

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD QUERÉTARO

**“Microencapsulación de bacterias probióticas utilizando almidón
de amaranto como material de pared”**

Tesis que presenta:

Reyna Nallely Falfán Cortés

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en la Especialidad de Materiales

Director de la tesis:

Dr. Fernando Martínez Bustos

Santiago de Querétaro, Qro.

Febrero 2014

**CINVESTAV
IPN
ADQUISICION
LIBROS**

CLASIF.. CA 00227
ADQUIS.. CA-242-551
FECHA: 30-Enero-2015
PROCED.. Do. = 2015
\$ _____

ID: 218070-1001

DEDICATORIA

*A **Díos** por permitirme vivir y aprender de la vida*

Gracias...

A mis padres

Francisca Cortés Velásquez

Armando Falfán Ceballos

Hermanos

Verónica Falfán Cortés

Armando Falfán Cortés

Mis sobrinitos hermosos

Vania, Vanessa y Said

*Y en especial a **Netza***

... Por confiar en mí siempre y no dejarme caer en momentos difíciles y gozar conmigo aquellos momentos felices ustedes son mi familia y por ustedes luchar en la vida tiene sentido, los Amo.

AGRADECIMIENTOS

A **CONACYT** por su apoyo y aceptación como becario durante la realización de este trabajo de investigación.

A **CINVESTAV** Querétaro y al Colegio de Profesores, por darme la aceptación al programa de doctorado y el apoyo para permanecer hasta el final.

Al **Dr. Fernando Martínez Bustos**, por la oportunidad que me dio de realizar este proyecto a su cargo y por sus aportaciones a este trabajo.

A cada miembro del Comité de Tesis, Dra. Silvia Amaya, Dr. Gerónimo Arámbula, Dr. Pedro Vázquez, Dr. Iñigo Verdalet, Dr. Juan de Dios Figueroa y Dr. Fernando Martínez por su tiempo y aportaciones a este trabajo.

Al **Dr. Carlos Grosso** por su hospitalidad para la estancia de investigación en la Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil.

A todos los auxiliares de laboratorio: especialmente Dra. Marcela Gaytán, M.C. Juan Vélez y M.C. Edmundo Gutiérrez, José Eleazar Urbina por su oportuno apoyo en el laboratorio y en las técnicas de análisis de su especialidad.

Al todo el personal administrativo que me dio apoyo a lo largo de mis estudios para llevar a cabo los trámites convenientes, especialmente a Mónica Hernández, Margarita Escobosa y Raquel Badillo.

A mi segunda familia hecha en esta etapa de mi vida (mis amigos): Raquel, Mara, Lizbeth, Paty, Sandra , Richo, Lizeth, Amira, Pepe, Gerardo, Chio, Liliana, Fany, Jael, Lalo Elizalde y Marco. Y en especial a **Marcela Gaytán** amiga gracias por tu confianza y apoyo que siempre brindaste en mi camino.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Probióticos.....	3
2.1.1 Características generales.....	3
2.1.2 Probióticos en la salud.....	5
2.1.2.1 Prevención de infecciones intestinales.....	6
2.1.2.2 Mejoramiento del sistema inmunológico.....	6
2.1.2.3 Prevención del cáncer de colon.....	7
2.1.2.4 Prevención de la hipercolesterolemia.....	7
2.1.2.5 Mejora de utilización de la lactosa.....	7
2.1.2.6 Prevención de enfermedades del tubo digestivo y estabilización de la mucosa intestinal	8
2.1.2 Probióticos en los alimentos.....	8
2.2 Microencapsulación de probióticos.....	10
2.2.1 Materiales de pared en la microencapsulación de probióticos.....	12
2.2.2 Métodos de microencapsulación de probióticos.....	12
2.2.3 Secado por aspersión.....	13
2.3 Almidón.....	18
2.3.1 Características generales.....	18
2.3.2 Estructura química del almidón.....	19
2.3.3 Cambios estructurales y funcionales del almidón.....	22
2.4 Almidones modificados.....	24
2.4.1 Características generales.....	24
2.4.2 Modificación del almidón por extrusión reactiva.....	25
2.4.3 Modificación del almidón por hidrólisis ácida.....	28
2.4.4 Modificación química del almidón por métodos convencionales.....	30
2.4.4.1 Reacciones de oxidación.....	31
2.4.4.2 Reacciones de entrecruzamiento.....	32
2.4.4.3 Reacciones de eterificación.....	32
2.4.4.4 Reacciones de esterificación.....	33
2.4.4.4.1 Almidones acetilados.....	33
2.4.4.4.2 Almidones succinatados.....	35
2.4.4.4.3 Almidones fosfatados.....	36
2.5 Amaranto.....	37
2.5.1 Características generales.....	37
2.5.2 Almidón de amaranto.....	38
3. HIPOTÉISIS.....	40
4. OBJETIVOS.....	41
4.1 Objetivo general.....	41
4.2 Objetivos específicos.....	41

5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1 Metodología general.....	42
5.2 Materias primas.....	43
5.3 Metodología.....	43
5.3.1 Extracción del almidón de amaranto.....	43
5.3.2 Caracterización del almidón de amaranto.....	44
5.3.2.1 Contenido de humedad.....	44
5.3.2.2 Determinación del contenido de proteína.....	45
5.3.2.3 Determinación del contenido del extracto etéreo.....	45
5.3.2.4 Determinación del contenido de cenizas.....	46
5.3.2.5 Caracterización morfológica de los gránulos (SEM).....	47
5.3.2.6 Contenido de amilosa.....	47
5.3.2.7 Perfiles de viscosidad.....	48
5.3.2.8 Propiedades térmicas.....	48
5.3.3 Hidrolisis ácida.....	49
5.3.4 Modificaciones químicas del almidón.....	49
5.3.4.1 Fosfatación de almidón por extrusión termoplástica.....	49
5.3.4.2 Acetilación de almidón usando el método convencional.....	50
5.3.4.3 Succinación de almidón usando el método convencional.....	50
5.3.5 Caracterización fisicoquímica de los almidones modificados.....	51
5.3.5.1 Grado de sustitución (GS) en almidón fosfatado.....	51
5.3.5.2 Grado de sustitución (GS) en almidón acetilado.....	53
5.3.5.3 Grado de sustitución (GS) en almidón succinatado.....	53
5.3.5.4 Índice de Solubilidad en Agua (ISA) e Índice de Absorción de Agua (IAA).....	54
5.3.6 Microencapsulación de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.....	55
5.3.6.1 Supervivencia después del proceso del secado por aspersión.....	56
5.3.7 Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersión.....	57
5.3.7.1 Contenido de humedad.....	57
5.3.7.2 Actividad de agua.....	57
5.3.7.3 Morfología macroscópica de colonias.....	57
5.3.7.4 Tinción de Gram.....	57
5.3.8 Estabilidad de las microcápsulas con <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 a 25°C y 4°C.....	58
5.3.9 Supervivencia de los microorganismos encapsulados <i>Bifidobacterium</i> <i>breve</i> ATCC 15700 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 en un sistema modelo alimentario (avena instantánea).....	59
5.3.10 Tolerancia de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 microencapsulado a condiciones simuladas del Tracto Gastrointestinal (TGI).....	59
5.3.11 Caracterización morfológica externa de las microcápsulas (SEM)...	60
5.4 Análisis estadístico.....	60
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
6.1 Extracción del almidón de amaranto.....	61
6.1.1 Rendimiento del proceso.....	61
6.2 Caracterización del almidón de amaranto.....	62
6.2.1 Contenido de humedad.....	62

6.2.2 Determinación del contenido de proteína.....	63
6.2.3 Determinación del contenido del extracto etéreo.....	64
6.2.4 Determinación de cenizas.....	65
6.2.5 Caracterización morfológica de los gránulos (SEM).....	65
6.2.6 Contenido de amilosa.....	66
6.2.7 Perfiles de viscosidad.....	67
6.2.8 Propiedades térmicas.....	68
6.3 Perfil de viscosidad de los almidones hidrolizados.....	71
6.4 Caracterización fisicoquímica de los almidones modificados.....	73
6.4.1 Grado de sustitución (GS) en almidón fosfatado.....	73
6.4.2 Grado de sustitución (GS) en almidón acetilado.....	74
6.4.3 Grado de sustitución (GS) en almidón succinatado.....	75
6.4.4 Índice de Solubilidad en Agua (ISA) e Índice de Absorción de Agua (IAA).....	76
6.4.5 Perfiles de viscosidad.....	78
6.5 Microencapsulación de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.....	79
6.5.1 Supervivencia después del proceso del secado por aspersión.....	79
6.6 Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersión.....	83
6.6.1 Contenido de humedad y actividad de agua.....	83
6.6.2 Morfología macroscópica de colonias y Tinción de Gram.....	85
6.7 Estabilidad de las microcápsulas con <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 a 25°C.....	86
6.8 Estabilidad de las microcápsulas con <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 a 4°C.....	95
6.9 Supervivencia de los microorganismos encapsulados <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 en un sistema modelo alimentario (avena instantánea).....	99
6.10 Tolerancia de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 microencapsulado a condiciones simuladas del Tracto Gastrointestinal (TGI).....	101
6.11 Caracterización morfológica de las microcápsulas (SEM).....	104
7. CONCLUSIONES.....	108
8. REFERENCIAS.....	110
ANEXO I.....	127

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Factores tecnológicos que influyen la funcionalidad de probióticos.....	10
Figura 2. Estructura química de las moléculas de la amilosa y amilopectina.....	20
Figura 3. Estructura del gránulo de almidón.....	22
Figura 4. Tratamiento hidrotérmico del almidón nativo.....	23
Figura 5. Representación esquemática de un sistema de extrusión reactiva usado para la modificación del almidón.....	27
Figura 6. Mecanismo de reacción durante la hidrólisis ácida del almidón...	29
Figura 7. Reacciones de modificación química de almidón.....	31
Figura 8. Reacciones químicas durante la acetilación del almidón.....	34
Figura 9. Reacción química durante la succinación del almidón.....	35
Figura 10. Reacción química durante la fosfatación del almidón.....	36
Figura 11. Esquema general del desarrollo de la investigación.....	42
Figura 12. Microfotografía de gránulos de almidón nativo de amaranto obtenido por molienda húmeda-alcalina.....	66
Figura 13. Viscoamilograma de almidón nativo de amaranto.....	67
Figura 14. Termograma de gelatinización del almidón nativo de amaranto.....	70
Figura 15. Perfiles de viscosidad para los almidones hidrolizados de amaranto.....	73
Figura 16. Perfiles de viscosidad para los almidones modificados de amaranto.....	79
Figura 17. Morfología macroscópica de las colonias de a) y b) <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y c) y d) <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.....	85
Figura 18. Sobrevivencia de microcápsulas de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 encapsulado durante el almacenamiento a 25°C.....	88
Figura 19. Sobrevivencia de microcápsulas de <i>Lactobacillus casei</i> ATTCC 334 durante el almacenamiento a 25°C.....	91
Figura 20. Sobrevivencia de microcápsulas de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 durante el almacenamiento a 4°C.....	94
Figura 21. Sobrevivencia de microcápsulas de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 durante el almacenamiento a 4°C.....	97
Figura 22. Sistema alimentario modelo de microcápsulas con probióticos y avena comercial instantánea.....	99
Figura 23. Sobrevivencia de mezcla de avena con microcápsulas de a) <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y b) <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 microencapsulados.....	100
Figura 24. Tolerancia a condiciones simuladas del Tracto Gastrointestinal (TGI) de a) de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 y b) <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 microencapsulados.....	102
Figura 25. Microfotografías de microcápsulas con <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 después del secado por aspersion.....	105
Figura 26. Microfotografías de microcápsulas con <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 después del secado por aspersion.....	105
Figura 27. Microfotografías de microcápsulas con <i>B. breve</i> ATCC 15700 después de 21 días de almacenamiento a a_w de 0.329 y 25°C de almacenamiento: a) almidón acetilado b) almidón fosfatado c) almidón	

succinatado y d) almidón control.....	106
Figura 28. Microfotografías de microcápsulas con <i>B. breve</i> ATCC 15700 después de 21 días de almacenamiento a a_w de 0.355 y 4°C de almacenamiento: a) almidón acetilado b) almidón fosfatado c) almidón succinatado y d) almidón control.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Bacterias probióticas microencapsuladas en diferentes sistemas poliméricos.....	14
Tabla 2. Características de los gránulos de almidón de diversas fuentes...	21
Tabla 3. Diferentes tipos de modificación del almidón y técnicas de preparación.....	26
Tabla 4. Composición proximal del grano y almidón nativo de amaranto.....	62
Tabla 5. Parámetros de viscosidad del almidón nativo de amaranto determinados por RVA.....	68
Tabla 6. Propiedades térmicas del almidón de amaranto nativo obtenidas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	70
Tabla 7. Índice de Absorción de Agua (IAA) e Índice de Solubilidad en Agua (ISA) de almidones de amaranto nativo y modificados químicamente.....	77
Tabla 8. Supervivencia después del secado por aspersión de <i>B. breve</i> ATCC 15700 encapsulado con almidones de amaranto modificados y un control.....	81
Tabla 9. Supervivencia después del secado por aspersión de <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con almidones de amaranto modificados y un control.....	83
Tabla 10. Actividad de agua (aw) y humedad de las microcápsulas con probióticos microencapsulados con almidones de amaranto modificados y un control.....	84
Tabla 11. Análisis de varianza de la supervivencia de células microencapsuladas de <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700 (Log UFC/g) almacenadas a 25°C de temperatura y 21 días de almacenamiento.....	89
Tabla 12. Análisis de varianza de la supervivencia de células microencapsuladas de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 (Log UFC/g) almacenadas a 25°C de temperatura y 21 días de almacenamiento.....	92
Tabla 13. Análisis de varianza de la supervivencia de células microencapsuladas de <i>Bifidobacterim breve</i> ATCC 15700 (Log UFC/g) almacenadas a 4°C de temperatura.....	96
Tabla 14. Análisis de varianza de la supervivencia de células microencapsuladas de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 (Log UFC/g) almacenadas a 4°C de temperatura.....	98

RESUMEN

La viabilidad de bacterias probióticas en un producto alimenticio es un factor crítico, ya que tienen que sobrevivir durante el procesamiento y la vida útil de los alimentos. Los objetivos de este estudio fueron desarrollar y caracterizar almidones derivatizados de amaranto usando la tecnología de extrusión termoplástica y evaluar su funcionalidad como agentes encapsulantes de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en el secado por aspersión, determinar su sobrevivencia durante el almacenamiento a 25°C y 4°C y la viabilidad en un sistema alimentario (avena instantánea), así como su tolerancia a condiciones simuladas del Tracto Gastrointestinal (TGI). Los almidones derivatizados fueron reducidos en su viscosidad e incrementada su solubilidad en agua. En general, los almidones modificados de amaranto y el almidón control no ofrecen una buena protección a ambos géneros de probióticos durante el almacenamiento a 25°C. Sin embargo, se registró una excelente viabilidad de las células durante todo el tiempo de almacenamiento a 4°C para ambos géneros, manteniéndose superior a 10^6 - 10^7 UFC/g concentración recomendada para aplicaciones terapéuticas. Las microcápsulas presentaron una cobertura uniforme de las células y sin evidencia de la presencia de células en el exterior de las mismas. El almacenamiento durante un periodo de 35 días a 25°C de las mezclas de avena con microcápsulas de amaranto succinatado con probióticos presentó una menor reducción en la viabilidad de estas con relación al almidón control. También este almidón de amaranto succinatado conteniendo probióticos presentó mayor resistencia a las condiciones simuladas del TGI. Las técnicas de preparación de almidones modificados fueron eficaces en la producción de materiales de pared para encapsulamiento de *B. breve* y *L. casei*. Así como su estabilidad durante el almacenamiento, en un sistema alimentario y con tolerancia a condiciones simuladas del TGI.

Palabras clave: probióticos, microencapsulación, almidones de amaranto, secado por aspersión.

ABSTRACT

The viability of probiotic bacteria in a food product is critical, since they must survive during processing and shelf life of food. The objectives of this study were to develop and characterize amaranth starches using a thermoplastic extrusion technology and assess its functionality as encapsulant agents of *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 during spray drying, to determine their survival during storage at 25°C and 4°C, viability in a food system (instant oatmeal) and their tolerance in simulated conditions of the gastrointestinal tract (GIT). The derivative starches were reduced in viscosity and increased their water solubility. In general, the modified amaranth starches and the control did not provide good protection to both genres of probiotics during storage at 25°C. However, there was excellent cell viability during the time of storage at 4°C for both genres, remaining above 10^6 - 10^7 CFU/g, a recommended concentration for therapeutic applications. The microcapsules had a uniform cell coverage and no evidence of the presence of cells outside thereof. The storage for a period of 35 days at 25°C of oat mixtures with succinylated amaranth microcapsules and probiotics showed less reduction in viability of these starches relative to control. Also this succinylated amaranth starch with probiotics presented higher resistance to simulated conditions of GIT. The techniques of starch preparation were effective in producing wall materials for encapsulating *B. breve* and *L. casei*, as well as their stability during storage in a food system and tolerance to simulated of GIT.

Key words: probiotics, microencapsulation, amaranth starches, spray drying.

1. INTRODUCCION

La Federación Internacional de Lácteos (IDF) ha sugerido que un mínimo de 10^6 - 10^7 UFC/ g de células probióticas bacterianas deberán estar vivas en el tiempo de consumo de un alimento adicionado de microorganismos probióticos para producir beneficios terapéuticos (FAO/WHO 2001). La terapéutica principal y beneficios para la salud de los microorganismos probióticos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son: aumento de la inmunidad contra las infecciones intestinales, mejora inmunológica, prevención del cáncer de colon; prevención de la hipercolesterolemia, mejora de utilización de la lactosa, prevención de enfermedades del tubo digestivo y estabilización de la mucosa intestinal (Charteris y col. 1998). Sin embargo, para que las bacterias probióticas proporcionen efectos benéficos al huésped estas deben ser estables y metabólicamente activas en el producto en el cual han sido incorporadas, además de sobrevivir el paso por la parte superior del aparato digestivo y presentar resistencia a enzimas hidrolíticas y altas concentraciones de sales biliares en el intestino (Gilliland 1989).

Estudios realizados indican que las bacterias probióticas no sobreviven en cantidades lo suficientemente altas cuando son incorporadas en productos alimenticios (Shah 2000, Lourens-Hattingh y Viljoen 2001). La pérdida de la viabilidad puede ocurrir antes de su consumo, durante el procesamiento por estrés de oxígeno, durante el almacenamiento o durante la congelación o secado o también debido a la acción severa de las condiciones del tracto gastrointestinal (GI) (Akhiar 2010). La microencapsulación tiene como objetivo crear un micro ambiente en donde la bacteria puede sobrevivir durante el procesamiento, almacenamiento y ser liberado en sitios apropiados del tracto digestivo (Weinbreck y col. 2010). La microencapsulación por secado por aspersion es un proceso que produce grandes cantidades de material, es económico y efectivo (Dziezak 1988). Además de que puede ser operado de manera continua. La desventaja es que la alta temperatura utilizada en el proceso podría no ser adecuada para encapsular

células bacterianas probióticas. Sin embargo, el propio ajuste y control de las condiciones de procesamiento, como la temperatura de entrada y de salida del equipo puede alcanzar buenas viabilidades de los microorganismos y tamaños de partícula deseados (Kailasapathy 2002). Diversos materiales de pared han sido utilizados para encapsular probióticos para la protección del pH del estómago y concentraciones de bilis e incrementar la viabilidad y estabilidad física durante el procesamiento de estos. Los principales agentes encapsulantes de estos organismos son sistemas constituidos principalmente por: carragenina, alginato, acetato ftalato de celulosa, gelatina, quitosano (Anal y Singh 2007).

Algunos de estos materiales evaluados como materiales de pared presentan algunos resultados promisorios, aunque las características deseadas de viabilidad no han sido completamente alcanzadas (Anal y Singh 2007). El objetivo de este trabajo fue microencapsular *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 utilizando almidón de amaranto modificado como material de pared y evaluar la sobrevivencia de estos organismos microencapsulados en diferentes condiciones de almacenamiento, exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI) y durante el almacenamiento de las microcápsulas incorporadas en un sistema modelo alimentario. El almidón de amaranto utilizado en este trabajo fue extraído en el laboratorio a través de una molienda húmeda-alcalina, el cual fue modificado químicamente y a través de la extrusión reactiva, para obtener almidones succinatados, acetilados y fosfatados. Los almidones modificados de amaranto mostraron buenas características para su empleo en el secado por aspersion. El almidón succinatado de amaranto junto con el control (almidón N-lok) presentaron las mejores viabilidades para los probióticos evaluados durante el almacenamiento a 25°C y 4°C, durante la evaluación del TGI simulado y finalmente durante el almacenamiento en un producto alimentario (avena).

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Probióticos

2.1.1 Características generales

Los probióticos son definidos como microorganismos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud de los consumidores (FAO/WHO 2001). Estos microorganismos son típicamente miembros del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, especies comúnmente asociados con el tracto gastrointestinal humano (Weinbreck y col. 2010). Sin embargo, las especies que pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* y *Propionibacterium* se consideran también probióticos debido a los beneficios a la salud (Sanders y col. 1999, Blandino y col. 2003, Vinderola y Reinheimer 2003).

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal del ser humano y animales y no es imposible encontrarlas en la boca y las heces. El tracto intestinal de los recién nacidos son colonizados con *Bifidobacterium* pocos días después del nacimiento y la población microbiana es influenciada por la edad, la dieta, los antibióticos y el estrés. La eficacia de estos microorganismos está relacionada con su capacidad de colonizar el tracto intestinal y controlar bacterias intestinales indeseables, aunque, el factor adhesivo y la sobrevivencia no se presentan en todas las bifidobacterias aisladas (Del Re y col. 1998). El pH óptimo para el crecimiento de bifidobacterias es 6.0-7.0 y prácticamente ningún crecimiento por debajo de 4.5 o superior de 8.5. Las temperaturas óptimas de crecimiento son 37°C - 41°C, las mínimas son 25°C - 28°C, y las máximas son 43°C - 45°C. Algunas cepas de *Bifidobacterium* utilizadas como probióticos son *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis* y *B. breve* (Anal y Singh 2007).

Por otro lado, las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) se clasifican por su morfología celular y la vía utilizada para fermentar la glucosa. Su hábitat natural son algunas plantas y también son una parte de la microflora gastrointestinal (Abadías y col. 2008). Las BAL más importantes son *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*. *Lactobacillus acidophilus* ha sido considerado el lactobacilo predominante en el tracto intestinal de los seres humanos sanos y por lo tanto es el organismo más comúnmente utilizados en los productos con probióticos (Arihara y col. 1998).

El crecimiento de las BAL se produce a una temperatura tan alta como 45°C; sin embargo, la temperatura óptima se encuentra entre 35°C y 40°C. Los microorganismos crecen en medios ligeramente ácidos a pH de 6.4-4.5, no obstante, su crecimiento se detiene en un pH de 3.6-4.0. Esta bacteria tolera de 0.3% a 1.9% de acidez titulable, con el pH óptimo en 5.5 a 6.0 (Curry y Cuervo 2003, Shah 2003). Las bacterias BAL son gram positivo, en forma de barra, no forman esporas, son catalasa negativa, organismos que son desprovistos de citocromo y son anaerobios aunque, son aerotolerantes, ácido tolerantes y estrictamente fermentativos, el ácido láctico es el mayor producto de la fermentación de estos microorganismos (Anal y Singh 2007).

Entre las bacterias ácido lácticas utilizadas como probióticos se encuentran: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonoo*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* etc. (Axelsson 1993, Mäkinen y Bigret 1993).

En personas sanas, los lactobacilos están normalmente presentes en la cavidad oral (10^3 a 10^4 ufc/g), el íleon (10^3 - 10^7 ufc/g) y en el colon (10^4 - 10^8 ufc/g) (Merk y col. 2005). Los componentes de la dieta que no son digeridos en la parte

superior del tracto intestinal, constituyen los principales nutrientes para la flora que reside en la parte distal del intestino delgado y en el colon. Entre éstos, los hidratos de carbono complejos (oligo y polisacáridos) aportados por la dieta constituyen el grupo de sustratos fermentables más abundantes. Los probióticos de la flora intestinal han desarrollado un complejo sistema de glicohidrolasas que les permiten utilizarlos, favoreciendo así su sobrevivencia, a la vez que generan energía metabólica para los enterocitos. Los principales productos de fermentación son ácidos grasos de cadena corta, principalmente propiónico, butírico y acético, que constituyen entre el 83% y 95% del total. El ácido butírico es, en su mayor parte, metabolizado por el epitelio intestinal, aportándole entre un 60% y 70% de toda la energía necesaria. El propiónico es transportado hasta el hígado, y el acético pasa a la circulación periférica llegando al músculo esquelético y cardiaco (Sanz y col. 2004).

2.1.2 Probióticos en la salud

La mucosa del tracto gastrointestinal es la segunda superficie más extensa del organismo (250 m²) y constituye la principal zona de contacto y defensa ante agentes externos como bacterias, virus, toxinas. La flora o microbiota que la coloniza constituye un complejo ecosistema integrado por más de 400 especies bacterianas, que coexisten en equilibrio dinámico con el huésped. La densidad microbiana en las zonas proximales y media del intestino delgado es relativamente baja, aunque, aumenta en gran medida en la parte distal de éste. El número de bacterias alcanza valores diez veces superiores al de las células del organismo, lo que constituye colectivamente un «órgano» activo, cuyo metabolismo influye de forma decisiva en el mantenimiento de la homeostasis del individuo (Sanz y col. 2004).

2.1.2.1 Prevención de infecciones intestinales

Lactobacillus acidophilus y bifidobacterias ejercen efectos antagónicos sobre el crecimiento de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* y *Clostridium perfringens* (Gilliland y Speck 1977, Ozbas 1995). Las bacterias probióticas mejoran la resistencia contra los agentes patógenos intestinales a través de mecanismos antimicrobianos. Estos incluyen la colonización competitiva y la producción de ácidos orgánicos, tales como ácido láctico y ácido acético, bacteriocinas y otros metabolitos primarios, como peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono (Robinson y Tamime 1990, Mishra y Lambert 1996).

