



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**DESARROLLO DE UNA BEBIDA FUNCIONAL ADICIONADA
CON *Lactobacillus casei* Y UN ANTIOXIDANTE NATURAL
(JUGO DE GRANADA)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:
LIZBETH AURORA LÓPEZ PÉREZ**

**ASESORA: I.Q. GUADALUPE FRANCO RODRÍGUEZ
COASESORA: DRA. CLARA INÉS ÁLVAREZ MANRIQUE**



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.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
CAPITULO I MARCO TEÓRICO	
1. GENERALIDADES	11
1.1. Alimento funcional	11
1.1.1. Probióticos	12
1.2. Bebidas	21
1.2.1. Tipos de bebidas	22
1.3. Encapsulación de <i>Lactobacillus</i>	23
1.3.1. Métodos de microencapsulación	24
1.3.2. Coberturas utilizadas en microencapsulación	29
1.4. Esferificación	31
1.5. Edulcorantes	32
1.6. Saborizantes	33
1.6.1. Potenciadores de sabor	34
1.7. Antioxidantes	35
1.7.1. Naturales	36
1.1.1. Granada	41
CAPÍTULO II METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL	
2. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL	47
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	



3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Estudio de mercado.	49
3.2. Aislamiento del lactobacilo	49
3.3. Obtención de la masa celular de <i>Lactobacillus</i> .	50
3.4. Encapsulación.	53
3.5. Cuantificación de <i>Lactobacillus</i> encapsulados.	53
3.6. Perfil de textura de las cápsulas.	56
3.7. Estabilidad.	56
3.8. Elaboración de la bebida	57
3.9. Evaluación sensorial.	57
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1. Estudio de mercado.	59
4.2. Identificación de <i>Lactobacillus</i> .	61
4.3. Cuantificación de <i>Lactobacillus</i> encapsulado.	64
4.4. Análisis de perfil de textura.	66
4.5. Estabilidad.	69
4.6. Evaluación sensorial.	70
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXOS	83



ANEXO I. ENCUESTA PARA ESTUDIO DE MERCADO	84
ANEXO II. ENCUESTA PARA EVALUACIÓN SENSORIAL	85
ANEXO III. TÉCNICA DE TINCIÓN DE GRAM	86
ANEXO IV. TABLA DE PRUEBA DE BASKER Y KRAMER “VALOR CRÍTICO DE DIFERENCIA ENTRE SUMA DE CATEGORÍAS”	87



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Materiales empleados en la encapsulación	30
Tabla 2. Algunos de los potenciadores de sabor que se admiten como aditivos en la Unión Europea.	37
Tabla 3. Partes de la granada y sus constituyentes característicos.	42
Tabla 4. Antioxidantes y sus alimentos de origen	43
Tabla 5. Composición nutricional de 100g de granada (fruta fresca)	45
Tabla 6. Composición de Agar Rogosa	49
Tabla 7. Formulación de bebida funcional	57
Tabla 8. Formulaciones manejadas para la elaboración de una bebida funcional	57
Tabla 9. Resultados de pruebas bioquímicas	63
Tabla 10. Cápsulas necesarias en cada lote para ser considerado funcional	65
Tabla 11. Datos obtenidos de textura de las cápsulas	67
Tabla 12. Resultados obtenidos de la prueba de estabilidad	69
Tabla 14. Análisis de datos de una prueba de categorías de preferencia usando la Prueba de Kramer	72



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología del <i>Lactobacillus</i> .	17
Figura 2. <i>Lactobacillus casei</i> Shirota.	20
Figura 3. Formación del gel de alginato cálcico.	20
Figura 4. Edulcorantes naturales a) lactosa, b) esteviósido, c) sorbitol, d) xilitol.	32
Figura 5. Edulcorantes artificiales a) sacarina, b) acesulfame K, c) aspartamo.	33
Figura 6. Estructura química del ácido ascórbico.	38
Figura 7. Estructura química de la vitamina E.	39
Figura 8. Estructura química del retinol.	40
Figura 9. Estructura química de la 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona), esqueleto de los flavonoides.	40
Figura 10. Estructuras químicas de la a) punicalagina y b) punicalina.	42
Figura 11. Agar Rogosa.	49
Figura 12. Crecimiento del <i>Lactobacillus</i> en Agar Rogosa.	50
Figura 13. Diagrama de obtención de masa celular de <i>Lactobacillus</i> .	51
Figura 14. Crecimiento de Lactobacilo en caldo Rogosa.	52
Figura 15. Distribución de los botes para la centrifuga.	52
Figura 16. Sedimento formado por el Lactobacilo centrifugado.	53
Figura 17. Tubos con SSF estéril.	53
Figura 18. Diagrama del proceso de encapsulación .	54
Figura 19. Maceración de las cápsulas con <i>Lactobacilus</i> .	55
Figura 20. Agitador Vortex.	55
Figura 21. Micropipeta de 500µl, siembra de diluciones en Agar Rogosa.	56
Figura 22. Porcentaje de consumidores encuestados según el género.	60
Figura 23. Preferencias del consumidor.	60
Figura 24. Resultado de las pruebas bioquímicas para la identificación primaria de <i>Lactobacillus</i> (de izq. a der. Arabinosa, Galactosa, Maltosa, Manitol, Melecitosa, Melibiosa, Rafinosa, Salicín, Sorbitol, Trehalosa, Glucosa).	62
Figura 25. Resultado de la prueba OF para identificación primaria de <i>Lactobacillus</i> (izq. original).	62



Figura 26. Agar Rogosa para la cuantificación.	64
Figura 27. Conteo de colonias.	64
Figura 28. Medias de los resultados obtenidos de la prueba de estabilidad.	70
Figura 29. Formulaciones de la muestra 538 usada para la elaboración de una bebida funcional.	71
Figura 30. Formulaciones de la muestra 927 usada para la elaboración de una bebida funcional.	71
Figura 31. Formulaciones de la muestra 492 usada para la elaboración de una bebida funcional.	71
Figura 32. Datos obtenidos de la evaluación sensorial.	73



Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo la elaboración de una bebida adicionada con *Lactobacillus casei* y jugo de granada como antioxidante. Para tal objetivo se formuló una bebida con un 5% de cápsulas con *lactobacillus casei* en una concentración de 10^6 (que es lo requerido para que la bebida sea considerada probiótica), el cual aislado e identificado a partir de un producto comercial.

Para la preparación de las cápsulas se utilizaron alginato de sodio en una concentración del 1.5% y xantana al 0.1% (Ko, *el. al.*, 2008) usando como medio de dispersión jugo de granada, se dejaron caer gotas de la dispersión en una solución de cloruro de calcio al 2% teniendo un tiempo de inmersión de 2 minutos. Se aplicaron pruebas de estabilidad y análisis de perfil de textura (TPA). Esto para ver la influencia que tiene el lactobacilo en la formación de geles.

Para el caso de las cápsulas que no contenían lactobacilos se tuvieron valores de dureza mayores al compararlas con las cápsulas que si lo contenían, de igual manera en los datos de cohesividad y masticabilidad. Teniendo como resultado cápsulas más estables las que no tenían lactobacilos.

En cuanto a la evaluación sensorial se hizo uso de una prueba no paramétrica para el análisis de los resultados ya que estas pruebas nos dan como resultado el nivel de preferencia de un producto sobre otro utilizando diferentes formulaciones.



Introducción

En los últimos tiempos ha surgido una gran preocupación por parte de los consumidores, de ingerir alimentos que, además de ser agradables al paladar, sean benéficos para la salud (Villavicencio, 2006).

A fines de la década de los 80, apareció un nuevo concepto en alimentos, definido como *alimentos funcionales*, los cuales además del aporte nutritivo entregado, causan un efecto positivo sobre la salud. Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos. Este último grupo, corresponde la introducción de microorganismos vivos que adicionados a un alimento, en concentraciones óptimas, ejercen un efecto benéfico sobre la salud humana. Bacterias probióticas como el *Lactobacillus casei* Shirota, han sido aplicados en la industria alimentaria durante bastante tiempo, mayoritariamente en productos lácteos, existiendo poca variedad de otros productos, que se utilicen como vehículo para estos microorganismos (Villavicencio, 2006).

El jugo de granada, ha sido intensamente investigado durante los últimos años, estudios realizados en la Universidad de Haifa (Israel) han descubierto que el zumo de Granada es el producto natural con más antioxidantes, contiene hasta tres veces más que el té verde y el vino tinto, esto es debido sobre todo a la acción de los polifenoles, el ácido elágico y los taninos hidrolizables. Y contiene un elevado contenido en Vitamina C, la cual contribuye enormemente a incrementar su valor añadido como producto altamente benéfico para la salud. Es un potente antioxidante anticancerígeno, destaca la prevención del cáncer de próstata, disminuye los riesgos cardiovasculares, ayuda a los diabéticos e hipertensos (Andreu-Sevilla, 2001).

Actualmente, no se han desarrollado productos que combinen probióticos y jugo de granada, por lo que la finalidad de este estudio, dado las características benéficas que estos poseen sobre el organismo, será desarrollar un producto que conjunte los beneficios de ambos.



CAPITULO I

MARCO TEÓRICO



1. Generalidades

1.1. Alimento funcional

Se entiende usualmente bajo esta denominación a cualquier alimento o ingrediente potencialmente saludable que pueda proveer beneficios a la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene. Diversas instituciones a nivel internacional han elaborado su propia definición sobre los alimentos funcionales, y existen aún controversias sobre qué es y que no es un alimento funcional; incluso la American Dietetic Association señala que todos los alimentos podrían considerarse como *alimentos funcionales* según el estado fisiológico (ADA, 2004). En este trabajo se utilizará la definición propuesta por el International Food Information Council (IFIC, 2002) que define a los alimentos funcionales como “*aquellos alimentos que proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica*”.

En consonancia con esta definición, podemos contar a las frutas y vegetales como una de las formas más simples de alimentos funcionales. La zanahoria por ejemplo debe ser considerada un alimento funcional ya que posee altas concentraciones de beta-carotenos. A pesar de que el Código Alimentario Argentino (CAA, 2002) no ha definido a los alimentos funcionales, hace mención a los alimentos modificados, enriquecidos y fortificados, que también podemos incluir dentro de los alimentos funcionales.

El concepto de alimento funcional como lo entendemos actualmente, emerge en Japón recién en 1984, a causa de la mayor preocupación de la población por las enfermedades relacionadas con el estilo de vida. En 1991, el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón es el primero en establecer una política que permitía legalmente la comercialización de alimentos funcionales bajo el nombre de “alimentos para usos de salud específicos” (FOSHU) (Arai, 2001).



1.1.1. Probióticos

1.1.1.1. Historia y definición

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos benéficos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles" (Metchnikoff, 1907).

Por entonces el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos (Tissier, 1906).

Sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana. Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, aun cuando la palabra "probiótico" no se acuñó hasta 1960, para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965). Fuller (1989), con objeto de recalcar el carácter microbiano de los probióticos, definió de nuevo el término como "un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta benéficamente al huésped mejorando su equilibrio intestinal". Havenaar y Huis in 't Veld (1992) propusieron una definición muy similar: "un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta benéficamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona".



Una definición más reciente, aunque probablemente no será la última, es la siguiente: "microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables " (Guarner y Schaafsma, 1998).

Es evidente que estas definiciones:

- 1) han circunscrito la utilización del término probiótico a los productos que contienen microorganismos vivos
- 2) indican la necesidad de proporcionar una dosis apropiada de bacterias probióticas para obtener los efectos deseados

Las observaciones de Metchnikoff (1907) y Tissier (1906) resultaron tan atractivas que, inmediatamente después, sus obras científicas fueron objeto de explotación comercial. Lamentablemente, los resultados no siempre fueron positivos y la mayoría de esas observaciones tuvieron un carácter anecdótico. Por consiguiente se consideró que el concepto de probiótico no estaba demostrado científicamente y durante decenios recibió escasa atención, aparte de algunas investigaciones sobre piensos encaminadas a encontrar sucedáneos saludables para los agentes promotores del crecimiento. Sin embargo, en los 20 últimos años la investigación sobre los probióticos ha progresado considerablemente y se han realizado avances notables en la selección y caracterización de cultivos de probióticos concretos y la justificación de las declaraciones de propiedades saludables en relación con su consumo (FAO/OMS, 2001).

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos probióticos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor. Para comprender la importancia del concepto de alimento probiótico para la salud humana son necesarias algunas consideraciones ecológicas acerca de la flora intestinal.



Las bacterias viven normalmente en el cuerpo humano (así como en el de los animales superiores y los insectos), incluido el aparato digestivo, donde existen más de 400 especies bacterianas (Tannock, 1999): más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano. El estómago contiene normalmente pocas bacterias (10^3 unidades formadoras de colonias por ml de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10^{12} bacterias/g. La colonización bacteriana del intestino comienza con el nacimiento, ya que los recién nacidos permanecen en un medio estéril hasta que comienza el parto, y continúa durante toda la vida, con cambios notables en función de la edad (Mitsuoka, 1992). Las bacterias, que forman la denominada microflora intestinal residente, no suelen tener efectos nocivos agudos, y se ha demostrado que algunas de ellas son necesarias para mantener el bienestar de su huésped.

Cabe citar como ejemplo de la función benéfica de la microflora intestinal lo que se ha denominado la "resistencia a la colonización" o "efecto de barrera" (van der Waaij *et al.*, 1971; Vollaard y Clasener, 1994), en referencia al mecanismo que utilizan las bacterias ya presentes en el intestino para mantener su presencia en ese medio y evitar la colonización de esas mismas zonas intestinales por microorganismos ingeridos recientemente, incluidos patógenos. Por consiguiente, cabe suponer que la manipulación alimentaria de la microflora intestinal con objeto de aumentar el número relativo de "bacterias beneficiosas" podría contribuir al bienestar del huésped. Ésta fue también la hipótesis original de Metchnikoff, quien, no obstante, advirtió:

"Deberían realizarse investigaciones sistemáticas sobre la relación de los microbios intestinales con la senilidad precoz, y sobre la influencia de los

regímenes alimenticios que impiden la putrefacción intestinal, prolongando la vida y manteniendo la fuerza del organismo."

1.1.1.2. Características de un alimento probiótico

Los requisitos que deben cumplir los alimentos probióticos son:

- Sinergismo entre los cultivos de microorganismos y los iniciadores de la fermentación (fermentos, cultivos iniciadores), para obtener un producto fermentado con óptimas características sensoriales.
- Los microorganismos probióticos deben permanecer viables y activos en el alimento y durante el tránsito gastrointestinal, para garantizar su potencial efecto benéfico en el huésped. En este aspecto, son importantes el pH derivado del proceso de fermentación, el oxígeno disuelto (especialmente para las bifidobacterias), el antagonismo entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración de azúcares, las prácticas de inoculación del cultivo probiótico, la temperatura y duración de la fermentación, y las condiciones de almacenamiento del producto (Taranto, 2005).

Según Nava (2008) un probiótico debe reunir las siguientes características:

- La seguridad biológica, no deben causar infecciones de órganos o de sistemas.
- La capacidad de ser toleradas por el sistema inmunitario del organismo huésped, por lo tanto, deben ser preferiblemente de procedencia intestinal.
- La capacidad de resistir la acción de los ácidos gástricos y de las sales biliares para llegar vivas en grandes cantidades al intestino.
- La capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y de colonizar el segmento gastrointestinal.
- La sinergia con la microflora endógena normal del intestino
- El efecto barrera, este término define la capacidad de producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio de la mucosa intestinal.



1.1.1.3. Tipos

1.1.1.3.1. Naturales

Se encuentran en lácteos fermentados, como yogurt, leche y quesos, vegetales fermentados, como aceitunas y chucrut, soya, cereales, carnes y pescados fermentados y bebidas alcohólicas artesanales. El problema de los probióticos naturales es que es difícil usarlos en condiciones terapéuticas y entornos médicos, porque la mayoría de ellos necesita de condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas y tienen una vida media, en buenas condiciones, limitada. Sin embargo, la principal limitante para su uso es que la cantidad de microorganismos que contienen es tan baja que habría que tomar varios litros de yogurt cada día, por ejemplo, para obtener algún efecto terapéutico. Entonces, estos productos pueden ser parte de una alimentación sana, pero no tienen eficacia terapéutica (Mennickent y Green, 2009).

1.1.1.3.2. Comercializados

Son los probióticos naturales pero incorporados en algún producto alimenticio, por ejemplo yogurt en formato comercial, obtenido a partir de diferentes cepas de microorganismos, y algunas leches maternizadas (Mennickent y Green, 2009).

1.1.1.3.3. Suplementos alimenticios

Se trata de suplementos dietarios que contienen probióticos en forma de cápsulas o en polvo. No es un medicamento y su distribución se rige por la legislación de los alimentos (Mennickent y Green, 2009).

1.1.1.4. *Lactobacillus*

1.1.1.4.1. Características generales del género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos (Figura 1), aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-



bacilos coryneformes (Kandler y Weiss, 1986); lo cual hace que se puedan confundir con géneros aislados habitualmente de materiales clínicos (Marin, *et al.*, 1993). Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no mótiles, pero cuando tienen motividad es por la presencia de flagelos. Son Gram positivos y sólo las células muertas o envejecidas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram.

