fragmentaron por completo.

La combinación 1% + alginato 2% + 0.05 M de CaCl_2 presentó resistencia de la esfera durante su estadía en solución de pH 1 y en la solución de pH 8 se observó que se empezaba a desintegrar al minuto 40 logrando que al cabo de una hora todas las esferas se fragmentaran. Estas condiciones obtenidas, son las necesarias para poder realizar la

evaluación “In vitro” con el *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* encapsulado en dichas combinaciones de concentraciones de los polímeros quitosán-alginato.

Combinación de Quitosán 1.5 %-Alginato 2% +0.05M CaCl₂

La combinación de Quitosán 1.5 %-Alginato 2% +0.05M CaCl₂ formaron esferas resistentes de acuerdo al criterio de selección de esferas. En la figura 20 se puede observar que las esferas formadas presentan buena esfericidad, no hay presencia de burbujas lo que asegura buen atrapamiento de células.



Figura 20: Esferas formadas a la concentración Quitosán 1.5% + Alginato 2% +0.05M CaCl₂.

De la misma forma que la concentración anterior estas esferas se sometieron a las condiciones de pH 1 y 8 en las cuales las esferas solo se suavizaron durante la etapa de acidez y en el caso de la solución de pH 8 solo se fragmentaron un poco.

En la figura 21 se puede observar que la resistencia y desintegración a cada una de las etapas de acidez y alcalinidad, durante su evaluación se observó que las esferas se empezaban a desintegrar al minuto 43 durante la etapa de alcalinidad (resistencia en solución de NaOH), por lo que esta combinación de concentraciones de los polímeros también se consideró para hacer la prueba de simulación In vitro conteniendo el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*.

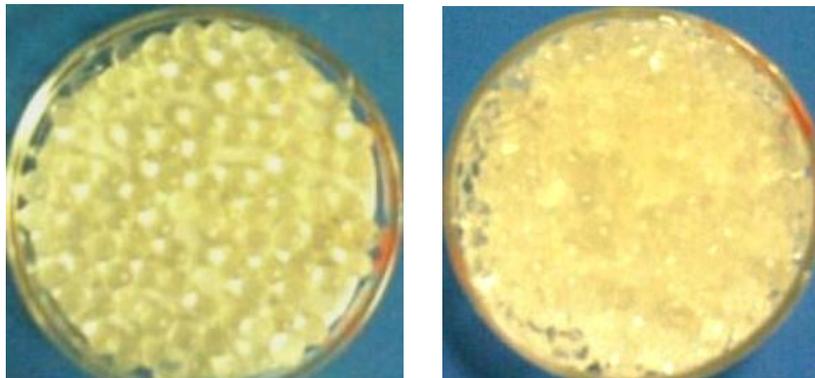


Figura 21: La imagen de la izquierda corresponde a la exposición de esferas a pH ácido, la del lado derecho corresponde a la exposición de pH básico.

Combinación de Quitosán 2.0 %-Alginato 2% +0.05M CaCl₂

En lo referente a la combinación de concentraciones quitosán 2% + alginato 25 + 0.05M CaCl₂, también se obtuvieron esferas resistentes al tacto, pero al ejercer presión sobre ellas se desintegraban, característica que era indispensable para predecir la desintegración de las esferas durante la etapa de alcalinidad.

Al presentar aparentemente resistencia se procedió a evaluar estas esferas en condiciones de las soluciones de pH=1 y pH=8 (recordemos que estos pH son similares al pH gástrico e intestinal), las esferas que se mantuvieron íntegras en el pH=1 o en su defecto solo fragmentado al cabo de una hora, se traspasaron a otro matraz el cual contenía solución a pH=8 ambas soluciones simulando las condiciones de acidez del estomago e intestino, respectivamente. En la figura 22, se muestran las esferas que se sometieron a pH=1, obteniéndose esferas suavizadas pero íntegras, por lo que se recuperaron y se colocaron el matraz que contenía la solución a pH= 8 (NAOH) se dejaron durante una hora en agitación.