En la colonización competitiva, las bacterias probióticas inhiben la adhesión de patógenos gastrointestinales en la mucosa del intestino (Conway 1996). Los microorganismos probióticos producen ácidos orgánicos, lo cual reduce el pH intestinal y por lo tanto inhibe el crecimiento de patógenos. Estos ácidos orgánicos también aumentan el peristaltismo, así, indirectamente, la eliminación de patógenos mediante la aceleración de su tasa del tránsito a través del intestino (Laroia y Martin 1990). El uso de cepas de *Lactobacillus* ha sido sugerido para prevenir y tratar la diarrea inducida por *Escherichia coli*, *Salmonella* o *Shigella* (Tojo y col. 1987).

2.1.2.2 Mejoramiento del sistema inmunológico

Los probióticos tienen propiedades inmunomoduladoras: modifican la respuesta a antígenos, aumentan la secreción de IgA específica ante rotavirus, facilitan la captación de antígenos en la placa de Peyer y producen enzimas hidrolíticas y disminuyen la inflamación intestinal (Kaila y col. 1992, Majamaa y col.

1995, Isolauri y col. 1993, Sutas y col. 1996, Majamaa e Isolauri 1997, Nieto 1999).

2.1.2.3 Prevención del cáncer de colon

La acción antitumoral de los probióticos puede ser atribuida a la supresión del crecimiento de bacterias que convierten los procarcinógenos en carcinógenos, la activación del sistema inmune, alteración de la motilidad del colon y tiempo de tránsito, y la reducción de enzimas fecales que pueden convertir procarcinógenos en carcinógenos en el sistema gastrointestinal (McIntosh 1996).

2.1.2.4 Prevención de la hipercolesterolemia

Los probióticos pueden producir hidrolasas de sales biliares responsables de su desconjugación durante la circulación enterohepática. Las sales biliares provocan la disrupción de las micelas de colesterol, su precipitación con las sales biliares desconjugadas y finalmente, su eliminación en heces. A su vez, el colesterol sérico se reduce como consecuencia del aumento de su conversión en ácidos biliares, debido a una mayor excreción fecal de éstos o por disminución de su solubilidad y su absorción a lo largo del lumen intestinal (Brashears y col. 1998, Pereira y col. 2003).

2.1.2.5 Mejora en la utilización de la lactosa

La intolerancia a la lactosa se produce como consecuencia de una deficiente producción de la enzima (lactasa o betagalactosidasa) responsable de su descomposición en los correspondientes monosacáridos (glucosa y galactosa) en la mucosa intestinal. Los cultivos iniciadores convencionales del yogur, así como algunas bacterias de origen intestinal, mejoran la digestión de la lactosa y pueden eliminar los síntomas de intolerancia. Estos efectos se deben a diversos

mecanismos: la actividad β -D-galactosidasa (lactasa) microbiana y posiblemente, a la mejoría inducida en la función intestinal por la flora que actúa previniendo la sintomatología (De Vrese y col. 2001, Marteau y col. 2001). Hughes y Hoover (1995) han reportado que, en condiciones de almacenamiento (refrigeración y congelación), *B. angulatum* exhibe mayor actividad enzimática con relación a *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* y *L. acidophilus*.

2.1.2.6 Prevención de enfermedades del tubo digestivo y estabilización de la mucosa intestinal

La acidificación del medio debido a la actividad fermentativa inhibe el desarrollo y la colonización de patógenos, así como la producción de elementos tóxicos derivados de su metabolismo (amonio, compuestos fenólicos, aminas, etc.). Por otro lado, el ácido butírico constituye la principal fuente de energía para los colonocitos, estimulando la proliferación celular y regulando la apoptosis y la composición del *mucus*. De este modo, contribuye a estabilizar la función barrera del intestino (Hooper y col. 2002). Es importante destacar que los beneficios a la salud conferida por los microorganismos probióticos son específicos de cada cepa. Ninguna cepa proporcionará todos los beneficios propuestos, ni siquiera las cepas de la misma especie serán eficaces contra las condiciones de salud definidos (Shah 2007).

2.1.2 Probióticos en los alimentos

La incorporación de bacterias probióticas en productos alimenticios es cada vez mayor (Dinakar y Mistry 1994, Stanton y col. 2005, Desmond y col. 2005). Tradicionalmente, los probióticos se han añadido a yogur y otros productos lácteos fermentados (Laroia y Martin 1991, Young 1998, Hagen y Narvhus 1999, Lourens-Hattingh y Viljoen 2001, Penna y col. 2007). Las bacterias ácido lácticas han sido importantes en los alimentos por siglos por su considerable contribución al valor

de los productos. Debido a varias de sus propiedades metabólicas, las bacterias ácido lácticas desempeñan un papel importante en la industria alimentaria, por su contribución significativa al sabor, olor, textura, características sensoriales, propiedades terapéuticas y valor nutricional de los productos alimentarios (Parra 2010).

Actualmente existe una creciente demanda de los consumidores por los probióticos en productos no lácteos y por lo tanto, estos organismos se están incorporando en bebidas, así como suplementos, y/o en presentación de tabletas, cápsulas, y preparaciones liofilizadas (Schrezenmeir y De Vrese 2001). Para que las bacterias probióticas proporcionen efectos benéficos al huésped estos deben ser estables y metabólicamente activos en el producto en el cual han sido incorporadas, además de sobrevivir el paso por la parte superior del aparato digestivo y presentar resistencia a enzimas hidrolíticas y altas concentraciones de sales biliares (Gilliland 1989). Los factores que influyen en la funcionalidad de los probióticos son descritos en la Figura 1.

En algunos países como Argentina, Checoslovaquia y Brasil, el estándar de 10^6 UFC/g ha sido bien aceptado en el caso de *Bifidobacteria*. Este estándar ha sido prescrito en Japón a $> 10^7$ UFC/g (Robinson 1987). Algunos estudios realizados indican que las bacterias probióticas no sobreviven en cantidades lo suficientemente altas cuando son incorporados en productos lácteos (Dave y Shah 1996, Kailasapathy y Rybka 1997).

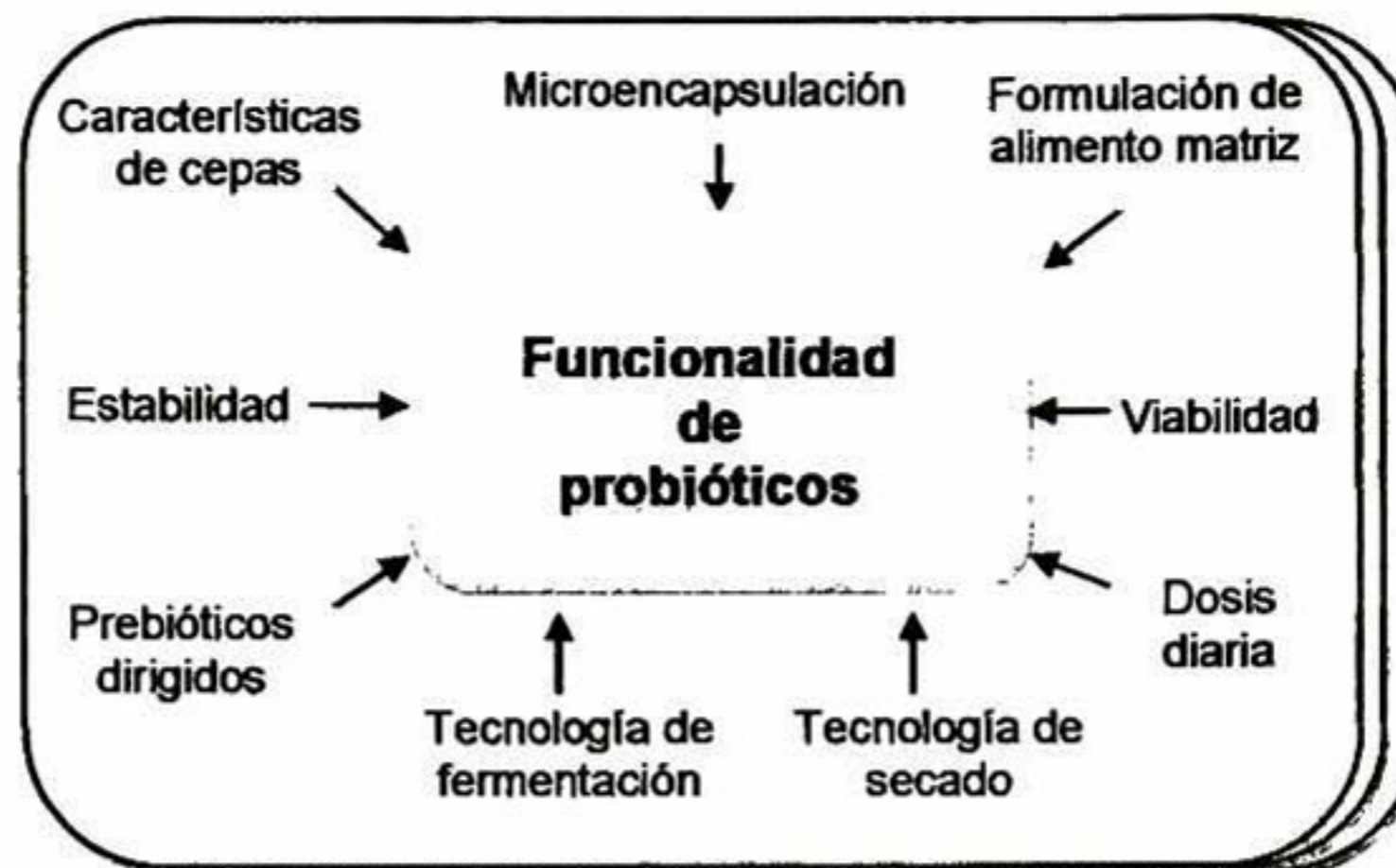


Figura 1. Factores tecnológicos que influyen la funcionalidad de probióticos. (Mattila-Sandholm y col. 2002).

Diversos factores que afectan la viabilidad de los probióticos incluyendo: la acidez titulable, el pH, el peróxido de hidrógeno, el contenido de oxígeno disuelto, la temperatura de almacenamiento, especies y cepas asociados en el producto fermentado, así como, la concentración de ácidos acético y láctico han sido reportados. También se han analizado diferentes enfoques con el fin de aumentar la resistencia de los microorganismos probióticos hacia estos factores adversos, entre ellos, la selección apropiada de cepas resistentes a condiciones ácidas y bilis, la utilización de contenedores impermeables al oxígeno, el estrés de adaptación, la incorporación de micronutrientes como péptidos y aminoácidos y la microencapsulación (Gismondo y col. 1999).

2.2 Microencapsulación de probióticos

La microencapsulación de probióticos tiene como objetivo crear un microambiente en donde la bacteria puede sobrevivir durante el procesamiento,

almacenamiento y ser liberado en sitios apropiados del tracto digestivo (Weinbreck y col. 2010). Se ha reportado que la microencapsulación puede mejorar notablemente la viabilidad de los microorganismos ante factores adversos como la alta acidez, bajo pH, oxígeno molecular (en caso de microorganismos anaerobios obligatorios), agentes tóxicos, enzimas digestivas, bacteriófagos, peróxido de hidrógeno, cadenas de ácidos cortos, compuestos carbonil-aromáticos (tres de estos producidos por cultivos iniciadores durante la fermentación) y procesos con calentamiento (secado) (Mortazavia y col. 2006). Las aplicaciones y ventajas de la encapsulación de probióticos puede ser discutida desde diferentes ángulos incluyendo (Mortazavian y col. 2007):

- a) **Producción de cultivos iniciadores.** La microencapsulación puede ser usada eficientemente para la preparación de cultivos iniciadores con alta viabilidad. Se ha reportado que la encapsulación de células iniciadoras con mezclas de alginato y glicerol pueden incrementar significativamente la sobrevivencia después de mantenerse en congelación (Sultana y col. 2000).
- b) **Viabilidad de células probióticas en el tracto gastrointestinal (TGI).** Varios reportes confirman (Sultana y col. 2000, Favaro-Trindade y Grosso 2002) que la microencapsulación incrementa eficientemente la viabilidad a través del paso de condiciones ácido-enzimática-biliares del tracto gastrointestinal.
- c) **Aplicación en fermentadores.** La microencapsulación ofrece ventajas como es el incremento a la tolerancia de microorganismos a factores como infección por bacteriófagos, agentes químicos tóxicos, protección de microorganismos a cambios no deseados (mutaciones genéticas) y la obtención de una buena productividad en la producción de metabolitos especialmente a altas velocidades de agitación.
- d) **Producción de alimentos.** Las ventajas de los probióticos microencapsulados en alimentos pueden ser discutidas desde diferentes

puntos, aspectos como la viabilidad de las células en los productos hasta el momento del consumo (almacenamiento), nuevos métodos de manufactura en alimentos, evaluación de las propiedades sensoriales e inmovilización de probióticos dentro de estos.

2.2.1 Materiales de pared utilizados en la microencapsulación de probióticos.

Durante la microencapsulación el material que forma la cubierta de las microcápsulas es referido como matriz, material de pared, acarreador, membrana o cobertura y generalmente no reacciona con el material a encapsular (Risch 1995). En la mayoría de los casos, la encapsulación utilizando el atrapamiento en gel con biopolímeros naturales como el alginato de calcio, carragenina, gelatina, goma y quitosano han favorecido las eficiencias de encapsulación de probióticos (Kailasapathy 2002). En la Tabla 1 se encuentran algunas bacterias probióticas microencapsuladas en diferentes sistemas poliméricos. Para la encapsulación de células bacterianas viables, los materiales utilizados como excipientes no deben ser tóxicos y deben ser grado alimenticio (Sheu y Marshall 1993, Shah y Ravula 2000).

2.2.2 Métodos de microencapsulación de probióticos.

Cuando se considera la microencapsulación de probióticos se presentan por lo general dos tipos de problemas: el tamaño de los microorganismos (generalmente entre 1 y 5 μm de diámetro), que inmediatamente excluye las nanotecnologías y el hecho de mantener la viabilidad de estos. Este último aspecto ha sido crucial en la selección de la tecnología apropiada del método de microencapsulación (Champagne y Fustier 2007). La tecnología de encapsulación de probióticos puede ser dividida en dos partes: la primera, microencapsulación de

probióticos en soluciones de encapsulación y la segunda secado de la solución de encapsulación con el objetivo de lograr polvos/gránulos (Krasaekoopt y col. 2003).

En la primera la extrusión y técnicas de emulsión podrían ser llamadas por goteo y doble fase. En la segunda los métodos más importantes son liofilización, secado por aspersion y recubrimiento fluidizado (Dimantov y col. 2003). Sin embargo, aunque se han desarrollado prometedoras tecnologías a escala-laboratorio para la producción de cápsulas en gel, estas presentan serias dificultades en producción a gran-escala con polímeros grado reactivo (Anal y Singh 2007).

2.2.3 Secado por aspersion

La microencapsulación por secado por aspersion es un proceso que produce grandes cantidades de material, es económico y efectivo (Dziezak 1988). El proceso implica la dispersión del material bioactivo en una solución de polímero, formando una emulsión o dispersión, seguido de homogeneización del líquido, y luego atomización de la mezcla en la cámara de secado. Esto conduce a la evaporación del disolvente (agua) y por lo tanto la formación de una matriz de tipo microcápsulas (Jackson y Lee 1991). La ventaja del proceso es que puede ser operado de manera continua. La desventaja es que las altas temperaturas utilizadas en el proceso podrían no ser las adecuadas para encapsular células bacterianas probióticas. Sin embargo, el propio ajuste y control de las condiciones de procesamiento, como la temperatura de entrada y de salida del equipo puede alcanzar viabilidades de los microorganismos y tamaños de partícula deseados (Kailasapathy 2002).

Tabla 1.
Bacterias probióticas microencapsuladas en diferentes sistemas poliméricos

Bacteria	Polímeros	Microencapsulación	Funcionalidad
<i>Lactobacillus</i>	Carragenina	Cápsulas de gel	Producción de biomasa
<i>S. thermophilus</i>	Carragenina	Cápsulas de gel	Producción de biomasa
<i>L. bulgaricus</i>	Carragenina/goma de algarroba	Cápsulas de gel	Producción de biomasa
<i>B. infantis</i>			
<i>Lactobacillus</i>	Carragenina/goma de algarroba	Cápsulas de gel	Producción de biomasa
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>Bifidobacterium</i>	Alginato/glicerol	Cápsulas de gel	Producción de biomasa
<i>Lactobacillus</i>	Alginato	Cápsulas de gel	Ácido estable
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Acetato ftalato de celulosa	Cápsulas de gel	Ácido estable y sales biliares
<i>L. delbrueckii</i>	Alginato/lauril sulfato de sodio	Cápsulas de gel	Producción de biomasa
<i>L. casei</i>	Carragenina/ goma de algarroba	Emulsificación	Ácido estable
<i>L. lactis</i>	Gelatina/tolueno-2-4- diisocianato	Cápsulas de gel	Producción de biomasa
<i>Lactobacillus</i>	Alginato	Cápsulas de gel	Ácido estable
<i>L. Acidophilus</i>	Alginato	Compresión directa	Ácido estable
<i>B. breve</i>	Microsporas de alginato	Emulsificación	Ácido estable
<i>B. Longum</i>	Proteínas de suero	Micronización	Ácido estable
<i>Pedococcus acidilactei</i>			
<i>Bifidobacterium</i>	Alginato/quitosano	Cápsulas de gel	Ácido estable/almacenamiento
<i>Bifidobacterium</i>	Alginato/ pectina/proteínas de suero	Cápsulas de gel	Ácido estable/almacenamiento
<i>Bifidobacterium</i>	Almidón resistente	Cápsulas de gel	Ácido estable/almacenamiento
<i>Lactobacillus</i>	Almidón	Cápsulas de gel	Ácido estable/almacenamiento
<i>Bifidobacterium</i>	Almidón ceroso de maíz	Cápsulas de gel	Ácido estable/almacenamiento
<i>Lactobacillus</i>		/emulsificación	Ácido estable
<i>Bifidobacterium</i>	Alginato/almidón	Cápsulas de gel	Ácido estable/almacenamiento

(Anal y Singh 2007)

Se han realizado estudios sobre la evaluación del proceso de secado por aspersión para la microencapsulación de probióticos donde se han encontrado parámetros de optimización del proceso, selección de un medio apropiado para el secado y el monitoreo de la pérdida de viabilidad durante diferentes condiciones de almacenamiento (Desmond y col. 2002, Lian y col. 2002). Previos reportes indican que la sobrevivencia de bacterias probióticas durante el secado por aspersión se reduce con el incremento de la temperatura de entrada (Mauriello y col. 1999). Han sido reportados diferentes investigaciones donde evalúan la sobrevivencia de los microorganismos probióticos encapsulados utilizando la tecnología del secado por aspersión entre los que incluyen los realizados por O'Riordan y col. (2001) quienes evaluaron la microencapsulación de cepas de *Bifidobacterium PL1* con almidón de maíz ceroso modificado, como material de pared, cuyo objetivo fue optimizar las condiciones de secado mediante el proceso de secado por aspersión, y lograr un incremento en la viabilidad de este microorganismo durante el almacenamiento. Estos autores encontraron que temperaturas de entrada de 100°C y de salida de 45°C presentaron las mejores características de humedad y morfología las microcápsulas obtenidas. También estos autores añadieron que las células microencapsuladas no presentaron evidencia sobre un incremento en la viabilidad comparado con células libres, cuando fueron sometidas a condiciones ácidas durante 6 horas y cuando se evaluó la incorporación de las microcápsulas en alimentos secos, durante 20 días de almacenamiento a temperatura ambiente (19°C-24°C).

Favaro-Trindade y Grosso (2002), encapsularon *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* en una matriz de acetato ftalato de celulosa usando el método de secado por aspersión, con temperatura de entrada de aire de 130°C y de salida de 75°C. En este estudio se evaluó la resistencia de los microorganismos microencapsulados en condiciones ácidas y de altas concentraciones de sales biliares. Estos autores concluyeron que el material de

pared y el proceso utilizado en la preparación de las microcápsulas con acetato ftalato de celulosa fueron adecuados en la protección de las bacterias lácticas, a través de su paso por el medio ácido del estómago, seguida de su rápida liberación en el pH encontrado en el intestino. Hsiao y col. (2004) microencapsularon *Bifidobacteria longum* CCRC 14633 y *B. infantis* CCRC 14633 mediante secado por aspersión, utilizando como materiales de pared leche reconstituida, goma arábiga, gelatina y almidón; estos autores evaluaron la estabilidad de estos materiales en diferentes condiciones de almacenamiento a 25°C y 4°C, en contenedores de vidrio y poliéster con y sin la adición de desoxidante, durante un periodo de 35-42 días de almacenamiento. Estos autores concluyeron que la sobrevivencia de *Bifidobacterium* microencapsuladas varió de acuerdo con la especie, la temperatura de almacenamiento, la presencia o ausencia de oxígeno y el material de pared utilizado.

Ananta y col. (2005) evaluaron la aplicación del secado por aspersión en la producción de cápsulas con leche reconstituida, conteniendo *Lactobacillus rhamnosus*. Estos autores reportaron la posibilidad de diferentes preparaciones usando como material de pared leche reconstituida y mezclas de este con compuestos prebióticos como raftilosa y polidextrosa. Añadiendo estos autores que la estabilidad en la sobrevivencia fue afectada por la parcial sustitución de ambos compuestos. El mantenimiento de la membrana celular no fue efectivo cuando el secado se llevó a cabo con las mezclas a diferencia de cuando se colocó únicamente la leche reconstituida. Utilizando la tecnología de secado por aspersión Crittenden y col. (2006) encapsularon células de *Bifidobacterium infantis* liofilizado en una emulsión constituida por proteína-carbohidratos y aceite, las cuales contenían aceite de canola vegetal, caseinato y prebióticos como: raftilosa (fructooligosacárido), glucosa anhidra o almidón resistente. Estos autores encontraron que las células no encapsuladas presentaron un decremento drástico en la sobrevivencia durante el almacenamiento en comparación con las células microencapsuladas, la mezcla que funcionó mejor en la protección de la viabilidad

fue aquella formulada con caseinato-fructooligosacáridos-aceite-almidón resistente. También encontraron un efecto significativo ($p < 0.01$) en la sobrevivencia de *B. infantis* cuando fueron expuestos a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal en comparación con las células de *B. infantis* sin encapsular.

Rodríguez-Hueso y col. (2007) reportaron que la viabilidad de células de *Bifidobacterium bifidum* durante el secado por aspersión y durante el tiempo de almacenamiento podría estar substancialmente influido por coloides protectores (combinaciones de concentrado de proteína de suero de leche, goma arábica, mezquite, goma, maltodextrinas y agua miel) que ofrecen resistencia a la difusión de oxígeno y la adición de agua miel como prebiótico termoprotector. Estos autores mencionaron que la mejor sobrevivencia fue obtenida en mezclas con concentrado de proteína de suero de leche, mezquite goma y maltodextrinas. Golowczc y col. (2010) evaluaron la sobrevivencia de dos cepas de *Lactobacillus kefir* después del secado por aspersión utilizando como material de pared leche reconstituida con y sin la adición de glutamato mosódico, sucrosa, y fructooligosacáridos y durante el almacenamiento en diferentes condiciones de temperatura (20°C y 30°C) y humedades relativas de 11 y 23%. Estos autores reportaron que después del secado *L. kefir* 8321 y *L. kefir* 8348 presentaron un decremento en la viabilidad de 0.29 y 0.70 Log ufc/ml respectivamente, mientras que, con la adición de los diferentes protectores se presentó una mejora en la sobrevivencia en ambos microorganismos. Durante el almacenamiento la sobrevivencia de las bacterias fue significativamente mayor a bajas condiciones de humedad (0-11%).

Ying y col. (2010) microencapsularon *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) liofilizado- utilizando una emulsión basada en la formulación de proteína de suero de leche y almidón resistente utilizando la tecnología de aspersión y liofilización. Estos autores reportaron que después del secado por aspersión y de la liofilización no se presentó pérdida en la sobrevivencia de los microorganismos. Además

añadieron que el incremento en la humedad relativa durante el almacenamiento, causa un incremento en la movilidad del agua y en la velocidad en la pérdida de viabilidad. Durante el almacenamiento las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión presentaron mayor estabilidad que las obtenidas por liofilización. Finalmente

Weinbreck y col. (2010) evaluaron la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)* microencapsulado durante el almacenamiento en diferentes niveles de actividad de agua. Cabe mencionar que estos autores utilizaron de manera directa el cultivo liofilizado (sin activación previa) el cual fue incorporado en el material de pared (proteína de suero de leche) y secado por aspersión. Estos autores concluyeron que la encapsulación de *LGG* no mejoró la sobrevivencia de de esta cepa durante el almacenamiento (actividad de agua=0.7 a 37°C), ni cuando fue incorporado en el producto seco (fórmula láctea) propuesto.

A pesar de que la encapsulación se menciona a menudo como una solución rápida para preservar la viabilidad de los probióticos en productos secos y semisecos, se necesitan más estudios que validen de manera más amplia el potencial de este enfoque, en diferentes tiempos de almacenamiento, actividades de agua y matrices de productos.

2.3 Almidón

2.3.1 Características generales

El almidón es el principal carbohidrato de reserva sintetizado por las plantas superiores, constituye una fuente de energía esencial para muchos organismos, especialmente para el hombre. El almidón se encuentra en cereales (maíz, trigo, arroz y otros) cuyo contenido del polímero varía del 30 al 80%, en leguminosas (frijol, chícharo, haba y otros) de un 25% a 50%, en tubérculos (papa yuca y otros)

representa entre un 60% a 90% de la materia seca (Takeda y Priess 1993, Thomas y Atwell 1999).