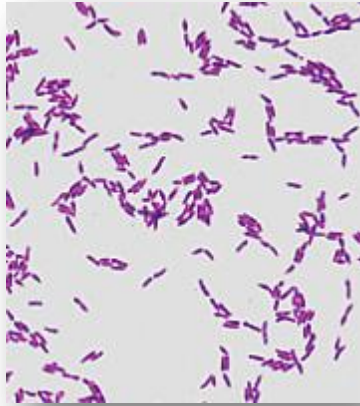


Figura 1. Morfología del *Lactobacillus* (Fuente: Frazier, 2000)

Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno.

El género *Lactobacillus* está distribuido en varios nichos ecológicos a través del tracto gastrointestinal y genital y constituye una fracción importante de la microflora nativa del hombre. Estos microorganismos son raramente asociados con casos de infección gastrointestinal y extraintestinal, y las cepas empleadas tecnológicamente son consideradas como no patógenas (Gomes y Malcata, 1999).

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza.

Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas intracelulares (Law y Kolstad, 1983; citados por Bergey, 1992).

Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Tampoco producen indol ni sulfídrico (H_2S). Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas; presentan una reacción benzidinanequivativa (Bergey, 1992).

Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta aminas en el queso (Law y Kolstad, 1983; citados por Bergey, 1992).

Los lactobacilos tienen requerimientos para su crecimiento las siguientes condiciones:

pH. Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Bergey, 1992).



Necesidades de oxígeno. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Bergey, 1992).

Temperatura de crecimiento. La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados).

Los llamados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C. Aún no se conocen los verdaderos lactobacilos termófilos que crezcan por encima de 55°C (Bergey, 1992).

1.1.1.4.2. Características generales del *Lactobacillus casei* Shirota (LcS)

Es una bacteria láctica, utilizada como cultivo indicador para la obtención de bebidas funcionales (Yokokura *et. al.*, 1999). Se consideraba probiótico, originalmente aislado de heces del intestino humano y es ampliamente utilizado como cultivo indicador para la obtención de productos lácteos fermentados considerados alimentos funcionales ya que contienen probióticos, se considera que es capaz de activar la respuesta inmune del huésped, destacando su actividad antitumoral y protección contra infecciones (Matsuzaki, *et. al.*, 1998; Kato, *et. al.*, 1988; Miake, *et. al.*, 1985).



En el sistema de clasificación tradicional LcS es una bacteria Gram (+) que pertenece al género *Streptobacterium*, que incluye organismos homofermentativos que pueden crecer a 15°C con un máximo de 41°C. Su contenido de G + C es de 45-47% y produce ácido L-láctico como principal producto metabólico a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa y maltosa. Produce además vitaminas B1, B2, B6, B12. El patrón de utilización de carbohidratos por esta cepa es similar al observado en otras cepas de *Lactobacillus casei*. Su capacidad de utilizar la lactosa está controlada por un plásmido (Takeshi, 2000).

El LcS posee un tamaño promedio de bacilo. Cada célula posee de 1 a 2.5 µm de longitud y tiene diámetro de cerca de 0.5 µm. en general el tamaño de las bacterias cambia ligeramente durante el cultivo (Figura 2). En el caso del LcS, células más grandes que 4 µm algunas aparecen en la última etapa del cultivo, cuando la división termina (Amako, 1983).



Figura 2. *Lactobacillus casei* Shirota (Fuente: Yakult.com, 2011)

Se ha comprobado que este microorganismo tiene influencia sobre un tipo de cáncer de vejiga, que es caracterizado por una alta incidencia y recurrencia en mujeres. El consumo de LcS ha mostrado una reducción en este tipo de cáncer. El posible mecanismo de acción, es una reducción en la actividad mutagénica urinaria, aunque también puede jugar un rol, la modulación del sistema inmune según Hayatzu *et al.*, 1993; Aso *et al.*, 1995 y Ohashi, *et al.*, 2002, citado por Ouwehand *et al.*, 2003. Por su parte, Aso *et al.*, 1995,



Salminen *et al.*, 1998, Tanaka y Ohwaki, 1994 citado por Fonden *et al.*, 2000, reportan efectos benéficos de LcS sobre la prevención de disturbios intestinales, balance en la microflora intestinal y efectos positivos sobre el cáncer femenino de vejiga.

Se han realizado estudios en los cuales se analizó la cantidad de LcS en la materia fecal de individuos que bebieron 125 ml de leche fermentada conteniendo 10^{10} LcS vivas durante 3 días. La cantidad promedio encontrada fue aproximadamente de 10^7 bacterias vivas por gramo de heces, indicando que estos LcS sobrevivieron el tránsito a través del tracto gastrointestinal luego de la ingestión de la leche fermentada. (Spanhaak *et al.*, 1998).

Un estudio realizado en la Argentina concluye que el consumo diario de 160ml de leche fermentada con LcS disminuye en un 16,7% la colesterolemia (presencia de colesterol en la sangre) en pacientes hipercolesterolémicos en 28 días. De la población estudiada, el 17% sufrió leves efectos digestivos adversos siendo su período de recuperación no superior a 2 días. (Fonden *et al.*, 2000).

Después de realizar estudios, del comportamiento de *L. casei* frente al pH del estómago se encontraron que la cepa permanece viable en un rango de pH de 3.0 a 7.0 logrando sobrevivir por el tránsito a través del estómago cuando se ingiere con alimentos o productos lácteos, lo cual aumenta por sobre 3 el valor de pH.

1.2. Bebidas

Según la NOM-051 se define una bebida no alcohólica como cualquier líquido natural o transformado, destinado al consumo humano, que proporciona al organismo elementos para su nutrición por vía oral y que no contiene más del 0,5 por ciento en volumen de alcohol etílico.



Entre los alimentos funcionales se encuentran las bebidas funcionales, a base de jugos de frutas ya que afectan beneficios a la salud por encima de los valores nutritivos simples atribuidos al producto convencional, como pueden ser los jugos de frutas, actualmente existen en el mercado bebidas para deportistas (con sales y minerales, isotónicas, fibra y soya) y enriquecidas (vitaminas, oligosacáridos, betacaroteno, etc.) para disminuir el nivel de colesterol en la sangre y prevenir enfermedades del colon (Davidson, *et. al.*, 1998).

Las bebidas se modernizan en respuesta a la demanda de los consumidores. Hoy en día el consumidor se preocupa más por llevar una vida sana. Por ello se ha vuelto más crítico y exige bebidas con un mejor sabor y más saludables. Además, los consumidores de hoy tienen menos tiempo disponible y buscan comprar productos que les ofrezcan soluciones. Las tendencias del mercado están basadas en conceptos tales como bienestar, conveniencia, protección de la salud e innovación. Los consumidores están dispuestos a probar cosas nuevas. Por supuesto siempre, lo más importante es que tengan un sabor agradable (Rivera, 2008).

1.2.1. Tipos de bebidas

1.2.1.1. Bebidas con fibras

Las numerosas pruebas realizadas han demostrado claramente que la fibra favorece una digestión más rápida y eficaz, y que además, optimiza la eliminación de las grasas ingeridas (Beristaín, 2006).

1.2.1.2. Bebidas enriquecidas

Enriquecida con las vitaminas A, C y E creando una auténtica barrera vitamínica. Refuerza el sistema inmunológico y estimula el crecimiento. Son consideradas bebidas contra el stress oxidativo dado que las sustancias antioxidantes funcionan como una barrera frente al efecto nocivo de los radicales libres sobre el ADN (los genes), las proteínas y los lípidos de nuestro cuerpo (Contreras, 2011).



1.2.1.3. Bebidas energéticas

El concepto de productos energéticos está basado en la cafeína como estimulador de cuerpo y mente. Otros ingredientes innovadores en esta área son el té verde, extracto de yerba mate, revitalizantes como vitamina C y extractos como guaraná, nuez cola, etc (Contreras, 2011).

1.2.1.4. Bebidas isotónicas

El empleo de una bebida que contenga disueltas las sales minerales que se pierden durante el ejercicio será benéfica para mejorar el rendimiento deportivo. La ventaja de este tipo de preparados es la reposición rápida de los electrolitos perdidos (Rivera, 2008).

1.2.1.5. Bebidas funcionales

Las bebidas funcionales son productos que poseen componentes fisiológicos que complementan su aporte nutricional y que representan un beneficio extra para la salud de las personas, como por ejemplo en el metabolismo del colesterol, la mineralización ósea y la reducción de riesgos de enfermedad (Makymat, 2010).

Dentro de los ingredientes que pueden ayudar en este beneficio, tenemos al lactato de calcio. Prácticamente todo tipo de bebidas, como el agua mineral, leche de soya, bebidas energéticas, néctares o jugos, ya tienen una línea de productos fortificados con calcio, como un valor agregado del producto (Rivera, 2008).

1.3. Encapsulación de *Lactobacillus*

Si tenemos en cuenta que los probióticos son principalmente consumidos por vía oral, es lógico pensar, que sus efectos beneficiosos se pondrán de manifiesto, fundamentalmente, en patologías intestinales. Sin embargo, la posibilidad de modular



la respuesta inmune de tipo sistémica, hace que los probióticos también presenten efectos positivos en otras alteraciones extraintestinales, como alergias y vaginitis (Arribas *et al.*, 2008).

No obstante, el problema que se presenta a la hora de incorporar probióticos a cualquier formulación, es la escasa resistencia de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, el oxígeno o la temperatura (Ruíz, 2009).

Por todo esto, es necesario que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Para ello, recurrimos a las técnicas de microencapsulación, que consisten en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica (Ruíz, 2009).

La microencapsulación protege a los materiales encapsulados de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos y como barrera contra malos olores y sabores. Ayuda, además, a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia (Ruíz, 2009).

La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del coste (Ruíz, 2009).

1.3.1. Métodos de microencapsulación

Existen diversos métodos para la producción de microcápsulas. En general, estos métodos se pueden dividir en tres grupos:



1.3.1.1. Procesos físicos

1.3.1.1.1. Secado por aspersión

Es la transformación de un fluido en material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente. La distribución del tamaño de las partículas obtenidas por este método es, en general, menor a 100 μ . Se distinguen los siguientes pasos:

1. La preparación de la emulsión o suspensión del material a encapsular en una solución encapsuladora.
2. La atomización y la deshidratación de las partículas atomizadas.

Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto. (Pedroza, 2002)

1.3.1.2. Procesos químicos

1.3.1.2.1. Polimerización interfacial

En este proceso se produce la polimerización de un monómero en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana, que dará lugar a la pared de la microcápsulas. Este proceso tiene lugar en tres pasos:

1. Dispersión de una solución acuosa de un reactante soluble en agua, en una fase orgánica para producir una emulsión agua en aceite
2. Formación de una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua, iniciada por la adición de un complejo soluble en aceite a la emulsión anterior.
3. Separación de las microcápsulas de la fase orgánica y su transferencia en agua para dar una suspensión acuosa. La separación de las microcápsulas se puede llevar a cabo por centrifugación (Yáñez, 2002).



1.3.1.2.2. Incompatibilidad polimérica

En este método se utiliza el fenómeno de separación de fases, en una mezcla de dos polímeros químicamente diferentes e incompatibles en un mismo solvente. El material a encapsular interaccionará solo con uno de los dos polímeros, el cual se adsorbe en la superficie del material a encapsular formando una película que los engloba. De manera general, este proceso se lleva a cabo en solventes orgánicos y cuando el material a encapsular es sólido (Yáñez, 2002).

1.3.1.3. Procesos fisicoquímicos

1.3.1.3.1. Coacervación

Es un método físico-químico que se basa en la separación de fases, consiste en tres pasos:

1. Formación de un sistema de tres fases químicamente inmiscibles (una fase líquida o fase continua, un material a recubrir y un material de cobertura o de pared)
2. Deposición del material polimérico líquido que formará la cubierta sobre el material a cubrir
3. Solidificación de la cubierta.

Con esta técnica, se pueden obtener microcápsulas esféricas muy pequeñas, de hasta de 4 μm y con una carga de material a encapsular de alrededor del 90%. Además, proporcionan una buena protección contra las pérdidas por volatilización y contra la oxidación (Yáñez, 2002).

1.3.1.3.2. Liposomas

Los liposomas son partículas microscópicas hechas de lípidos y agua principalmente. Son estructuras compuestas de una bicapa de lípidos que



engloban un volumen acuoso. Se elaboran con moléculas anfifílicas que poseen sitios hidrofóbicos, por ejemplo, fosfolípidos como la lecitina. En la fase acuosa, se coloca en material a encapsular cuando es hidrofílico o bien se agrega en el solvente orgánico donde se disuelven los fosfolípidos, si es lipofílico (Yáñez).

1.3.1.3.3. Gelificación iónica

Existen dos técnicas de gelificación (Rodríguez, 2003):

Gelificación externa:

En la gelificación externa, la sal de calcio soluble es agregada en el seno de una emulsión A/O. El tamaño de partícula no puede ser bien controlado y las partículas tienden a coagular en grandes masas antes de adquirir la consistencia apropiada. Además, el tamaño de partícula que se obtiene es grande, entre 400µm y 1mm (Liu, 2007).

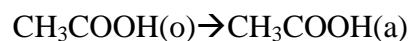
Gelificación interna:

La gelificación interna se basa en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio. Esto se lleva a cabo por acidificación de un sistema aceite-ácido soluble, con participación en la fase acuosa del alginato. Esta técnica permite obtener partículas de un tamaño de aproximadamente 50 µm (Liu, 2007).

De acuerdo con esta técnica, a la fase acuosa, generalmente formada por alginato y carbonato cálcico, se le adiciona la fase oleosa (aceite vegetal, Span 80 y ácido acético).

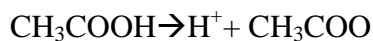
Las reacciones que se producen son las siguientes:

1. Difusión del ácido acético desde la fase oleosa a la acuosa.



2. El hidrogenión es liberado del ácido acético a la fase acuosa





3. El calcio es liberado por la reacción entre el hidrogenión y la sal insoluble de calcio.

4. El gel de alginato se forma gradualmente a través de la reacción entre el calcio y los residuos de los ácidos glucurónicos de la cadena, formándose la estructura que se conoce como “egg-box” (Figura 3) en la que, metafóricamente, los huevos serían los iones de calcio (Xiu-dong, 2007).

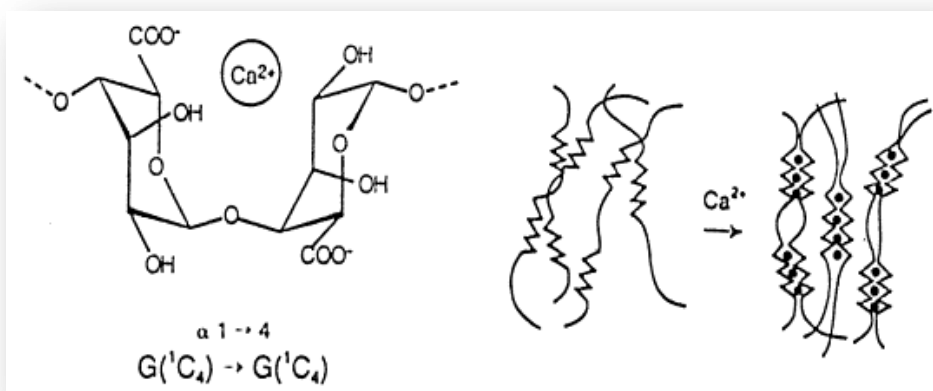
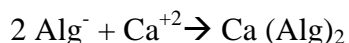


Figura 3. Formación del gel de alginato cálcico (*Fuente: Stortz, 1997*)

El gel de alginato cálcico formado es permeable a moléculas solubles en agua, cuyos pesos moleculares sean menores a 5000 dalton. Moléculas mayores también pueden difundir a través del gel, pero si el peso molecular excede los 10.000 dalton, la difusión no ocurre. La excepción a esto, la constituyen los lípidos, que permanecen en la matriz aun cuando sean de peso molecular bajo (Xiu-dong, 2007).

En la gelificación interna, una serie de parámetros han sido estudiados, tales como:

- Tiempo de agitación con el ácido acético glacial: Al aumentar el tiempo de contacto 10 veces se observa que la encapsulación del paracetamol aumenta 3 veces, esto podría deberse a que se lleva a cabo una gelificación más completa debido a una mayor liberación de iones calcio desde el complejo insoluble carbonato cálcico (Rodríguez, 2003).
- Tiempo de contacto de las micropartículas con la solución de cloruro cálcico: Si bien es necesario un tiempo de reacción, el mismo no debe ser excesivo, debido a que facilitará la difusión del principio activo por gradiente de concentración. (Rodríguez, 2003).
- Concentración de iones calcio: Parece ser un parámetro crítico en la producción de micropartículas. La influencia de la concentración de ión calcio fue evaluada con tres concentraciones diferentes (Rodríguez, 2003).

1.3.2. Coberturas utilizadas en microencapsulación

Independientemente del método elegido para preparar las microcápsulas, el primer paso en la encapsulación será la selección de una matriz de encapsulación adecuada. (Tabla 1) (Pedroza, 2002).

Entre los agentes encapsulantes que se utilizan destacan:

- Las proteínas aisladas del suero de la leche, utilizadas como cobertura en el secado por aspersion. Este material posee alta capacidad emulsificante y genera microcápsulas de tamaño inferior a 2 micrómetros. Pueden utilizarse solas o combinadas con carbohidratos para modificar las propiedades de la pared y el tamaño de las partículas.