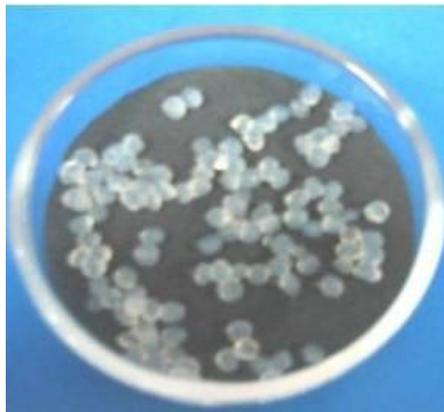


Figura 22: Esferas sometidas en solución de pH=1

Al minuto 43 de mantenerse las esferas en solución de NAOH a pH 8, éstas empezaban a fragmentarse ligeramente, al cabo de una hora se obtuvieron las esferas fragmentadas al 100 % como se puede observar en la figura 23.

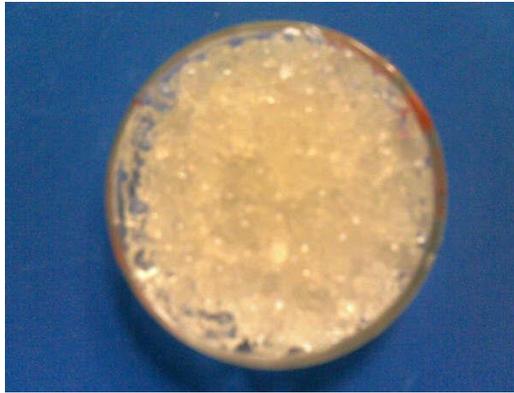


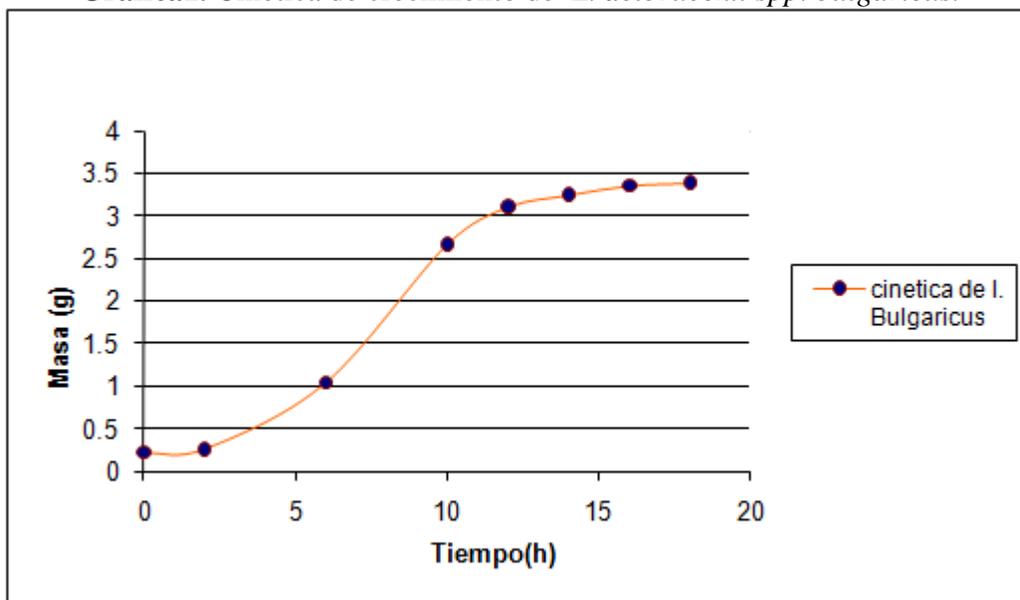
Figura 23: Esferas fragmentadas sometidas a la solución de pH=8

Curva de crecimiento del *L. delbrueckii spp bulgaricus*

Se realizó la cinética del microorganismo *L. delbrueckii spp bulgaricus* para determinar el tiempo necesario para alcanzar el máximo crecimiento de la bacteria.

Se obtuvieron 8 datos en un estudio de 20 h, la cinética se hizo por triplicado y solo se muestran los promedios. En la gráfica 1, se puede observar que a la hora 18 se mantiene constante el crecimiento, teniendo una velocidad de crecimiento de 0.2083 g/h.