2.3.2 Estructura química del almidón

El almidón está compuesto esencialmente por D-glucosa, aunque puede contener otros constituyentes en bajos niveles como lípidos, minerales como fósforo y nitrógeno e inclusive trazas de proteínas, dependiendo de la fuente botánica usada para su extracción. Químicamente se encuentra constituido por dos polímeros: la amilosa (esencialmente lineal) y la amilopectina (altamente ramificada); ambos polímeros presentan diferencias entre sus propiedades estructurales y funcionales (Thomas y Atwell 1999, Tester y col. 2004).

Amilosa. Es un polímero esencialmente lineal formada por moléculas de glucosa unidas por enlaces aproximadamente en un 99% α -D (1,4), aunque se ha reportado un bajo grado de ramificación y de cadenas de poca longitud unidas a la cadena central por enlaces α -(1,6) (Figura 2). Las moléculas de amilosa tienden a formar estructuras helicoidales capaces de incluir a otras moléculas como ácidos grasos o hidrocarburos, a estos complejos se le denominan compuestos de inclusión. La amilosa tiene un peso aproximadamente de $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ g/mol (Mua y Jackson 1997, Biliaderis 1998, Buléon y col. 1998).

Amilopectina. Es mucho más larga que la molécula de amilosa, con un peso molecular de $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ g/mol consiste de unidades de D-glucosa unidas por enlaces 95% α -(1,4) presentando un grado de ramificación localizadas cada 15 a 25 unidades lineales de glucosa y estas cadenas laterales están unidas a la cadena central por enlaces α -(1,6) (Figura 2) (Thomas y Atwell 1999, Tester y col. 2004).

Las moléculas de amilosa y amilopectina no existen de forma libre en la naturaleza sino como agregados semicristalinos, es decir, contenidos en los gránulos de almidón. Estos gránulos pueden variar con relación al tamaño (1-100 μm) y forma que puede ser regular (esféricas ovoides o angular) o irregular de acuerdo a su origen botánico, la Tabla 2 muestra las características de algunos gránulos de almidón de diversas fuentes.

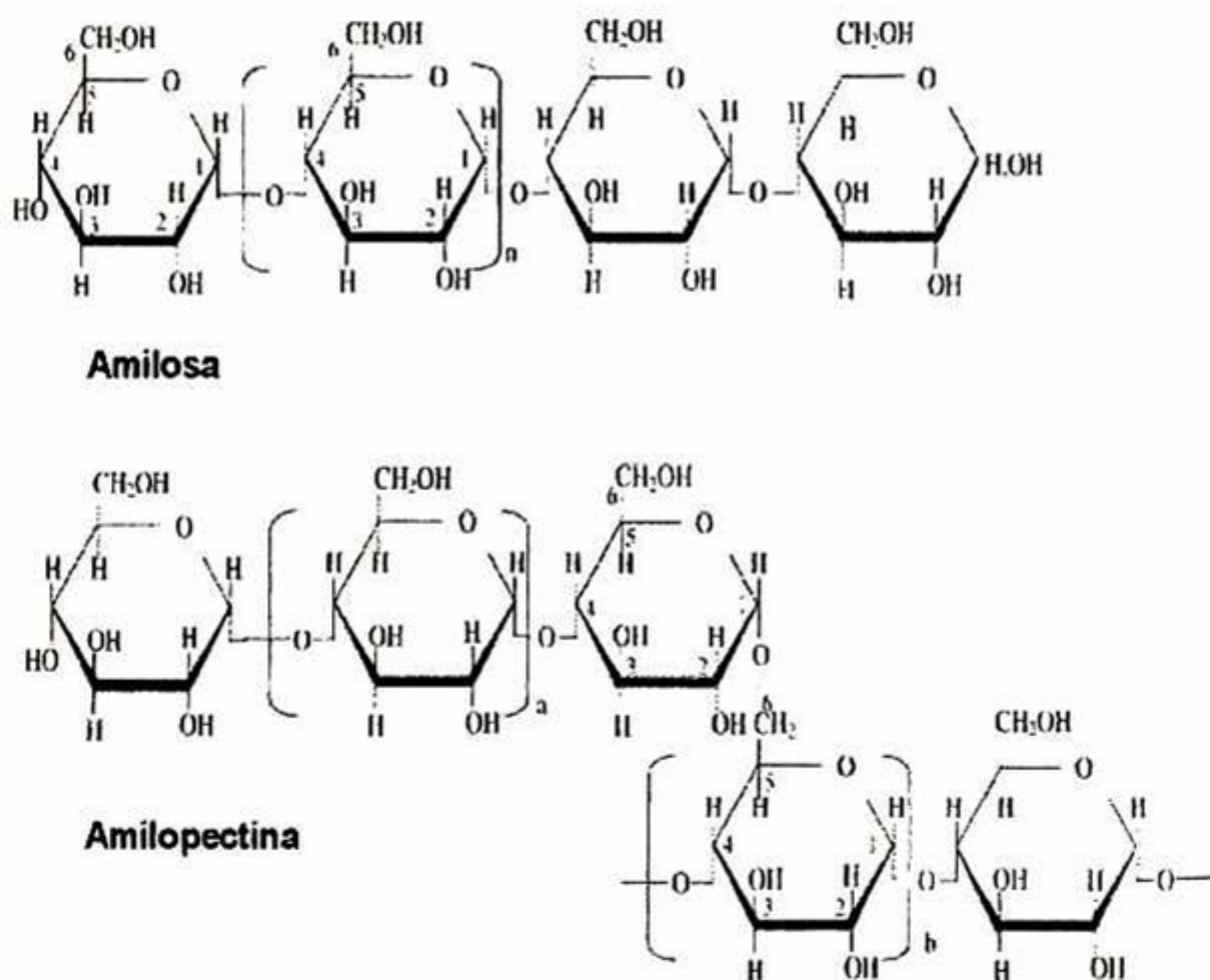


Figura 2. Estructura química de las moléculas de amilosa y amilopectina. Adaptado por Tester y Karkalas (2002).

Tabla 2.**Características de los gránulos de almidón de diversas fuentes**

Fuente de almidón	Tamaño en μm	Forma	Amilopectina %
Amaranto	1	Poligonal	75-99
Maíz	20	Poligonal	75
Maíz ceroso	30	Poligonal	97-99
Papa	35	Ovalada	80
Tapioca	18	Redonda	89
Trigo	25	Ovalada, truncada	73
Arroz	7	Redonda, poligonal	83
Cebada	23	Redonda, elíptica	78
Plátano	10-40	Elíptica	70-75
Sorgo	35	Esférica	75
Centeno	28	Redonda o lenticular	73
Avena	7	Poliédrica	77

(Bello y Paredes 1999, Agustiano 2004).

La Figura 3 muestra una perspectiva general de la estructura del gránulo de almidón. Los gránulos consisten de regiones amorfas y regiones cristalinas. Las macromoléculas de almidón presentan una organización radial, en la que el hilum representa la región menos ordenada (Baker y col. 2001). La presencia de enlaces α -(1,6) en la amilopectina es responsable de la formación de zonas amorfas y cristalinas alternadas. Las estructuras de dobles hélices formadas por cadenas adyacentes de amilopectina dan lugar a la capa cristalina, mientras que los puntos de ramificación constituyen las regiones amorfas. Se ha sugerido que algunas moléculas de amilosa están localizadas en las regiones amorfas interaccionando con las cadenas ramificadas de la amilopectina. Estas regiones amorfas del gránulo de almidón son susceptibles a reacciones químicas, por tanto, éstas pueden ser removidas por acción de ácidos o pueden reaccionar con grupos funcionales. Las regiones amorfas son los principales elementos estructurales de hinchamiento del gránulo nativo (Liu 2005).

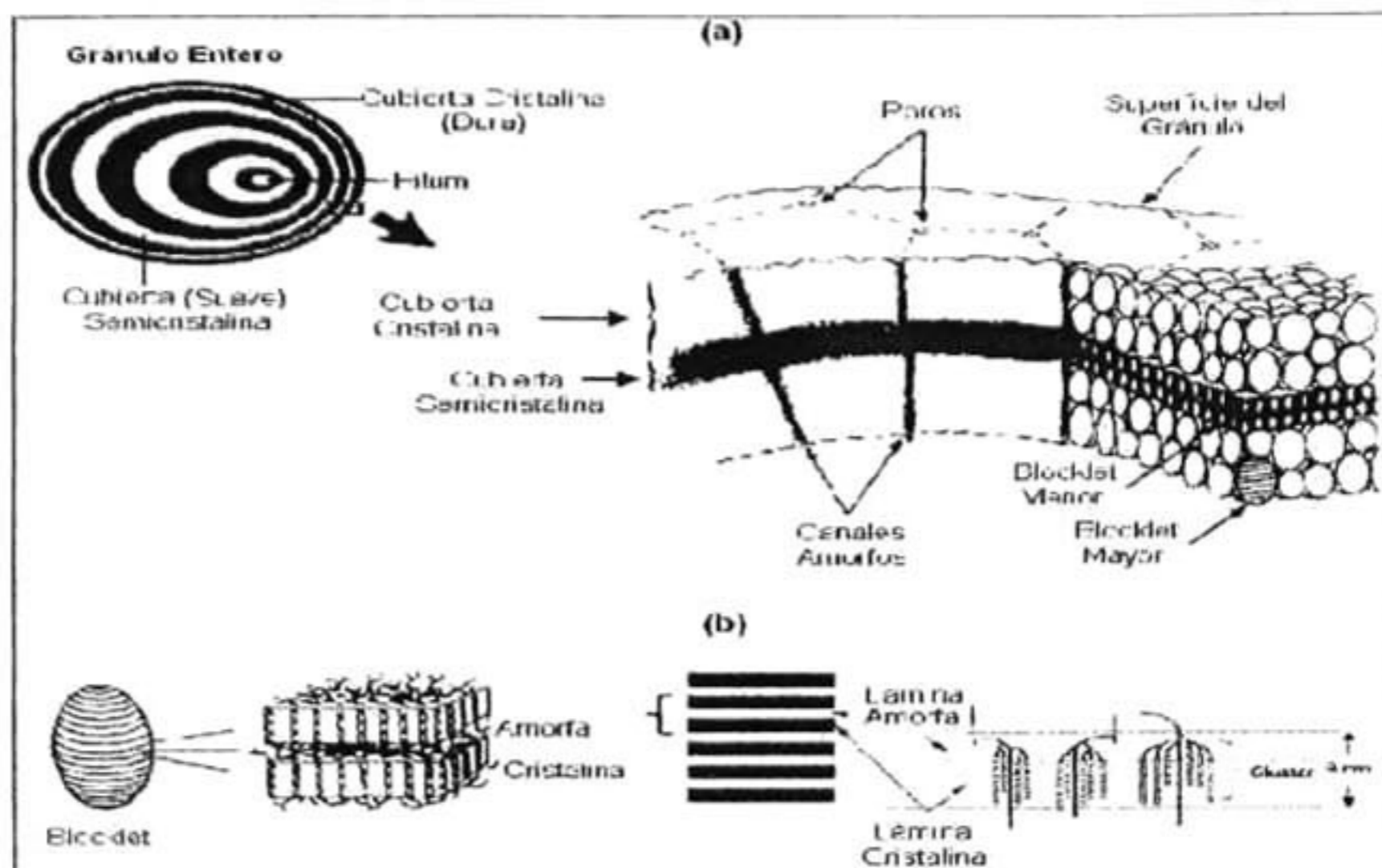


Figura 3. Estructura del gránulo de almidón. Adaptada de Liu (2005); Tester y col. (2004)

La abundancia de grupos hidroxilo a lo largo de las moléculas de amilosa imparte propiedades hidrofílicas al polímero, confiriéndole mayor afinidad por el agua. Debido a su naturaleza lineal, su movilidad y la presencia de numerosos grupos hidroxilo a lo largo de las cadenas del polímero, las moléculas de amilosa tienden a orientarse de forma paralela y acercarse lo suficiente como para permitir la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas adyacentes. Como resultado, la afinidad de los polímeros por el agua se reduce y la solución que forman se vuelve opaca (Liu 2005).

2.3.3 Cambios estructurales y funcionales del almidón

Al colocar el gránulo de almidón nativo en agua este comienza a hidratarse y por tanto a incrementar su volumen. De acuerdo a las condiciones de temperatura y agitación en el sistema, se presentan fenómenos hidrotérmicos que modifican las características microestructurales del gránulo, estos fenómenos son denominados como gelatinización, gelación y retrogradación representados de manera general en la Figura 4.

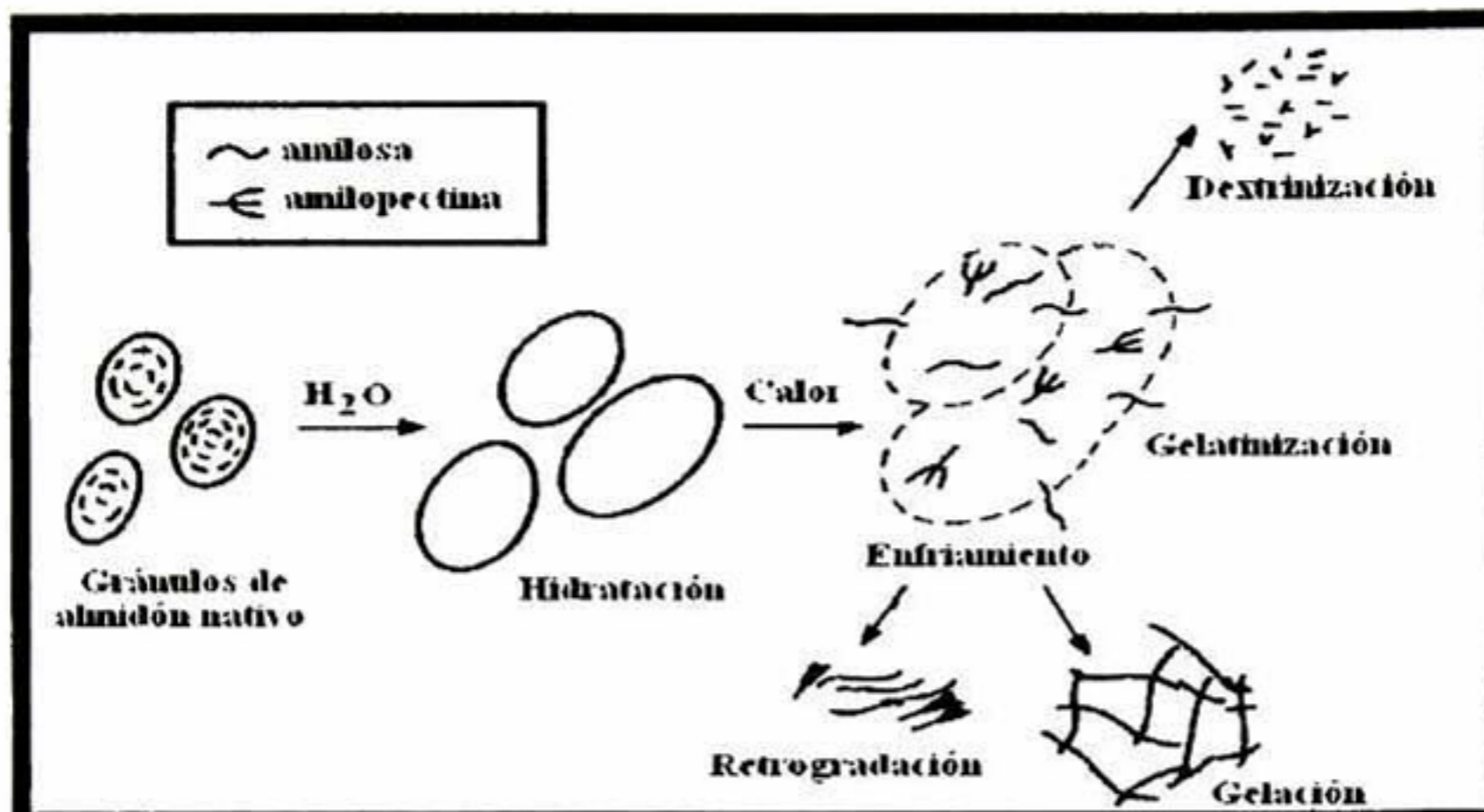


Figura 4. Tratamiento hidrotérmico del almidón nativo (Liu 2005).

Gelatinización. La gelatinización ocurre durante el calentamiento de los gránulos de almidón en presencia de agua, el cual conduce a una serie de transformaciones irreversibles una vez que se alcanza la temperatura de gelatinización representada por el hinchamiento granular, fusión de la cristalinidad nativa, pérdida de birrefringencia, pérdida del patrón de difracción de rayos X, solubilización del almidón y un incremento en la viscosidad (Lai y Kokini 1991, Akalu y col. 1998).

Gelación. La amilosa y la amilopectina pueden formar un gel; la primera se gelifica de manera más rápida fuera del gránulo por su naturaleza esencialmente lineal, mientras que la amilopectina por lo general permanece dentro del gránulo hinchado, donde lentamente recristaliza. Ambos polímeros, a partir del almidón gelatinizado, se reasocian e incrementan la rigidez entre y dentro de los gránulos hinchados. Se considera que la amilosa, por su estructura, es la responsable principalmente de la gelación del almidón y puede formar geles firmes a concentraciones tan bajas como 1.5%. (Thomas y Atwell 1999).

Retrogradación. Este fenómeno se define como la insolubilización y la precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan en paralelo e interaccionan entre sí mediante la formación de puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilos polares. Este fenómeno depende de la concentración de almidón y temperatura del sistema (Badui 1995).

2.4 Almidones modificados

2.4.1 Características generales

El almidón nativo es un buen estabilizador de textura y regulador en sistemas alimentarios (Cousidine 1982), aunque, las limitaciones como la baja resistencia al corte, resistencia térmica, la descomposición térmica y alta tendencia a la retrogradación, insolubilidad en agua y alta viscosidad limitan su uso en algunas aplicaciones industriales en alimentos. Sin embargo, estas deficiencias del almidón se han podido superar, por ejemplo, mediante la introducción de pequeñas cantidades de grupos iónicos o hidrofóbicos en las moléculas del polímero. Las modificaciones del almidón alteran las propiedades del polímero, incluyendo viscosidad de la solución, el comportamiento de asociación, y la estabilidad de conservación en la vida productos finales. Otro propósito de la modificación del almidón es estabilizar los gránulos de almidón durante el procesamiento y hacer el almidón adecuado para muchos alimentos y aplicaciones industriales (Hermansson y Svegmark 1996).

La modificación del almidón se consigue generalmente mediante derivatización tales como eterificación, esterificación, entrecruzamiento; descomposición (hidrólisis ácida o enzimática y oxidación de almidón) y tratamientos físicos utilizando tratamientos que involucran calor, humedad, presión, cizallamiento e irradiación. En la modificación química del almidón se han estudiado varios procedimientos: usando un reactor con métodos

convencionales de calentamiento y presión; activando el almidón y modificando con ácidos orgánicos, otros, mediante la reacción reactiva con un extrusor de tornillo simple o de doble tornillo y algunos usando energía de microondas (Peñaranda y col. 2008). La Tabla 3 muestra los diferentes tipos de modificación del almidón y técnicas de preparación.

2.4.2 Modificación del almidón por extrusión reactiva

El almidón se utiliza ampliamente en la producción de productos alimentarios e industriales. La modificación química del almidón a menudo se requiere para mejorar sus propiedades para aplicaciones específicas. Tradicionalmente, los ésteres de almidón con bajo grado de sustitución (DS) se han preparado en medio acuoso mediante procesos convencionales (Jarowenko 1986). La extrusión reactiva (REX por sus siglas en inglés) se ha definido como la reacción en el proceso de extrusión de los polímeros en el extrusor (Brown y Orlando 1988). La extrusión reactiva fue desarrollada en la década de los 80s, principalmente para la modificación de polímeros sintéticos. Desde entonces, la tecnología ha sido desarrollada rápidamente y se ha aplicado en diversas áreas. Extrusores de simple y doble tornillo han sido utilizados como reactores químicos para la polimerización de plásticos (Chinnaswamy y Hanna 1991). A pesar de que la extrusión no se utiliza ampliamente para las modificaciones de almidón, este tiene un gran potencial. Diferentes tipos de extrusores han sido utilizados para la fabricación de almidón de papa catiónico y carboximetilado (Gimmler y col. 1994), almidones fosfatados (Chang y Lii 1992), almidones aniónicos (ésteres de ácidos dicarboxílicos distintos) (Tomasik y col. 1995) y almidones oxidados (Wing y Willett 1997).

Tabla 3

Diferentes tipos de modificación del almidón y técnicas de preparación

Modificación	Tipos	Preparación
Física	Tratamientos que involucran calor/humedad	Calentamiento del almidón a temperatura cercana al punto de gelatinización con insuficiente contenido de humedad que causa la gelatinización del polímero. Annealing-calentamiento de una mezcla granular del almidón sometido a incubación en exceso de agua por un cierto periodo de tiempo a temperatura arriba de la transición vítrea y abajo del punto de gelatinización.
	Pregelatinización	Pregeles/instantáneos/ almidones preparados usando secadores de tambor, extrusión, procesamiento con bases solventes. Tratamiento con ácido clorhídrico o ácido orto fosfórico o ácido sulfúrico.
Conversión	Hidrólisis ácida parcial	Tratamientos en una solución acuosa a temperaturas por abajo del punto de gelatinización con uno o más enzimas amilolíticas grado reactivo.
	Hidrólisis enzimática parcial	Tratamiento con solución e hidróxido de sodio o hidróxido de potasio,
	Tratamiento alcalino	Tratamiento con ácido peracético y/o peróxido de hidrogeno, hipoclorito de sodio clorito de sodio, dióxido sulfúrico, permanganato de amonio y /o persulfato de amonio.
	Oxidación/blanqueamiento	Pirodextrinas-Preparado por acidificación del almidón seco.
Derivatización	Piroconversión (dextrinización)	Almidón hidroxipropil- Esterificación con óxido propileno.
	Eterificación	Almidón acetilado-Esterificación con anhídrido acético o acetato de vinil.
	Esterificación	Adipato de Almidón acetilado- Esterificación con anhídrido acético y anhídrido adipico Almidón octenilsuccinato de sodio -Esterificación por anhídrido octenilsuccinico. Almidón monofosfatado- Esterificación con orto-ácido fosfórico, orto fosfato de sodio o potasio, o tripolifosfato de potasio.
Entrecruzamiento		Di Almidón fosfatado- Esterificación con trimetafosfato de sodio.
		Almidón acetilado-fosfatado- Esterificación por trimetafosfato de sodio
Modificación dual		trimetafosfato de sodio o fósforo combinado con la esterificación de oxicloruro de anhídrido acético o acetato de vinilo.
		Hidroxipropil-fosfatado di almidón- Esterificación por trimetafosfato de sodio y/o oxicloruro de fósforo combinado con la eterificación por óxido de propileno

(Singh y col. 2007).

Las reacciones se llevan a cabo de forma continua y rápidamente en el extrusor. La Figura 5 muestra una representación esquemática de un sistema reactivo de extrusión usado para la modificación de almidón. La fuente de alimentación del almidón necesita un extrusor de doble tornillo. La bomba dosificadora primero proporciona reactivos químicos para la modificación y la segunda bomba generalmente proporciona productos químicos para neutralizar el reactivo sistema. El agua se convierte en vapor en el interior del extrusor y se direcciona a través del tornillo axialmente abierto. Los almidones emergen del extrusor en forma de hebras y/o pellet (Xie y col. 2006).

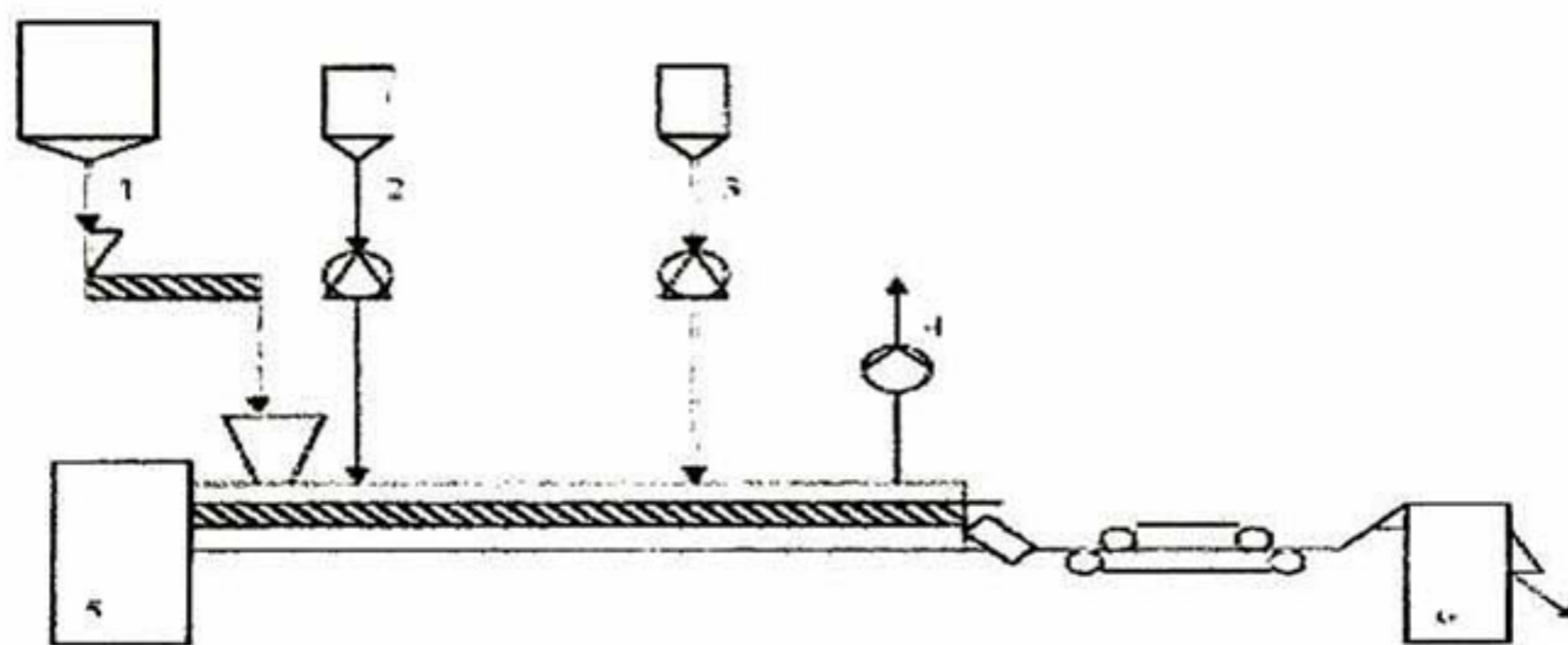


Figura 5. Representación esquemática de un sistema de extrusión reactiva usado para la modificación del almidón. (1) Fuente de alimentación, (2 y 3) bomba dosificadora del polímero, (4) bomba de vacío (5) extrusor de doble tornillo (6) dado de salida (Xie y col. 2006).