El uso de proteínas del suero de la leche tiene efectos sobre la morfología de las microcápsulas haciéndolas más esféricas y de superficie tersa en comparación con los polisacáridos (Ruíz, 2009).

- Los alginatos son uno de los polímeros más utilizados en la microencapsulación. Se extraen principalmente de tres especies de algas marrones (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*). Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados, que contienen cantidades variables de ácido (1,4) β -D-manurónico y de ácido α -L-gulurónico. La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan sus propiedades físicas (Ruíz, 2009).

Tabla 1. Materiales empleados en la encapsulación

Tipo de cobertura	Cobertura específica
Gomas	Agar, alginato de sodio, carragenina, goma arábiga.
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz.
Celulosas	Etil celulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa.
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, trisetearina.
Proteínas	Gluten, caseína, albúmina.
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos.

Fuente: Pedroza, 2002

Los alginatos han sido empleados como agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes coloidales en la industria alimentaria y gracias a sus propiedades, también se han podido aplicar en el entrapamiento y liberación de fármacos y microorganismos. Estas propiedades son:

- Permitir que la encapsulación se lleve a cabo a temperatura ambiente.
- No requerir solventes orgánicos tóxicos.
- Elevado grado de porosidad.
- Permitir una alta velocidad de difusión para macromoléculas, y la posibilidad de controlar dicha difusión.
- Disolverse y degradarse bajo condiciones fisiológicas normales (Jun-Nan, 2005).



1.4. Esferificación

Es la gelificación controlada de un líquido con un polisacárido. Esta es una técnica de inmovilización que ha encontrado una amplia solicitud hoy en día (Blandino et al., 1999). Una de las técnicas comúnmente utilizadas en la cocina molecular es la esferificación con alginato de sodio. Los alginatos (producto natural que se extrae de las algas pardas) en presencia de una cantidad suficiente de iones calcio, forman agregaciones de alginato cálcico dando lugar a un gel insoluble y bastante resistente (Pinto, 2010).

Inmediatamente se forma la red de alginato y las gotas quedan con su forma esférica, de tal manera que el contacto entre el alginato y el calcio producen una gelificación inmediata, generando una película alrededor y manteniendo líquido el centro (Pinto, 2010).

1.4.1. Directa

Se añade alginato de sodio al producto que se desea gelificar, produciendo un líquido viscoso y denso, dejando gotear sobre una solución de cloruro de calcio, produciendo gotas similares a las del caviar que se hunden, teniendo una textura semi-sólida en la superficie y líquida en el centro. Si se deja por mucho tiempo la esfera dentro de la solución de cloruro de calcio este se llega a gelificar en su totalidad.

Dependiendo del grado de acidez del producto se añade citrato de calcio con el fin de equilibrar el pH del alimento (Gourmetología, 2011).

1.4.2. Indirecta

El producto que se esferifica es el que debe contener cloruro de calcio y se debe sumergir en una solución de alginato de sodio. Si el producto contiene calcio en su composición original (leche, yogurt, entre otros) ya que no se agrega ninguna sal para lograr que gelifique la esfera. Por lo tanto el gel de alginato crece alrededor de



la esfera, pero por dentro permanece líquida (nunca se gelifica en su totalidad). Puede crecer tanto que se llegue a pegar a otra esfera. El tamaño de la esfera es más grande, se conoce como raviolis (Gourmetología, 2011).

1.5. Edulcorantes

Tanto la naturaleza como el hombre producen diversos alimentos que son aceptados por su sabor dulce; esta percepción sensorial se lleva a cabo gracias a un gran número de compuestos químicos, muchos de ellos sintetizados, que dan esas propiedades sensoriales tan agradables a la mayoría de los individuos. A los agentes que producen esta sensación se les designa con el nombre de edulcorantes y en términos muy genéricos se pueden dividir en naturales y sintéticos (Badui, 2006).

Entre los primeros están: a) mono y oligosacáridos (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, miel de abeja, azúcar invertido y jarabes de maíz); b) glucósidos (filodulcina, esteviósido, osladina, glicirrina y los del fruto lo-han); c) alcoholes polihídricos (sorbitol y xilitol); y d) proteínas (miralina o miraculina, monelina y taumatina) (Ver Figura 4) (Badui, 2006).

Por su parte, los sintéticos están constituidos por acesulfame K, aspartamo, L-azúcares, ciclamatos, dihidrochalconas, dulcina y sacarina. Estos no son los únicos compuestos que provocan la sensación de dulzura; de hecho, existen muchos otros (Badui, 2006).

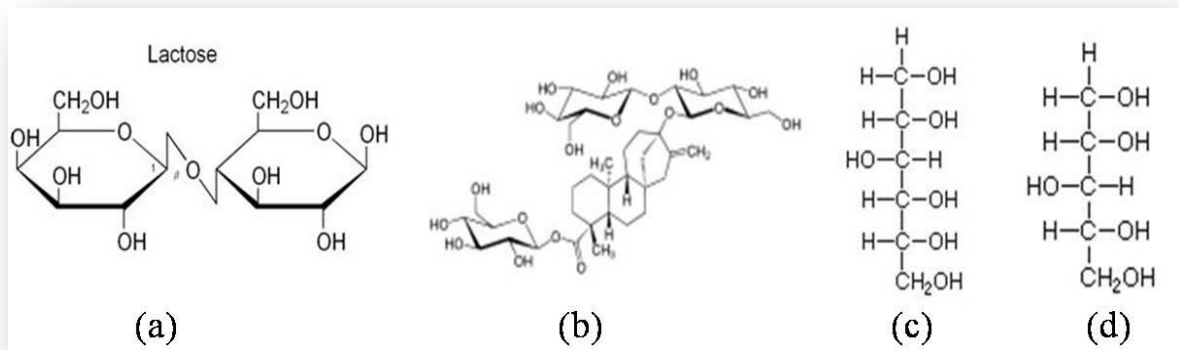


Figura 4. Edulcorantes naturales a) lactosa, b) esteviósido, c) sorbitol, d) xilitol
(Fuente: Badui, 2006)

El poder edulcorante, es decir, la capacidad de una sustancia para causar dicha sensación, se mide subjetivamente tomando como base de comparación la sacarosa, a la que se le da un valor arbitrario de 1 o de 100. Es decir, si un compuesto tiene un poder de 2 (1 lo presenta la sacarosa), indica que es 100% más dulce que el disacárido (Badui, 2006).

La sustitución de la sacarosa por los edulcorantes sintéticos (Figura 5) no siempre es sencilla, ya que este azúcar no sólo desempeña un papel como saborizante, sino que, en muchos casos, también actúa como conservador y para conferir al producto una textura y una consistencia adecuadas (Badui, 2006).

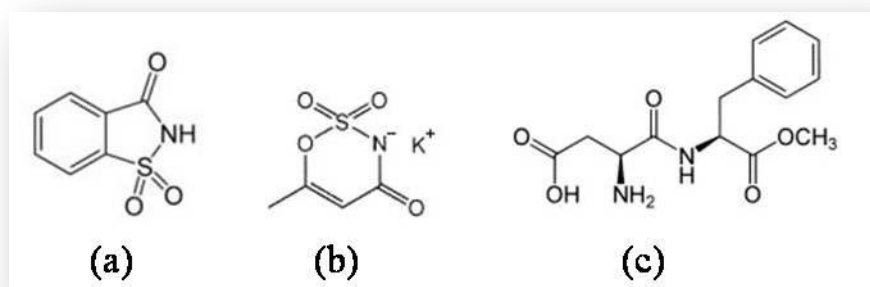


Figura 5. Edulcorantes artificiales a) sacarina, b) acesulfame K, c) aspartamo

(Fuente: Badui, 2006)

1.6. Saborizantes

El sabor es un factor que influye considerablemente a las cualidades de un alimento. Respecto a saborizantes, no se puede pensar estrictamente en la relación de un solo compuesto y un tipo de alimento en especial; por ejemplo, el sabor de fresa puede ser imitado aproximadamente por una combinación de: maltol, alcohol, propilenglicol, ácido acético, aldehídos, cinamato de metilo, beta-ionona, diacetilo, etc., a pesar de combinar estos compuestos y otros más, no se ha logrado una reproducción fiel. Cabe resaltar que varios de estos compuestos se encuentran en forma natural en frutas y otros

vegetales, por lo que se puede asumir un riesgo bajo al usarse como parte de la formulación de aromas y sabores.

En forma histórica se ha considerado a la siguiente clasificación para las materias primas en sabores/aromas o "flavor", considerado como la combinación de los sentidos gustativos y olfativos; según los expertos es un concepto y término que no debe confundirse en forma aislada con un sabor o aroma, sino como una interacción (Pollack, 1984):

- 1) Aceites esenciales obtenidos por prensado o destilación.
- 2) Extractos:
 - a) oleoresina: extractos vegetales, contienen aceite esencial, resinas y exudados.
 - b) tinturas y percolados: extractos etanólicos.
 - c) concentrados: extractos con disolventes orgánicos.
 - d) absoluto: extracto etanólico de un concentrado y otros extractos.
- 3) Concentrado: jugos y extractos concentrados.
- 4) Destilados: destilación de extractos o materias vegetales (por ejemplo, etanol).
- 5) Aislado:
 - a) desterpenado o desesquiterpenado. Aceites esenciales libres de terpenos o sesquiterpenos, extracción por cromatografía.
 - b) terpenos: subproductos de aceites desterpenados.
 - c) compuesto aislado: es un químico aislado por extracción, cromatografía, etc, prácticamente se considera puro, por ejemplo:

- eugenol (del aceite de clavo)	- metil-metil antrolinato (del aceite de la
- linalol (del aceite de rosas)	mandarina)
- geraniol (del aceite de palmarosa)	- metil-cinamato (del aceite de eucalipto)

1.6.1. Potenciadores de sabor

Son sustancias que, a las concentraciones que se utilizan normalmente en los alimentos, no aportan un sabor propio, sino que refuerzan el de los otros compuestos presentes (tabla 2). Esto es especialmente importante en el caso de sopas y salsas



deshidratadas, aunque también se utilizan en otros muchos productos. El más utilizado es el ácido L-glutámico, uno de los 20 aminoácidos que está presente en las proteínas naturales. Al igual que la sal común, a bajas concentraciones refuerza los sabores de otras moléculas sápidas. A concentraciones superiores posee un sabor que se denomina “umami” (voz japonesa para describir la sensación gustativa generada por este compuesto y que recuerda al caldo de carne) (Cubero, 2002).

1.7. Antioxidantes

Las células presentan mecanismos de protección, de manera que los radicales libres derivados de la activación del oxígeno pueden ser transformados a productos menos tóxicos o no tóxicos. La protección de las células contra los radicales libres derivados del oxígeno comprende no solo la captura de estos intermediarios agresivos, sino también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones (González, 2000).

La primera línea de defensa del organismo contra los radicales libres es la prevención, esto implica la acción de procedimientos que bloquean su formación, como sería la presencia de proteínas que se unen a metales (en particular hierro y cobre) lo que controla eficientemente la lipoperoxidación y la fragmentación del ADN, ya que de esta manera se evita la participación de estos metales en las reacciones donde se producen las diferentes especies reactivas de oxígeno (Vilar-Rojas, 1996; Halliwell, 1991).

En un segundo nivel de protección está la acción de los antioxidantes, que eliminan a los radicales para suprimir su actividad nociva en la célula. Estos agentes pueden dividirse en dos categorías: no enzimáticos y enzimáticos (Halliwell, 1991).

Los antioxidantes no enzimáticos se unen a los radicales libres, y los transfieren de sitios donde pueden provocar graves daños (p. ej. las membranas) a compartimentos celulares donde sus efectos sean menos drásticos (p. ej. el citoplasma), o bien, los transforman en radicales menos agresivos. Ejemplos de este tipo de antioxidantes son:



α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), glutatión, urato, bilirrubina y flavonoides entre otros. La vitamina E, el β -caroteno y la vitamina C son los únicos nutrientes esenciales que atrapan directamente radicales libres. La vitamina C es soluble en agua y se ubica en el citoplasma celular, mientras que la vitamina E y el β -caroteno son solubles en lípidos (Halliwell, 1991; Lawrence, 1987; Krinsky, 1989).

Con respecto a los antioxidantes enzimáticos se puede señalar que en las células se presentan tres sistemas principales de enzimas antioxidativas: las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa y las glutatión peroxidasas (GP) (Halliwell, 1997).

Si después de la acción de los antioxidantes el daño persiste, el último nivel de protección de la célula consiste en la reparación de las lesiones, lo que reside básicamente en la actividad de enzimas que repararán el daño inducido por los radicales libres al ADN, y de otras que destruirán las proteínas dañadas por los radicales libres o las que removerán los ácidos grasos oxidados de las membranas (Anderson, 1996).

1.7.1. Naturales

Se trata de un grupo de vitaminas y otros compuestos vegetales y enzimas que bloquean el efecto perjudicial de los denominados radicales libres.

1.7.1.1. Vitamina C

Puede presentarse como ácido ascórbico (E 300), ascorbato sódico (E 301), ascorbato cálcico (E 302) y palmitato de ascorbilo (E 304). El ácido L-ascórbico es la vitamina C. El ácido ascórbico (Figura 6) contribuye a evitar el oscurecimiento de la fruta cortada en trozos y evitar la corrosión de los envases metálicos; también se utiliza en panadería, no como antioxidante sino como auxiliar tecnológico, para mejorar el comportamiento de la masa. Su adición a mostos y vinos permite reducir el uso de sulfitos. Además mejora la absorción intestinal del hierro presente en los alimentos. Su utilidad como vitamina no es muy grande, ya que en gran parte se destruye al cumplir su papel de antioxidante (Shahidi, 2000).



Tabla 2. Algunos de los potenciadores de sabor que se admiten como aditivos en la Unión Europea.

Nombre	Obtención	Característica	Aplicación	Efectos y límites
Ácido L-glutámico	En 1908 se detectó en los extractos del alga Laminaria japonica, usados en la cocina japonesa. Se obtiene industrialmente por fermentación de azúcares.	En forma libre se encuentra, en pequeña cantidad, en tomates y champiñones. Esta es probablemente una de las razones de que éstos sean tan útiles como componentes de guarniciones, salsas y sopas.	A bajas concentraciones, potencia los sabores y a dosis altas, confiere un sabor que recuerda a la carne.	Su toxicidad es mínima. El “síndrome del restaurante chino” (hormigueo, somnolencia, sensación de calor y cefaleas) se atribuye a dosis superiores a 30g/kg peso corporal. IDA: 120 mg/Kg
Ácido guanílico	Se obtiene a partir de levaduras o de extractos de carne o de pescado por hidrólisis química.	Potencia el sabor 20 veces más que el ácido glutámico.	Derivados cárnicos (fiambres, patés, etc.) Sopas y caldos deshidratados	Se metaboliza hasta ácido úrico. IDA: no especificada.
Maltol		Potencia el sabor dulce de los azúcares. Olor a caramelo	Repostería (postres, bollos, galletas, etc.) y confitería (caramelos, chicles, etc.).	Se absorbe en el intestino y se elimina fácilmente en la orina. IDA: 1 mg/Kg de peso.

Fuente: Cubero, 2002



Sus principales fuentes son las frutas, verduras y hortalizas (cítricos, fresas, kiwi, melón, tomate, pimiento, coles, coliflor, etc.), entre los alimentos de origen animal cabe destacar el hígado (Valls, 2000).

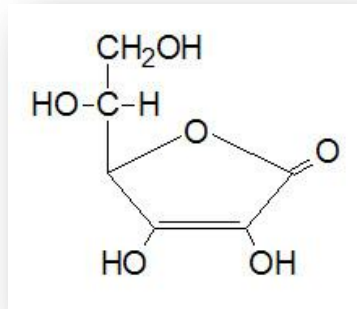


Figura 6. Estructura química del ácido ascórbico (*Fuente:* Shahidi, 2000)

1.7.1.2. Vitamina E

Es un poderoso antioxidante que protege las membranas celulares y otros componentes liposolubles, puede actuar de prooxidante, según la teoría que apoya la función prooxidante, esta produce una peroxidación en el LDL, facilita la transferencia de la reacción de los radicales libres de la fase acuosa al interior del ambiente lipídico. Para inactivar esta peroxidación mediada por el tocoferol, son necesarios los adecuados agentes reductores, llamados coantioxidantes, siendo los más eficaces el ácido ascórbico, en ambientes hidrofílicos y el CoQ en el hidrofóbico (Valls, 2000). Se sabe que la modificación del colesterol malo es susceptible a ser corregido por los antioxidantes. Algunos informes dicen que el suplemento de vitamina E es muy útil en la prevención y tratamiento de la diabetes (Shahidi, 2000).

La vitamina E (Figura 7) alimentaria se compone mayoritariamente de α - γ -tocoferol, estando las formas ingeridas en estado libre o formando ésteres (Valls, 2000). Los tocoferoles abundan de forman natural en las grasas vegetales sin refinar, y especialmente en los aceites de germen de trigo, arroz, maíz o soja, yemas de huevos y hojas de vegetales verdes. Se obtiene



industrialmente como un subproducto del refinado de estos aceites o por síntesis química. Son unos protectores muy eficaces de la vitamina A, muy sensible a la oxidación. Al igual que el ácido ascórbico, evitan la formación de nitrosaminas en los alimentos. La función biológica de la vitamina E es similar a su función como aditivo, es decir, la de proteger la oxidación de las grasas insaturadas (Shahidi, 2000).