Gráfica1. Cinética de crecimiento de *L. delbrueckii spp. bulgaricus*.



Obtención de la Biomasa

Para preparar el inóculo se incubó el microorganismo durante 18 h, en 500 ml de medio de crecimiento MRS (Man Rugosa y Sharpe), tal volumen se estableció ya que de este solo se obtenían 2 gramos (www.difcomanual.com) ver figura 24.



Figura 24: *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* en MRS.

De la biomasa centrifugada obtenida de el cultivo de 500 ml de MRS (Man Rugosa y Sharpe) se llevó a cabo el conteo de microorganismos viables antes de encapsular en las esferas, este conteo se realizó con un gramo de microorganismos centrifugados, esto se realizó por dilución donde los resultados fueron los siguientes:

Se hicieron 3 repeticiones y se obtuvieron los siguientes datos.

Tabla 12. Conteo de *L. delbrueckii spp. bulgaricus*

DILUCIÓN	UFC/ ml
10^{-8}	17×10^9
10^{-8}	3×10^9
10^{-8}	1×10^9

$$\text{Promedio} = 7 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$$

Para poder comprobar que las colonias que crecieron estaban puras, se realizó una tinción de Gram, la cual se puede apreciar en la figura 25. Por lo que inicialmente se realizó la tinción del microorganismo directamente de la muestra comercial (CHIS-HANSEN). Para

así tener un parámetro de comparación con las tinciones de Gram que se hicieron durante toda la experimentación.

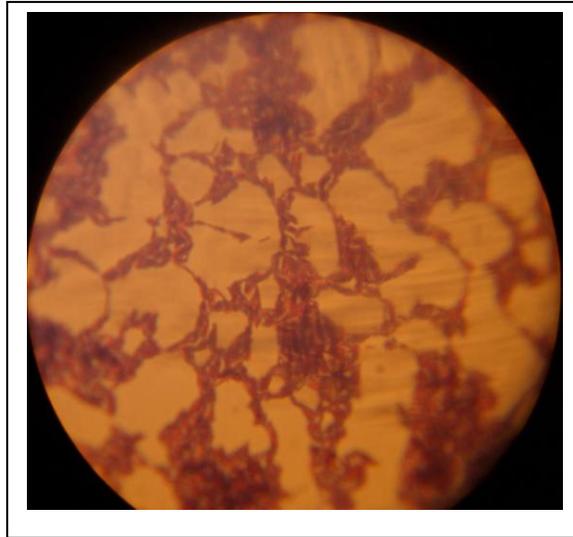


Figura 25: *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*

La siguiente imagen (figura 26) corresponde a una tinción de Gram de una muestra de MRS (Man Rugosa y Sharpe) conteniendo el microorganismo *L. delbrueckii spp. bulgaricus*. Para verificar que hasta esta etapa no existiera contaminación de las muestras.



Figura 26: Tinción de Gram a una muestra de MRS (Man Rugosa y Sharpe)

Encapsulación de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*

Como se observa en la figura 27, se presentan las esferas de quitosán-alginato + CaCl₂ a las concentraciones de quitosán al 1%, 1.5% y 2% y alginato al 2% con CaCl₂ 0.05M, con el microorganismo encapsulado. Las esferas se ven sólidas y de color blanco. Conforme aumenta la concentración de quitosán, las esferas se notan de un tamaño más pequeño y con menor esfericidad.