El proceso de extrusión consiste en mezclar uno o varios materiales pre acondicionados a humedad uniforme, ya sea por contacto con agua o con vapor. El material acondicionado es alimentado al extrusor, para ser transportado por un tornillo sinfín a través del cañón. Los mayores cambios que sufre el material se realizan dentro del cañón del extrusor, con ayuda del tornillo sinfín. Debido al calor generado por la energía mecánica que produce el tornillo, la misma transferencia de calor y la presión que va ejerciendo el material a través de los alabes del

tornillo a una velocidad dada, provocan transformaciones formando un material viscoso y plastificado. De acuerdo a Riaz (2000), las ventajas que ofrece el proceso de extrusión, comparadas con los procesos tradicionales de cocimiento en alimentos, son: una amplia versatilidad (adaptable a las demandas del consumidor en formas, texturas, sabores, colores, consistencia y apariencia), así como un bajo costo de procesamiento. Además, una ventaja importante es la ausencia de efluentes durante el proceso, sin requerir mucho espacio. También proporciona una alta eficiencia del uso de energía, ya que el cocinado de alimentos es realizado a bajas humedades, por lo tanto se requiere menor tiempo de secado (Harper 1990).

2.4.3 Modificación del almidón por hidrólisis ácida

La modificación ácida se utiliza ampliamente en la industria del almidón para preparar almidones para su uso en las industrias de alimentos, papel, textiles y otros (Rohwer y Klem 1984). El procedimiento general para la fabricación de almidones ácidos implica el tratamiento de una suspensión de almidón concentrado (36%-40% de sólidos) a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización del almidón (40°C-60°C) con ácido mineral (HCl o H₂SO₄ a 25°C-55°C) durante un cierto periodo de tiempo (Würzburg 1986). Cuando la viscosidad deseada o el grado de conversión se alcanza, el ácido se neutraliza y el almidón es recuperado. La hidrólisis puede ser controlada mediante la concentración de ácido usado, el tiempo de reacción y la temperatura.

La Figura 6 muestra el mecanismo de reacción durante la hidrólisis ácida del almidón. En la hidrólisis ácida, el ión hidronio (H₃O⁺) lleva a cabo un ataque electrofílico sobre el átomo de oxígeno del enlace glucosídico (1-4) (Fig. 7A). En el paso siguiente, los electrones en uno de los enlaces carbono-oxígeno se mueven sobre el átomo de oxígeno (Fig. 7B) lo cual genera una estructura intermedia de alta energía inestable (Fig. 7C). El carbocatión intermedio es un ácido de Lewis, por lo que posteriormente reacciona con agua (Fig. 7D),

formando una base de Lewis, lo que conduce a la regeneración de un grupo hidroxilo (Fig. 7F). Las regiones amorfas de almidón son más rápidamente hidrolizadas con relación a las regiones cristalinas durante la hidrólisis ácida, a temperaturas inferiores a la temperatura de gelatinización (Bemiller 1965).

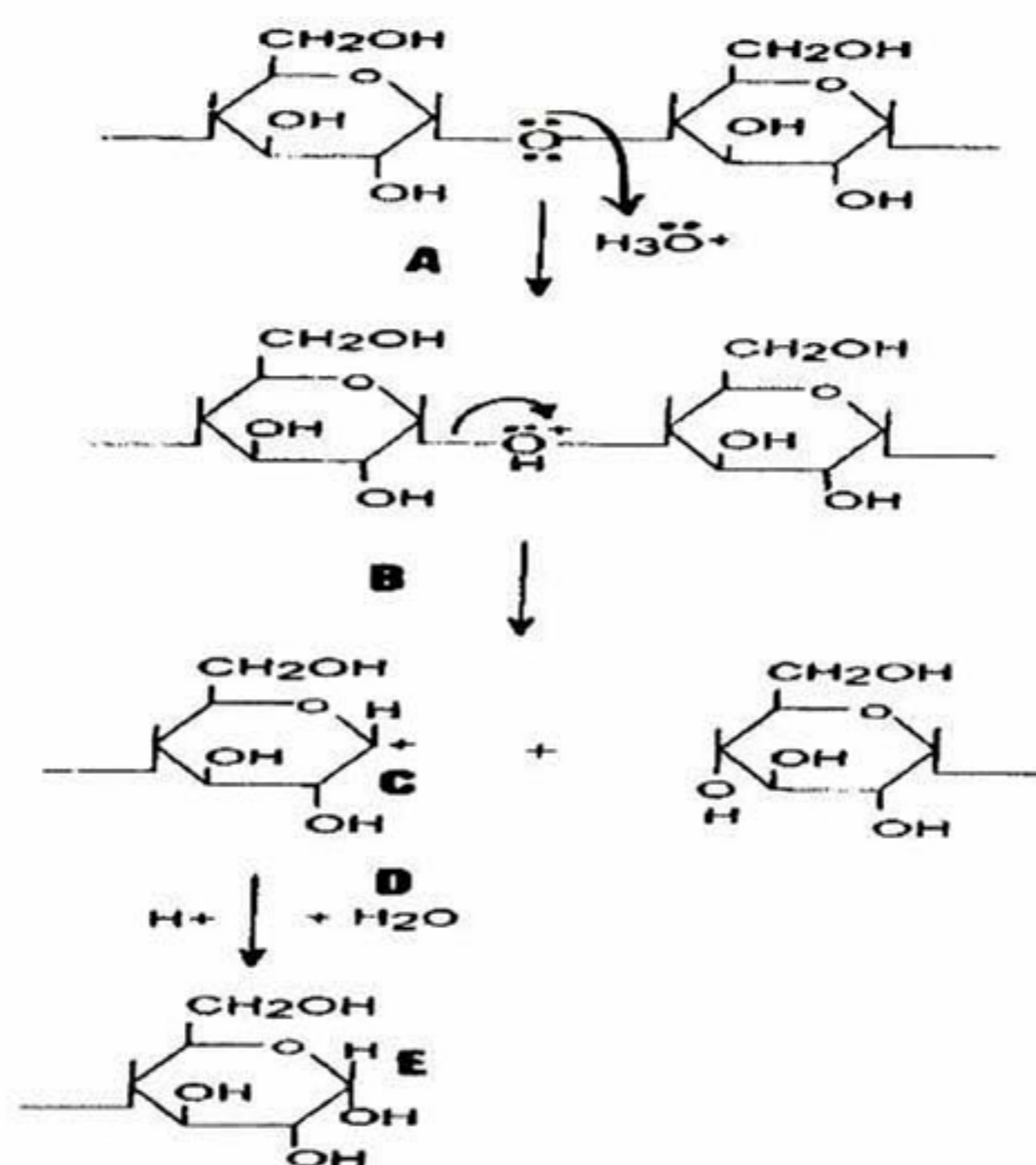


Figura 6. Mecanismo de reacción durante la hidrólisis ácida del almidón (Hoover 2000).

La modificación ácida en el almidón cambia las propiedades fisicoquímicas de este. La temperatura de gelatinización y el ancho de la endoterma de gelatinización se ha demostrado que aumenta después de la hidrólisis (Shi y Seib 1992). También aumenta la solubilidad de los almidones y presentan menor viscosidad (Kim y Ahn 1996). En la industria, los almidones ácidos modificados (maíz normal, maíz ceroso, trigo, y yuca) se preparan por tratamiento de una suspensión de almidón (40%) con HCl diluido o H_2SO_4 a 25°C - 55°C durante

diversos períodos de tiempo. Las condiciones utilizadas durante la hidrólisis ácida se ven influidas por la relación de la viscosidad de la pasta fría a caliente y por la textura de gel requerida. Cuando la viscosidad deseada o fluidez se alcanza, la suspensión de almidón se neutraliza, y los gránulos se recuperan mediante lavado, centrifugación y secado (Hoover 2000).

2.4.4 Modificación química del almidón por métodos convencionales

La modificación química del almidón implica la introducción de grupos funcionales en la molécula, dando como resultado la alteración de sus propiedades fisicoquímicas. Las modificaciones químicas más comunes del almidón incluyen: la oxidación, el entrecruzamiento, la esterificación y la eterificación. En la Figura 7 se muestran algunas reacciones de la modificación química del almidón (Muhrbeck y Eliasson 1993, Kim y col. 2003).

Las reacciones químicas de almidón generalmente se llevan a cabo en un medio acuoso. Una suspensión de almidón en agua, generalmente de 30%-45% en peso de sólidos, es tratada con un reactivo químico bajo condiciones adecuadas de agitación, temperatura y pH. Cuando la reacción se completa, el almidón se ajusta al pH deseado con un agente neutralizante y después es purificado mediante lavados con agua y recuperado como un polvo seco (Xie y col. 2005). El grado de modificación química es generalmente expresado como grado de sustitución (GS) cuando el grupo sustituyente (por ejemplo acetato o fosfato) reacciona con los grupos hidroxilo de las unidades D-glucopiranosas. La sustitución molar (SM) es referida cuando el grupo sustituyente puede también reaccionar con el mismo reactivo para formar un sustituyente polimérico (Thomas y Atwell 1999).

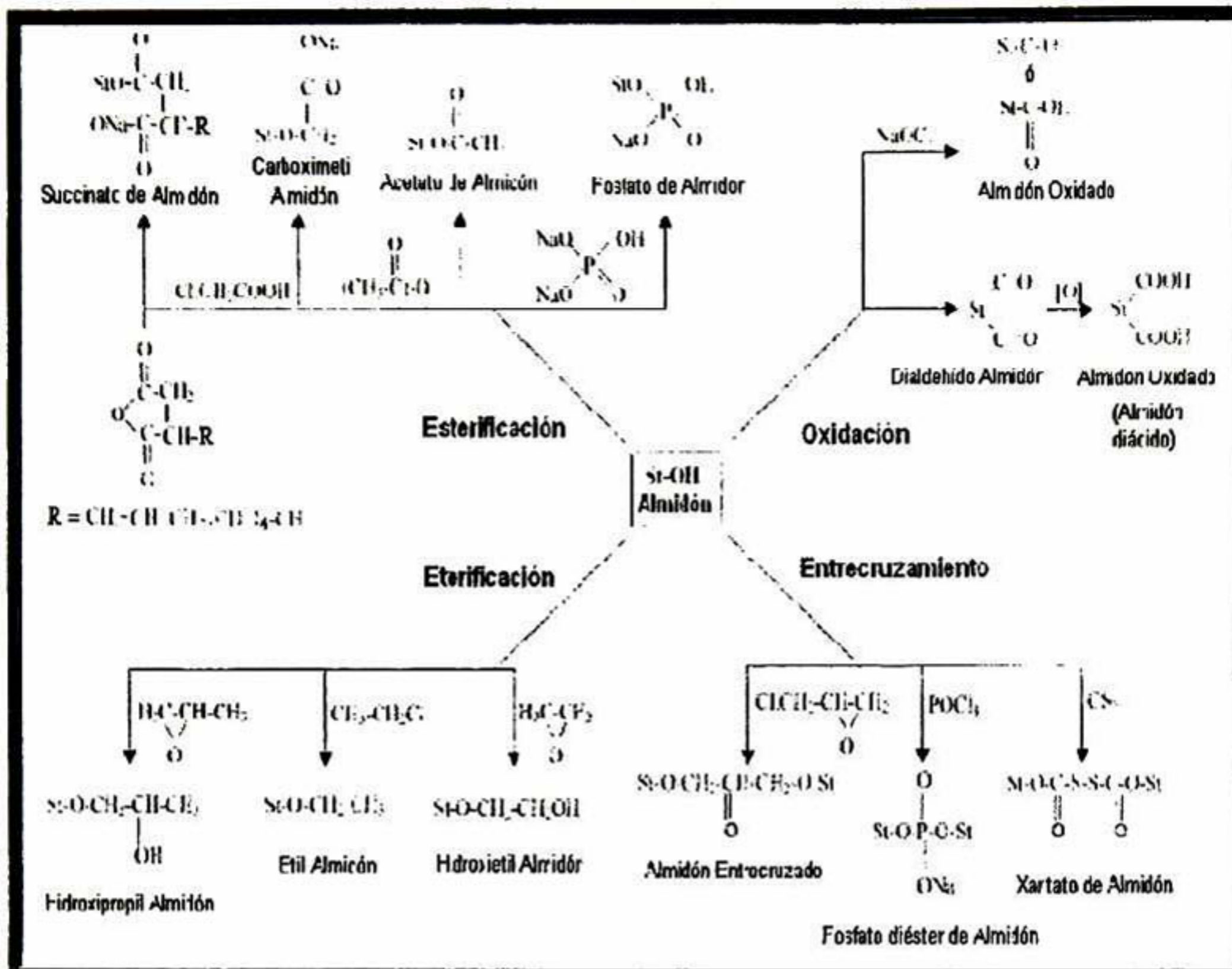


Figura 7. Reacciones de modificación química de almidón. Adaptada de Tharanathan (2005).

2.4.4.1 Reacciones de oxidación

La oxidación del almidón se ha practicado desde principios de 1800, usando varios agentes oxidantes que se han introducido en la molécula del almidón, por ejemplo, hipoclorito, peróxido de hidrógeno, peryodato, permanganato, dicromato, persulfato, y clorito (Rutenberg y Solarek 1984). Los usos principales del almidón oxidado son en las industrias del papel y textil. Sin embargo, la aplicación de almidones oxidados en la industria alimentaria está aumentando debido a su baja viscosidad, alta estabilidad, claridad de pasta y propiedades de ligación. El almidón oxidado para uso alimentario se produce principalmente por la reacción del almidón con hipoclorito de sodio. Los agentes blanqueadores, como peróxido

de hidrógeno, ácido peracético, permanganato de potasio, y el clorito de sodio, también se permiten por la Food and Drug Administration (FDA), sin embargo, los niveles utilizados en la reacción son demasiado bajos para modificar el comportamiento de los almidones (Xie y col. 2005).

2.4.4.2 Reacciones de entrecruzamiento

El almidón contiene dos tipos de grupos hidroxilo, primarios (6-OH) y secundarios (2-OH y 3-OH). Estos hidroxilos son capaces de reaccionar con reactivos multifuncionales dando como resultado almidones entrecruzados. El entrecruzamiento se realiza para evitar el hinchamiento de los gránulos de almidón en condiciones de cocción o para evitar la gelatinización de este. Las moléculas de almidón se pueden interconectar por reacciones con pequeñas cantidades del reactivo multifuncional. Los enlaces covalentes formados por entrecruzamiento actúan como refuerzo de la estructura granular, controlando el hinchamiento y produciendo almidones que pueden tolerar altas temperaturas, esfuerzos de corte y condiciones ácidas. El entrecruzamiento altera la gelatinización del gránulo de almidón; se requiere de una mayor energía para separar las moléculas, por lo que se incrementa la temperatura de gelatinización. La viscosidad máxima desarrollada es mayor debido a que el almidón retiene su estructura molecular; se presenta una retrogradación muy pequeña o nula (Wurzburg 1986). Los reactivos de calidad alimentaria permitidos por la FDA para la preparación de almidones entrecruzados son cloruro de fósforo, trimetafosfato de sodio, acético adípico mezclado con anhídrido, y mezclas de trimetafosfato de sodio y tripolifosfatos. Almidones con un bajo nivel de entrecruzamiento muestran picos más altos de viscosidad con relación a sus respectivos almidones nativos (Xie y col. 2005).

2.4.4.3 Reacciones de eterificación

La eterificación confiere estabilidad al almidón y excelente viscosidad. Almidones hidroxialquilados, incluyendo hidroxietilado e hidroxipropilado, se

producen principalmente para aplicaciones industriales. El almidón hidroxietilado aún no ha sido aprobado como aditivo alimentario directo, aunque puede ser utilizado como aditivo alimentario indirecto, como agente de pegamento en papel para alimentos, mientras que, el almidón hidroxipropilado se utiliza principalmente para la industria alimentaria. El almidón hidroxipropilado, se obtiene por la reacción de óxido de propileno con almidón, bajo condiciones alcalinas (Xie y col. 2005).

2.4.4.4 Reacciones de esterificación

Ésteres de almidón son un grupo de almidones modificados, en los que algunos grupos hidroxilo han sido reemplazados por grupos éster. Los reactivos aprobados por la FDA para la preparación de monoésteres de almidón son el anhídrido acético, acetato de vinilo, anhídrido succínico, anhídrido 1-octenil succínico y tripolifosfato de sodio. Los tres tipos de ésteres de almidón más estudiados son los almidones: a) almidón acetilado se prepara principalmente haciendo reaccionar el almidón con anhídrido acético, b) almidón succinatado y alquenilsuccinato, que se producen por la reacción del almidón con anhídrido succínico y anhídrido succínico sustituido con grupos alquenil y c) almidón fosfatado resultante de la reacción del almidón con tripolifosfato y/o trimetafosfato de sodio (Xie y col. 2005).

2.4.4.4.1 Almidones acetilados

La acetilación del almidón en suspensión acuosa con anhídrido acético con un pH alcalino se usa comercialmente para producir acetatos de almidón de bajo grado de sustitución. Bajo condiciones alcalinas, el almidón reacciona indirectamente con el anhídrido carboxílico. En la Figura 8 se muestra las reacciones durante la acetilación; En primer lugar se forma un complejo alcalino con el almidón que a su vez interactúa con el anhídrido carboxílico para formar un éster de almidón con la eliminación de los iones carboxilato y una molécula de

agua (reacción 1) (Aszalos y Prey 1962, Jarowenko 1986). Durante el proceso de acetilación se presentan dos reacciones secundarias, incluyendo la desacetilación de almidón (reacción 2) y la formación de acetato de sodio (por producto) (reacción 3).

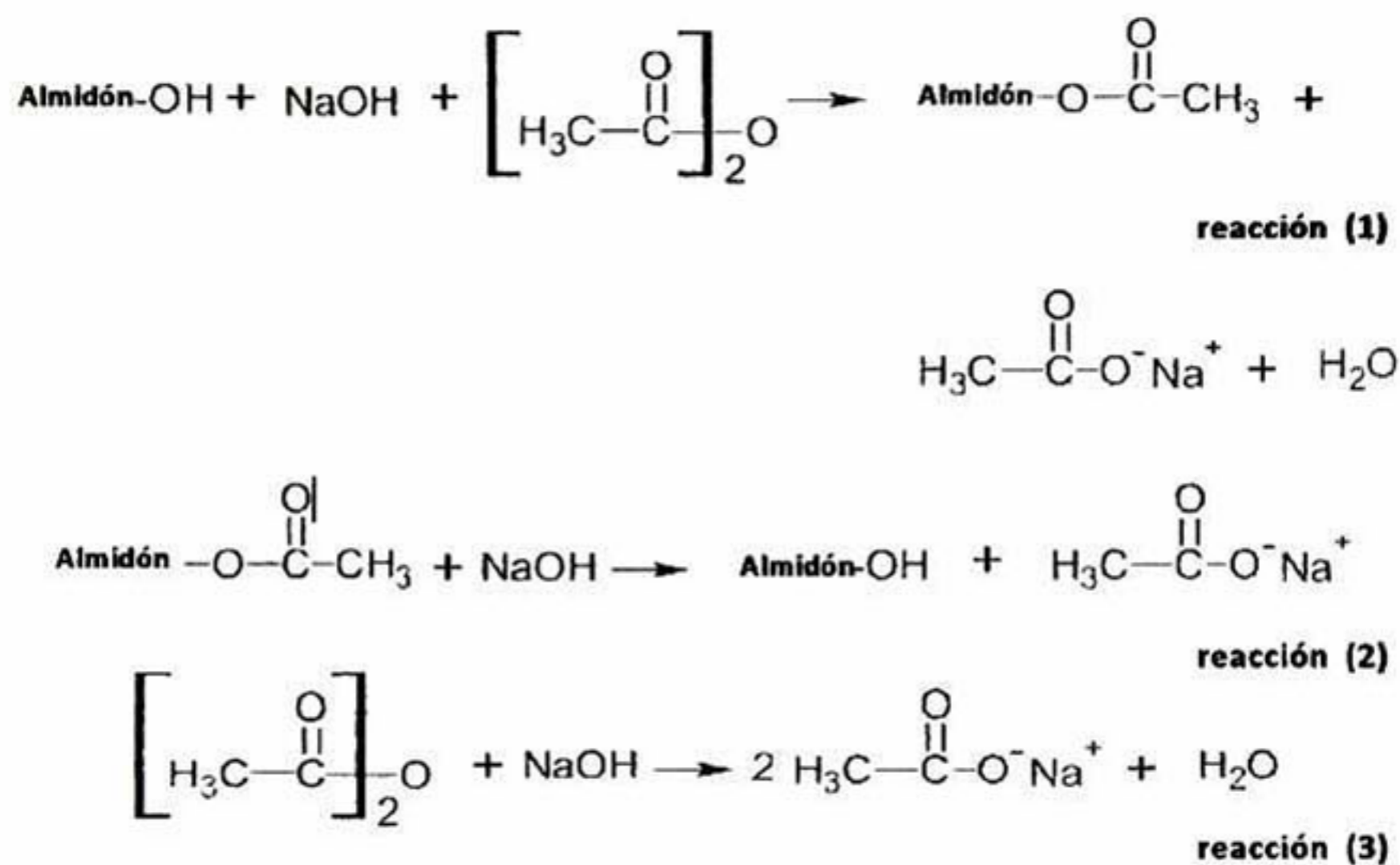


Figura 8. Reacciones químicas durante la acetilación del almidón.

Rutenberg y Solarek (1984) reportaron que la introducción de grupos acetil reduce los puentes de hidrógeno entre las moléculas de almidón e incrementa la solubilidad del gránulo y reduce la retrogradación por lo que le confiere estabilidad durante el congelamiento. El grado de cambios en las propiedades fisicoquímicas del almidón acetilado con respecto al almidón nativo o el grado de acetilación (GS) depende del grado de C=O sustituidos incorporados en la molécula de almidón. Existen algunos estudios relacionados con la acetilación del almidón. La FDA indica que no se debe exceder del 2.5% de grupos acetil en almidones modificados para su aplicación en alimentos.

2.4.4.4.2 Almidones succinatados

Los ésteres de almidón succinatado son preparados comercialmente por la reacción básica de anhídridos de alquenil succínico con el almidón granular en suspensión acuosa. La sustitución puede ocurrir en las posiciones 2, 3, y 6 de los carbonos de la unidad de glucosa. El anhídrido más utilizado para esta modificación es el octenilsuccinato anidro (OSA). La reacción del almidón con 1-octenil succinato se muestra en la Figura 9. Los almidones OSA son efectivos emulsificadores por tener grupos bifuncionales tanto hidrofóbicos como hidrofílicos (Tesh y col. 2002). A diferencia de los surfactantes comunes, los almidones alquenil succinatados forman películas fuertes en la interface aceite/agua, proporcionando a la emulsión resistencia a la reaglomeración.

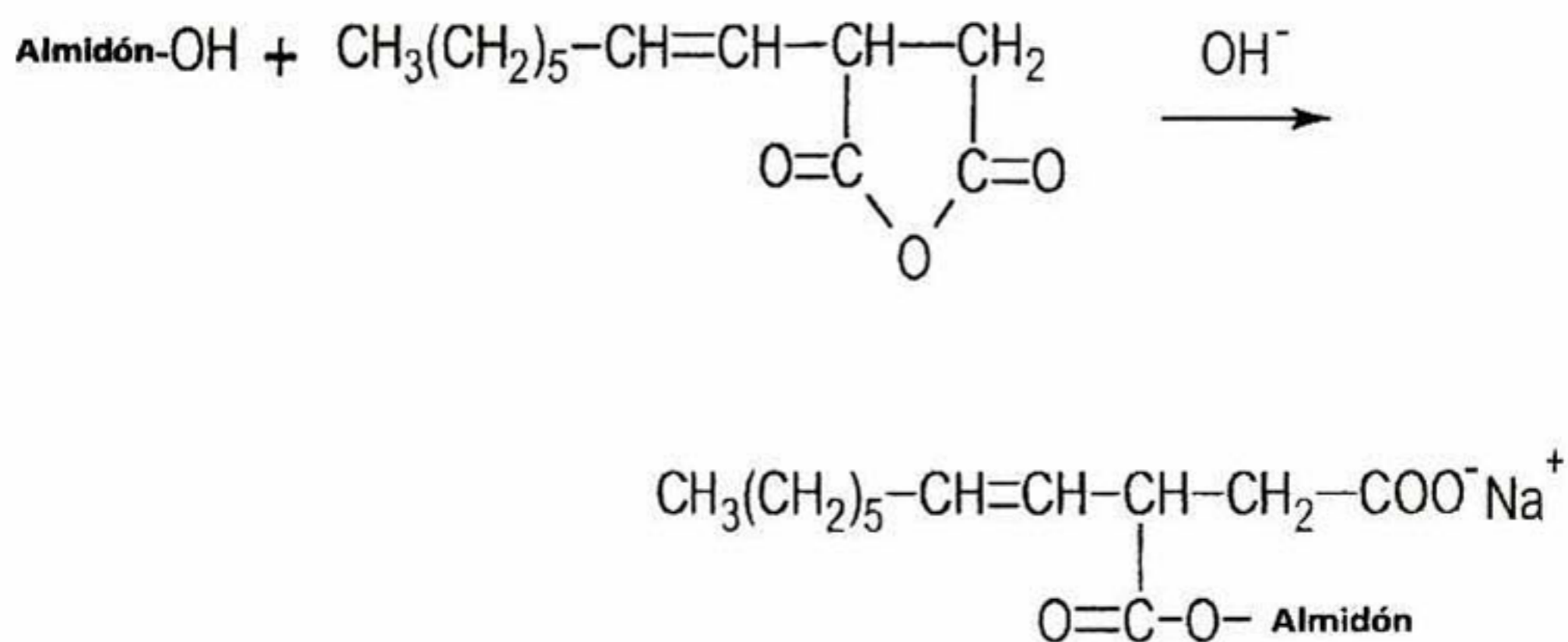


Figura 9. Reacción química durante la succinatación del almidón.