Sus principales fuentes dietéticas son los aceites vegetales y sus derivados (margarinas y mayonesas), así mismo se encuentra en granos de cereales, el germen de trigo, frutos secos, judías verdes, en el tejido adiposo de los animales, etc (Valls, 2000).

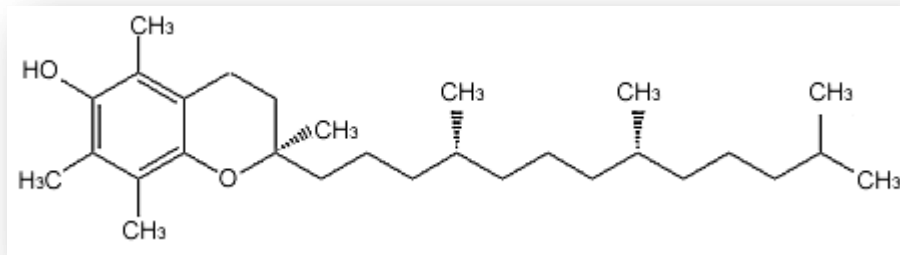


Figura 7. Estructura química de la vitamina E (*Fuente:* Valls, 2000)

1.7.1.3. Carotenoides

Existen más de seiscientos carotenoides, de los cuales cerca de 50 son precursores de la vitamina A o retinol. La vitamina A (Figura 8) en la dieta puede ser ingerida a través de los alimentos de origen animal, mayoritariamente en forma de ésteres de retinilo o a través de alimentos de origen vegetal, en forma de carotenoides, principalmente el β -caroteno. Tanto el retinol como los carotenoides han mostrado actividad antioxidante, aunque son los carotenoides los compuestos más activos (Valls, 2000).

La vitamina A se encuentra mayoritariamente en la materia grasa de ciertos alimentos de origen animal como carnes, hígado, yema de huevo, leche, mantequilla, queso y nata. Por otra parte los carotenoides, y fundamentalmente

el β -caroteno, se encuentran en las frutas, verduras y hortalizas, especialmente la zanahoria, tomates, cítricos, calabaza, albaricoque, melón. También contienen carotenoides las partes verdes de las verduras como las espinacas (Valls, 2000).

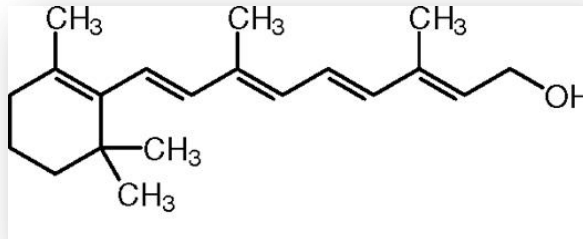


Figura 8. Estructura química del retinol (*Fuente:* Valls, 2000)

1.7.1.4. Polifenoles: flavonoides

En los últimos años han cobrado especial interés la capacidad antioxidante que presentan determinados polifenoles, especialmente flavonoides (Figura 9), presentes en diferentes vegetales. Estas sustancias se forman en el reino vegetal a partir de la fenilalanina y la tirosina, combinados con unidades de acetato (Valls, 2000).

En general, estos antioxidantes naturales (Ver Tabla 4) se encuentran en los aceites, frutas y vegetales, así como en determinadas bebidas como la cerveza y el vino obtenidas por fermentación a partir de vegetales, como son en caso de la cerveza la cebada y el lúpulo y del vino la uva. Los flavonoides son transportados unidos a la albúmina hasta el hígado (Valls, 2000).

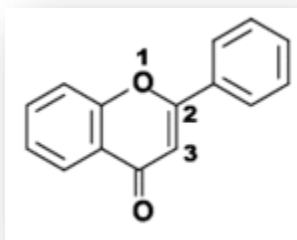


Figura 9. Estructura química de la 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona), esqueleto de los flavonoides (*Fuente:* Valls, 2000)

1.1.1. Granada

El origen de la palabra Granada proviene del francés pome garnete que significa manzana granada. En latín es malum granatum (manzana con grano) o punicum malum (manzana cartaginesa). El nombre botánico es *Púnica granatum linnaneus*. Púnica se refiere a proveniencia de la antigua zona fenicia, actualmente es la región costera de Siria y Líbano, donde se hablaba la lengua Púnica y donde se continúa cultivando la granada hasta la actualidad (Morton ,1987).

La Granada no es únicamente una fruta de sabor dulce. Es característico su sabor mezcla de dulce, ácido y amargo. Esta sensación es parte del beneficio que se obtiene de ella y está producida originariamente por un grupo de constituyentes denominados taninos. La piel de la uva y las hojas de té son quizás dos de las fuentes más conocidas de taninos de nuestra dieta. Otras frutas, verduras y plantas medicinales también son ricas en taninos: los caquis, los arándanos, el chocolate, las legumbres, el sorgo, etc. De hecho, el significado de los taninos se extiende más allá de la comida. Los taninos se unen y precipitan proteínas. Los taninos del roble, por ejemplo, se han utilizado durante siglos para curtir el cuero. Los taninos también se han utilizado ampliamente como agentes medicinales para prevenir la diarrea, para detener hemorragias y para otros usos. Muchos de los componentes de la Granada se han identificado y estudiado por sus potenciales propiedades promotoras de la salud (ver Tabla 3) (Andreu-Sevilla, 2001).

Los extractos de numerosas frutas, bayas, frutos secos y semillas poseen actividad antioxidante. Científicos noruegos han comparado la capacidad de diferentes antioxidantes naturales. Los vegetales con las mayores cantidades de antioxidantes son las moras, las frambuesas, las fresas, los arándanos, las nueces, las semillas de girasol, el jengibre y la Granada. De todos los alimentos evaluados únicamente las nueces y el escaramujo poseen más antioxidantes que la Granada. De las frutas evaluadas, la Granada es una de las que posee mayor cantidad de antioxidantes (cinco veces más que la mayoría de ellas). Muchas de las partes de la Granada los poseen, incluyendo la flor y la corteza.



Tabla 3. Partes de la granada y sus constituyentes característicos.

Parte de la planta	Constituyentes principales
PERICARPIO (PIEL + ARILOS)	Punicalaginas, compuestos fenólicos, ácido gálico y otros ácidos grasos, catequizas, EGCG, quercetina, rutina, flaonas, flavanonas y antocianidinas.
ACEITE DE SEMILLAS	95 % ácido púnico, ácido elágico, ácidos grasos, esteroides
ZUMO	Antocianos, glucosa, ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico, ácido cafeico, catequinas, EGCG, quercetina, rutina, minerales, aminoácidos.
EXTRACTO DE LAS HOJAS	Taninos (punicalina y punicafolina), glicósidos de flavonas, incluido la luteolina y apigenina.
EXTRACTO DE LAS FLORES	Ácido gálico, ácido ursólico, triterpenoides, ácido asiático, ácido maslínico y otros constituyentes sin identificar
EXTRACTO DE LAS RAÍCES Y CORTEZA	Taninos (punicalina y punicalagina) y numerosos alcaloides

Fuente: Chidambara, 2002

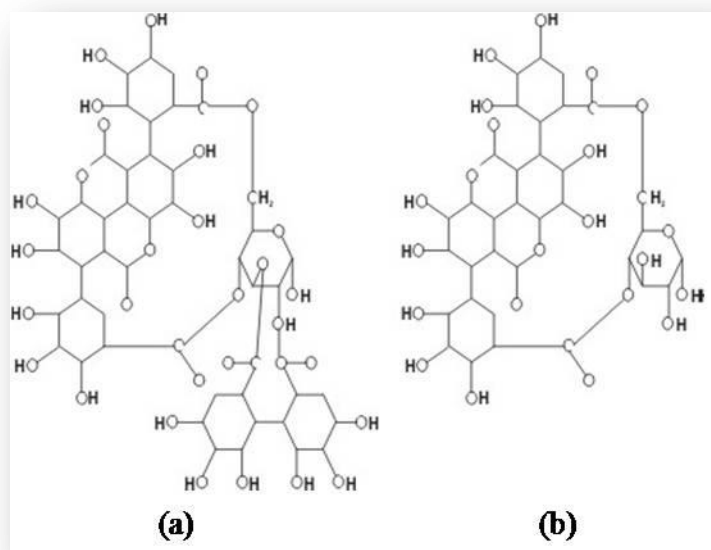


Figura 10. Estructuras químicas de la a) punicalagina y b) punicalina

Tabla 4. Antioxidantes y sus alimentos de origen

Antioxidante	Alimentos
Ácido elágico con propiedades antioxidantes y hemostáticas. En algunos países se utiliza como suplemento alimentario atribuyéndole propiedades antitumorales	Fresas, Frambuesa, Cerezas, Uvas, Kiwis, Arándanos, Bayas
Antocianoses un grupo de pigmentos flavonoides hidrosolubles (glucósidos) que están en solución en las vacuolas de las células vegetales de frutos, flores, tallos y hojas	Uva, Cerezas, Kiwis, ciruelas.
Carotenoides. Los alfa y beta carotenos son precursores de la vitamina A y actúan como nutrientes antioxidantes. Son los únicos carotenoides que se transforman en cantidades apreciables de vitamina A.	Zanahoria, Tomate, Naranja, Papaya, Lechuga, espinacas.
Catequinas. El té verde según las últimas investigaciones es clave por su alto contenido en catequinas y polifenoles, que actúan como antioxidantes y activadores del Metabolismo	Té verde, Cacao
Compuestos sulfurados compuestos órgano-sulfurados que inhiben la carcinogénesis química inducida provocada por algunas sustancias.	Ajo, cebolla, puerro, cebolletas, chalotes
Hesperidina también con acción diurética y antihipertensiva de la hesperidina	Cítricos, naranja
Isotiocianatos pueden suprimir el crecimiento de tumores mediante el bloqueo de enzimas.	Coles, brócoli, calabaza, mostaza, nabos, berros.
Isoflavonas se relaciona como aliado contra enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y de cánceres dependientes de hormonas como el de mama	Soja y derivados. En mucha menor cantidad: té verde, guisantes, lentejas, garbanzos
Lycopeno responsable del característico color rojo de los tomates	Tomate
Quercetina es un potente antioxidante, encontrado en una gran variedad de frutas y vegetales	Uvas, cebolla roja, brócoli, toronja y manzanas, cerezas, te verde, vino tinto
Taninos también muy potentes para limpiar nuestras arterias (consumo moderado de vino tinto)	Vino tinto, uvas, moras lentejas.
Vitamina C. Junto a la vitamina E los dos clásicos con muy potente capacidad antioxidante.	Kiwi, cítricos, piña, tomates, brécol, alfalfa germinada, pimientos, espinacas.
Vitamina E. La Vitamina E es el clásico antioxidante que protege a las células de agresiones externas del tipo: contaminación, pesticidas, humo del tabaco	Aguacate, nueces, maíz, aceites vegetales, germen de trigo cereales.

Fuente: Zorica, 2005



La Granada es una fuente rica en antioxidantes, los polifenoles. El más abundante de ellos es un tanino conocido como punicalagina. La punicalagina se ha estudiado por parte de los científicos como un agente promotor de la salud presente en la Granada. Este componente se ha considerado como el responsable de los beneficios sobre la salud y de las propiedades antioxidantes de la Granada. La punicalagina puede inhibir la proliferación de las células cancerosas en casos de cáncer de colon, promoviendo su autodestrucción en un proceso conocido como apoptosis. La punicalagina puede hacer más lenta la progresión de la enfermedad de Alzheimer, al inhibir la acción de la enzima beta-secretasa (Noda, 2002)

La Granada es una fuente rica en antocianidinas, constituyentes que contribuyen a su actividad antioxidante. Las antocianidinas son un tipo de bioflavonoides responsables del color azul oscuro, rojo oscuro y púrpura presente en numerosos vegetales y plantas. La palabra procede del griego y significa flor azul. La mayoría de antocianidinas son potentes antioxidantes y neutralizadores de radicales libres. También son capaces de absorber la radiación, incluyendo la luz ultravioleta y la radiación ionizante (Du CT, 1975).

Las antocianidinas inhiben el daño oxidativo sobre los lípidos plasmáticos, previniendo uno de los primeros pasos del desarrollo de las alteraciones cardiovasculares. La pelargonidina, una de las antocianidinas también presentes en la Granada, ha demostrado su efectividad en casos de diabetes en estudios realizados en ratas. Las antocianinas también intervienen combatiendo el cáncer gracias a su acción antioxidante protegiendo el DNA e inhibiendo la formación anormal de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que nutren el tejido tumoral (Du CT, 1975).

La Granada tiene una acción antioxidante y anticancerígena similar a la del té verde (*Camellia Sinensis*), en parte porque ambos contienen galocatequinas. En la Granada las galocatequinas son especialmente abundantes en la piel de la fruta (Plumb, 2002).

El ácido elágico se encuentra en la Granada y en otras muchas frutas y verduras incluyendo las frambuesas, las fresas, los arándanos y las nueces. Este componente es antioxidante y potencialmente anticancerígeno. Como la punicalagina, el ácido elágico puede inhibir la beta-secretasa haciendo más lenta la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Plumb, 2002).

Tabla 5. Composición nutricional de 100g de granada (fruta fresca)

NUTRIENTES	UNIDADES	VALOR por 100 g
Agua	G	80,97
Energía	Kcal	68
Proteína	G	0,95
Grasa	G	0,30
Colesterol	mg	0
Carbohidratos	g	17
Azúcares totales	g	16,57
Fibra dietética	g	0,6
VITAMINAS		
Vitamina C (ácido ascórbico)	mg	6,1
Vitamina A	UI	108
Vitamina E (α -tocoferol)	mg	0,60
Vitamina K (filoquinona)	μ g	4,6
α -Caroteno	μ g	50
β -Caroteno	μ g	40
Fitoesteroles	mg	17
MINERALES		
Potasio	mg	250
Hierro	mg	0,3
Calcio	mg	3
Sodio	mg	0

Fuente: Chidambara, 2002



CAPÍTULO II

METODOLOGÍA DE

INVESTIGACIÓN

EXPERIMENTAL



2. Metodología de Investigación Experimental

PROBLEMA

Elaborar una bebida funcional de consumo humano saborizada, adicionada con un antioxidante (jugo de granada) y un probiótico (*Lactobacillus casei*).

OBJETIVO GENERAL

Elaborar una bebida denominada funcional con lactobacilos y un antioxidante (jugo de granada) encapsulados mediante la metodología de la esferificación para el transporte de los mismos.

Objetivo Particular 1

Determinar la viabilidad del producto mediante un estudio de mercado, para conocer los intereses del público.

Objetivo particular 2

Determinar las propiedades texturales (dureza, cohesividad, elasticidad, adhesividad, gomosidad y masticabilidad) de las esferas de alginato—xantana con lactobacilo, con un antioxidante (jugo de granada) y la mezcla de ambos, por medio de un texturómetro.

Objetivo particular 3

Evaluar la sinéresis producida por las esferas de alginato—xantana con y sin lactobacilo y con y sin un antioxidante (jugo de granada), mediante una prueba física para saber cuál presenta mayor estabilidad.

Objetivo particular 4

Determinar mediante una evaluación sensorial si es agradable al consumidor el sabor y color del producto.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y

MÉTODOS



3. Materiales y métodos

3.1. Estudio de mercado. Para saber la viabilidad que el producto tendría en el mercado se realizó un estudio a los consumidores el cual consistió en una encuesta de aceptación (Liria, 2007) de 10 preguntas realizada a 50 personas. Anexo 1

3.2. Aislamiento del lactobacilo

1. Para aislar el lactobacilo se partió de un producto lácteo fermentado para obtener el *Lactobacillus casei*
2. Se tomó con el asa una porción del producto para sembrar en Agar rogosa (Figura 11).

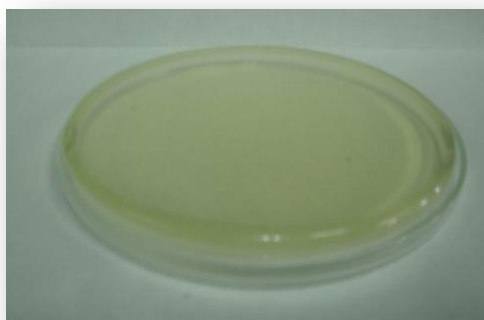


Figura 11. Agar Rogosa

Tabla 6. Composición de Agar Rogosa

Medio rogosa	
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Ácido ascórbico	0.5 g
Peptona de soya	5 g
Polypeptona atriptosa	5 g
Acetato de sodio trihidratado	3 g
Dextrosa	5 g
Agar bacteriológico	20 g
Agua	1 L
pH	7.2

3. Se incubó a 37°C durante 48 horas.

4. Se seleccionan colonias separadas para purificarlas sembradas por estrías en agar Rogosa (Figura 12) y se realizaron las siguientes pruebas para su identificación: Tinción de Gram, habilidad de degradar en Arabinosa, Lactosa, Maltosa, Manitol, Melecitosa, Melibiosa, Rafinosa, Salicín, Sorbitol, Trehalosa, OF (oxidación-fermentación) y catalasa.