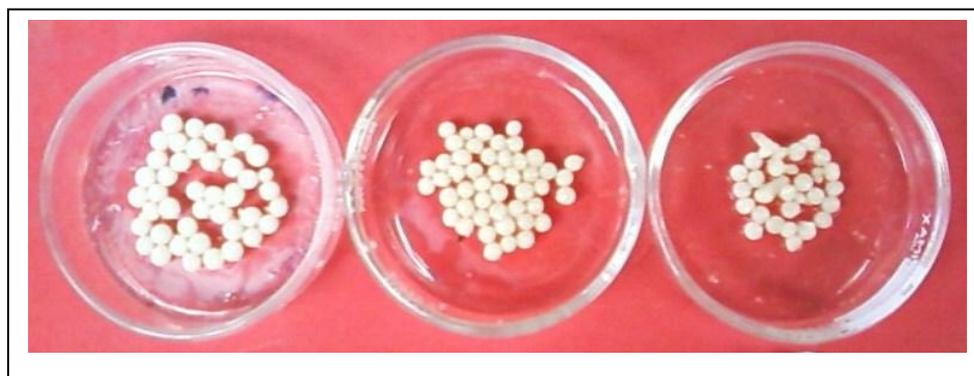


Figura 27: De Izquierda a derecha esferas a concentración de quitosán: 1%, 1.5% y 2% en combinación con alginato al 2% y CaCl₂ 0.05M respectivamente.

Viabilidad del *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* por esferas

Se realizó el conteo de microorganismos atrapados por esfera para comparar contra los microorganismos que sobrevivan después de la actividad “In vitro” de los fluidos gastrointestinales.

A continuación se muestra el conteo de microorganismos por esferas para cada una de las concentraciones, se realizó por triplicado y se muestran los promedios. Ver tabla 13.

Tabla 13. Conteo de *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*

CONCENTRACIÓN	DILUCIÓN	UFC/ ml
QN 2% - ALG 2%	10 ⁻⁶	2 x 10 ⁷
QN 1.5% - ALG 2%	10 ⁻⁶	5 x 10 ⁷
QN 1% - ALG 2%	10 ⁻⁶	11x 10 ⁷

Viabilidad del *L. delbrueckii spp. bulgaricus* en condiciones gástricas e intestinales “*In Vitro*”

Las esferas formadas para las combinaciones de quitosán – alginato seleccionadas, una vez que demostraron ser resistentes a los cambios de pH, de ácido a básico; se procedió a evaluarlas conteniendo el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*, durante la simulación gástrica e intestinal “*In Vitro*” (Hurdzan, 2008). Lo cual significa que el ambiente de exposición de las esferas comprende: Cambios de pH drásticos, Temperatura de 37°C, presencia de enzimas y agitación ligera (esta condición simulando los movimientos de estómago e intestino). El tiempo de residencia durante la simulación gástrica fue de 1h, mismo tiempo establecido para la simulación intestinal (figura 28).

Lo que se pudo observar que a partir del minuto 50 aproximadamente las esferas empezaban a desprender pequeños fragmentos por lo que al término de la hora las esferas solo estaban suavizadas, esto, durante la etapa de simulación gástrica tal manera que se pudieron recolectar y traspasarlas a otro tubo el cual contenía solución de simulación intestinal, en esta segunda etapa se pudo observar que al minuto 40 aproximadamente empezaba a fragmentarse una pequeña cantidad de esferas, al minuto 55 las esferas fragmentadas era mayor al 50% y al minuto 60 las esferas en su totalidad estaban fragmentadas.

Durante estas dos etapas las esferas formadas a las 3 concentraciones seleccionadas se comportaron de forma muy similar. Ya que al final de la simulación se obtuvieron esferas fragmentadas de tal manera que pudieran perfectamente liberar el contenido.

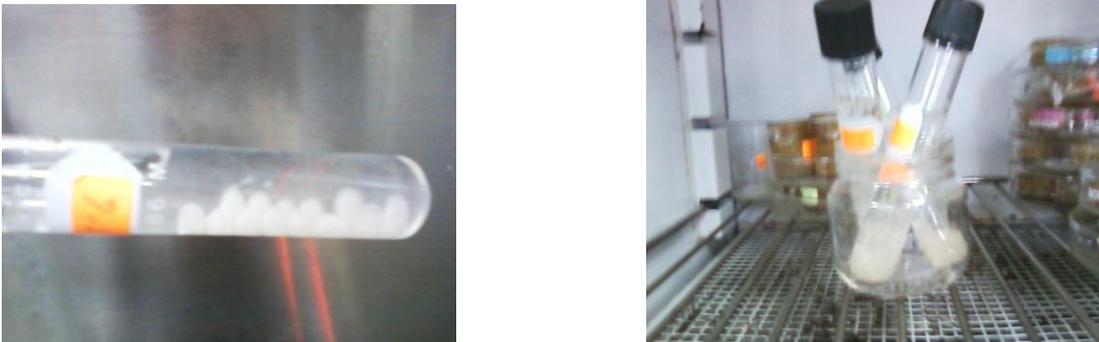


Figura 28: Esferas sometidas a la simulación “*in vitro*”