La derivatización del almidón con un grupo iónico como el succinato y bajos grados de sustitución (GS) convierte al almidón en un polielectrolito e incrementa su solubilidad (Robert 1976). La FDA establece hasta el 3% de anhídrido succínico para modificaciones con aplicaciones alimentarias y grados de sustitución con GS

cerca de 0.02. La modificación de almidones con n-OSA (n-anhidrido octenil succínico) fue patentada por Cadwell y Wurzburg (1953). Las soluciones acuosas de los almidones alquénil succinatos y en particular almidones OSA, han sido usadas para estabilizar concentrados de sabor en bebidas, aceite en aderezos, para encapsular sabores, aromas y vitaminas en formulaciones mediante secado por aspersión (Shogren y col. 2000). Almidones hidrolizados y octenilsuccinatados de almidón ceroso de maíz se encuentran de manera comercial entre los que destacan: HiCap, Capsul, Nlok, Emcap y Cleargum (Bhosale y Singhal 2006).

2.4.4.4.3 Almidones fosfatados

Los almidones fosfatados están diseñados para superar las deficiencias mostradas por los almidones nativos y la fosfatación puede llevarse a cabo a través de la esterificación de los grupos hidroxilos con agentes fosforilantes, como el tripolifosfato de sodio, el meta fosfato de sodio y el oxiclورو de fósforo (Kim y col. 1999, Sitohy 2000). En la Figura 10 se muestra la representación de un almidón fosfatado con TPS. De acuerdo a la FDA, el fósforo residual en el almidón para uso alimenticio está regulado en base al agente fosfatante empleado. Para el almidón modificado por TPS el límite en el grado de sustitución (GS) está establecido en 0.04 (Kim y col. 1999).

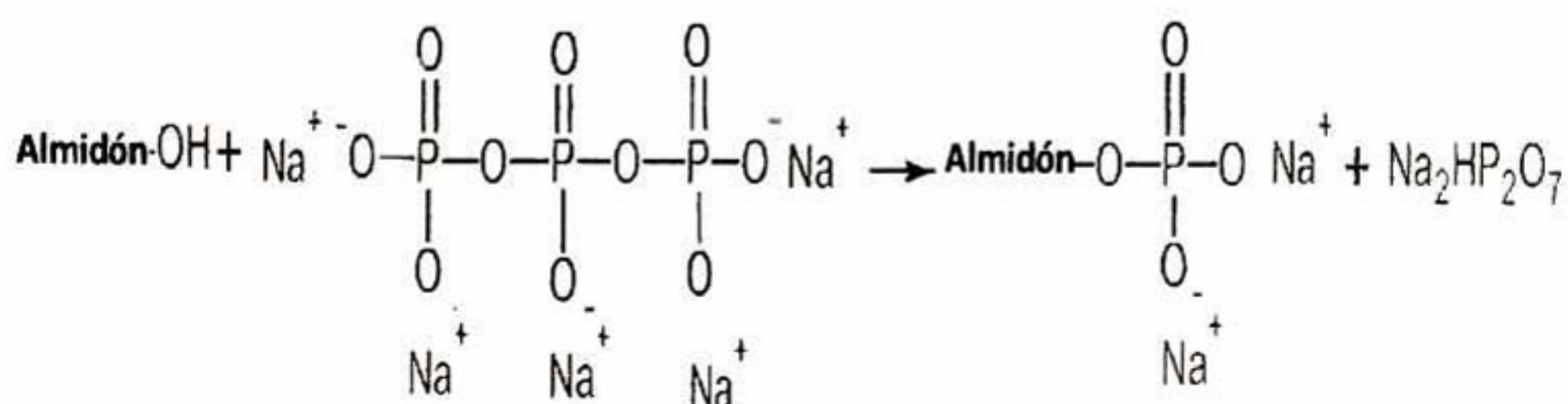


Figura 10. Reacción química durante la fosfatación del almidón.

El reactivo de tripolifosfato de sodio (TPS) es un anhídrido parcial del ácido ortofosfórico y es utilizado para formar ortofosfatos de almidón monoéster con un GS de 0.02. Puede usarse a temperaturas moderadas (100°C a 120°C) en la fosfatación del almidón. El almidón fosfatado por esterificación ha sido preparado para alcanzar niveles de fosfatación mayores del 2% por la vía de los métodos convencionales. Sin embargo, la fosfatación mediante el método de extrusión termoplástica, normalmente produce almidones fosfatados a un nivel menor de fósforo que van del 0.1 al 0.4% (Kim y col. 1999).

2.5 Amaranto

2.5.1 Características generales

El amaranto (*huautli* en náhuatl) fue la principal cosecha en las dinastías Azteca e Inca; su presencia en Tehuacán se remonta a 4 mil años A.C. lo que lo convierte en uno de los cultivos más antiguos. La familia *Amaranthaceae* comprende más de 60 géneros y 800 especies de plantas herbáceas anuales y perennes. El género *Amaranthus* (significa inmortal en griego) tiene tres especies que producen grandes vainas repletas de granos, *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, cultivadas en Mesoamérica, y *A. caudatus* en Perú; diversos materiales genéticos derivados de estas especies son originarios de Mesoamérica y de aquí migraron a otras regiones del mundo (Paredes López y col. 1989, Lehmann 1996).

El amaranto es un pseudocereal, la planta crece en condiciones de baja disponibilidad de agua, suelos pobres, altitudes elevadas, y ante la presencia de infinidad de plagas; es decir, es tolerante a condiciones ambientales adversas bajo las cuales los cereales tienen pocas opciones, por lo que tiene un gran potencial económico, la producción anual estimada en todo el mundo es de 470×10^6 toneladas (Hauptli 1977, Lehmann 1996).

Los granos de amaranto contienen aproximadamente 4% de cenizas, 3.1-11.5 de lípidos, 15-22% de proteína, 9-16% fibra dietaria, y 58-66% de almidón. Tiene un atractivo especial pues es una fuente rica en aminoácidos esenciales

especialmente lisina y aminoácidos sulfurados, los cuales son limitados en otros cereales (Pedersen y col. 1987, Tosi y col. 2001). Las gluteninas, representan la mayor fracción proteica en el grano de amaranto en un rango de 42-46%, del total de proteína, las cuales son solubles en solución alcalina (Radosavljevic y col. 1998). Actualmente el amaranto es considerado un cultivo alternativo e investigadores en muchas partes del mundo se han centrado en la mejora de las características agronómicas de la planta, la calidad nutricional y la tecnología de procesamiento de los granos.

2.5.2 Almidón de amaranto

Recientemente almidones con propiedades y funcionalidades diferentes han atraído el interés de diferentes investigadores y la industria para diversas aplicaciones. El componente más abundante de las granos de amaranto es el almidón, el cual se encuentra localizado en el perispermo, este contenido es reportado en un rango de 48% a 69% (base seca) dependiendo de las especies, y esta reportado que contiene de 92% a 95% de amilopectina (Saunders y Becker 1984). El almidón de amaranto ha recibido gran atención, debido a sus pequeños gránulos que van de 1-3 μm y de forma esférica o poligonal (Irving y Becker 1985), lo cual le confiere propiedades únicas para aplicaciones alimentarias y no alimentarias, como sustitutos de grasa y revestimientos de papel además de que el gránulo muestra buena estabilidad al congelamiento/descongelamiento, y resistencia a la cizalla mecánica (Singhal y Kulkarni 1990).

Diferentes investigadores han reportado diferentes métodos de extracción para el almidón de amaranto a escala laboratorio, ya que debido a tamaño de su gránulo es un proceso difícil. Los métodos más utilizados son a través de la molienda húmeda-alcalina; sin embargo, altas concentraciones de álcali provocan daños en la calidad del almidón e incrementa costos (Radosavljevic y col. 1998).

Radosavljevic y col. (1998) realizaron la extracción de almidón de amaranto a partir de granos, utilizando un método con una concentración baja de NaOH y aplicaron la acción de enzimas proteasas para el incremento en el rendimiento del almidón obtenido. Estos concluyeron que utilizando una concentración de 0.2% de proteína y bajas concentraciones alcalinas se recobró cerca del 80% del total de almidón presente en la semilla, finalmente a través del método utilizado, obtuvieron almidones de mejor calidad, y observaron reducción en costos.

Bhandari y Singhal (2002), realizaron un estudio donde optimizaron las condiciones para la succinatación de almidones de amaranto y maíz utilizando anhídrido succínico, estos autores determinaron el porcentaje de los grupos succinil y el grado de sustitución de los almidones modificados de manera convencional. Estos autores reportaron que los almidones derivatizados de ambas fuentes presentaron grados de sustitución relacionados con la concentración de reactivos y tiempo de reacción.

Kshirsagar y col. (2008) realizaron la microencapsulación de aceite de limón en una matriz de almidón de amaranto modificado (hidroxipropilado), la extracción del almidón de amaranto a través de método alcalino; estos autores reportaron que el almidón de amaranto modificado presenta excelentes propiedades para la microencapsulación de este principio activo.

3. HIPÓTESIS

Es factible microencapsular células probióticas utilizando almidones modificados de amaranto mediante secado por aspersión. Así como mantener la sobrevivencia de los probióticos microencapsulados cuando son expuestos a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal y durante el almacenamiento.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Microencapsular *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 utilizando almidón de amaranto modificado como material de pared y evaluar la sobrevivencia de estos organismos microencapsulados en diferentes condiciones de almacenamiento, exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI) y durante el almacenamiento de las microcápsulas incorporadas en un sistema modelo alimentario.

4.2 Objetivos específicos

1. Extraer almidón nativo de amaranto y modificar químicamente el almidón obtenido mediante el método convencional (succinatación y acetilación) y mediante extrusión termoplástica (fosfatación).
2. Caracterizar los almidones: nativo y modificados de amaranto.
3. Microencapsular los probióticos: *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 utilizando como agentes encapsulantes almidones modificados de amaranto, empleando la tecnología de secado por aspersion.
4. Caracterizar las microcápsulas obtenidas (sobrevivencia, humedad, actividad de agua y morfología externa de las microcápsulas).
5. Evaluar la estabilidad de las microcápsulas conteniendo *B. breve* ATCC 15700 y *L. casei* ATCC 334 almacenadas a 25°C equilibradas en sales con actividades de agua de 0.329, 0.536, y 0.765, y a 4°C con actividades de agua de 0.355, 0.587 y 0.807.
6. Evaluar la sobrevivencia de los microorganismos microencapsulados en un sistema modelo alimentario (avena instantánea) durante el almacenamiento a 25°C durante 35 días.
7. Evaluar la tolerancia a condiciones simuladas del Tracto Gastrointestinal (TGI) de los microorganismos probióticos *B. breve* ATCC 15700 y *L. casei* ATCC 334 microencapsulados e incorporados a un sistema modelo alimentario (avena instantánea).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Metodología general

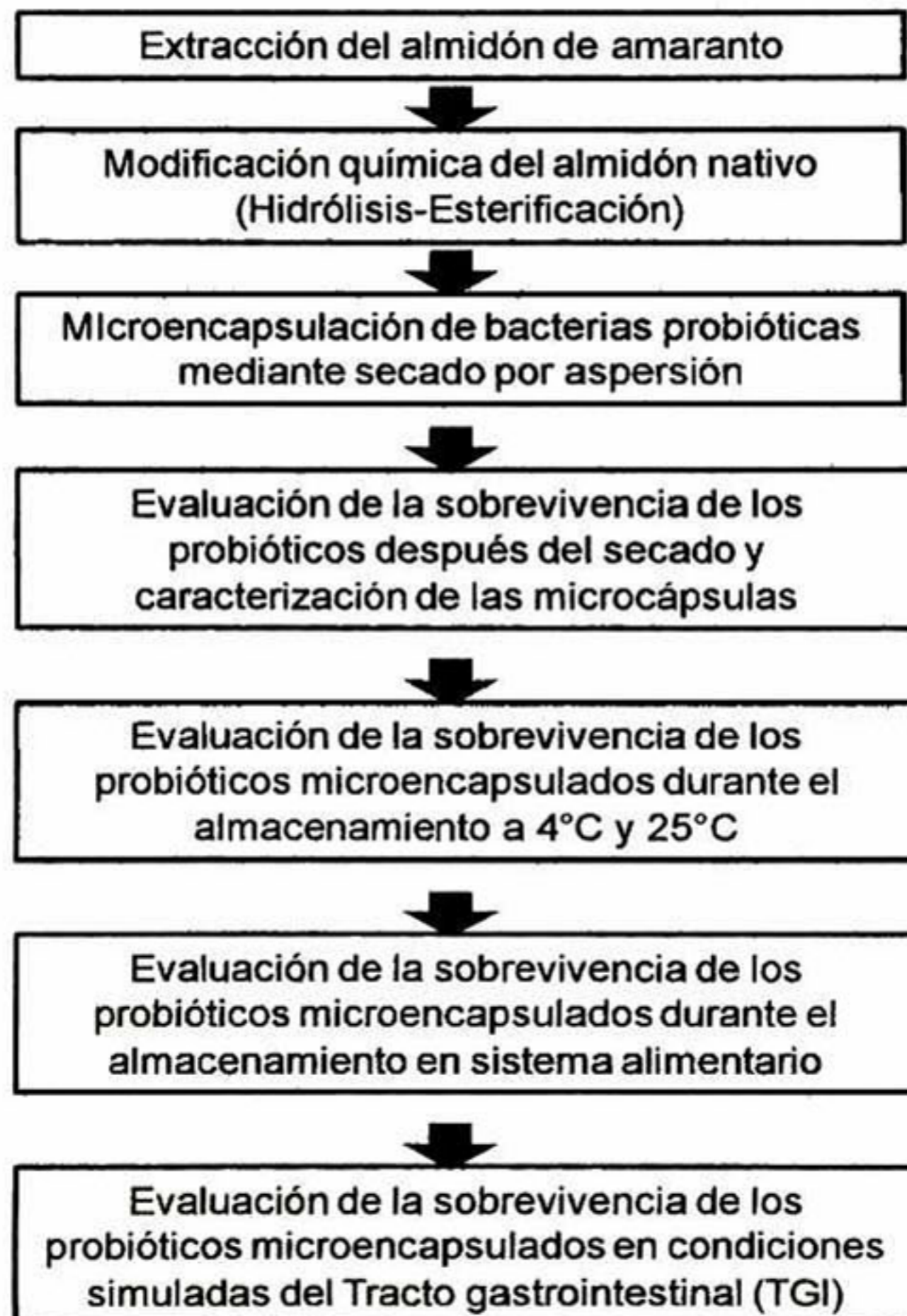


Figura 11. Esquema general del desarrollo de la investigación.

Este proyecto se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Querétaro. La parte de simulación del tracto gastrointestinal se desarrolló en el laboratorio de desarrollo e innovación de alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.2 Materias primas

Fueron donados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP México) granos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) variedad nutrisol. En este estudio fueron utilizadas las cepas de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 como microorganismos probióticos obtenidos de la colección de cepas "the American Type Culture Collection" (ATCC*, Manassas, VA). Fue utilizado como control almidón de maíz ceroso hidrolizado enzimáticamente y modificado N-lok obtenido de National Starch and Chemical de México, S.A. de C.V.

5.3 Metodología

5.3.1 Extracción del almidón de amaranto

La extracción del almidón de amaranto se realizó a través de una molienda húmeda-alcalina (Myers y Fox 1994, Radosavljevic y col. 1998) con algunas modificaciones, 1 Kg de grano de amaranto se colocó en un recipiente y se agregaron 1.5 L de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N de manera que el grano quedó totalmente cubierto por la solución, se dejó 24 h en reposo con agitación repentina. En el método de extracción utilizado en este trabajo, se basó en la solubilidad de las proteínas de Osborne (1994); se utilizó una solución de NaOH 0.1N para solubilizar las glutelinas encontradas en el grano de amaranto. Se lavó el grano con agua hasta retirar totalmente los residuos de NaOH, posteriormente, se realizó una molienda húmeda con hielo en un molino de piedras (Fumasa), la suspensión de amaranto molido fue tamizada, con la finalidad de obtener el almidón, a través de una serie de mallas con abertura de 841 μm , 595 μm , 420

μm , 250 μm , 177 μm , 149 μm , 74 μm y 62.5 μm mientras se enjuagaba el residuo que quedó en la malla con una solución fría de bisulfito de sodio (NaHSO_3) 0.1 N. Se centrifugó la suspensión a 2500 rpm por 10 min en un equipo Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K, el precipitado fue extendido en recipientes de aluminio y secado en un horno Felisa a 40°C, posteriormente se molió en un equipo Mini Pulvex modelo 100 y finalmente se tamizó usando una malla con abertura de 250 μm . El rendimiento (%) del proceso de extracción fue calculado de acuerdo a lo reportado por Calzetta y col. (2006).

5.3.2 Caracterización del almidón de amaranto

5.3.2.1 Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó de acuerdo al método 934.0 descrito por la AACCC (2000). Se colocaron recipientes de aluminio por una hora en un horno Felisa a temperatura de 110°C, una vez transcurrido este tiempo los recipientes fueron colocados en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, posteriormente, fueron pesados y este valor fue registrado como w_1 . Se tomaron 2.0 g de muestra de almidón previamente homogenizada en los recipientes de aluminio (w_2), nuevamente los recipientes fueron colocados en la estufa a 110°C durante 24 h y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente dentro de un desecador para luego ser pesados (w_3). Los cálculos se determinaron con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{w_2 - w_3}{w_2 - w_1} \times 100$$

Donde:

w_1 : masa del recipiente vacío (g).

w_2 : masa del recipiente con la muestra antes del secado (g).

w_3 : masa del recipiente con la muestra después del secado (g).

5.3.2.2 Determinación del contenido de proteína

Se utilizó el método 32.1.22 de la AACC (2000) con algunas modificaciones, en un equipo micro Kjeldhal Gerhardt. Se colocó 1.0 g de muestra seca y desengrasada en un tubo Kjeldhal, se agregaron 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado y un comprimido del catalizador de sulfato de cobre (II) y sulfito de potasio (0.5 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y 5.0 g de K_2SO_4). Se colocó el tubo Kjeldhal en el digestor dejándolo digerir hasta que alcanzó una coloración verde claro, la solución se dejó enfriar, posteriormente se colocó en el destilador un matraz Erlenmeyer con 25 mL del indicador (verde de bromocresol y rojo de metilo en una solución al 4% de ácido bórico) y el tubo con la muestra donde se le agregaron de 10 a 15 mL de hidróxido de sodio (NaOH al 40%) y se destilaron por lo menos 100 mL. Finalmente el contenido del matraz fue titulado con solución estándar de ácido clorhídrico (HCl 0.1 N). Para determinar el porcentaje de nitrógeno y de proteína se utilizaron las siguientes relaciones:

$$\% \text{Nitrogeno} = \frac{(V)(N_{\text{ác.}})(0.014)}{(m)} \times 100$$

$$\% \text{Proteína} = (\% \text{Nitrogeno})(\text{Factor})$$

Donde:

V: Volumen de ácido utilizado (mL).

N: Normalidad del ácido.

m: Masa de la muestra (g).

Factor: el factor de conversión utilizado para el amaranto fue 5.85

5.3.2.3 Determinación del contenido de extracto etéreo

La determinación del extracto etéreo, se realizó de acuerdo al método 30.10 descrito por la AACC (2000) con algunas modificaciones. Se colocaron 2.0 g de muestra (P) en un dedal o cartucho el cual se cubrió con algodón. El cartucho fue introducido en el cuerpo extractor del equipo Soxhlet para luego colocar un matraz bola de 250 mL en la parte inferior de éste, llevado previamente a peso constante (definido como P_1) y ocupado hasta 2/3 partes de su volumen con éter etílico; se

conectó el refrigerante al cuerpo del extractor, el agua se hizo circular por el refrigerante y se inició el calentamiento hasta que se obtuvo una frecuencia de 2 gotas por segundo y la extracción se efectuó durante 5 h, después del tiempo transcurrido de extracción se suspendió el calentamiento, se retiró el dedal y se recuperó el solvente para finalmente colocar el matraz bola en un horno Felisa a 110°C permitiendo la total evaporación del éter hasta obtener un peso contante (definido como P₂). Para calcular el porcentaje de extracto etéreo total se utilizó la siguiente relación.

$$\% \text{Extracto etéreo} = \frac{P_2 - P_1}{P} \times 100$$

Donde:

P₁: masa del matraz vacío (g).

P₂: masa del matraz con muestra (g).

P: masa de la muestra (g).

5.3.2.4 Determinación del contenido de cenizas

Esta técnica fue realizada de acuerdo a lo descrito por el método 942.05 de la AACC (2000). Se colocaron 2.0 g de muestra (m) en un crisol de porcelana a peso constante (X₁), el cual se colocó a fuego directo para quemar el material hasta que ya no se desprendieran humos. El crisol fue llevado a una mufla Felisa para efectuar la calcinación completa por 5 h a 550°C. Posteriormente se dejó enfriar la muestra por 8 h dentro de la mufla, para luego transferir el crisol a un desecador y una vez que éste llegó a temperatura ambiente fue pesado (X₂). Para la determinación del porcentaje total de cenizas se utilizó la siguiente relación:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{(X_2 - X_1)}{m} \times 100$$

Donde:

X₁: masa del crisol vacío (g).

X₂: masa del crisol con las cenizas (g).

m: masa de la muestra (g).

5.3.2.5 Caracterización morfológica de los gránulos (SEM)

Se llevó a cabo por microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) de acuerdo con la metodología descrita por Gunning y col. (1999) con algunas modificaciones. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (ESEM Phillips, modelo XL30, Holanda), en condiciones de bajo vacío (0.7 mBar) con un voltaje de aceleración de 15.0-20.0 KV, aproximadamente 50 μ A de corriente, un detector GSE (Gaseus Secondary Electron) y un spotsize del láser de 3.8-4.6. Las muestras de los almidones nativos y modificados fueron fijadas en portamuestras de aluminio con semicírculos de cinta adhesiva doble cara de grafito, expandidas por medio de aire comprimido y observadas a diversos aumentos.

5.3.2.6 Contenido de amilosa

Esta determinación se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Williams y col. (1970). Se pesaron 20 mg de la muestra en un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 10 mL de una solución 0.5 N de hidróxido de potasio (KOH) y se mantuvo en agitación continua (con un agitador magnético) por 5 min o hasta que estuviera totalmente disperso el almidón, posteriormente se llevó el volumen cuidadosamente hasta la marca de aforo. Se tomó un alícuota de 10 mL de la solución de almidón anterior, se situó en un matraz volumétrico de 50 mL y se agregaron 5 mL de una solución 0.1 N de ácido clorhídrico (HCl), después se añadieron 0.5 mL del reactivo de yodo (se colocan 20 g de yoduro de potasio y 2.0 g de yodo resublimado en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y se llevaron a la marca de aforo con agua destilada, posteriormente se tomaron 10 mL de esta solución y se añadieron en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y se aforó cuidadosamente con agua destilada). El volumen se llevó hasta la marca de aforo, la solución se dejó en reposo por 5 min y la absorbancia del color azul fue medida a 625 nm en un espectrofotómetro (UV- Visible Spectrometer Cintra 20 GBC) también se corrió un blanco como referencia. Para realizar la curva de calibración se colocaron en matraces volumétricos de 100 mL

las siguientes relaciones amilosa (mg)/amilopectina(mg): 2/8, 4/16, 6/24, 8/32, 10/40 y 12/48 y después se les dio el mismo tratamiento y lectura que a los 20 mg de muestra mencionados con anterioridad.

5.3.2.7 Perfiles de viscosidad

Estos análisis se les realizaron a los almidones nativos, hidrolizados y almidones modificados, fueron medidos en un equipo 3C Rapid Visco Analyzer (Newport Scientific PTY LTD, Sydney Australia). Se colocaron 2.5 g (base seca) de muestra cribada por una malla con abertura de 250 μm , adicionando la cantidad de agua destilada necesaria para alcanzar un peso total de 28 g de suspensión en un recipiente de aluminio. La muestra se colocó en el viscosímetro, el cual produce una agitación rápida durante 10 s, para luego estabilizarse a velocidad constante de 75 rpm. La temperatura inicial de 50°C fue mantenida durante un minuto y posteriormente la temperatura fue elevada a 92°C a una velocidad de calentamiento de 5.6°C/min. Una vez alcanzada la temperatura indicada, ésta se mantuvo constante durante 5 min; el enfriamiento se llevó a cabo a la misma velocidad de calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 50°C. La temperatura final se mantuvo constante durante 2 min y el tiempo total de la prueba fue de 23 min manteniendo una agitación constante durante todo el análisis.

5.3.2.8 Propiedades térmicas

Esta técnica fue efectuada de acuerdo a la metodología descrita por Narváz y col. (2007) con algunas modificaciones. Para llevar a cabo los análisis térmicos se usó un calorímetro diferencial de barrido (DSC Mettler Toledo modelo 821). 3 mg de muestra molida y cribada con malla 60 (250 μm) y 7 mg de agua destilada fueron colocados en un crisol de aluminio de 40 μL , que fue sellado con una prensa Mettler Toledo. El crisol se colocó en el equipo; la muestra fue sometida a calentamiento de 30°C a 100°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Del termograma obtenido se determinaron los siguientes parámetros:

temperatura de inicio (T_0), temperatura final (T_c), temperatura de pico (T_p), así como la entalpía de gelatinización (ΔH).