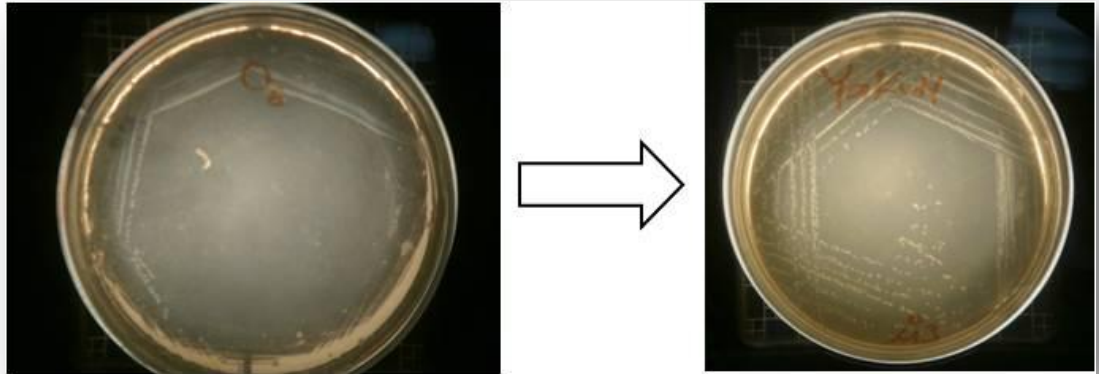


Figura 12. Crecimiento del *Lactobacillus* en Agar Rogosa

3.3. Obtención de la masa celular de *Lactobacillus*. Se realizaron siembras del *L. casei* cultivadas en una proporción del 10%, iniciando con 2.5 ml e incubando cada inoculo a 37°C por 24 horas hasta tener un cultivo en 250 ml de caldo Rogosa (Figura 14).

Se sembró primero el lactobacilo en 2.5 ml de caldo Rogosa a 37°C por 24 horas y se inoculó posteriormente en 25 ml de caldo Rogosa a las mismas condiciones de tiempo y temperatura, finalmente se inoculó en 250 ml de caldo Rogosa a 37°C por 24 horas y así obtener una mayor masa celular (Figura 13).

El volumen obtenido de cultivo de lactobacilo se pasó a botes estériles donde se centrifugó por 20 minutos a 6000 rpm, en una centrífuga RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge (Figura 15).



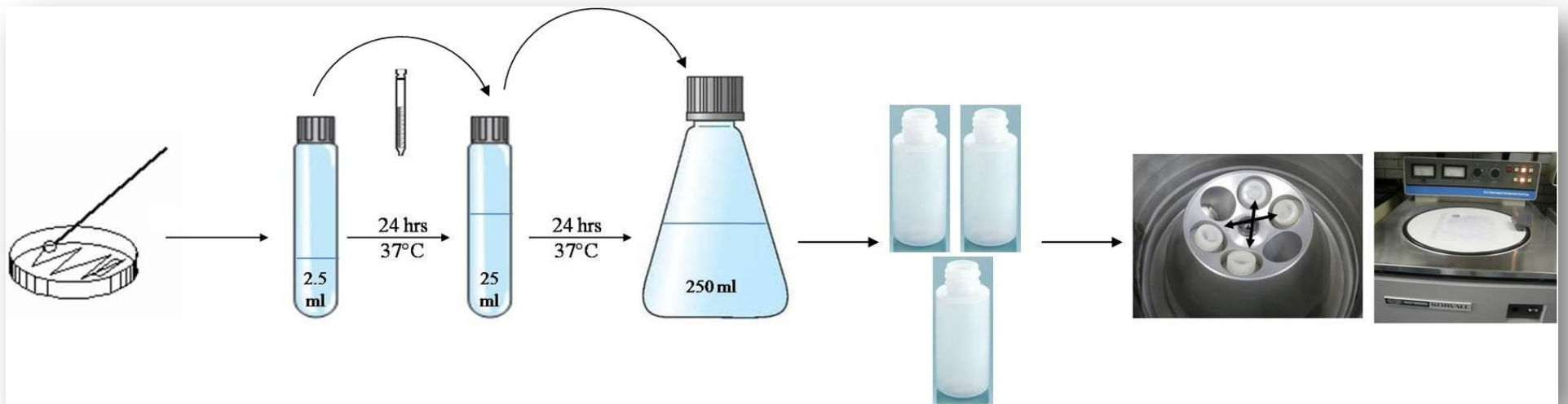


Figura 13. Diagrama de obtención de masa celular de *Lactobacillus*

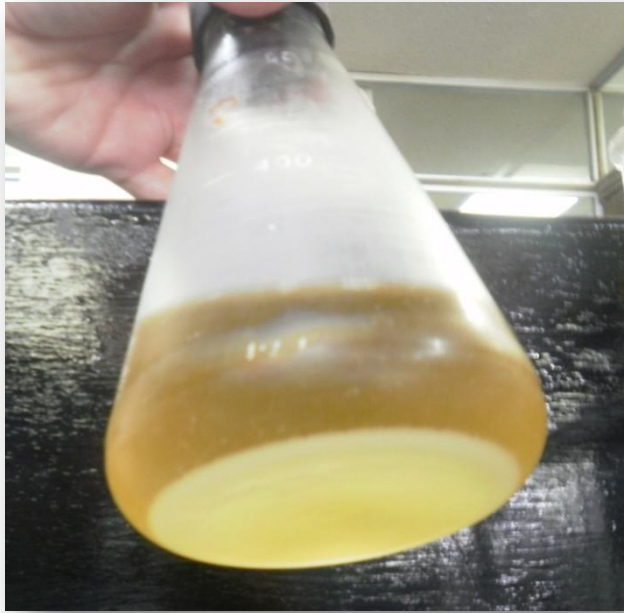


Figura 14. Crecimiento de Lactobacilo en caldo Rogosa



Figura 15. Distribución de los botes para la centrifuga.

Se tiró el sobrenadante para conservar el sedimento formado por el lactobacilo (Figura 16), se lavó dos veces con solución salina fisiológica (SSF), centrifugando cada lavado a las condiciones mencionadas. Se suspendió en 2 ml de SSF y se refrigeró hasta su uso.

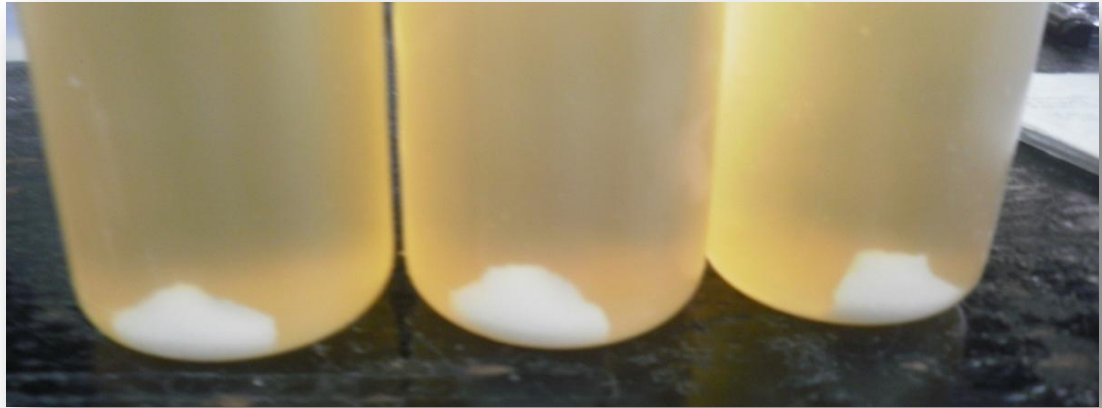


Figura 16. Sedimento formado por el Lactobacilo centrifugado.

3.4. Encapsulación. Para elaborar las esferas de alginato-xantana primero fue necesario hacer una solución de cloruro de calcio al 1.5%, posteriormente se hizo una dispersión de Xantana 0.1% — Alginato de sodio 1.5% en jugo de granada y se añadió 5 ml de *Lactobacillus casei*. Con ayuda de una jeringa de 3ml se tomó una porción de la dispersión y se dejó caer gota a gota en la solución de cloruro. Se dejó reposar por 2 minutos. Se quitó el exceso de sales pasando las cápsulas por agua limpia (Figura 18).

3.5. Cuantificación de *Lactobacillus* encapsulados. Se llevó a cabo mediante seis diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-6}) empleando SSF estéril (Figura 17).

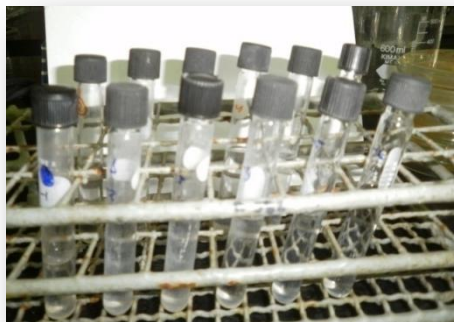


Figura 17. Tubos con SSF estéril.

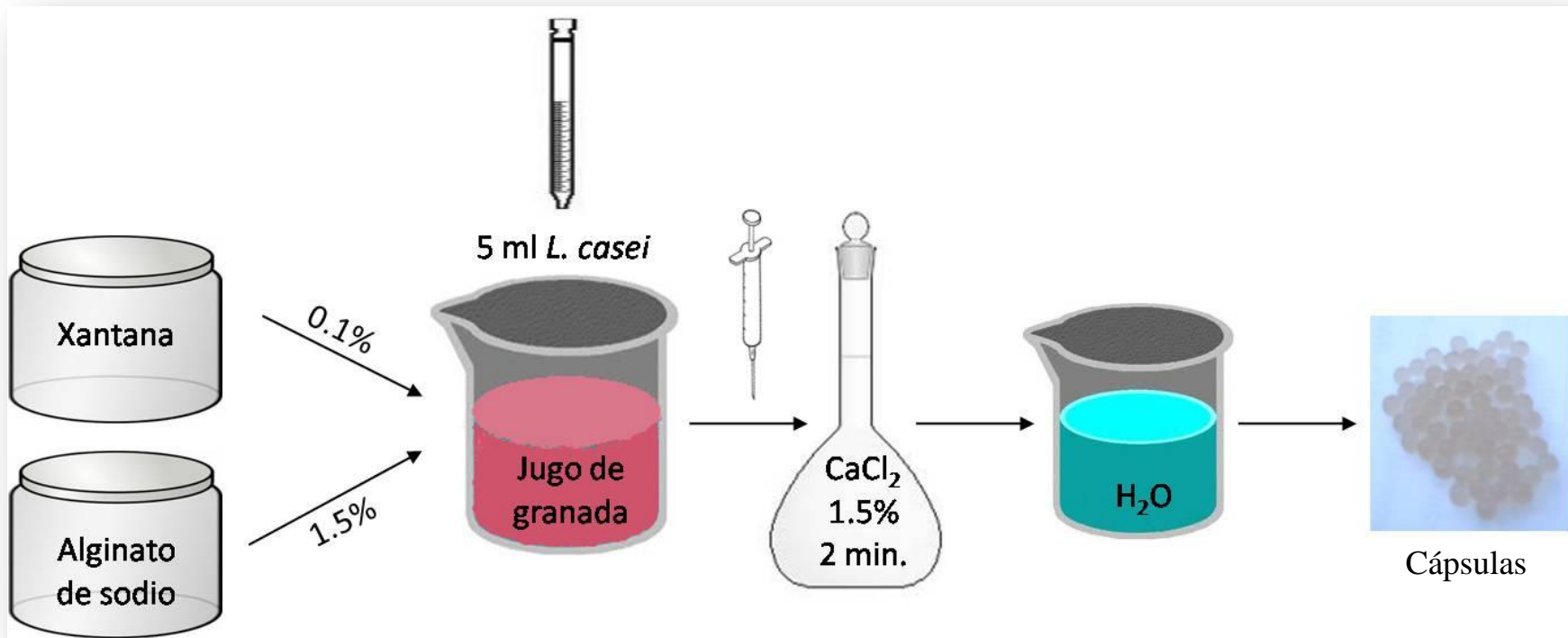


Figura 18. Diagrama del proceso de encapsulación.

Para realizar la primera dilución se maceró en un mortero estéril 1g de cápsulas conteniendo el *Lactobacillus casei* (Figura 19).



Figura 19. Maceración de las cápsulas con *Lactobacillus*.

De ahí se tomó 1ml para pasarlo al siguiente tubo conteniendo 9 ml de SSF estéril con ayuda de una micropipeta (Figura 21). Se sometió cada tubo a agitación por 30seg en el Vortex (Figura 20), se repitió el procedimiento hasta tener la dilución 10^{-6} .

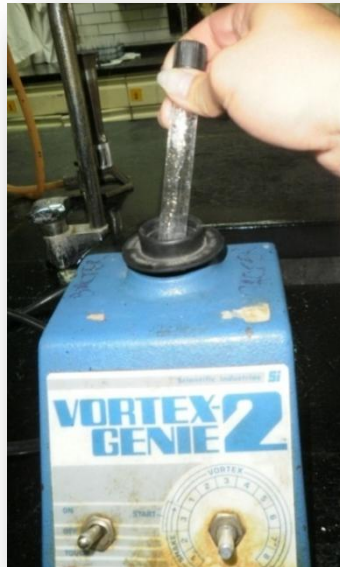


Figura 20. Agitador Vortex

Se sembró cada dilución en Agar Rogosa por gota en superficie, incubando durante 24 horas a 37°C.



Figura 21. Micropipeta de 500µl, siembra de diluciones en Agar Rogosa.

En un litro de agua destilada se agregó cada ingrediente y se dejó reposar por 5 minutos, se calentó hasta disolver completamente los ingredientes agitando cada vez que fue calentado, se ajustó el pH a 7.2 con NaOH.

3.6. Perfil de textura de las cápsulas. Se evaluó dureza, cohesividad, elasticidad, adhesividad, gomosidad y masticabilidad en un texturómetro TA500 con geometría cilíndrica de acrílico de 1/8 in de diámetro con las siguientes condiciones:

- Muestra: 0.5cm de diámetro
- Precarga: 1g
- Distancia de penetración: 2mm
- Velocidad de penetración: 1.7mm/s

3.7. Estabilidad. Esta prueba se realizó con el fin de conocer el porcentaje de agua perdida, mediante una prueba física de tipo acelerada. Esto se realizó tomando una cápsula, la cual se prepara de tres formas diferentes: entera, en trozos (partida en cuatro partes) y comprimida (en un mortero), registrando sus respectivos pesos. Se tomó el peso del papel filtro inicial y transcurridos 30 minutos se registró el peso del papel húmedo y se tomó de acuerdo a la ecuación 1:

$$\% H_2O = \frac{\text{peso papel mojado} - \text{peso papel seco}}{g \text{ muestra}} * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

3.8. Elaboración de la bebida. Una vez encapsulado el lactobacilo se añadió en una concentración del 5% a la formulación de la Tabla 7, ya que es lo que corresponde para que se considere alimento probiótico:

Tabla 7. Formulación de bebida funcional

Agua	47.37%
Jugo de granada	47.37%
Azúcar	0.25%

3.9. Evaluación sensorial. Se realizó una encuesta (Anexo II) de 6 preguntas en escala hedónica para saber cuál de las formulaciones de la Tabla 8 tenía mayor aceptación por los consumidores.

Tabla 8. Formulaciones manejadas para la elaboración de una bebida funcional

	538	927	492
Agua	47.50%	47.37%	47.25%
Jugo de granada	47.50%	47.37%	47.25%
Azúcar	0.00%	0.25%	0.50%



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN



4. Resultados y Discusión

4.1. Estudio de mercado.

Para que el desarrollo de productos se ejecute con facilidad, seguridad y eficiencia, debe seguir una secuencia lógica, que implica que cada una de las acciones se haga en el tiempo adecuado y con el grado de calidad necesario (Lerma, 2004).

El inicio del ciclo consiste en la tarea de investigar, monitorear y analizar el mercado, a fin de detectar oportunidades (necesidades y deseos), que introduzcan y motiven al desarrollo de nuevos productos (Lerma, 2004).

Cuando se detectan las necesidades y/o oportunidades, se debe proceder a la generación de ideas con respecto a posibles alternativas de producto. Después de haber generado el mayor número posible de ideas, éstas se tamizan, analizan y evalúan a fin de seleccionar aquellas que convengan seguir figurando (Lerma, 2004).

Las ideas que hayan sido catalogadas como viables, pasan al proceso de diseño, que comprende la formulación detallada de las especificaciones. Ya que se cuenta con el diseño del producto, se procede a efectuar una segunda etapa de análisis y evaluación, para corregir errores o incongruencias (Lerma, 2004).

Después se procede al análisis y la evaluación comercial para así proceder a la elaboración del prototipo, cuya calidad se habrá de inspeccionar y evaluar. Una vez que se cuenta con el producto se procede a someter al producto a la prueba de fuego, que consiste en evaluar la aceptación real del producto por el mercado. Cuando la prueba de mercado es confiable y arroja como resultado, que el producto tiene alta probabilidad de lograr el éxito, se procede a hacer todas las acciones necesarias para lanzarlo e introducir el producto al mercado (Lerma, 2004).