Después de observar el comportamiento físico de la esfera ante los rigores físicos y químicos de la simulación gastrointestinal se procedió a evaluar la supervivencia del microorganismo ante estas condiciones.

Se realizó el conteo de microorganismos *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* después de la actividad “*in vitro*”. Obteniéndose lo siguiente:

En los datos de la tabla 14 se puede observar que partiendo de una concentración inicial del *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* 1×10^9 y concentración inicial de la esfera de 10^7

se obtuvo una supervivencia del microorganismo máximo de 4×10^2 en el caso de la concentración de quitosán del 1% con alginato 2% y 0.05M de CaCl_2 .

Tabla 14: Conteo de *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*

[QUITOSÁN]	DILUCIÓN	UFC/ ml
1	10^{-1}	4×10^2
1.5	10^{-1}	1×10^2
2	10^{-1}	No hubo crecimiento

Se realizó la tinción de Gram para asegurar que los microorganismos fueran los de interés (figura 29), además de asegurar que no existiera ningún tipo de contaminación durante las siembras y/o dilución.

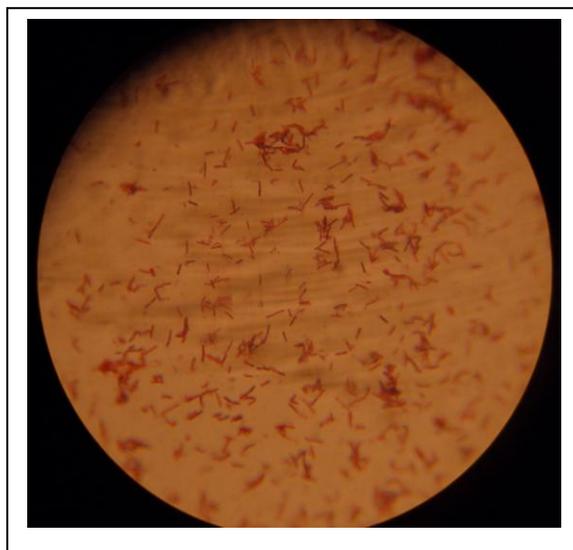


Figura 29: *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* después de la simulación gastrointestinal “*In vitro*”

DISCUSIÓN

La encapsulación puede ser usada para algunas aplicaciones en la industria alimentaria como estabilizante de material interno controlando reacciones oxidativas, como liberación controlada y extendiendo la vida de anaquel de componentes contra pérdida nutricional. Polímeros como alginato y quitosán, carboxymetil celulosa (CMC), carrageninas y pectinas son muy empleados en las tecnologías de microencapsulación. Anal y Singh 2007 menciona en su artículo que una microcápsula que contiene materiales sensibles al ácido que serán consumidos por fluidos gastrointestinales debe fracturarse hasta después de su paso a través del estómago. Este autor muestra la necesidad de crear protección a los microorganismos y a su vez obtener la mejor formulación para una protección efectiva de ellos. Por lo que en este trabajo se muestra la necesidad de conferir una mayor protección al *L. delbrueckii spp. bulgaricus* ya que en medio libre es muy sensible a los ácidos.

Debido a que uno de los polímeros más empleados y que han arrojado los mejores resultados en el ámbito de la encapsulación es el alginato de sodio dentro de estas investigaciones no es totalmente efectivo, los estudios se han orientado a buscar mayor estabilidad de las esferas combinando con otros polímeros por lo que en el presente estudio se busco mayor estabilidad empleando quitosán y CaCl_2 .