5.3.3 Hidrólisis ácida

El almidón nativo de amaranto fue hidrolizado de acuerdo a lo reportado por Murúa-Pagola y col. (2009). Se preparó una suspensión de almidón al 40% de sólidos con una solución que contenía ácido clorhídrico (HCl) en una concentración de 3.4% con respecto a los sólidos de almidón. La hidrólisis se llevó a cabo a una temperatura de $50 \pm 2^\circ\text{C}$ en un baño María, manteniéndose en agitación constante durante 6 h. Posteriormente se ajustó el pH a 5.0 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10% y la suspensión fue centrifugada a 6000 rpm, durante 10 min en una centrifuga Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K. El sedimento se recuperó y lavó 2 veces con agua destilada para eliminar residuos de ácido. La pasta de almidón fue secada en un horno Felisa a una temperatura de 45°C por 24 h, después el almidón fue molido en un equipo (Mini Pulvex modelo 100) y se tamizó con una malla de $250 \mu\text{m}$ para su posterior modificación química

5.3.4 Modificaciones químicas del almidón

5.3.4.1 Fosfatación de almidón por extrusión termoplástica

Se realizó de acuerdo a lo reportado por Murúa-Pagola y col. (2009) con modificaciones. La fosfatación de almidón se realizó en un extrusor de tornillo simple (CINVESTAV-IPN). Las temperaturas del barril fueron 50 , 130 y 170°C en las zonas de alimentación, de transición y de alta presión respectivamente, con una velocidad de tornillo de 80 rpm y de alimentación de 35 rpm, relación de compresión del tornillo de 2:1 y un dado con un diámetro de salida de 4.0 mm. Se emplearon 4 g de tripolifosfato de sodio/100 g de almidón acondicionado a 25% de humedad, pH de 4.5-5.0 y almacenadas en bolsas de polipropileno a 4°C . Posteriormente las muestras fueron extrudidas y molidas a $250 \mu\text{m}$.

5.3.4.2 Acetilación de almidón usando el método convencional

Se siguió el método descrito por Phillips y col. (1999) en suspensión acuosa. Se dispersaron 100 gr de almidón hidrolizado por ácido en 230 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 8.0 con solución acuosa de NaOH al 3% y se adicionaron por goteo 2.5 g de anhídrido acético/100 g de almidón en agitación constante. La suspensión de almidón se mantuvo en agitación por 10 min adicionales después de la adición del reactivo y posteriormente fue centrifugada a 6000 rpm durante 10 min. La pasta del almidón succinatado fue secada en un horno Felisa a una temperatura de 40°C por 24 h, luego molido en un equipo (Mini Pulvex modelo 100) y cribado en una malla de 250 μm . Una vez llevada a cabo la modificación química, las muestras fueron acondicionadas a 25% de humedad y extrudidas en las mismas condiciones de extrusión descritas para la fosfatación de almidón.

5.3.4.3 Succinatación de almidón usando el método convencional

Se realizó de acuerdo al método descrito por Murúa-Pagola y col. (1999) en suspensión acuosa. El almidón modificado fue extrudido en las condiciones descritas para almidón fosfatado. Se preparó una suspensión en agua al 30-35% de sólidos del almidón (base seca) sometido previamente a una hidrólisis ácida, se mantuvo en agitación constante y se le adicionó por goteo, anhídrido n-octenil succínico en una proporción de 2 mL/100 g de almidón en base seca, durante 2 h y se ajustó continuamente a un pH de 8.0-8.5 con una solución de NaOH al 3%. Se mantuvieron las mismas condiciones durante un tiempo total de 6 h. Posteriormente se ajustó el pH a 5.0 y la suspensión fue centrifugada a 6000 rpm, durante 10 min en una centrifuga Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K. Se llevaron a cabo 2 lavados del sedimento con agua destilada para eliminar residuos del reactivo. La pasta del almidón succinatado fue secada en un horno Felisa a una temperatura de 40°C por 24 h, luego molido (Mini Pulvex modelo 100) y cribado en una malla de 250 μm .

5.3.5 Caracterización fisicoquímica de los almidones modificados

5.3.5.1 Grado de sustitución (GS) en almidón fosfatado

El grado de sustitución de fósforo se determinó de acuerdo al método descrito por Smith y Caruso (1964) con algunas modificaciones. Las muestras de almidón nativo y fosfatado por extrusión se lavaron con una solución de etanol al 65% (v/v) y después con metanol anhidro para eliminar los fosfatos libres, posteriormente las muestras se secaron en un horno Felisa a 40°C por 24 h. Se colocaron 5.0 g de muestra molida y tamizada en una malla con abertura de 250 μm , en un crisol de porcelana grande. Se agregaron 10 mL de acetato de zinc dihidratado $[\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ al 10% distribuyéndolo uniformemente en toda la muestra. El crisol se colocó en un plato caliente hasta que el líquido se evaporó totalmente, a continuación se calentó a fuego directo hasta carbonizar la muestra y se introdujo en una mufla Felisa a una temperatura de 550°C durante 2 h. El crisol se enfrió hasta temperatura ambiente y el residuo se humedeció con 3 mL de ácido nítrico (HNO_3) al 29%. La muestra fue calentada en un plato caliente hasta evaporar el contenido líquido y se colocó en la mufla a 550°C por 30 min.

Después de alcanzar la temperatura ambiente, las paredes del crisol se lavaron con 10 mL de ácido nítrico al 29% y se adicionaron 15 mL de agua. El crisol fue cubierto con un vidrio de reloj, la solución residual se calentó hasta comenzar a hervir y se mantuvo así durante 10 min. Se enfrió el crisol a temperatura ambiente y se filtró su contenido a través de papel Whatman N° 1 en un matraz volumétrico de 100 mL. La transferencia del residuo se complementó adicionando 10 mL de agua al crisol en repetidas ocasiones, se aforó y se mezcló. Una alícuota de 25 mL (que no contenía más de 2.4 mg de fósforo) se pipeteó en un matraz volumétrico de 100 mL. En otro matraz volumétrico fue preparado un blanco con 25 mL de agua destilada.

Los siguientes reactivos fueron adicionados a ambos matraces: 20 mL de ácido nítrico (HNO_3) al 29%, 20 mL de vanadato de amonio (NH_4VO_3) al 0.25% y 10 mL de solución de molibdato de amonio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ al 5%. Ambas soluciones se diluyeron hasta aforar con agua destilada y se mezclaron vigorosamente, se dejó reposar durante 20 min hasta su lectura en el

espectrofotómetro. Se colocó el blanco en una celda de cuarzo y se determinó la absorbancia de la solución a 460 nm en un espectrofotómetro (UV- Visible Spectrometer Cintra 20 GBC) esta lectura se usó como referencia para fijar el valor de cero absorbancia, posteriormente se leyó la muestra.

Para la curva de calibración se prepararon soluciones estándar de fósforo que contenían 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg de fósforo en 25 mL de agua destilada, se colocaron en matraces volumétricos de 100 mL y se preparó un blanco con 25 mL de agua destilada. A cada matraz se agregaron los siguientes reactivos en el orden indicado, agitando después de cada adición: 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) al 29%, 10 mL de vanadato de amonio (NH₄VO₃) al 0.25% y 10 mL de molibdato de amonio [(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O] al 5%. Todas las soluciones se aforaron con agua destilada agitando vigorosamente y se dejaron en reposo durante 10 min antes de su lectura en un espectrofotómetro (UV- Visible Spectrometer Cintra 20 GBC). La concentración de fósforo (mg/100 mL) de la soluciones que contenían la muestras se obtuvo de la ecuación de la curva de calibración. Las relaciones empleadas para determinar la concentración y el grado de sustitución de fósforo son las siguientes:

$$\%Fosforo = \frac{CVF}{1000 M} \times 100$$

$$GS_{Fósforo} = \left(\frac{162P}{3100 - 124P} \right)$$

Donde:

C: contenido de fósforo (mg/ 100 mL) obtenido de la curva de calibración.

V: volumen de la dilución (es 100 mL si no se altera este volumen al diluir la muestra filtrada).

F: factor de dilución.

M: cantidad de muestra (g).

GS_{Fósforo}: grado de sustitución de fósforo

P: porcentaje de fósforo del almidón fosfatado.

5.3.5.2 Grado de sustitución (GS) en almidón acetilado.

El nivel de acetilación se determinó de acuerdo con el método de Wurzburg (1978). Esta determinación se le realizó a los almidones nativos y a los modificados; se colocó 1.0 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 50 mL de una solución de etanol-agua (75% v/v). La mezcla se agitó y se mantuvo a 50°C durante 30 min. A continuación se enfrió y se agregaron 40 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N; esta mezcla se mantuvo durante 72 h con agitación ocasional. El exceso de álcali fue titulado con una solución estándar de ácido clorhídrico (HCl) 0.5 N, usando fenolftaleína como indicador. La solución se dejó en reposo por 2 h. Las muestras de almidón nativo fueron usadas como blancos. El porcentaje de acetil fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Acetil} = \frac{(B - M) \times N \times 0.043 \times 100}{W}$$

$$GS = \frac{162 \times S}{(4300 - (42 \times S))}$$

Donde:

B: volumen gastado (mL) en la titulación del blanco (almidón sin modificar).

M: volumen gastado (mL) en la titulación de la muestra (almidón modificado).

N: normalidad del ácido.

W: cantidad de muestra (g).

GS: grado de sustitución en la acetilación.

S: porcentaje de acetilación del almidón acetilado.

162= peso molecular de las unidades de glucosa

4300= 100 x peso molecular del grupo acetil

42= peso molecular del grupo acetil.

5.3.5.3 Grado de sustitución (GS) en almidón succinatado

El grado de succinatación se determinó de acuerdo con el método de Whistler y Paschall (1967). Una muestra de almidón de 5 g base seca (modificado

y sin modificar) fueron disueltos en 50 mL de agua destilada y se adicionaron 25 mL de una solución acuosa de NaOH 0.5 N a la mezcla de almidones y se dejó reposar durante 24 h. El exceso de álcali fue titulado con una solución estándar de ácido clorhídrico (HCl) 0.5 N, usando fenolftaleína como indicador. La solución se dejó en reposo por 2 h. Las muestras de almidón nativo fueron usadas como blancos. El porcentaje de acetil fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Succinato} = \frac{(B - M) \times 0.1 \times N}{W} \times 100$$

$$GS = \frac{162 \times S}{21000 - (209 \times S)}$$

Donde:

B: volumen gastado en la titulación del blanco (mL) almidón sin modificar.

M: volumen gastado en la titulación de la muestra (mL) almidón modificado.

N: normalidad del ácido.

W: cantidad de muestra (g).

GS=: grado de sustitución de succinato.

S: porcentaje de succinato del almidón succinatado.

162= peso molecular de las unidades de glucosa

21,000= 100 x peso molecular del grupo octenil succinil

209= peso molecular de grupo octenil succinil.

5.3.5.4 Índice de Solubilidad en Agua (ISA) e Índice de Absorción de Agua (IAA)

Estos análisis se les realizaron a los almidones en estado nativo y a los modificados, de acuerdo al método descrito por Anderson y col. (1969). Se colocaron 2.5 g (base seca) de almidón (M) en un tubo de centrifuga de 50 mL; se adicionaron 40 mL de agua destilada a 30°C, se cubrió y agitó el tubo por 1 min. Los tubos se mantuvieron a una temperatura de 30°C en un baño María, con agitación constante durante 30 min. A continuación las muestras fueron centrifugadas en un equipo (Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K) a

3000 rpm durante 10 min. Se registró el peso del residuo sólido (R_{cent}) y el sobrenadante se vació en un crisol de aluminio a peso contante, el líquido decantado se secó en un horno Felisa a temperatura de 110°C. El sedimento del tubo se pesó y se registró el peso del residuo de evaporación ($Revap$) para emplearse en las siguientes relaciones:

$$IAA = \frac{R_{cent}}{M - Revap}$$

$$ISA = \frac{Revap}{M} \times 100$$

Donde:

IAA: índice de absorción en agua (g de gel/g de muestra seca)

ISA: índice de solubilidad en agua (%)

R_{cent} : peso del residuo de centrifugación.

$Revap$: peso del residuo de evaporación.

M : peso en base seca de la muestra.

5.3.6 Microencapsulación de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334

Las células de ambas bacterias fueron obtenidas separadamente después de la activación por doble transferencia en caldo Lactobacilli MRS, sobre condiciones de anaerobiosis a 37°C por 48 h. Células en fase estacionaria fueron obtenidas por centrifugación a 6000 rpm por 15 min (Centrifuge Hermle Z200A), el precipitado con células fue lavado dos veces con una solución estéril de peptona al 0.9%. El paquete celular obtenido fue resuspendido en 10 mL de una solución al 12% de leche reconstituida, la suspensión celular (con $\sim 10^9$ UFC g^{-1}) fue mezclada con una solución de almidón modificado (acetilado, succinatado o fosfatado) y almidón control, se usaron 20 g (base seca/100 mL de agua destilada estéril) y homogenizadas previo al secado por aspersión.

Las microcápsulas fueron preparadas por el proceso de secado por aspersión en un secador SD-Basic de LabPlant (Huddersfield,UK), bajo las siguientes condiciones: temperatura de entrada 100°C-110°C, temperatura de salida 70°C-80°C, diámetro de la aguja 0.5 mm, velocidad de flujo 3 mL/s. Los polvos con microcápsulas ambos probióticos fueron disueltos en una solución estéril de citrato de sodio al 2% usando un homogeneizador (Themolyne Type 37600 Mixer). El conteo bacteriano en las microcápsulas se realizó utilizando el método de vaciado en placa. Las cajas petri fueron incubadas a 37°C por 48 h en jarras de anaerobiosis. El conteo celular fue realizado por triplicado.

5.3.6.1 Sobrevivencia después del proceso del secado por aspersión

El recuento bacteriano después del secado por aspersión se realizó por triplicado por el método de vaciado en placa. Se tomaron 1 g de microcápsulas y se colocaron en 9.0 mL de diluyente citrato de sodio al 2% posteriormente con la ayuda de un equipo vortex se rompieron las microcápsulas. Se tomó 1 mL de la solución y se colocó en 9 mL de solución diluyente de peptona; se realizaron 8 diluciones más de la muestra. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de las 1° a 8° diluciones y se colocaron en cajas Petri para luego agregarles agar MRS y homogeneizarlas. A continuación las cajas fueron incubadas (incubadora Thermo Forma) a 37°C durante 36 h y se realizó el recuento de colonias (contador de colonias Felisa).

La viabilidad de las bacterias fue determinado en la suspensión de almidón por el método de vaciado en placa (con $\sim 10^9$ UFC g^{-1}) antes del proceso de secado por aspersión, obteniendo las UFC, inmediatamente después del proceso se realizó el conteo bacteriano en el polvo recolectado. El rendimiento de la microencapsulación es decir, el porcentaje de inmovilización de los microorganismos fue calculado de acuerdo al método reportado por Picot y Lacroix (2004) y este se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento de Inmovilización} = \frac{\text{UFC/g antes del secado}}{\frac{\text{UFC}}{\text{g}} \text{ despues del secado por aspersión}} \times 100$$

5.3.7 Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersión

5.3.7.1 Contenido de humedad

El contenido de humedad de las microcápsulas fue determinado por diferencia de peso en las muestras antes y después del secado en estufa a 100°C en presencia de sílica gel durante 24 h (o peso constante).

5.3.7.2 Actividad de agua

Para la determinación de la actividad de agua de las microcápsulas se empleó un equipo Aqua Lab CX- 2 (USA) Las muestras fueron colocadas en contenedores propios del equipo y la medición se realizó a 25 °C.

5.3.7.3 Morfología macroscópica de colonias

Este fue obtenido después de la incubación a 37°C por observación macroscópica con ayuda del contador de colonias Felisa (Fabricantes Feligneo, S.A. de C.V. México).

5.3.7.4 Tinción de Gram

Este método se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Rodríguez y col. (2006) con algunas modificaciones. Se le realizó tinción de Gram a las colonias que se desarrollaron a las 36 h mantenidas en incubación. Para realizar el frotis se colocó 1 gota de solución fisiológica (solución NaCl al 0.9%) en un portaobjetos

limpio y seco; se tomó un asa y se flameó en un mechero, se esperó a que se enfriara y con ésta se tomó un poco de la colonia a analizar para colocarla en la gota de solución fisiológica y extender la muestra en el portaobjetos con la ayuda del asa. Para fijar la muestra se pasó el portaobjetos por la flama del mechero (no de manera directa) teniendo cuidado de que el calor no fuera excesivo. El calor deseable es aquél en el que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano. Para la tinción se le agregó el colorante de cristal violeta al frotis en una cantidad suficiente como para cubrirlo por completo. Se dejó actuar al colorante por 1 min al transcurrir este tiempo, se enjuagó el portaobjetos con agua. Después se le añadió lugol al portaobjetos en la misma cantidad que el colorante anterior; se dejó en reposo por 1 min y se enjuagó nuevamente con agua y luego con etanol al 95% o con acetona, hasta que ya no se presentará el color líquido azul. Nuevamente fue lavado con agua y se esperó a que se secara el portaobjetos; a continuación el frotis fue teñido con safranina y se dejó actuar por 1 min, luego se enjuagó de nuevo con agua y se dejó secar. Posteriormente el frotis se observó al microscopio óptico.

5.3.8 Estabilidad de las microcápsulas con *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 a 25°C y 4 °C

Se siguió el método de Rascón y col. (2010) con algunas modificaciones. Las microcápsulas con células fueron evaluadas a 25°C equilibradas en sales con actividades de agua de 0.329 ($MgCl_2$), 0.536 ($Mg(NO_3)_2$) y 0.765 (NaCl) y a 4°C con actividades de agua de 0.355 ($MgCl_2$), 0.587 ($Mg(NO_3)_2$) y 0.807 (NaCl) (Greenspan 1977, Labuza y col. 1985). Los polvos con células microencapsuladas (1 gr base seca) fueron colocados en contenedores de aluminio y almacenados en desecadores conteniendo soluciones saturadas previamente mencionadas, la viabilidad de las células fue determinada a 0, 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días de almacenamiento a ambas temperaturas.

5.3.9 Sobrevivencia de los microorganismos encapsulados *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 en un sistema modelo alimentario (avena instantánea)

Las microcápsulas (1 gramo base seca / 9 g de producto) fueron mezcladas con avena precocida comercial. La mezcla fue homogenizada y colocada en bolsas de polietileno cerradas herméticamente. Se almacenaron a 25°C y la viabilidad de las bacterias en cada mezcla fue evaluada durante 0, 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días.

5.3.10 Tolerancia de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 microencapsulado a condiciones simuladas del Tracto Gastrointestinal (TGI)

Se realizó de acuerdo a lo reportado por Charteris y col. (1998) con modificaciones. Una muestra de 3 g (mezcla probióticos-avena, con $\sim 10^8$ UFC/g como concentración bacteriana inicial) se resuspendió en i) 3 mL de saliva artificial simulada preparada de la siguiente manera 6.2 gL⁻¹ cloruro de sodio, 2.2 gL⁻¹ de cloruro de potasio, 0.22 gL⁻¹ de cloruro de calcio y 1.2 gL⁻¹ de bicarbonato de sodio, además se adicionó en ii) 24 mL jugo gástrico simulado que fue preparado con 3 gL⁻¹ de pepsina a pH 2 (El pH fue ajustado con 0.1 M HCL) las muestras se homogenizaron manualmente por 1 min y se colocaron a 37°C durante 2 h. Se monitoreó la cuenta viable de los microorganismos recién colocados en la saliva y jugo gástrico simulado y después de las 2 h de incubación. Posteriormente las muestras fueron expuestas a condiciones intestinales simuladas. Para ello se tomaron 25 mL de las suspensiones y se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y sobre la pastilla se adicionó 1 mL del sobrenadante recién decantado más iii) 27 mL de jugo intestinal simulado preparada de la siguiente manera, 1 gL⁻¹ pancreatina y 1.5 gL⁻¹ sales biliares, a pH 8 (el pH fue ajustado con NaOH 0.1 M) las muestras fueron colocadas en incubación a 37°C durante 4 h. La cuenta viable de estas

suspensiones fue determinada una vez que se agregó el jugo intestinal simulado y a las 2 y 4 h de residencia de las muestras en la solución. El diluyente para el conteo viable de los microorganismos fue una solución amortiguadora de fosfatos que se preparó con 33 mL de solución 0.2 M de fosfato monobásico de sodio y 67 mL de solución 0.2 M de fosfato dibásico de sodio.

5.3.11 Caracterización morfológica externa de las microcápsulas (SEM)

Se llevó a cabo usando un equipo de microscopía electrónica de barrido (ESEM Phillips, modelo XL30, Holanda) en condiciones de bajo vacío, de acuerdo con la metodología descrita por Gunning (1999) con algunas modificaciones. La manera de preparar la muestra y las condiciones del equipo fueron las mismas que las mencionadas anteriormente.

5.4 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias mediante pruebas de rango múltiple de Tukey ($p=0.05$), utilizando el paquete computacional JMP 5.0.1 (Rodríguez-Huezo y col. 2007).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción del almidón de amaranto

6.1.1 Rendimiento del proceso

Se obtuvieron rendimientos entre el 30- 34% del almidón extraído con respecto a la cantidad de semilla que se utilizó. Se han realizado diferentes investigaciones con el fin de incrementar el rendimiento de extracción del almidón de amaranto. Considerando que el grano de amaranto contiene en un rango del 48-69% de almidón concentrado en el perispermo (Saunders y Becker 1984).

Uriyapongson y Rayas (1994) obtuvieron rendimientos de 34.8% y 34.2% para *Amaranthus hypochondriacus* y *Amaranthus cruentus* respectivamente, estos autores no encontraron diferencias significativas entre los diferentes cultivos evaluados. Radosavjevic y col. (1998) usando diferentes tratamientos alcalinos y enzimas proteasas durante la extracción de almidón de amaranto obtuvieron rendimientos de recuperación de 43.2% y 50.3% con y sin el uso de enzimas proteasas respectivamente, sin embargo, este método implica altos costos durante la extracción de polímero. Calixto y Arnao (2004) aislaron almidón de los granos de *amaranthus caudatus* a partir de una extracción alcalina con NaOH 0.25% y desproteinización con alcohol isoamílico, estos autores obtuvieron rendimientos de 60.5 a 63.7% con una pureza de almidón del 94% al 97%.

Calzetta y col. (2006) En búsqueda de un método que pueda ser aplicado a escala industrial realizaron un estudio para evaluar el efecto de la concentración de metabisulfito de sodio y la temperatura de agitación de los granos de amaranto durante la etapa de remojo. Estos autores encontraron que con una concentración de 0.01 (p/v %) de metabisulfito de sodio y a 50°C de temperatura de agitación durante la extracción del almidón se obtuvo un rendimiento mayor (49.4%). Como resultado de sus investigaciones estos autores concluyeron que la concentración del reactivo utilizado está directamente relacionada con el rendimiento de extracción de almidón de amaranto.

Debido al pequeño tamaño del gránulo del almidón de amaranto se dificultó la sedimentación durante la extracción realizada, por tal razón sólo se logró aislar un porcentaje relativamente bajo en relación a la cantidad de granos utilizados.

6.2 Caracterización del almidón de amaranto

La caracterización fisicoquímica del grano y el almidón nativo de amaranto se presenta en la Tabla 4. Los granos de amaranto fueron molidos en un molino Pulvex y la harina homogeneizada con una malla con abertura de 40 μm .

Tabla 4.
Composición proximal del grano y almidón nativo de amaranto.

Muestra	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Extracto etéreo (%)	Cenizas (%)	Amilosa (%)
Grano de amaranto	12.8 \pm 0.04	16 \pm 0.07	6.5 \pm 0.07	3.5 \pm 0.01	
Almidón nativo de amaranto	10.1 \pm 0.07	3.2 \pm 0.03	1.7 \pm 0.07	0.8 \pm 0.002	12.38 \pm 0.06

*Medias de tres replicas \pm desviación estándar. Todos los resultados están expresados en base seca a excepción del porcentaje de humedad.

6.2.1 Contenido de humedad

En la Tabla 4 se presentan los valores obtenidos para el contenido de humedad del grano y almidón nativo de amaranto. La determinación de humedad se realizó por diferencia de pesos debido a la pérdida de agua por la evaporación de la misma en la muestra. Para la harina del grano se obtuvo un valor de 12.8% de humedad resultado que concuerda con lo reportado por Barba y col. (2009) estos autores reportaron una humedad para las granos de *Amaranthus caudatus* de 12.32% y en harina de amaranto extrudida una humedad de 7.80%. En general los cereales se caracterizan por su bajo contenido de humedad de

alrededor de 9% a 12%. Choi y col. (2004) reportaron valores de 11.5% y 11.3% de humedad para el grano y almidón de *Amaranthus cruentus* respectivamente.

El almidón nativo presentó un valor de 10.1%. Pérez y col. (1993) reportaron valores de 8.34% y 8.88% para almidones nativos de *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* respectivamente. Sin embargo, Calixto y Arnao (2004) obtuvieron valores entre 11%-13%.

6.2.2 Determinación del contenido de proteína

El contenido de proteína para el grano de amaranto fue de 16% (base seca) valor similar a lo reportado por Barba y col. (2009). Estos autores reportaron contenidos de proteína en un rango de 14.8% a 17.3% (base seca) en diferentes variedades de amaranto. Este porcentaje es alto en comparación con otros cereales de gran consumo humano como trigo (12-14%), arroz (7-10%) y maíz (9-10%) (Chang y Sosulski 1985).