Dentro del flujo de actividades para el desarrollo de productos se tiene que “detectar oportunidades y generar ideas” esto se llevó a cabo mediante un estudio de mercado el que mostró de acuerdo a los resultados obtenidos, que los consumidores encuestados fueron mujeres en un 62% y hombres 38% en un rango de edad de 20 a 24 años (Figura 22) de los cuales un 64% dijo aceptaría probar el producto (Figura 23), ya sea por salud o simple curiosidad; esto debido a que no es del total conocimiento de los consumidores el elevado valor nutricional y las propiedades terapéuticas que posee el jugo de granada así como de los beneficios que tiene el *Lactobacillus casei* en el organismo. Se aplicó la encuesta presentada en el Anexo I.

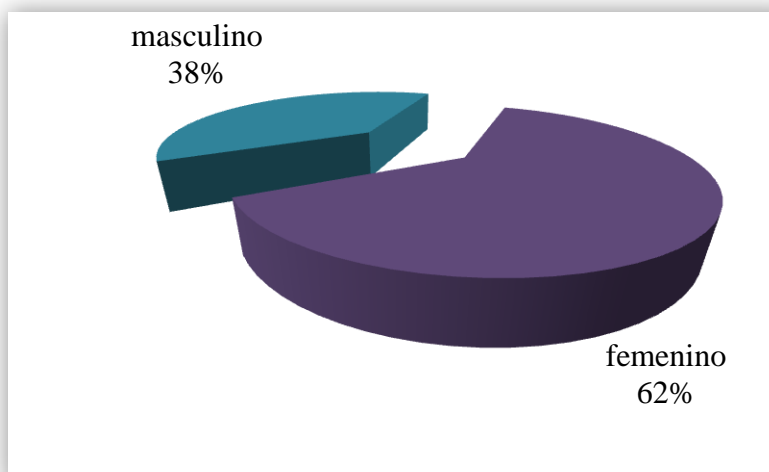


Figura 22. Porcentaje de consumidores encuestados según el género.

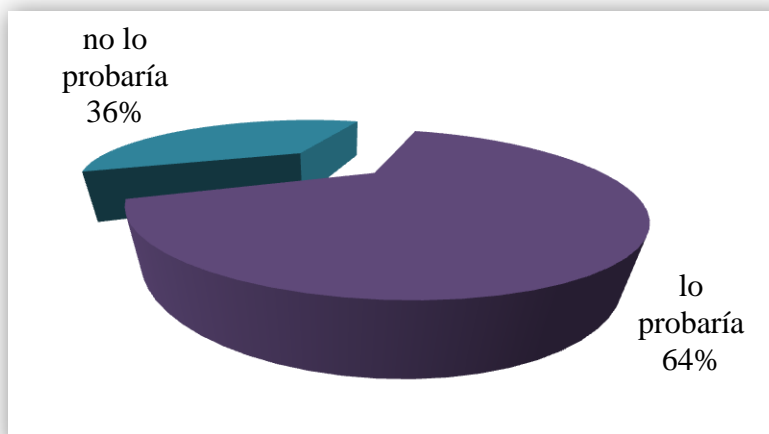


Figura 23. Preferencias del consumidor.

El estudio realizado dio la pauta para desarrollar la bebida funcional adicionada con *Lactobacillus casei* y un antioxidante y saber que sería aceptada por los consumidores.

4.2. Identificación de *Lactobacillus*.

La fermentación es un proceso metabólico de óxido-reducción que ocurre en un medio ambiente anaerobio y, en lugar de oxígeno, un sustrato orgánico sirve como el aceptor final de hidrógeno (electrones). En los sistemas de prueba bacteriológicos, este proceso se detecta observando cambios de color en indicadores de pH a medida que se forman productos ácidos (Mac, 1993).

La identificación bacteriana se realiza tras el estudio de las características tintoriales, morfológicas y bioquímicas de los microorganismos. La identificación bioquímica se basa en la habilidad de las bacterias de producir enzimas fácilmente detectables, en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, etc (Rose, 1997).

El proceso de fermentación se inicia a partir del ácido pirúvico, tiene como características fundamentales, (Rose, 1997):

- No requiere oxígeno (aunque a veces puede ocurrir en su presencia)
- No necesita cadenas transportadoras de electrones (ciclo de Krebs)
- Utiliza moléculas orgánicas como aceptor final de electrones
- Libera energía a partir de azúcares u otras moléculas orgánicas como aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.

En las figuras 24 y 25 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas, las permitieron identificar al *Lactobacillus casei* (Tabla 9).





Figura 24. Resultado de las pruebas bioquímicas para la identificación primaria de *Lactobacillus* (de izq. a der. Arabinosa, Galactosa, Maltosa, Manitol, Melecitosa, Melibiosa, Rafinosa, Salicín, Sorbitol, Trehalosa, Glucosa).

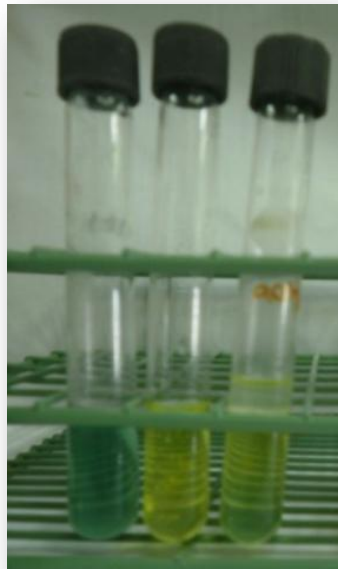


Figura 25. Resultado de la prueba OF para identificación primaria de *Lactobacillus* (izq. original).

Tabla 9. Resultados de pruebas bioquímicas

Azúcar	Resultado bibliográfico	Resultado experimental
Arabinosa	-	-
Galactosa	+	+
Maltosa	+	+
Manitol	+	+
Melecitosa	+	+
Melibiosa	-	-
Rafinosa	-	-
Salicín	+	+
Sorbitol	+	+
Trehalosa	+	+
OF	+	+
Catalasa	-	-
Glucosa	+	+

Las pruebas bioquímicas se realizaron con la finalidad de identificar que el microorganismo aislado fue el LcS. Estas pruebas incluyen la fermentación de galactosa, glucosa, manitol, maltosa, trehalosa, rafinosa y arabinosa como describe Cai et. al. (2007).

En los ambientes acuosos, que contienen oxígeno disuelto, como el citoplasma de las células, aparecen formas tóxicas derivadas del oxígeno. Las bacterias que viven en ambientes aerobios necesitan un equipo enzimático capaz de neutralizar estas formas tóxicas. Entre estas enzimas se encuentra la catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Rose, 1997). Para el caso del *Lactobacillus casei* la prueba resulto negativa lo que significa que no hubo presencia de la enzima.

La capacidad de fermentar la Lactosa (disacárido formado por dos monosacáridos, unidos por el enlaces β -1,4, entre la glucosa y la galactosa), depende de la presencia de la enzima β -galactosidasa. La utilización efectiva de la Lactosa, también requiere la presencia de la *Galactósido permeasa* que favorece la entrada de la lactosa en el interior de la célula (Rose, 1997).

Las bacterias que producen β -galactosidasa pero les falta *permeasa* no pueden incorporar lactosa a una velocidad suficiente para producir una fermentación rápida y vigorosa, y generalmente, se clasifican como NO fermentadores de lactosa. La fermentación de Lactosa es especialmente característica de *Escherichia* y *Enterobacter*, y ausente de *Shigella*, *Salmonella* y *Proteus* (Rose, 1997). En este caso el *Lactobacillus casei* es fermentador de lactosa ya que en su célula puede tener la permeasa y posiblemente la enzima β -galactosidasa o la β -glucuronidasa.

Los requerimientos nutricionales para el crecimiento óptimo del LcS son muy variados. El crecimiento máximo de este microorganismo se produce en un medio de cultivo sintético, con más de 12 aminoácidos y 4 vitaminas. El LcS es auxotrófica (mutación que ocasiona la incapacidad de la bacteria para crecer en un medio mínimo) por valina, ácido glutámico, ácido nicotínico y ácido pantoténico, los cuales son requeridos para el mejor crecimiento de este tipo de bacterias ácido lácticas. Además se requieren varios minerales para el crecimiento del LcS, siendo la concentración más alta requerida la de magnesio (Jiménez, 2009). Debido a esto se requirió de un mayor tiempo para la obtención de la masa celular del lactobacilo.

4.3. Cuantificación de *Lactobacillus* encapsulado.

Para hacer la cuantificación se sacó el promedio del número de colonias obtenidas en las repeticiones de aquellas diluciones que presentaron colonias que podían ser contabilizadas fácilmente (Figura 27).

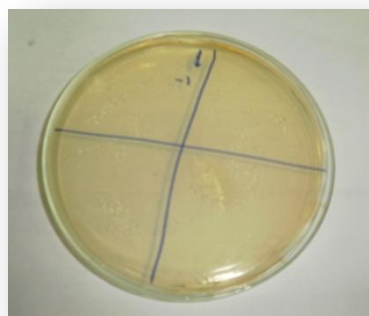


Figura 26. Agar Rogosa para la cuantificación

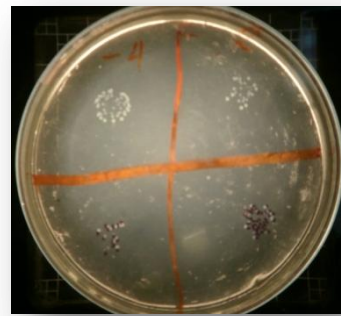


Figura 27. Conteo de colonias

El número de bacterias viables por muestra se expresa en UFC (Unidades Formadoras de Colonias), uno representa cada colonia contada.

El número mínimo estipulado de microorganismos viables es 1×10^6 UFC/g para que el alimento sea considerado como funcional (Fuller, 1989).

Se siguió la siguiente ecuación:

$$UFC \text{ total/ml} = \frac{\# \text{ de colonias contadas}}{\# \text{ de cuadrantes}} * \text{inverso de la dilución} * 20\mu\text{L} * 50\mu\text{L} \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde:

20 μ L es la cantidad que se utilizó de dilución

50 μ L es el factor para el cálculo en 1mL

Ejemplo. Para el lote 1 se eligió la dilución 10^{-4} , entonces:

$$Total \text{ UFC} = \frac{5}{4} \times 10^4 * 20\mu\text{L} * 50\mu\text{L} = 13 \times 10^6 / \text{gr de cápsulas}$$

Como 56 esferas = 1g:

56 cápsulas contienen 13×10^6 UFC de *Lactobacillus*

Por lo tanto para que el producto sea funcional es necesario adicionar:

$$56 \text{ cápsulas} \rightarrow 13 \times 10^6$$

$$560 \text{ cápsulas} \rightarrow 13 \times 10^7$$

Siguiendo la misma metodología para cada lote se tuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 10:

Tabla 10. Cápsulas necesarias en cada lote para ser considerado funcional

Lote	Dilución	Colonias	Cuadrantes	UFC/g	Cápsulas
1	10^{-4}	5	4	13×10^6	560
2	10^{-3}	9	4	23×10^5	560
3	10^{-5}	3	4	75×10^6	560



Aplicando la Ecuación 2 para cada lote se tiene como resultado que se requieren de 560 cápsulas en los 3 lotes para que la bebida sea funcional para el organismo, ya que el número de células viables de lactobacilos es el mismo para los tres lotes.

4.4. Análisis de perfil de textura.

La textura puede ser definida como los atributos que tiene un alimento resultado de la combinación de las propiedades físicas y las percibidas por nuestros órganos sensoriales (Chand, 1986) y es muy importante en la selección y preferencia de los alimentos, y además es reconocida como el mayor atributo de su calidad (Bourne, 1973).

El análisis de perfil de textura es un excelente procedimiento instrumental para medir, cuantificar y desarrollar nuevos parámetros relacionadas con la textura, aunque la magnitud de estos parámetros será influenciada por las variables introducidas en las mediciones como la tasa de deformación (Peleg, 1976) y para que ellas puedan proveer información objetiva y que se pueda comparar es necesario ejecutar las mediciones bajo condiciones estandarizadas. La evaluación de dicho parámetro es empleada en el desarrollo de nuevos alimentos, en el mejoramiento de los existentes, en el control de los procesos de elaboración y en el control de la calidad, ya que muchas de las propiedades texturales de los alimentos como la firmeza, dureza, etc., están directamente relacionadas con las propiedades mecánicas de los alimentos, es por ello que es importante su estudio y conocimiento para el control de calidad (Lu y Chen, 1998). Para determinar las propiedades texturales de los alimentos se usa una prueba empírica denominada Análisis de Perfil de Textura (TPA), que consiste en una prueba de doble compresión en las cuales se someten muestras del producto a una compresión del 80 a 90% de su altura inicial, lo cual resulta casi siempre en la ruptura del alimento. Demonte (1995), cita los siguientes principales parámetros texturales obtenidos con el TPA: fractura, dureza, cohesión, adhesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad.



Para el análisis del producto los parámetros más importantes a evaluar fueron dureza, cohesividad, elasticidad y masticabilidad, ya que son los de mayor relevancia para el caso del análisis en geles (Ver Tabla 11). En cuanto al análisis de los resultados se obtuvo la media y la desviación estándar de los datos obtenidos.

Tabla 11. Datos obtenidos de textura de las cápsulas

		Dureza	Cohesividad	Elasticidad	Masticabilidad
s/lactobacilo	x	0,1471	0,9252	0,3023	0,0455
	σ	0,1222	0,1152	0,0436	0,0431
c/lactobacilo	x	0,0156	0,62	0,9351	0,0227
	σ	0,0074	0,072	0,0796	0,0085

Comparando los datos de dureza hay una diferencia entre los valores presentando mayor dureza la cápsula que no contiene lactobacilo, esto se debe a un impedimento físico causado por la presencia del lactobacilo; la adsorción física es un fenómeno fácilmente reversible, es el resultado de las fuerzas intermoleculares de atracción entre las moléculas del sólido y la sustancia adsorbida. Estas fuerzas son llamadas fuerzas de Van der Waals las cuales posibilitan la adsorción de multicapa, ya que éstas se pueden extender desde la capa más interna hasta otras más externas; así mismo se observa el fenómeno de adsorción en donde interfiere también la química de las sustancias involucradas, en este caso el adsorbente (alginato) y el adsorbato (CaCl_2) unidos mediante enlaces químicos de tipo covalente. La transformación química de la especie adsorbida requiere una cierta energía llamada energía de activación la cual es necesaria para que se inicie el cambio químico (Seira, 2008). Se puede deber también al intercambio iónico el cual se produce como resultado de la atracción electrostática de los iones de una sustancia que se concentra en la superficie del sólido. La carga del ión es el factor que determina la adsorción por intercambio iónico. Para iones de igual carga, el tamaño molecular es el factor que determina el intercambio (Seira, 2008)

En cuanto a la cohesividad al ser la cápsula sin lactobacilo más dura y también más cohesiva; dichos datos son correspondientes al valor de elasticidad, lo cual indica que la cápsula con mayor dureza es menos elástica y por consiguiente requiere de una



mayor fuerza para reducir su consistencia y así pueda ser tragada lo que se ve reflejado en el valor de masticabilidad.

Como las moléculas de alginato están muy cerca unas de otras, a través de las interacciones con calcio, los enlaces hidrógeno se hacen más fácilmente y probablemente sean el factor más importante en la consolidación del gel (Rosas, 1994).

Cuando las soluciones de alginato se ponen en contacto con el calcio ionizado se forma de inmediato el gel en la interfase. Por lo tanto la gelación depende de la difusión de los iones a través de la membrana del gel, lo cual requiere tiempo (Rosas, 1994); lo que ocurre en el caso de la cápsula con lactobacilos es que se requiere del doble de tiempo para que ocurra la gelificación total. La protonación de los grupos carboxil conduce a la gelación, permitiendo que las moléculas de alginato interactúen más fácilmente a través de enlaces hidrógeno (Rosas, 1994). El lactobacilo actúa como barrera al impedir la inmediata interacción entre los enlaces, esto se ve reflejado en el aumento o disminución de los valores tanto de elasticidad como de dureza, respectivamente.

Todas las características texturales mencionadas anteriormente están relacionadas con el fenómeno de adsorción el cual a su vez depende de diversos factores como lo son principalmente:

- Área superficial: La adsorción es un fenómeno superficial, como tal, el grado de adsorción es proporcional al área superficial específica. El área superficial puede definirse como la porción de área total que está disponible para la adsorción. La velocidad y grado de adsorción para partículas de un determinado tamaño tendrían que variar de forma aproximadamente lineal con la dosificación de adsorbente (Seira, 2008). Para este caso no fue factor importante el tamaño de cápsula pero está íntimamente relacionado ya que a mayor tamaño de cápsula la velocidad de adsorción es menor y por el contrario, mientras más pequeña sea la cápsula su velocidad será mayor.



- Naturaleza del adsorbente: Cuando se considera la adsorción de una solución, se tiene que tener en cuenta el hecho de que la solubilidad del soluto influye, en gran parte, con el control del equilibrio de adsorción (Seira, 2008).
- pH: influye en la adsorción ya que también influye en el grado de ionización de los compuestos ácidos o básicos, el cual es un factor determinante de la adsorción (Seira, 2008).

4.5. Estabilidad.

Para la prueba de estabilidad se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 12. Resultados obtenidos de la prueba de estabilidad

	%H ₂ O	\bar{X}	σ	C.V
sin lacto	5.828	5.6130	1.2393	22.0806
	6.730			
	4.280			
con lacto	13.963	12.6088	0.9681	7.6785
	11.805			
	12.034			
	12.631			

De acuerdo a los datos obtenidos el porcentaje de agua liberada es mayor en el caso de las cápsulas que contenían lactobacilo, esto puede atribuirse a que el lactobacilo interfiere en la formación de enlaces entre las sales de calcio y el alginato de sodio.