El método elegido para el desarrollo de esferas se eligió por goteo y mezcla de polímeros como lo hizo en su estudio Anal & Stevens 2005. La encapsulación en sistemas de alginato de sodio se da principalmente adicionando la solución de alginato de sodio a una solución de CaCl_2 es instantánea una polimerización interfacial, con la precipitación de alginato de calcio seguido por una gelación gradual del interior como iones de calcio a través de los sistemas poliméricos (Anal y Singh 2007).

Se observó en este trabajo que el tamaño de la esfera depende de la viscosidad, de la solución de polímero, del diámetro del orificio donde es goteado y de la distancia hacia la solución de coagulación y eso mismo concluyen Chandramouli, Kailasapathy, Peiris y Jones (2004) Lee, Cha and Park (2004) y Sheu and Marshall (1993) que estudiaron los factores que afectan la preparación de la cápsula como concentraciones de alginato y CaCl_2 .

El método de microencapsulación convencional con alginato de sodio y CaCl_2 han sido usados para encapsular *L. acidophilus* y protegerlo de las condiciones ácidas de los fluidos gastrointestinales. Los estudios han mostrado que la unión alginato-calcio conteniendo cultivos inmovilizados son mejor protegidos, lo cual muestra un incremento en la supervivencia de la bacteria bajo diferentes condiciones en comparación con bacterias no encapsuladas como lo mostrado en este trabajo.

Sin embargo, Hansen, Allan Wotjas, Jin y Paulson (2002), comentan que esferas menores a 100 μm no proporcionan protección significativa en comparación a las células en libertad En el presente trabajo se obtuvieron esferas de aproximadamente 3 mm en todas las concentraciones probadas, obteniéndose mejor esfericidad en la concentración de 1% de quitosán+ 2% de alginato y 0.05 M de CaCl_2 , además de ser las que mejor comportamiento tuvieron antes los fluidos gastrointestinales.

Chen, Chen Liu, Lin y Chiu (2005) usaron prebióticos (fructooligosacáridos y isomaltooligosacáridos) como promotores de crecimiento y alginato de sodio como material encapsulante de *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum* y *B. longum*. Manejando una concentración de 1% de alginato obteniendo una mayor supervivencia de ellos. También Cui, Goh, Kim, Choi y Lee (2001), prepararon microcápsulas de alginato unidas con poli-L-lisina para encapsular bifidobacterias donde la supervivencia fue más alta en un pH medio (6.8) y también se observó que la supervivencia es mayor, que en comparación a células libres. Este es un punto que debemos considerar para mejorar la supervivencia porque en este trabajo se planteó en primera instancia la protección del microorganismo a través del paso en diversos medios tanto en ácido como el alcalino y muy probablemente podríamos mejorar la supervivencia, si se le adicionan algunos elementos de alimentación de los microorganismos para procurar su crecimiento.

De acuerdo a los resultados de varios investigadores donde sus estudios se basaron principalmente en la elaboración de esferas con alginato, surgió la necesidad de implementar un material que en conjunto con alginato se formara red más fuerte y estable.

Krasaekoopt, Bhandari y Deeth (2003, 2004), evaluaron la supervivencia de probióticos encapsulados en esferas de alginato recubiertas de quitosán tratados en pasteurización UHT y pasteurización convencional durante el almacenamiento. Ellos utilizaron el microorganismo *L. acidophilus* 547, *L. casei* 01 y *B. bifidum* para este estudio. La supervivencia de la bacteria encapsulada fue mas alta en comparación con la bacteria en medio libre en aproximadamente 1 log. El número de bacterias probióticas se mantuvo en el mínimo recomendado (10^7 CFU/g) solo en el caso de los lactobacilos no para la bifidobacteria. Lee et. al (2004) ellos investigaron los efectos de las micropartículas de quitosán-alginato en la supervivencia del *L. bulgaricus* KFRI763 durante la simulación de jugo gástrico e intestinal y su estabilidad durante el almacenamiento de 4 a 22°C. Cuando el microorganismo fue expuesto a fluido gástrico pH=2 por 1 h solo en esferas de alginato, el microorganismo no sobrevivió. En contraste, se obtuvo un alto grado de supervivencia cuando las cápsulas de fueron recubiertas con quitosán. Ellos concluyeron que la microencapsulación de LAB con alginato recubiertas de quitosán es efectiva para la liberación bacterias en el colon y manteniéndose su supervivencia durante su almacenamiento en refrigeración.