Dentro de las proteínas más representativas del grano de amaranto se encuentran albuminas, 11S-globulina (amarantina), globulina-P y glutelinas (Tapia y col. 2007). Duarte-Correa y col. (1986) reportaron las siguientes fracciones para la semilla de amaranto *A. hypochondriacus* albumina 65%, globulinas 17%, prolaminas 11%, glutelinas 7%; Sin embargo, existen diferentes reportes del porcentaje de acuerdo a la especie, ya que para *A. caudatus* y *cruentus* se reportaron valores de glutelina del 44%-46%, globulinas del 19%-20%, albuminas de 19%-20% y prolaminas del 1%-2% respectivamente.

A diferencia de los cereales está reportado que el grano de amaranto presenta alto contenido de aminoácidos esenciales como leucina, lisina, metionina valina treonina con valores superiores a los estándares establecidos por la FAO/WHO (Gamel y col. 2006). Becker y col. (1981) realizaron un estudio en diez diferentes cultivos de granos de amaranto, donde determinaron la composición química de los granos. Estos autores reportaron un rango de 15.33% a 18.19% de

proteína para las diferentes variedades en estudio, además de un alto contenido de lisina.

Radosavjevic y col. (1998) reportaron que un alto rendimiento y una alta recuperación de almidón, así como un bajo contenido de proteína en el almidón extraído son indicadores de una eficiente molienda húmeda. Para el almidón nativo de amaranto se obtuvo 3.2% de proteína (base seca) valor relativamente alto comparado con la extracción realizada con tratamientos enzimáticos y moliendas húmedas durante la extracción del polímero. Manni y col. (2008) reportaron que el contenido de proteína del almidón de *Amaranthus mantegazzianus* fue de 1.47% el cual es un resultado menor que lo encontrado en el presente trabajo, esta diferencia puede atribuirse al método de extracción con el que se aisló el almidón. Radosavjevic y col. (1998) reportaron valores de 0.10% a 0.22% de contenido de proteína; Sin embargo, durante el método de extracción utilizaron enzimas proteasas que dieron como resultado un bajo contenido proteico.

6.2.3 Determinación del contenido del extracto etéreo

Se obtuvieron valores del extracto etéreo de 6.5% para la semilla de amaranto y 1.7% para el almidón nativo extraído (Tabla 4). Estos valores son similares a los reportados por Uriyapongson y Rayas- Duarte (1994) quienes reportaron para almidón extraído de *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypocondriacus*, valores de 1.23% y 1.40% respectivamente. Bello-Pérez y col. (1998) reportaron un contenido de grasa de 0.2% para *Amaranthus hypochondriacus*; estos autores atribuyeron las posibles diferencias entre los altos y bajos valores reportados para el contenido de grasa a las diferentes especies del grano de almidón.

6.2.4 Determinación de cenizas

En la Tabla 4 se presentan los valores obtenidos de cenizas para el grano de amaranto y el almidón extraído 3.5% y 0.8% respectivamente. Uriyapongson y Rayas- Duarte (1994) reportaron porcentajes similares a los encontrados en este trabajo, para harinas de amaranto, con valores de 2.24% a 3.46% y para almidón de amaranto obtenido por diferentes métodos valores de cenizas entre 0.10% a 0.30%. El grano de amaranto está constituido por una importante cantidad de minerales como fósforo, potasio, magnesio, hierro y calcio, entre otros los cuales no son separados completamente durante la extracción alcalina del almidón (Gamel y col. 2006).

6.2.5 Caracterización morfológica de los gránulos (SEM)

El examen microscópico de los gránulos finos de almidón de amaranto mostró uniformidad en la forma hexagonal y de tamaño muy pequeño el cual varió de 1 a 5 μm (Figura 12). Se puede observar que el método de extracción no dañó estas características de los gránulos. Los gránulos están íntegros sin grietas, ni daño alguno, estos resultados concuerdan con lo reportado por Choi y col. (2004) quienes utilizaron un tratamiento alcalino para la extracción del almidón; también coinciden con Radosavljevic y col. (1998) los cuales utilizaron proteasas y un tratamiento alcalino para la extracción de almidón de amaranto. Estos autores concluyeron que las diferencias entre los métodos de extracción no afectaron la forma ni el tamaño de los gránulos. En las microfotografías se observa que los gránulos de almidón de amaranto forman aglomerados. A este respecto Qian y Kuhn (1999) reportaron que este es un fenómeno muy común en los gránulos pequeños el cual se atribuye a los residuos de proteína y lípidos que no son removidos durante la extracción del almidón.

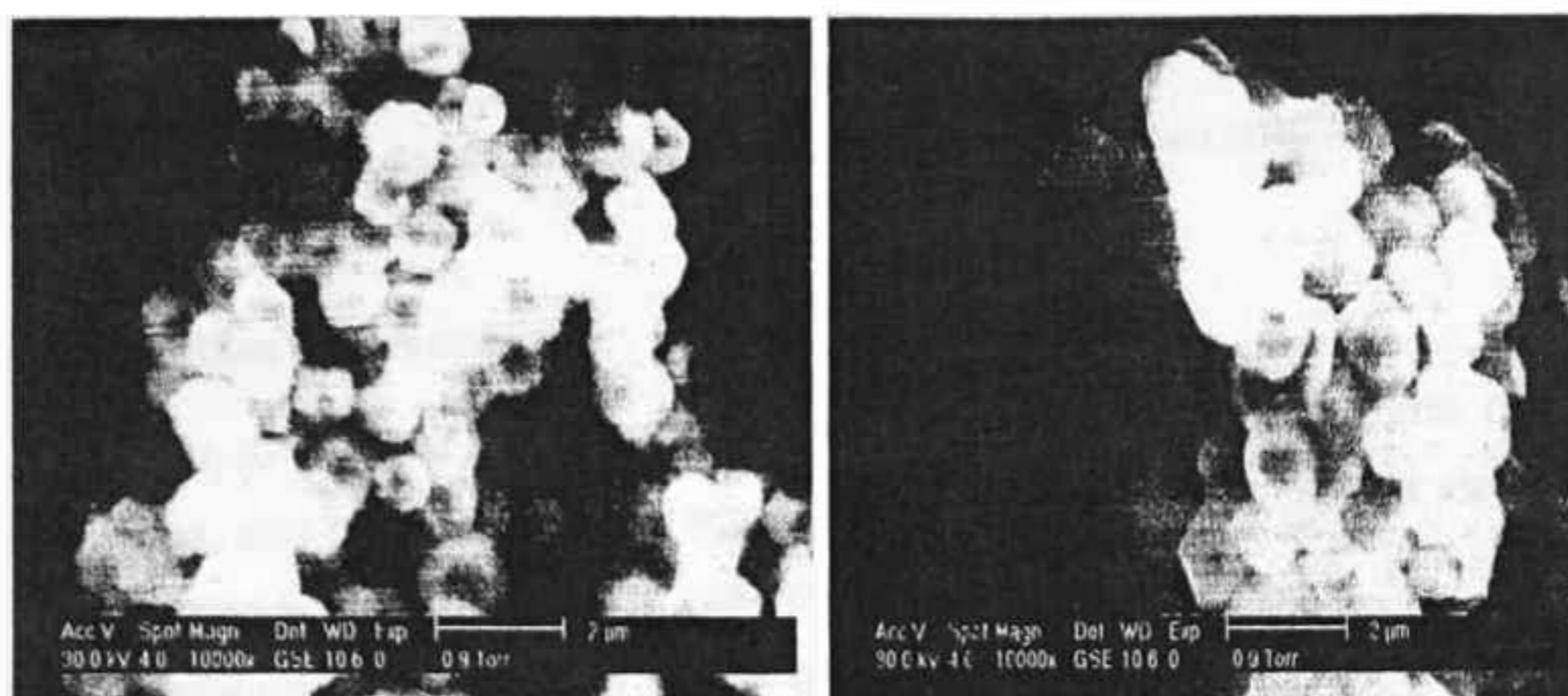


Figura 12. Microfotografía de gránulos de almidón nativo de amaranto obtenido por molienda húmeda-alcalina.

6.2.6 Contenido de amilosa

El contenido de amilosa es un factor importante que afecta ciertas propiedades del almidón como la capacidad de hinchamiento, la solubilidad y la formación de geles (Choi y col. 2004). En la Tabla 4 se presenta el porcentaje de amilosa en el almidón de amaranto (12.38%) lo que se traduce en un alto contenido de amilopectina (87.62%). Yangzhou y Stuttgart (1999) reportaron para *Amaranthus cruentus* 7.8% de contenido de amilosa.

Uriyapongson y Rayas (1994) reportaron un contenido de amilosa de 5.79% y 6.81% en *Amaranthus hypochondriacus* y *Amaranthus cruentus* respectivamente, también reportaron que el contenido de amilosa en el almidón de amaranto es muy variable ya que existen especies cerosas y otras de tipo no ceroso. Calixto y Arnao (2004), reportaron valores de amilosa de entre 6.8% a 24.2% para tres variedades de almidones de amaranto; estos autores reportaron que la variedad que presentó un valor de 6.8% de amilosa, es considerado del tipo ceroso, además que las diferencias en la composición entre diferentes variedades puede ser atribuida a factores ambientales y biológicos. Es importante destacar que el bajo contenido de amilosa en el almidón de amaranto es una propiedad

muy importante para sus aplicaciones futuras en la industria alimentaria y farmacéuticas siendo el almidón de amaranto una alterativa ante otros cultivos.

6.2.7 Perfiles de viscosidad

Por lo general los almidones en estado nativo presentan una naturaleza hidrofílica, son poco solubles en agua fría y producen pastas de alta viscosidad al ser suspendidos en agua y calentados. En la Figura 13 se observa el viscoamilograma del almidón de amaranto, la Tabla 5 muestra los parámetros obtenidos a partir del viscoamilograma en estado nativo del almidón. Se obtuvo una viscosidad máxima de 1771 cP, viscosidad mínima de 1135 cP, viscosidad final 1203.50 cP y finalmente una viscosidad de retrogradación de 68.50 cP. Resultados similares fueron reportados por Yangzhou y Stuttgart (1999); estos autores obtuvieron una viscosidad máxima de 1662 cP para el almidón de amaranto nativo de la especie *Amaranthus cruentus*. Es importante mencionar que el comportamiento del perfil viscoamilografico del almidón de amaranto (pseudocereal) muestra un comportamiento normal similar al de los almidones de cereales y raíces.

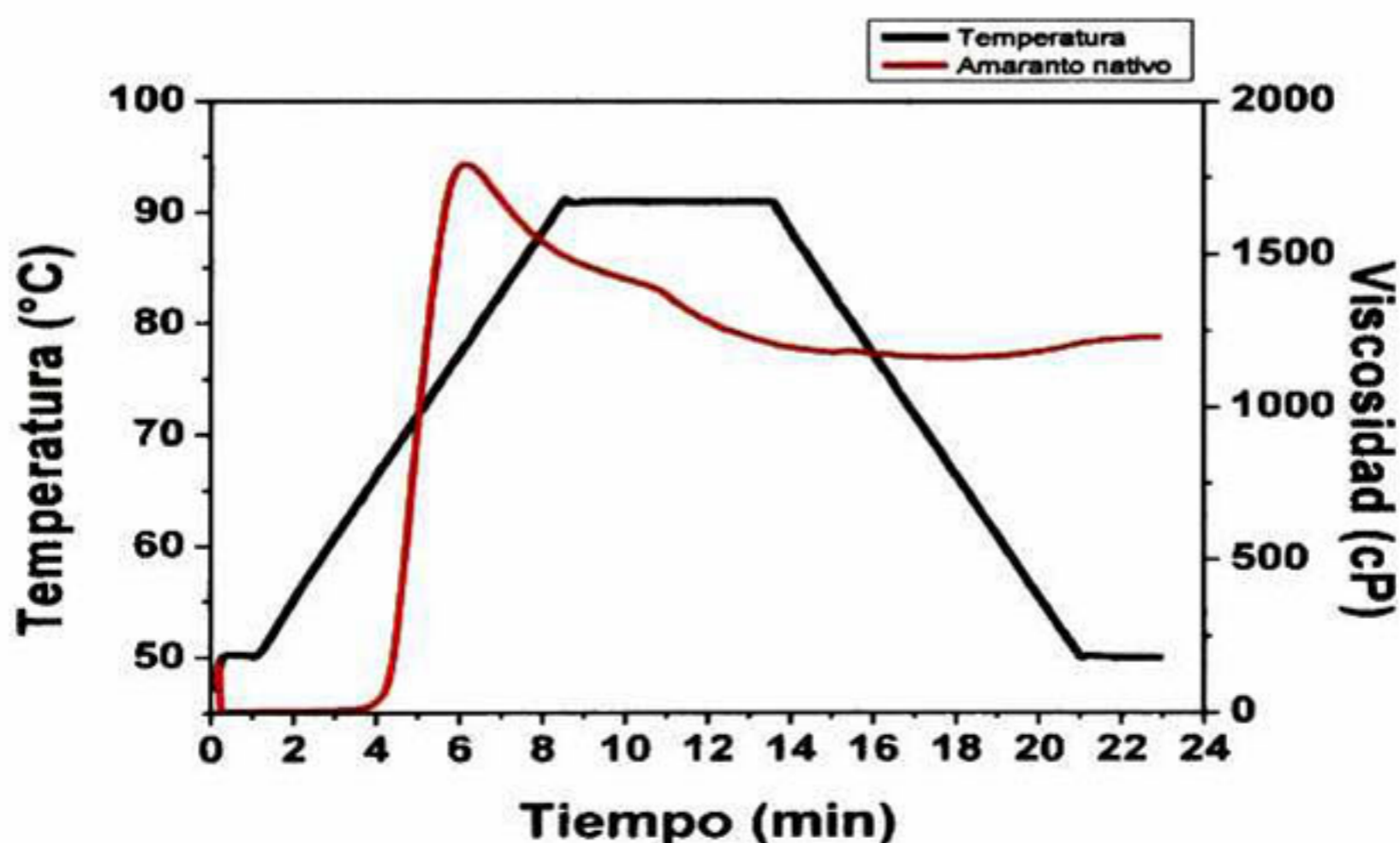


Figura13. Viscoamilograma de almidón nativo de amaranto.

Pérez y col. (1993) evaluaron la viscosidad de almidón de *Amaranthus hypochondriacus* y obtuvieron bajos valores de viscosidad comparado con otros cereales convencionales, estos autores reportaron que la posible razón a este comportamiento fue debido al bajo contenido de amilosa presente en el almidón de amaranto. De la misma manera Paredes-López y col. (1994) reportaron que las cadenas de corta longitud del almidón de amaranto (amilosa), podrían explicar la baja viscosidad que presenta el almidón de amaranto, debido a que moléculas más grandes contribuyen más a la viscosidad del líquido en una solución o emulsión, desde un punto de vista reológico. Por otro lado cabe mencionar que estas propiedades como el bajo valor de retrogradación (636 cP) obtenido a partir del perfil viscoamilografico le confieren características importantes al almidón de amaranto como la estabilidad ante el enfriamiento y posiblemente el bajo grado de sinéresis del almidón por lo que este puede ser de gran potencial para el uso de agentes espesantes, aplicado como aditivo en salsas, sopas frías y productos refrigerados. Ha sido reportado que el almidón de amaranto presenta mayor estabilidad a condiciones de enfriamiento que el almidón ceroso de maíz y de plátano (Bello-Pérez y col. 1998).

Tabla 5.

Parámetros de viscosidad del almidón nativo de amaranto determinados por RVA

Muestra	Visc. máxima (cP)	Visc. mínima (cP)	Visc. final (cP)	Visc. de retrogradación (cP)*
Almidón de amaranto nativo	1771.0	1135.0	1203.5	68.5

* Viscosidad de retrogradación= Viscosidad final - Viscosidad mínima.

6.2.8 Propiedades térmicas

En almidones nativos durante la gelatinización, estructuras helicoidales dobles y cristalinas se interrumpen simultáneamente. La entalpía de gelatinización

(ΔH) puede corresponder a la interrupción del orden de la doble hélice y se ilustra por endotermas de DSC en el intervalo de 50°C a 70°C (Colonna y col. 1992).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) se ha utilizado ampliamente para estudiar el comportamiento térmico de gelatinización del almidón y la retrogradación. La endoterma de fusión DSC de almidón proporciona la entalpía, así como las temperaturas para la fusión de la estructura cristalina en el almidón, que refleja el grado y la perfección de la cristalinidad. La entalpía de gelatinización (ΔH) a menudo se relaciona positivamente con la cantidad de cristales (estructura helicoidal doble o simple) del almidón (Liu y col. 2006).

La temperatura de inicio (T_i) representa la temperatura de fusión de los cristales menos estables. La temperatura de pico (T_p) sugiere la temperatura de fusión de la mayoría de los cristales de almidón. La temperatura final (T_f) indica la temperatura de fusión de los cristales más estables. El rango de temperatura de fusión (ΔT), es decir, $\Delta T = T_f - T_i$, indica el grado de heterogeneidad de los cristales del polímero (Biliaderis 1992). Cuanto mayor sea el rango de temperatura de fusión (ΔT), los cristales de almidón son más estables y uniformes (Durrani y Donald 1995).

La Figura 14 muestra el termograma para el almidón nativo de amaranto del cual se obtuvieron los parámetros térmicos presentados en la Tabla 6 que incluyen: T_i = Temperatura de inicio de gelatinización, T_p = Temperatura de pico, T_f = Temperatura final de gelatinización, ΔH = Entalpía de gelatinización y ΔT = el rango de temperatura de fusión.

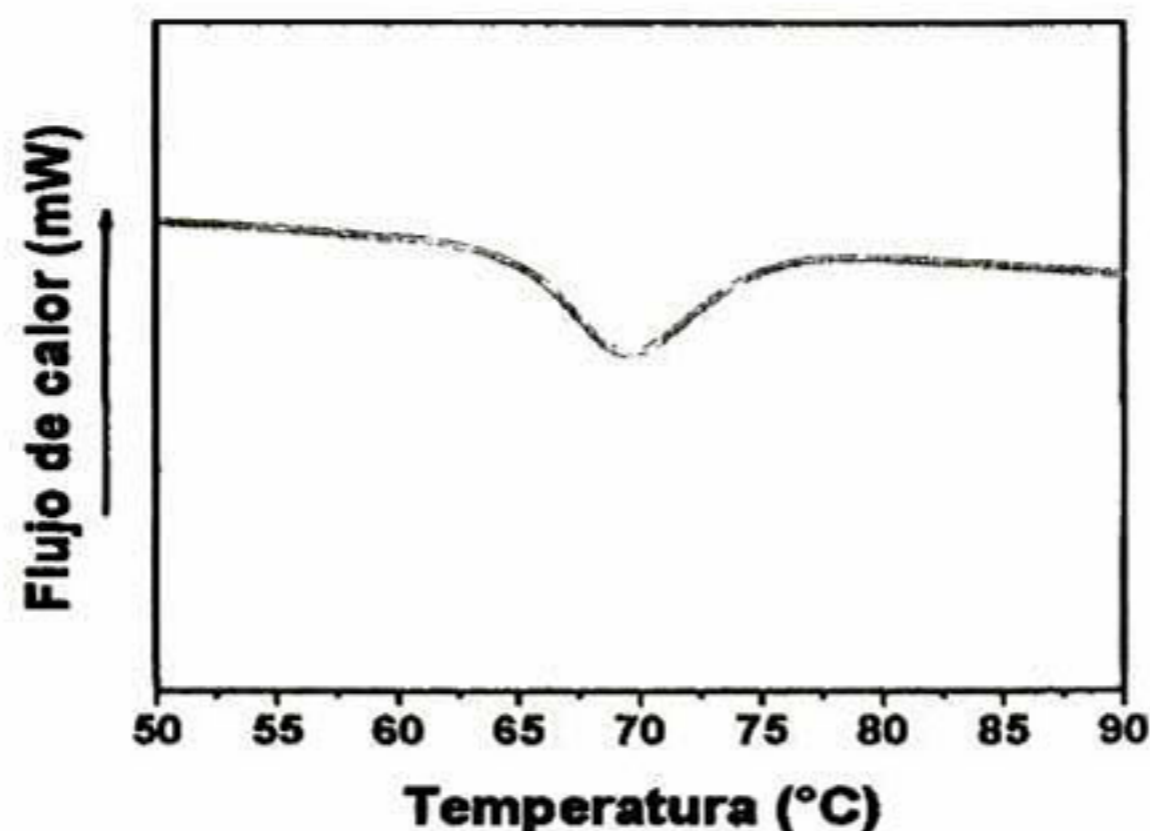


Figura 14. Termograma de gelatinización del almidón nativo de amaranto.

Tabla 6.

Propiedades térmicas del almidón de amaranto nativo obtenidas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Muestra	ΔH (J/g)	Ti (°C)	Tp (°C)	Tf (°C)	ΔT (°C)
Amaranto nativo	10.49	64.20	69.41	75.26	11.06

Ti= Temperatura de inicio de gelatinización, Tp= Temperatura de pico, Tf= Temperatura final de gelatinización, ΔH = Entalpía de gelatinización y ΔT = Tf-Ti rango de temperatura de fusión.

Con respecto a la temperatura de gelatinización los resultados son similares a los reportados por Wu y col. (1995) quienes encontraron un rango de temperatura de gelatinización entre 64.5°C a 87.5°C para almidón de amaranto. Uriyapongson y Rayas-Duarte (1994) extrajeron almidón de *Amaranthus hypochondriacus X hybridus* siguiendo una metodología semejante a la utilizada en el presente trabajo y señalaron los siguientes valores para las propiedades térmicas del almidón nativo: Ti= 63.3 °C, Tp= 67.8 °C, Tf= 75.9°C ΔH = 20.2 J/g.

Yangzhou y Stuttgart (1999) obtuvieron los siguientes valores $T_i= 66.3^{\circ}\text{C}$, $T_p=74.5^{\circ}\text{C}$ y $T_f=86.9^{\circ}\text{C}$ estas diferencias probablemente sean atribuidas al método de extracción del almidón y/o variedad del grano de amaranto, así como el tamaño de gránulo. Radosavljevic y col. (1998) reportaron que el método de extracción es un factor que puede inducir variaciones en las propiedades térmicas del almidón; los valores reportados por estos autores para el almidón de amaranto extraído por tratamiento alcalino fueron de $T_i= 70.6^{\circ}\text{C}$, $T_p= 74.3^{\circ}\text{C}$, $T_f= 82.9^{\circ}\text{C}$ y $\Delta H= 15.0 \text{ J/g}$ y por tratamiento alcalino adicionado con enzimas proteasas fueron de $T_i= 65.5^{\circ}\text{C}$, $T_p= 69.2^{\circ}\text{C}$, $T_f= \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\Delta H= 14.4 \text{ J/g}$.

Con respecto a la entalpía de gelatinización (ΔH) se obtuvo un valor de 10.49 (J/g). Yangzhou y Stuttgart (1999) reportaron un valor de 2.58 (J/g) valor bajo comparado con el obtenido en este trabajo, de acuerdo al valor obtenido de ΔH podría indicar una mayor compactación en la estructura molecular interna y un mayor grado de cristalinidad en el almidón comparado con aquellos de menor ΔH . Las variaciones entre muestras en la estructura cristalina producen diferencias en las temperaturas de gelatinización. Los granos poco compactos presentan generalmente gránulos de almidón de mayores tamaños ($>10 \mu\text{m}$). Los gránulos con cristalinidad alta muestran altas temperaturas y entalpías de gelatinización (Narváez y col. 2006).

6.3 Perfil de viscosidad de los almidones hidrolizados

Los primeros intentos de modificar las propiedades del almidón nativo con el fin de mejorar su funcionalidad para aplicaciones industriales y de esa manera extender su utilidad estuvieron dirigidos en llevar a cabo un cambio en el almidón que le permitiera ser calentado a concentraciones de sólidos más elevadas con relación a los almidones sin modificar. Esta modificación es llamada conversión o hidrólisis de almidón e involucra el tratamiento del gránulo de almidón con medios químicos y/o físicos para romper o fragmentar algunos o todos los gránulos de almidón, formando estructuras más débiles y disminuyendo por un lado su capacidad de hinchamiento cuando son calentadas en agua y por otro,

disminuyendo el tamaño de las moléculas. Como resultado, la viscosidad de la solución producida cuando el almidón es calentado en agua se reduce, permitiendo que el almidón convertido o hidrolizado se disperse a mayores concentraciones de sólidos que el almidón sin modificar (Wurzburg 1989).

El principal objetivo de realizar la hidrólisis ácida en el almidón nativo fue reducir la viscosidad del almidón. Esto se logró utilizando una solución de HCl en diferentes tiempos de hidrólisis. Se realizaron tres ensayos a 2 horas de agitación constante, 4 h y 6 h de reacción del almidón con la solución de HCl. En la Figura 15 se muestran los perfiles de viscosidad para los almidones hidrolizados donde se aprecia que se redujo drásticamente en comparación con la viscosidad del almidón nativo de amaranto (cP 1771.0). Murúa-Pagola y col. (2009) reportaron para almidones hidrolizados de maíz normal y tipo ceroso después de un tiempo de reacción de 6 horas, en las mismas condiciones que las realizadas en este trabajo, obtuvieron viscosidades entre 1000 cP a 1500 cP, con reducciones de viscosidad de entre un 40% y 50% a partir del almidón nativo de maíz y de tipo ceroso respectivamente. En los viscoamilogramas del almidón de amaranto se puede observar que el efecto de la solución de HCl fue mayor en comparación con lo reportado por Murúa-Pagola y col. (2009).

Los almidones hidrolizados con un tiempo de 6 horas fueron utilizados para las diferentes modificaciones químicas realizadas en este trabajo. Las regiones amorfas del almidón son hidrolizadas más rápidamente que las regiones cristalinas durante la hidrólisis a temperaturas bajas de gelatinización (BeMiller 1965). Wang y col. (2003) reportaron que almidones de maíz tratados con diferentes concentraciones de HCl (1.0N, 0.06N y 0.14N) exhibieron diferentes perfiles de viscosidad y contenido de amilosa. Añadiendo estos autores que las cadenas de amilosa y amilopectina fueron hidrolizadas de acuerdo a la concentración de reactivo utilizado.