Estructuralmente, los geles están formados por una red tridimensional coloidal continua, que mantiene al producto junto, con un medio más o menos viscoso embebido en él. La interacción entre ésta red coloidal y el medio viscoso determina el comportamiento mecánico y la estabilidad del sistema y por consiguiente da un ascenso en sus propiedades características como elasticidad (Rosenthal, 2001).



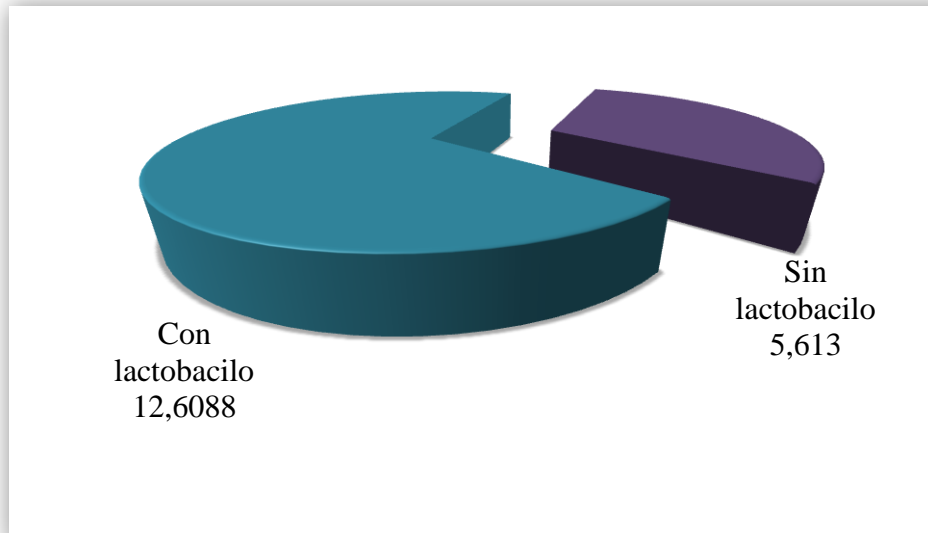


Figura 28. Medias de los resultados obtenidos de la prueba de estabilidad

Existen también fuerzas electrostáticas que surgen entre los grupos hidroxilos de la misma molécula de alginato que ayudan a conseguir una buena estabilidad en la estructura (Seira, 2008). Esas fuerzas se ven afectadas debido a la presencia del lactobacilo provocando así una menor capacidad de absorción de agua que dará como resultado un gel menos firme, de menor viscosidad que presenta sinéresis que es el caso de las cápsulas que lo contienen.

Alguna consideración para mejorar la estabilidad de las cápsulas que contienen *Lactobacillus* sería aumentando el tiempo de inmersión en la solución de cloruro de calcio para que interactúen los puentes de hidrógeno y ocurra la gelificación total; por otra parte se podría aumentar la concentración del cloruro de calcio sin modificar el tiempo de inmersión.

4.6. Evaluación sensorial.

Para la evaluación sensorial se aplicó la encuesta mostrada en el Anexo II, para este caso se usaron 3 formulaciones mostradas en las Figuras 29, 30 y 31.

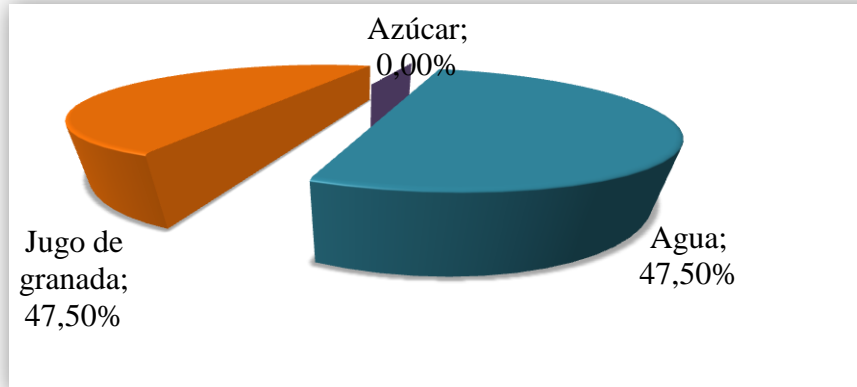


Figura 29. Formulación de la muestra 538 usada para la elaboración de una bebida funcional.

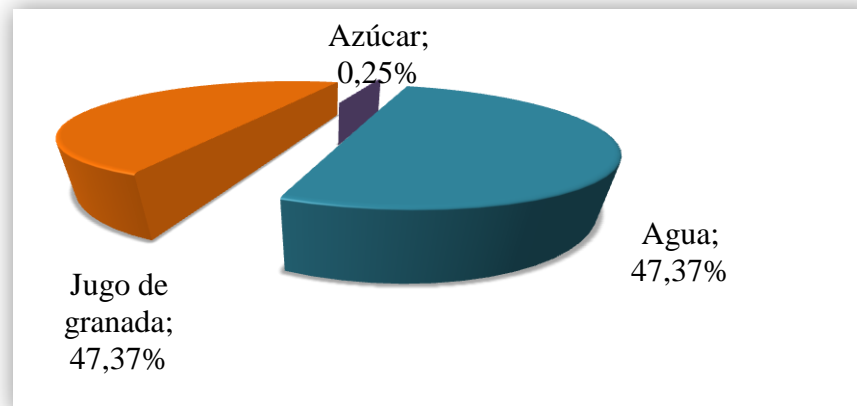


Figura 30. Formulación de la muestra 927 usada para la elaboración de una bebida funcional.

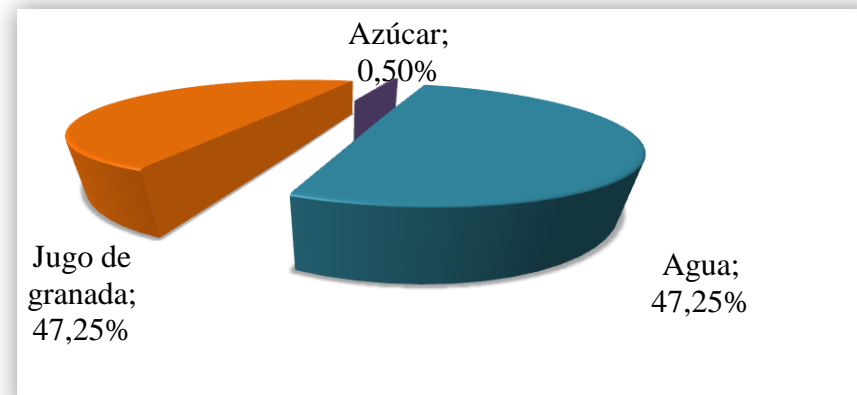


Figura 31. Formulación de la muestra 492 usada para la elaboración de una bebida funcional.

Para su análisis se hizo uso de las pruebas afectivas o hedónicas, entre ellas se encuentra la prueba de preferencia la cual nos ayuda a decidir cuál sería la mejor opción entre la elaboración de diversos productos en los que se ha utilizado diferentes formulaciones, todas igualmente convenientes (Liria, 2007).

A través de la prueba de categorías de preferencia se establece una escala ascendente o descendente en orden de preferencia o gusto. Esto permite evaluar la dirección de preferencia, sin embargo no se puede establecer el tamaño de la preferencia (Liria, 2007).

Debido a que son niveles de preferencia se trabajó con datos ordinales por lo tanto se usan pruebas no paramétricas: Prueba de Basker, Friedman o Kramer (Liria, 2007). Para este caso se utilizó la prueba de Kramer ya que se usa para determinar si existe un producto preferido frente a otros.

En esta prueba lo que se hace es comparar la suma total de preferencia de un producto vs la suma de los otros (“A” vs “B”, “A” vs “C” y “B” vs “C”) (Tabla 11). Se define el valor crítico utilizando la Tabla de Basker (Anexo IV), para una prueba con 50 panelistas y 3 productos el valor es 23.4. Cada columna vertical se resta con la columna horizontal, como se muestra en la tabla. En este caso los Productos B y C son diferentes al Producto A (porque el valor absoluto del Producto A es mayor a 23.4).

Tabla 13. Análisis de datos de una prueba de categorías de preferencia usando la Prueba de Kramer

Productos	Suma pref.	A. 538 123	B. 492 82	C. 927 95
A. 538	123	0	41	28
B. 492	82	-41	0	54
C. 927	95	-28	13	0

Por lo tanto al comparar la diferencia entre cada muestra se tiene:

$$A \text{ vs } B = B$$

$$A \text{ vs } C = C$$

$$B \text{ vs } C = C$$

Consecuentemente, el producto C es más preferido que el producto B, y el producto A es el de menor preferencia. Esto corresponde con los datos obtenidos de la encuesta que fue aplicada.

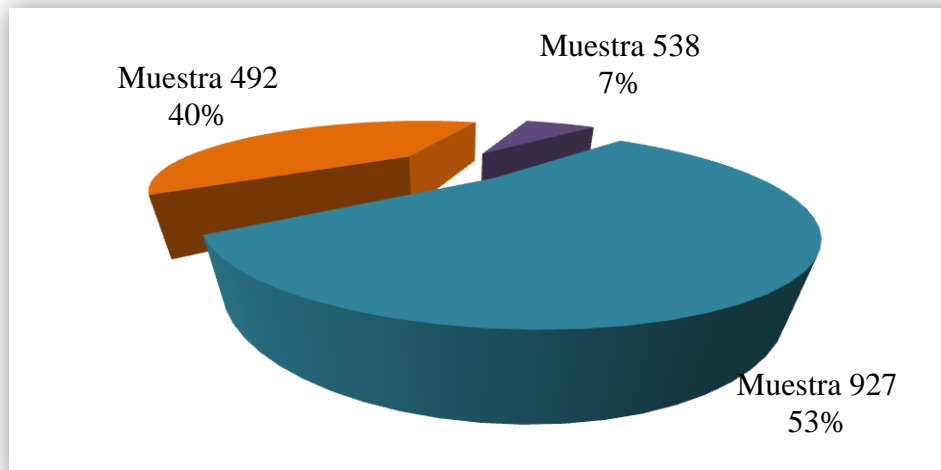


Figura 32. Datos obtenidos de la evaluación sensorial

La figura 30 nos muestra la respuesta de los consumidores de acuerdo con la preferencia de las formulaciones planteadas; en primer lugar se tiene que la formulación marcada con el código 927 es preferida por el 53% de los consumidores encuestados, comentando que el grado de dulzor es el adecuado para una bebida; por el contrario la muestra 538 la prefirió el 7% de los encuestados ya que su sabor era simple.

Conclusiones

De acuerdo a los objetivos planteados se concluye lo siguiente:

- La adición de *Lactobacillus* influye en los parámetros texturales de las cápsulas, teniendo como resultado una disminución en características como: dureza, cohesividad y masticabilidad.
- La estabilidad de las cápsulas se ve reflejada en el porcentaje de agua liberada y los resultados indicaron que las cápsulas con lactobacilo fueron menos estables, esto debido al impedimento físico que provoca el lactobacilo para la formación de enlaces.
- Se manejaron tres formulaciones a las cuales se les aplicó el mismo tratamiento para conocer el nivel de preferencia de cada una, el resultado dio como preferida la muestra marcada con el código 927 el que corresponde a la formulación:

Agua 47.37%

Jugo de granada 47.37%

Azúcar 0.25%

Agrado la presencia de la granada en el producto, esto apoya su carácter funcional ya que varió la aceptación en un porcentaje pequeño de los encuestados (6%) por lo que se decidió variar la concentración de azúcar y no la de granada.

- Algunas sugerencias para mejorar el producto podrían ser:
 - Enriquecerlo con vitaminas C y E para tener un mayor poder antioxidante
 - Mejorar la textura de las cápsulas debido a que no era del agrado de todos los encuestados su presencia en el producto
 - Mejorar su aspecto en general para hacerlo más atractivo al público



Bibliografía

- Abel, Mariné. (1973). Los alimentos. Cuestiones de bromatología. Selecciones de Scientific American, Madrid.
- Amako, K. (1983). Fine structure of bacteria, in Electron Micrograph of Bacteria. Ed. Nanzando. Tokyo.
- American Dietetic Association (2004). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. J Am Diet Assoc; 104:814-826.
- Anderson, D. (1996). Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. Mutat Res; 350: 103-8.
- Andreu-Sevilla, Antonio J., Signes-Pastor Antonio J., Ángel A. Carbonell-Barrachina (2001). “La granada y su zumo: Producción, Composición y Propiedades Beneficiosas para la Salud”. (UMH). Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Grupo de Calidad y Seguridad Alimentaria.
- Arai, S. (2001). A Mainstay of Functional Food Science in Japan – History, Present Status and Future Outlook. Biosci. Biotechnol. Biochem., 65 (1), 1-13.
- Bellisle, F., Diplock A. y Hornstra G. (1998). Functional food science in Europe. British Journal Nutrition. 80:3-4.
- Beristaín (2010). Revista Énfasis: Alimentación Latinoamérica. Publicaciones técnicas: Bebidas funcionales, sabor y buena salud.
- Blandino, A., Macias M., Cantero D. (1999). Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and Ca₂ concentration on gelation kinetics. Journal of Bioengineering, 88, 686-689.
- Bourne, M. (1973). Texture measurement of individual cooked dry beans by the puncture test. Journal of Food Science, 37(5), 751-753.
- Cai, H., Rodríguez B.T., Zhang W., Broadbent J.R., Steele J.L. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strain Shirota isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niches specificity. Microbiology 153: 2655-2665.
- Chand, N. (1986). Textural classification of food based on Warner-Bratzler Shear. Journal of Food Science and Technology, 23(1), 49-54.



- Chidambara, Murthy K.N., Jayaprakasha G.K., Singh R.P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agric Food Chem* 50:4791-4795.
- Ciencia Ahora (2009). Los probióticos y su utilidad terapéutica. Universidad de Concepción, Chile.
- Cubero, N., Montferrer A., Y Villalta J. (2002). Aditivos alimentarios Editorial Mundi-Prensa Libros, S.A. Madrid.
- Demonte, P. (1995). Evaluación sensorial de la textura y búsqueda de correlaciones con medidas instrumentales. Memorias de seminario textura y reología de alimentos.
- Du, C.T., et al. (1975). Anthocyanins of pomegranate *Punica granatum*. *J Food Sci*; 40: 417-18.
- FAO/OMS, (2001). Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Córdoba Argentina.
- Fonden, R., Mogensen G., Tanaka R. y Salminen S. (2000). Effect of culture- containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health. *Bulletin IDF-FIL*.352:5-30.
- Frazier, W. W. (2000). Microbiología de los alimentos. Zaragoza, España. Acribia.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man animals. *Journal Applied Bacteriology*. 66:365-378
- Gomes, A. y Malcata, X. (1999). *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. *Trends in Foods & Technology*10: 139-157.
- Guarner, F., Schaafsma G.J. (1998). Probiotics. *Int J Food Microbiol*, 39: 237-238.
- Halliwell, B (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*; 91: 14S-22S.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease. *Nutr Rev*; 55: S44-S52.
- Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H.J. (1992). Probiotics: A general view. In: Wood BJB: *The Lactic Acid Bacteria, Vol. 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, Chapman & Hall, New York, NY: 209–224.

- Jiménez, A. (2009). Efecto de diferentes fármacos sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Sección de graduados e investigación de alimentos.
- Jun-Nan, C., Ming-Ju C, Je-Ruei L, Chin-Wen L, Hsin-Yi C. (2005). Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. Journal of food science. Vol.70, Nr.5.
- Kandler, O. y Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 2. Williams and Wilkins Publications. Baltimore. Pp. 1209-1234.
- Karmelic, V. (1988). Los aditivos alimentarios. Rev. Alimentos vol. 13; 2: 3.
- Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. Free Radical Biol Med; 6: 617-37.
- Ko, J.S., Koo and H. Park (2008). Effects of alginate microencapsulation on the fibrinolytic activity of fermented soybean paste (*Cheunggukjang*) extract. Food Chemistry 111(4): 921-924.
- Lawrence, J.M., Bendich A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. FASEB J; 1: 441-5.
- Lee, Y. y Salminen S. (1995). The coming of age of probiotics. Trends in Food Science and Technology. 6:241–245.
- Lerma, A. (2004). Guía para el desarrollo de producto: un enfoque práctico. Thomson. México.
- Lilly, D. y Stilwell R.H. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147: 747- 748.
- Liu, Q., Michael Rauth A., Yu Wu X. (2007). Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification-internal gelation-adsorption-polyelectrolyte coating method. Int. J. Pharmaceut.
- Lu, R., Chen Y. (1998). Characterization of nonlinear elastic properties of beef products under large deformation. Transactions of the ASAE, 41(1), 163-168.
- Mac, F. (1993). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Panamericana. Argentina.