Haciendo una comparación de los estudios ya realizados con este trabajo se confirma que la combinación quitosán-alginato logra una cápsula más estable y resistente, sobre todo cuando estas esferas contienen iones de calcio. También se puede observar que se obtuvo una supervivencia (4×10^2 UFC/ml) en la concentración quitosán 1% quitosán y alginato 2%-CaCl₂ 0.05M; y 1×10^2 UFC/ml en la concentración de quitosán al 1.5% y alginato 2% del *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*. En la concentración de 2% quitosán, 2% alginato y 0.05M de CaCl₂ ya no hubo supervivencia. De esto se desprende que a mayor concentración del Quitosán y alginato la esfera es más estable pero quizá no permite el paso adecuado de nutrientes ni la salida de los desechos de los microorganismos. También es importante especificar el peso molecular del Quitosán, ya que cuanto mayor sea su peso mayor viscosidad presenta y las soluciones no pueden manejarse cuando son de alto peso molecular y alta concentración como 2% de quitosán.

El quitosán en un pH ácido se comporta como un polícatión lo que le confiere una actividad antibacteriana de acuerdo con Skjak-Braek et.al (1989), pero una vez formada la esfera con el alginato, estas cargas positivas del polícatión se pierden y así mismo se pierde también la actividad antibacteriana, lo cual permite sobrevivencia del *L. delbrueckii spp. bulgaricus*, ya que las esferas no tienen esa propiedad antibacteriana sino solo de protección. En el medio ácido del estómago podría haberse deshecho las esferas si solo se hubiera tratado de Quitosán, sin embargo al estar polimerizadas con el alginato esto no permite su disolución. Además la adición del cloruro de calcio confirió una cierta dureza a las esferas al polimerizar así mismo al alginato. La protección que le confiere la esfera a los *L. delbrueckii spp. bulgaricus* se vio reflejada al tener una población viable hasta su llegada al intestino, aunque no fue la esperada debido a la falta de nutrientes (prebióticos) que estimularán el crecimiento y mantuvieran vivos a los microorganismos hasta su llegada al intestino.

Comparando estos resultados con estudios realizados con las bacterias probióticas en forma libre en la cual no hay supervivencia, se puede observar que la esfera confiere protección al microorganismo, cabe señalar que el microorganismo utilizado en este estudio es altamente sensible.

3. CONCLUSIÓN

Se obtuvo formación de esferas para las concentraciones de quitosán al 1%, 1.5% y 2% en combinación con alginato al 2% y CaCl_2 al 0.05M. Las cuales fueron sometidas a condiciones gástricas e intestinales “*In Vitro*”.

Se comportaron satisfactoriamente durante su paso por las condiciones de simulación gástrica manteniéndose íntegras al término de 1 h las esferas se suavizaron un poco, y en su paso por las simulación intestinal, al término de 1 hora las esferas se fragmentaron de manera que el contenido se pudiera liberar en este sitio.

La combinación de los polímeros quitosán – alginato auxiliado con los iones de calcio da mayor estabilidad a la cápsula formada debido a que como material encapsulante soporta el rigor físico y químico de los fluidos gastrointestinales, sin embargo, el microorganismo utilizado es altamente sensible y para futuros estudios se tendría que agregar un sustrato (prebiótico) a las soluciones para estimular su crecimiento como lo hizo en su estudio Chen et. al (2006) y lograr que llegué en el numero deseado para poder influir sobre la flora intestinal del huésped. También se puede considerar aumentar la concentración inicial de células para tener al final de la simulación mayor supervivencia de células y así poder alcanzar los beneficios de salud con el consumo mínimo requerido de 10^7 células /ml.