- Marin M., Bantar C., Monterisi A., Smayevsy J., Suárez de Basnec M.C. y Bianchini H. (1993). Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* spp. vancomicina-resistentes en materiales clínicos. *Infect. & Microbiol. Clin.* 5(4): 28-31.
- Matsuzaki, T. (1998). Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int J Food Microbiol.* 41:133-40.
- Mennickent, S., Green K. (2009). Los probióticos y su utilidad terapéutica. Universidad de Concepción. Chile.
- Metchnikoff, E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies.* W. Heinemann, London: 161-183.
- Mitsuoka, T. (1992). Intestinal flora and ageing. *Nutr Rev*, 50: 438-46.
- Nava, J. (2008). Evaluación de Bacterias Ácido Lácticas Comercializadas como Probióticas. Universidad de los Andes. Departamento de Biología. Merida – Colombia.
- Noda, Y., et al. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem*; 50: 166-71
- NOM-051-SCFI-1994. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.
- Ouwehand, A. C., Bianchi Salvadori B., Fonden R., Mogensen G. Y Salminen S. (2003). Health effects of probiotics and culture- containing dairy products in humans. *Bulletin IDF FIL.* 380: 4-19.
- Parker, R.B. (1974). Probiotics: the others half of the antibiotics story. *An Nutrition Health.* 29: 4-8.
- Pedroza, Islas R. (2002). Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de Alimentos para larvas de especies acuícolas. VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.
- Peleg, M. (1976). Texture of profile analysis parameters obtained by an INSTRON universal testing machine. *Journal of Food Science*, 41(3), 721-722.
- Pollack, C.L. (1984). Natural raw materials: in the development of applications of natural and artificial flavor systems 47-63. Allured Pu. Wheaton, I.L., USA.



- Rosas, M. (1994). Caracterización reológica de geles de alginato. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de Licenciatura.
- Rose, H. (1997). Microbiología química. Alambra. España.
- Rosenthal, A. (2001). Textura de los alimentos. Acribia. España.
- Salminen, S., Bouley C. y Boutron- Ruault M.C. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal Nutrition*. 80 (suppl): 147-171.
- Shah N. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*. 55: 46- 53.
- Seira, J. (2008). Adsorción del boro mediante perlas de alginato. Universidad Politécnica de Cataluña. España. Tesis doctorado.
- Shahidi, Fereidoon, PhD. (2000). “Natural Antioxidants: Sources, Effects and Applications”. Department of Biochemistry, University of Newfoundland St. John’s, Canadá.
- Spanhaak, S., Havenaar R. Y Schaafsma G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European Journal Clinical Nutrition* 12: 899-907.
- Takeshi, M. (2000). Health properties of milk fermented with *Lactobacillus casei* strain Shirota (LcS).
- Tannock, G.W. (1999). Analysis of the intestinal microflora: A renaissance. *Antonie van Leenwenhoek*, 76: 265-278.
- Tissier, H. (1906). Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l’intestin. *CR.Soc Biol*, 60: 359-361.
- Valls i Bellés, Victoria (2000). El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal: Vitaminas y polifenoles. Facultad de medicina, Universidad de Valencia.
- Van der Waaij, D., Berghuis-de Vries J.M., Lekkerkerk–van der Wees, J.E.C. (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)*, 69: 405-11.
- Vilar-Rojas, C., Guzmán-Grenfell A.M., Hicks J.J. (1996) Participation of oxygenfree radicals in the oxido-reduction of proteins. *Arch Med Res*; 27: 1-6.

- Villavicencio, L. (2006). Viabilidad de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* en jugo de cranberry. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en Alimentos. Tesis licenciatura.
- Vollaard, E.J., Clasener H.A. (1994). Colonization resistance. Antimicrob Agents Chemother, 38: 409-14.
- Xiu-dong, L, Wei-ting Y, Jun—zhang L, Xiao-jun M, Quan Y. (2007). Diffusion of Acetic Acid Across Oil/Water Interface in Emulsification-Internal Gelation Process for Preparation of Alginate Gel Beads. CHEM. RES.CHINESEU. 23(5), 579-584.
- Yáñez, J., Salazar J.A., Chaires L., Jiménez J., Márquez M., Ramos E.G. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Avance y perspectiva vol.21.
- Yokokura, T., Watanuki M., Gohgi T., Tanaka R., Ohwaki M., Tohyama K., Ozaki H., Yasutake, N. (1999). *Lactobacillus casei* strain Shirota; Intestinal Flora and Human Health. Yakult Honsha, Tokyo.
- Zorica, Juranić1, Željko Žižak. (2005). Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects. BioFactors Journal, 23(4).

Revistas en línea

- Amores R., Calvo A., Maestre J. R. y Martínez- Hernández D. Probióticos. Revisión. Rev. Esp. Quimioterap [En línea] 2004, 17(2):131-139: [Fecha de consulta: Agosto 2011] Disponible en: <http://seq.es/seq/0214-3429/17/2/131.pdf>
- Arribas B., Rodríguez M.E., Camuesco D., Zarzuelo A., Gálvez J. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. Ars Pharm [En línea] 2008, 49(1):5-30: [Fecha de consulta: Agosto 2011] Disponible en: http://farmacia.ugr.es/ars/ars_web/#
- Beristain, C. I.Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Rodríguez-Huezo, M. E., Verde-Calvo, J. R.. Applications of soluble dietary fibers in beverages. Revista Mexicana de Ingeniería Química [en línea] 2006, 5 (Sin mes) : [fecha de consulta: 26 de octubre de 2011] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=62050107> ISSN 1665-2738



- Contreras L., Elizabeth Jaimez O., Judith, Soto R., Juan Carlos, Castañeda O., Aracelí, Añorve M., Javier. Aumento del contenido proteico de una bebida a base de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Revista Chilena de Nutrición [en línea] 2011, 38 (Septiembre) : [fecha de consulta: 24 de agosto de 2011] Disponible en: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=46921378013> ISSN 0716-1549
- González Torres, María Cristina; Betancourt Rule, Miguel; Ortiz Muñiz, Rocío. Daño Oxidativo y Antioxidantes. Bioquímica [en línea] 2000, 25 (Enero-Marzo): [fecha de consulta: 30 de septiembre de 2011] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57611797001> ISSN 0185-5751.
- Pía Taranto, María; Médici, Marta; Font Valdez, Graciela. Alimentos funcionales probióticos. Química Viva [en línea] 2005, 4 (mayo): [fecha de consulta: 24 de septiembre de 2011] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=86340104> ISSN 1666-7948
- Rivera, Juan A, Muñoz-Hernández, Onofre, Rosas-Peralta, Martín, Aguilar-Salinas, Carlos A, Popkin, Barry M, Willett, Walter C. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. Salud Pública de México [en línea] 2008, 50 (Marzo-Abril) : [fecha de consulta: 4 de octubre de 2011] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=10650210> ISSN 0036-3634
- Rodriguez-LLimos A.C, Chiappetta D, Szeliga M.E, Fernández A, Bregni C. Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol. Ars Pharm [En línea] 2003, 44:4;333-342: [Fecha de consulta: Octubre 2011] Disponible en: http://farmacia.ugr.es/ars/ars_web/#
- Ruíz Martínez, M.A., Martín Villena M.J., Morales Hernández M.E., Gallardo Lara V. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para encapsular probióticos. Ars Pharm [En línea] 2009, 50(1): 43-50: [Fecha de consulta: Noviembre 2011] Disponible en: http://farmacia.ugr.es/ars/ars_web/# ISSN 0004-2927.
- Salamanca G., Guillermo Osorio T., Mónica Patricia, Montoya, Leidy Marcela. Elaboración de una bebida funcional de alto valor biológico a base de borojo (Borojoa



patinoi Cuatrec). Revista Chilena de Nutrición [en línea] 2010, 37 (Marzo) : [fecha de consulta: 29 de julio de 2011] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=46912524009> ISSN 0716-1549.

- Vanegas Pérez, Luz Stella, Restrepo Molina, Diego Alonso, López Vargas, Jairo Humberto. Características de las bebidas con proteína de soya. Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín [en línea] 2009, 62 (Sin mes) : [fecha de consulta: 20 de agosto de 2012] Disponible en: <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=179914590015>> ISSN 0304-2847.

Páginas de internet

- Alimentos de Régimen o Dietéticos. Código Alimentario Argentino. Capítulo XVII. Consultado en Agosto de 2011. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/codigoa/Capitulo_XVII.pdf
- Alimentos Funcionales. International Food Information Council (IFIC) (2006). Consultado en Agosto de 2011. Disponible en: <http://www.ific.org/sp/nutrition/functional/index.cfm>
- Antioxidantes naturales: los más recientes benefactores de la salud. Consultado Noviembre de 2011. Disponible en: www.revista.consumer.es.
- Pinto, F., Cocina molecular: selecciones argentina. Consultado Septiembre de 2011. Disponible en: http://ar.selecciones.com/contenido/a1171_cocina_molecular
- Técnicas esferificación. Gourmetología. Consultado Octubre de 2011. Disponible en: www.gourmetol.com/es/tecnicas/esferificacion

ANEXOS



Anexo I. Encuesta para estudio de mercado

SEXO:

EDAD:

FECHA:

La siguiente encuesta tiene como finalidad determinar la viabilidad de una bebida funcional

1. ¿Consumes agua natural?

sí no

¿Por qué? _____

2. ¿En qué cantidad?

~~menos de 2 lts.~~ 2 lts. más de 2 lts.

3. ¿Consumes bebidas adicionadas con vitaminas o algún beneficio extra?

sí no

¿Cuáles? _____

4. ¿Sabes que es un lactobacilo?

sí no

5. ¿Consumes lactobacilos?

sí no

¿En qué productos? _____

6. ¿Sabes que es un antioxidante?

sí no

7. ¿Consumes alguno?

sí no

8. ¿Te gustaría consumir una ~~agua saborizada~~ ~~adicionada~~ con lactobacilos y un antioxidante?

sí no

¿Por qué? _____

9. ¿En qué presentación la consumirías?

500 ml 1 lt. 1.5 lts.

10. ¿Cuánto pagarías por una presentación de 500 ml?

\$10 \$12.5 \$15 más de \$15

¡¡¡GRACIAS!!!



Anexo II. Encuesta para evaluación sensorial

Sexo: M _____ F _____

Edad: 15-20 _____ 20-25 _____ >25 _____

Observa y prueba la muestra, contesta lo que se te pide

<p>1. De acuerdo a su vista en general</p> <p style="text-align: right;">538 927 492</p> <p>Gusta muchísimo Gusta mucho Gusta moderadamente Gusta poco Me es indiferente Disgusta poco Disgusta moderadamente Disgusta mucho Disgusta muchísimo</p>	<p>4. De acuerdo a su sabor en general</p> <p style="text-align: right;">538 927 492</p> <p>Gusta muchísimo Gusta mucho Gusta moderadamente Gusta poco Me es indiferente Disgusta poco Disgusta moderadamente Disgusta mucho Disgusta muchísimo</p>
<p>2. De acuerdo al color</p> <p style="text-align: right;">538 927 492</p> <p>Gusta muchísimo Gusta mucho Gusta moderadamente Gusta poco Me es indiferente Disgusta poco Disgusta moderadamente Disgusta mucho Disgusta muchísimo</p>	<p>5. De acuerdo al dulzor</p> <p style="text-align: right;">538 927 492</p> <p>Gusta muchísimo Gusta mucho Gusta moderadamente Gusta poco Me es indiferente Disgusta poco Disgusta moderadamente Disgusta mucho Disgusta muchísimo</p>
<p>3. De acuerdo al aroma</p> <p style="text-align: right;">538 927 492</p> <p>Gusta muchísimo Gusta mucho Gusta moderadamente Gusta poco Me es indiferente Disgusta poco Disgusta moderadamente Disgusta mucho Disgusta muchísimo</p>	<p>6. De acuerdo a la textura</p> <p style="text-align: right;">538 927 492</p> <p>Gusta muchísimo Gusta mucho Gusta moderadamente Gusta poco Me es indiferente Disgusta poco Disgusta moderadamente Disgusta mucho Disgusta muchísimo</p>
	<p>7. Ordena 1, 2, 3 las muestras según te hayan agradado</p> <p>1. 2. 3.</p>

Anexo III. Técnica de tinción de gram

Esta es una técnica de información sobre propiedades estructurales de las bacterias que permiten separarlas en dos grupos: gram positivas y gram negativas.

Los cultivos s deben de teñir jóvenes (incubados con un máximo de 24 horas), esto debido a que los cultivos viejos liberan enzimas por autólisis y atacan la pared celular modificando sus propiedades estructurales y convirtiendo los gérmenes en gram positivos en gram negativos.

Procedimiento:

1. Preparar un frotis para tinción de un cultivo de 18 a 24 horas y fijar con calor
2. Añadir solución de cristal violeta-oxalato de amonio durante 1 min
3. Lavar con agua
4. Agregar solución de lugol (mordiente) durante 1 min
5. Decantar la solución de lugol sin lavar
6. Decolorar con algunas gotas de acetona, o alcohol acetona no más de 4 seg
7. Lavar rápidamente con agua
8. Contrastar con safranina (colorante de contraste) al 0.5%, 1 min
9. Lavar y secar la laminilla

Toda laminilla deberá ser cubierta con cada reactivo y eliminar éste en cada etapa, excepto en la de lugol que no se lava. Cantidades insuficientes de reactivos darán como resultado una tinción o decoloración pobre.

Otra situación que puede aparecer es que cultivos viejos gram positivos, pueden llegar a observarse gram negativos como es frecuente con los *Lactobacillus* que pueden envejecer muy rápido. Lo cual debe estandarizarse cuidadosamente para no tener falsos positivos o falsos negativos.



Anexo IV. Tabla de Prueba de Basker y Kramer “Valor crítico de diferencia entre suma de categorías”

Número de panelistas	Número de productos									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
20	8.8	14.8	21.0	27.3	33.7	40.3	47	53.7	60.6	
21	9.0	15.2	21.5	28.0	34.6	41.3	48.1	55.1	62.1	
22	9.2	15.5	22.0	28.6	35.4	42.3	49.2	56.4	63.5	
23	9.4	15.9	22.5	29.3	36.2	43.2	50.3	57.6	65.0	
24	9.6	16.2	23.0	29.3	36.9	44.1	51.4	58.9	66.4	
25	9.8	16.6	23.5	29.9	37.7	45.0	52.5	60.1	67.7	
26	10.0	16.9	23.9	30.5	38.4	45.9	53.5	61.3	69.1	
27	10.2	17.2	24.4	31.1	39.2	46.8	54.6	62.4	70.4	
28	10.4	17.5	24.8	31.7	39.9	47.7	55.6	63.6	71.7	
29	10.6	17.8	25.3	32.3	40.6	48.5	56.5	64.7	72.9	
30	10.7	18.2	25.7	32.8	41.3	49.3	57.5	65.8	74.2	
31	10.9	18.5	26.1	33.4	42.0	50.2	59.4	66.9	75.4	
32	11.1	18.7	26.5	34.0	42.6	51.0	60.3	60.3	76.6	
33	11.3	19.0	26.9	35.0	43.3	51.7	61.2	69.0	77.8	
34	11.4	19.3	27.3	35.6	44.0	52.5	62.1	70.1	79.0	
35	11.6	19.6	27.7	36.1	44.6	53.3	63	71.1	80.1	
36	11.8	19.9	28.1	36.6	45.2	54.0	63.9	72.1	81.3	
37	11.9	20.2	28.5	37.1	45.9	54.8	64.7	73.1	82.4	
38	12.1	20.4	28.9	37.6	46.5	55.5	67.2	74.1	83.5	
39	12.2	20.7	29.3	38.1	47.1	56.3	65.6	75.0	84.6	
40	12.4	21.0	29.7	38.6	47.7	57.0	66.4	76.0	85.7	
41	12.6	21.2	30.0	39.1	48.3	57.7	67.2	76.9	86.7	
42	12.7	21.5	30.4	39.5	48.9	58.4	68	77.9	87.8	
43	12.9	21.7	30.8	40.0	49.4	59.1	68.8	78.8	88.8	
44	13.0	22.0	31.1	40.5	50.0	59.8	69.6	79.7	89.9	
45	13.1	22.2	31.5	40.9	50.6	60.4	70.4	80.6	90.9	
46	13.3	22.5	31.8	41.4	51.1	61.1	71.2	81.5	91.9	
47	13.4	22.7	32.2	41.8	51.7	61.8	72	82.4	92.1	
48	13.6	23.0	32.5	42.3	52.2	62.4	72.7	83.2	93.8	
49	13.7	23.2	32.8	42.7	52.8	63.1	73.5	84.1	94.8	
50	13.9	23.4	33.2	43.1	53.3	63.7	74.2	85.0	95.8	
55	14.5	24.6	34.8	45.2	55.9	66.8	77.9	89.1	100.5	
60	15.2	25.7	36.3	47.3	58.4	69.8	81.3	93.1	104.9	
65	15.8	26.7	37.8	49.2	60.8	72.6	84.6	96.9	109.2	
70	16.4	27.7	39.2	51.0	63.1	75.4	87.8	100.5	113.3	
80	17.5	29.6	42.0	54.6	67.4	80.6	93.9	107.5	121.2	
90	18.6	31.4	44.5	57.9	71.5	85.5	99.6	114.0	128.5	
100	19.6	33.1	46.9	61.0	75.4	90.1	105	120.1	135.5	
110	20.6	34.8	49.2	64.0	79.1	94.5	110.1	126.0	142.1	
120	21.5	36.3	51.4	66.8	82.6	98.7	115	131.6	148.4	

Fuente: Lawlees HT, Heymann H., 1998.