Las esferas que se obtuvieron las cuales soportaron los rigores físicos y químicos del tracto gastrointestinal, podrían probarse para liberar otro tipo de microorganismos ya sea *Lactobacillus* del género *Casei*, *Acidophilus* etc, y/o *bifidobacterias*. Ya que con estas concentraciones de esferas se consiguió una mayor protección del microorganismo *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*, siendo un microorganismo altamente sensible en comparación a otros probióticos.

Por medio de la esferas se consiguió sobrevivencia del *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* en comparación; a una exposición del microorganismo en condiciones de gastrointestinales en forma libre, donde varios autores reportan que no sobreviven a estas condiciones por su alta sensibilidad.

REFERENCIAS

- Anal A K., Singh H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Tecnology*, 1,1-12.
- Anal A K., & Stevens W F. (2005). Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of pharmaceutics*, 290, 45-54.
- Chandramouli V., Kailasapathy K., Peiris P., & Jones M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27-35.
- Chen K., Chen M., Liu JR., Lin C., & Chiu H. (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70, 260-266.
- Chen K., Chen M., Lin C. (2006). Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verifications (R1). *Journal of Food Engineering*, 76, 313-320.
- Cui J H., Goh J S., Kim P H., Choi S H., & Lee B J. (2001). Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. *International Journal Of Pharmaceutics*, 210, 51-59
- Goseen M. (1997) Chitin and Chitosan Applications, Technomic publishing company , USA 3- 22.
- Gäserød O. Sannes A., Skjåk-Braek G. (1999). Microcapsules of alginate-chitosan.II. A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials*, 19, 1815-1825.
- Hansen L T., Allan-Wotjas P M., Jin Y L., & Paulson A T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35-45.
- Hurdzan CM., Basta NT., Hatcher PG., Tuovinen OH (2008). Phenanthrene release from natural organic matter surrogates under simulated human gastrointestinal conditions. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*, 69, 525-530.
- Kailasapathy K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT*, 39, 1221-1227.
- Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivality of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 737-743.

Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT*, 39, 177-183.

Larez V. (2003). Algunos usos del quitosán en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 4(2), 91-109

Lee J S., Cha D S., & Park H J. (2004). Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673nin chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7300-7305.

Martinez R. (2005). Probióticos en leches fermentadas. Tesis de Licenciatura (Ingeniero en Alimentos).UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.

Mazza G. (2000) *Alimentos Funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesado*. Acribia S.A Zaragoza (España).

Miranda Castro S.P. (2002). Proceso de extracción de quitina a partir de caparazones y su conversión a quitosán. Patente en trámite. Instituto Mexicano de la propiedad industrial en México. Número de expediente 005444. Número de folio 1175930-5

Murakami R., Takashima R. (2003). Mechanical properties of the capsules of chitosan-soy globulin polyelectrolyte complex. *Food Hydrocolloids*, 17, 885-888.

Peral I. y Garzia I. Elementos valiosos en los residuos de industrias transformadoras de productos de la pesca: Quitina-Quitosan y sus aplicaciones. *Los residuos*, pag 58.

Salminen S. Isolauri E. (2006.) Intestinal Colonization, Microbiota, and Probiotics. *J Pediatr*; 149:S115-S120

Sheu T Y., Marshall R T., & Heymann H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapped. *Journal of Dairy Science*, 76, 1902-1907.

Skjak-Braek, Thorleit A, Sandford P.(1989). Chitin and Chitosan; sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. *London Elsevier Applied Science*. Ed by Gudmund.

Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P., Kailasaphaty K. (2000). Encapsulation of probiotics bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47-55.

Ortega RM, et.al. (2002). *Alimentos Funcionales. Probióticos*. Médica Panamericana. Madrid.

Peniche C., Howland I., Carrillo O. Záldivar C., Arguelles-Monal W. (2004). Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. *Food Hydrocolloids*, 18, 865-871.

Prakash S., Jones M.L. (2005) Artificial cell therapy: New strategies for the therapeutic delivery of live bacteria. *Journal of Biomedical Biotechnology*, 1, 44-56.

Vries MC, Vaughan E, Kleerebezem M, De Vos WM. (2006) *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*. 16,1018-1028.

www.difcomanual.com

www.monografias.com

www.profesor-enlinea.cl

www.sistemadigestivo.com