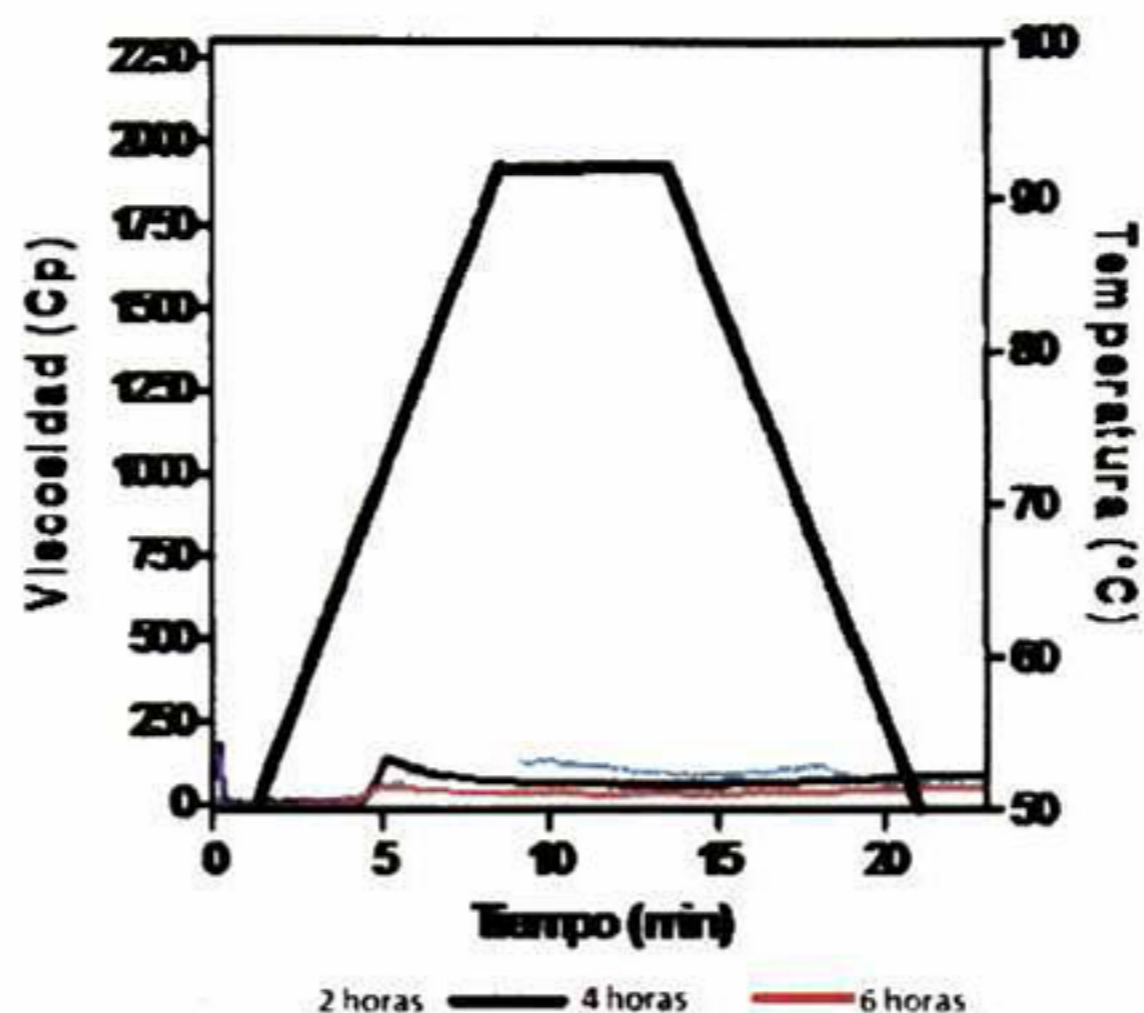


Figura 15. Perfiles de viscosidad para los almidones hidrolizados de amaranto.

6.4 Caracterización Físicoquímica de los almidones modificados

6.4.1 Grado de sustitución (GS) en almidón fosfatado

El contenido de fósforo fue $0.38\% \pm 0.05$ y un GS 0.02 ± 0.00 . Landerito y Wang (2005) obtuvieron almidones fosfatados de almidón de maíz ceroso mediante extrusión termoplástica usando una combinación de tripolifosfato y trimetafosfato con 1.63% de contenido de fósforo. Chang y Lii (1992) reportaron valores máximos de GS de 0.040 en almidones de maíz y yuca empleando 4% de TPS al 15% de humedad y 200°C de temperatura de extrusión lo cual concuerda con lo señalado en este trabajo.

O'Brien y col. (2009) reportaron el contenido de fósforo en diferentes tipos de almidones modificados por el método convencional en un rango de entre 0.27 a 0.43 y de 0.27 a 0.33 a pH 9.0 y 11.0 respectivamente. Pérez y col. (1993) realizaron la modificación química por el método convencional de almidón, extraído de granos de *A. hypochondriacus* (K343) y *A. cruentus* y determinaron el contenido de fósforo y obtuvieron 0.25% y 0.20%. Se puede observar que existen

diferencias entre los diferentes contenidos y grados de sustitución reportados, esto probablemente como resultado del tipo de almidón, tipo y concentración de reactivo utilizado, efectos del pH y métodos para el cálculo de los resultados.

El conocimiento sobre los cambios estructurales en el gránulo de almidón causados por la modificación con reactivos químicos es de importancia para la comprensión de los cambios en las propiedades funcionales y para el desarrollo de almidones modificados con las propiedades deseadas. Sung y col. (2005) reportaron que los grupos fosfato sustituidos en la molécula de almidón a través de la esterificación son adicionados al grupo de amilosa del almidón. Otro factor que influye en el grado de entrecruzamiento es el tamaño del gránulo ya que se ha reportado que los gránulos pequeños son derivatizados en mayor medida con relación a los de mayor tamaño (Singh y col. 2007).

El contenido de fósforo y el grado de sustitución obtenido en este trabajo es apropiado de acuerdo a los requerimientos de la FDA para su utilización como aditivos en alimentos (para el almidón modificado por TPS el límite en el grado de sustitución (GS) está establecido en 0.04). Por otro lado, las ventajas que ofrece el proceso de extrusión es la no generación de efluentes durante la modificación química y la utilización de menor cantidad de reactivos utilizados.

6.4.2 Grado de sustitución (GS) en almidón acetilado

La acetilación del almidón fue realizada por el método convencional y una vez modificado el almidón acetilado fue sometido a extrusión, el porcentaje de grupos acetilo y GS de los almidones acetilados fue de $2.32\% \pm 0.00$ y 0.08 ± 0.00 , respectivamente. Murúa-Pagola y col. (2009), reportaron resultados similares con 0.03 de grado de sustitución para almidón de maíz ceroso modificado en las mismas condiciones llevadas a cabo en este trabajo; estos autores concluyeron que los grupos acetil con carácter hidrofóbico introducidos al almidón le aportan características deseables durante la emulsificación de estos materiales además de ser buenos materiales encapsulantes de sabores.

Vasanthan y col. (1995) reportaron el contenido de grupos acetil entre 1.01% y 2.80% usando diferentes fuentes de almidón como almidón de papa, maíz ceroso, maíz normal, chicharos y lentejas con 5% y 10% de anhídrido acético. Singh-Sodhi y Singh (2005) reportaron porcentajes similares de acetilación (2.26%–3.68%) y grados de sustitución de (0.09–0.14) para diferentes variedades de almidón de arroz. Estos autores reportaron que las diferencias en el contenido de grupos acetil podría ser atribuido a las diferentes condiciones de reacción y fuentes de almidón utilizados.

6.4.3 Grado de sustitución (GS) en almidón succinatado

La succinatación confiere carácter hidrofóbico e hidrofílico a la molécula del almidón (Bhosale y Singhal 2006). El porcentaje de grupos octenil y los grados de sustitución de los almidones modificados de amaranto fueron $2.90\% \pm 0.016$ y 0.02 ± 0.00 , respectivamente. Bhosale y Singhal (2006) reportaron un incremento lineal en el GS de almidones de maíz y amaranto succinatados, a medida que se incrementó la concentración de n-OSA (anhídrido n-octenil succínico). Estos autores encontraron un GS de 0.022 para el almidón de amaranto y de 0.021 para el almidón de maíz ceroso resultados similares a los encontrados en este trabajo.

Song y col. (2006) realizaron la succinatación de almidones de arroz y reportaron grados de sustitución de 0.018 - 0.046, en este estudio mencionaron que la succinatación y la eficiencia de la modificación está en función de la concentración del almidón durante la reacción, el período de reacción, el pH, la temperatura y finalmente la concentración de reactivo utilizado. Además de que la modificación con OSA se lleva a cabo en la superficie del gránulo en algunos poros formados; Sin embargo, esta no causa modificación en el patrón de difracción en la zona cristalina (amilopectina) en almidones con un GS de 0.046.

Shogren y col. (2000) en búsqueda de un mejor entendimiento del comportamiento de la reacción durante la succinatación realizaron la modificación química de almidón de maíz ceroso y reportaron grados de sustitución de entre 0.03-0.11; estos autores reportaron que probablemente la distribución de grupos OSA son distribuidos en el interior del gránulo en las regiones amorfas (amilosa) de las moléculas de la amilopectina. La FDA establece un nivel máximo del 3% de agregado de OSA como agente modificador de almidones para su utilización en alimentos. De acuerdo a los resultados obtenidos el almidón succinatado de amaranto puede ser empleado como aditivo de acuerdo con las regulaciones establecidas.

6.4.4 Índice de Solubilidad en Agua (ISA) e Índice de Absorción de Agua (IAA)

IAA e ISA son determinaciones que muestran el cambio en la estructura del gránulo de almidón. En la Tabla 7 se muestran los valores de IAA (g de gel/g de muestra seca) e ISA (%) para el almidón nativo de amaranto y para los almidones modificados. Los valores obtenidos para el almidón de amaranto nativo fueron para IAA 2.1 (g de gel/g de muestra seca) y de ISA 6.0%; Sin embargo, después de las modificaciones química y mecánica (extrusión) se incrementaron estos valores. Resultados similares fueron obtenidos por Hevia y col. (2002). Estos autores reportaron valores de IAA que variaron de 2.27 a 2.50 (g de gel/g de muestra seca) y de ISA de 4.54% a 8.94% para el almidón nativo de *Amaranthus spp.* Los bajos valores de IAA e ISA encontrados para el almidón nativo de amaranto son debidos de la alta cristalinidad del almidón nativo, lo que da como resultado la baja solubilidad en agua (Bhosale y Singhal 2006).

La severidad del tratamiento térmico en el extrusor aumenta progresivamente los valores del ISA, lo que indica un aumento en la degradación del almidón en moléculas más pequeñas. Para el almidón succinatado (carácter hidrofílico e hidrofóbico) se obtuvieron valores de IAA 3.5 (g de gel/g de muestra seca) y de ISA de 19.8%. La introducción de grupos hidrofóbicos en estos almidones en bajos niveles de sustitución (0.01-0.1) le confiere propiedades

los gránulos con una estructura unida fuertemente muestran una baja capacidad de absorción y de solubilidad. De esta manera, con las modificaciones químicas que implican la introducción de ciertos grupos en los gránulos de almidón puede reducirse la fuerza de los enlaces ocasionando el incremento de la absorción y de la solubilidad en agua (Sitohy y col. 2000).

6.4.5 Perfiles de viscosidad

En la Figura 16 se muestran los perfiles de viscosidad de los almidones modificados: fosfatado, succinatado y acetilado así como del almidón control N-lok, estos desarrollaron viscosidades muy bajas por abajo de los 400 cP cuando inicia la etapa de calentamiento en el equipo; Sin embargo, se puede observar que durante la etapa de homogeneización del equipo los almidones a temperatura ambiente presentaron viscosidades inferiores a los 850 cP y como resultado del calentamiento estos muestran un decremento en la viscosidad en todos los almidones evaluados. Las bajas viscosidades obtenidas es atribuido a que antes de la modificación química se hidrolizaron con HCl y posteriormente extrudidos. Murúa-Pagola y col. (2009) reportaron resultados similares a los obtenidos en este trabajo para almidones modificados de maíz tipo ceroso. Esto atribuido a la desintegración de la estructura de almidón debido al cizallamiento, presión y temperatura durante la extrusión (Chang y Lii 1992). Usualmente los almidones modificados por extrusión exhiben bajos perfiles de viscosidad comparados con los almidones modificados por el método convencional. Los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo a lo reportado por Wurzburg (1995) quien menciona que el peso molecular del almidón puede ser reducido con la hidrólisis, para producir almidones con baja viscosidad. La viscosidad de los almidones succinatados es generalmente mayor con relación a otros almidones derivatizados. Este fenómeno puede ser debido al efecto asociativo de las cadenas hidrofóbicas de la molécula del almidón y la formación de complejos amilosa-succinato (Orteja-Ojeda y col. 2005).

Thirathumthavom y Choroenrein (2006) realizaron la succinatación de almidones de tapioca y arroz hidrolizados y por el método convencional de succinatación; estos autores encontraron que las viscosidades de los almidones succinatados fueron mayores a las viscosidades presentadas por el almidón nativo para ambos tipos de almidón. Lo cual demuestra una ventaja adicional para el proceso de extrusión después de haber realizado la succinatación por el método convencional. Resultados similares fueron encontrados por Sodhi y Singh (2005) quienes acetilaron diferentes variedades de almidón de arroz, estos autores encontraron que estos presentaron mayor viscosidad con relación al almidón nativo.

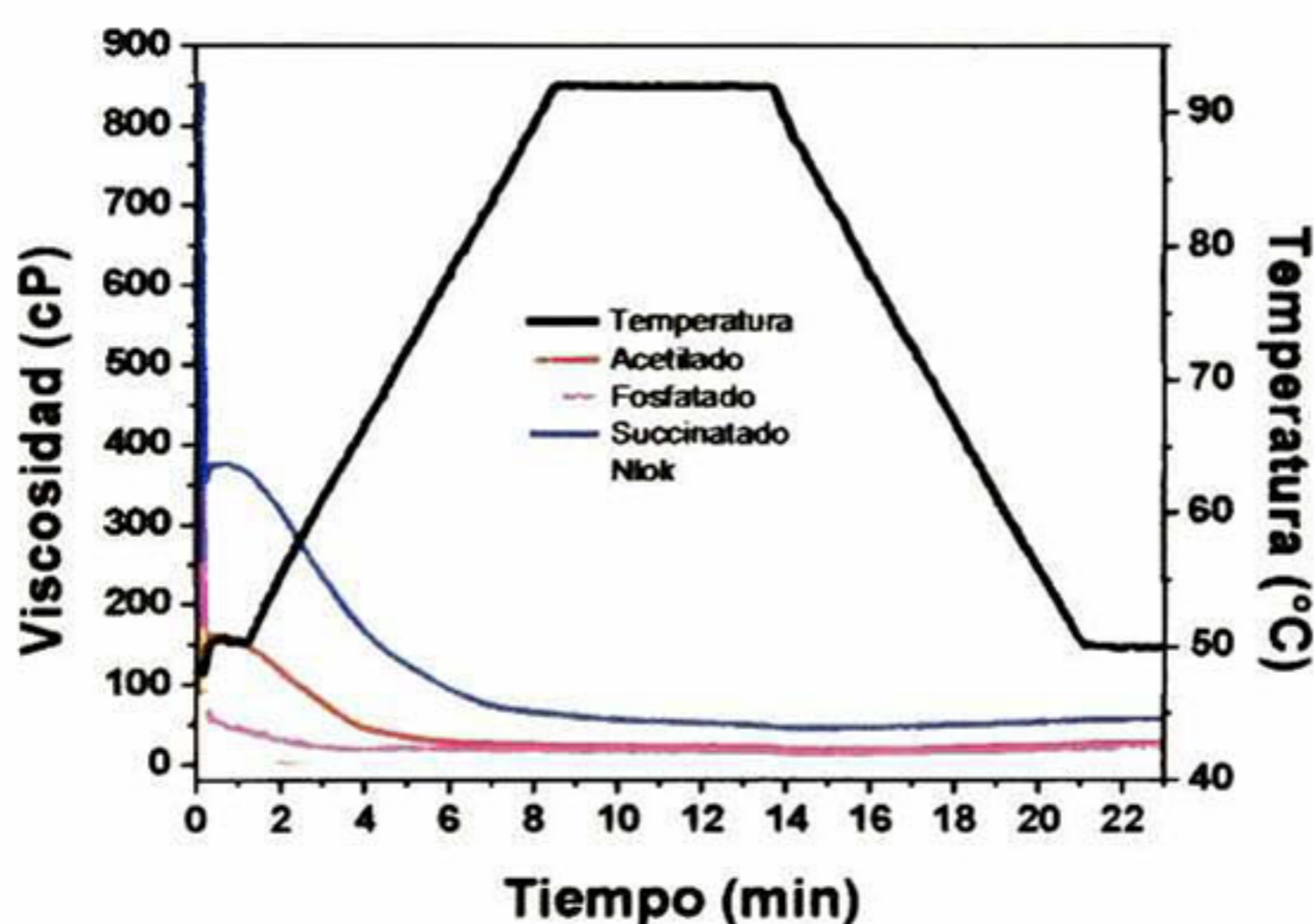


Figura 16. Perfiles de viscosidad para los almidones modificados de amaranto.

6.5 Microencapsulación de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334

6.5.1 Supervivencia después del proceso del secado por aspersion

La microencapsulación por secado por aspersion es un proceso eficiente que puede producir grandes cantidades de material. Sin embargo, esta económica

y efectiva tecnología es raramente considerada para la microencapsulación de microorganismos debido a la alta mortalidad resultado de la deshidratación e inactivación térmica que sufren los microorganismos. En este trabajo las condiciones de secado fueron realizadas a partir de lo reportado por O'Riordan (2001) donde optimizaron las condiciones de secado para células de *Bifidobacterium*.

El efecto del secado por aspersion sobre la membrana de la célula puede conducir a un incremento en la permeabilidad de la célula que podría dar como resultado la salida de componentes intracelulares desde el interior de la célula hacia el medio que la rodea. La membrana citoplasmática es la más susceptible al estrés asociado por el secado, la pared celular, ADN y ARN también son afectados, dando como resultado una pérdida en la actividad metabólica (Teixeira y col. 1997).

La Tabla 8 muestra la sobrevivencia de los microorganismos *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 encapsulados después del secado por aspersion, así como la reducción de la sobrevivencia expresada como la diferencia de la concentración bacteriana antes del secado-la concentración bacteriana después del secado por aspersion. Finalmente se determinó el porcentaje de inmovilización (%) de microorganismos.

Para el género *Bifidobacterium* se obtuvieron reducciones de sobrevivencia de entre 0.8 a 1.0 Log UFC/g, y porcentajes de inmovilización en un rango de 89.8% a 91.9%. De manera general se puede observar que los almidones acetilado y fosfatado de amaranto presentaron las menores pérdidas de sobrevivencia y mejores rendimientos de inmovilización en comparación con el almidón succinatado y el almidón control (N-lok). Estos resultados son similares a los reportados por Fávaro-Trindade y Grosso (2002); los cuales reportaron para *Bifidobacterium lactis* pérdidas de 1 a 3 Log de acuerdo a las condiciones de proceso evaluadas; estos autores reportaron mayor pérdida en la sobrevivencia de

las células microencapsuladas en función al incremento en la temperatura de entrada y salida del secador; Sin embargo, estos autores utilizaron como material de pared acetato ftalato de celulosa, el cual es utilizado en la industria farmacéutica como aditivo entérico de costo elevado.

Tabla 8.

Sobrevivencia después del secado por aspersion de *B. breve* ATCC 15700 encapsulado con almidones de amaranto modificados y un control.

Material de pared	Antes del secado Log UFC/g	Después de secado Log UFC/g	*Reducción de la sobrevivencia Log UFC/g	Inmovilización (%)
Almidón acetilado	9.8 ± 0.03	9.0 ± 0.06	0.8 ± 0.07 ab	91.7 ± 0.70 a
Almidón fosfatado	9.6 ± 0.03	8.8 ± 0.04	0.8 ± 0.06 a	91.9 ± 0.58 a
Almidón succinatado	9.8 ± 0.03	8.8 ± 0.05	1.0 ± 0.08 c	89.8 ± 0.82 b
Almidón N-lok	9.6 ± 0.02	8.6 ± 0.05	1.0 ± 0.04 bc	89.8 ± 0.45 b

*Reducción de la sobrevivencia Log UFC/g (Concentración antes del secado-concentración después del secado por aspersion).

Medias y desviación estándar de tres repeticiones. Medias con diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0.05).

Lieh y col. (2007) microencapsularon células de *Bifidobacterium longum* (BCRC 14605) y *Lactobacillus acidophilus* (BCRC 14079) utilizando la tecnología de secado por aspersion y como materiales de pared una mezcla de maltodextrinas y goma arábica; estos autores reportaron eficiencias del proceso de secado de 45.65% a 52.38%, además evaluaron el efecto de la temperatura de entrada para cada microorganismo, donde encontraron un decremento de la sobrevivencia de ambos microorganismos con el incremento de la temperatura de entrada del secador. También añadieron que la concentración final para ambos géneros fue superior a 10⁷ UFC/g después del secado por aspersion, lo cual es un

resultado favorable de acuerdo a las recomendaciones como mínimo para efectos terapéuticos, estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo.

La Tabla 9 muestra la sobrevivencia de los microorganismos *Lactobacillus casei* ATCC 334 encapsulados con almidones modificados de amaranto después del secado por aspersion, así como la reducción de la sobrevivencia y el porcentaje de inmovilización de microorganismos. Se obtuvieron reducciones de la sobrevivencia en un rango de 1.0 a 1.1 Log UFC/g y porcentajes de inmovilización de 88.6% a 89.7%. Las sobrevivencias después del secado fueron mayores a 10^8 UFC/g resultado favorable de acuerdo a lo recomendado con el fin de producir beneficios terapéuticos. Ying y col. (2010) reportaron para *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) microencapsulado por secado por aspersion y liofilización pérdidas menores a 2 Log UFC/g, sin embargo, los mejores resultados fueron para los microorganismos que fueron encapsulados por secado por aspersion con respecto a la liofilización, estos autores reportaron que las posibles diferencias con lo reportado con la literatura, con respecto al mejor método es posiblemente resultado de las condiciones de liofilizado.

Para el caso de *Lactobacillus casei* ATCC 334 el mejor material que protegió estas células durante el proceso de secado por aspersion fueron los almidones fosfatado, succinatado de amaranto y N-lok, con reducción en la sobrevivencia de 1.0 Log UFC/g y porcentajes de inmovilización de 89%. Comparando la sobrevivencia entre cada género se observó que se presenta una mayor sensibilidad a las condiciones de secado por el género *Lactobacillus* esto concuerda con lo reportado por Fávaro–Trindade y Grosso (2002). Golowezyc y col. (2010) reportaron un decremento después del secado por aspersion en la viabilidad de células *Lactobacillus kéfir* de 0.29 y 0.70 Log UFC/g para las cepas *L. kéfir* 8321 y *L. kéfir* 8348 respectivamente; estos autores utilizaron leche reconstituida como material de pared.

Tabla 9.

Sobrevivencia después del secado por aspersión de *L. casei* ATCC 334 encapsulado con almidones de amaranto modificados y un control.

Material de pared	Antes del secado Log UFC/g	Después de secado Log UFC/g	*Reducción de la sobrevivencia Log UFC/g	Inmovilización (%)
Almidón acetilado	9.6 ± 0.02	8.5 ± 0.03	1.1 ± 0.03 a	88.6 a
Almidón fosfatado	9.7 ± 0.03	8.7 ± 0.03	1.0 ± 0.00 b	89.7 b
Almidón succinatado	9.6 ± 0.04	8.6 ± 0.06	1.0 ± 0.03 b	89.6 b
Almidón N-lok	9.6 ± 0.03	8.6 ± 0.03	1.0 ± 0.03 b	89.7 b

*Reducción de la sobrevivencia Log UFC/g (Concentración antes del secado-concentración después del secado por aspersión).

Medias y desviación estándar de tres repeticiones. Medias con diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0.05).

6.6 Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersión

6.6.1 Contenido de humedad y actividad de agua

En la Tabla 10 se puede observar que las microcápsulas (polvos obtenidos después del proceso de secado) para el género *Bifidobacterium* mostraron una actividad de agua en un rango de 0.31 a 0.36, y humedades entre 3.8% a 6.2%, estos valores son similares a los reportados por Fávaro-Trindade y Grosso, (2002) en polvos obtenidos después del secado por aspersión; estos autores reportaron contenidos de humedad y actividades de agua de 3.2% a 5.3%, y 0.204 a 0.23 respectivamente y añadieron que estos parámetros disminuyen con el incremento de la temperatura de secado, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Tabla 10.

Actividad de agua (aw) y humedad de las microcápsulas con probióticos microencapsulados con almidones de amaranto modificados y un control.

Microorganismo	<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700	
Material de pared	Actividad de agua (aw)	Humedad (%)
Acetilado	0.36 ± 0.0 a	6.2 ± 0.1 a
Fosfatado	0.31 ± 0.0 b	3.8 ± 0.1 b
Succinatado	0.33 ± 0.0 c	5.9 ± 0.1 a
N-lok	0.33 ± 0.0 c	6.0 ± 0.2 a

Microorganismo	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	
Material de pared	Actividad de agua (aw)	Humedad (%)
Acetilado	0.32 ± 0.0 a	4.5 ± 0.12 a
Fosfatado	0.41 ± 0.0 b	5.8 ± 0.55 a
Succinatado	0.44 ± 0.0 c	5.8 ± 0.17 a
N-lok	0.45 ± 0.0 c	5.6 ± 0.2 a

Medias y desviación estándar de tres repeticiones. Medias con diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para el género *Lactobacillus* se obtuvieron actividades de agua entre 0.32 y 0.45 y contenidos de humedad en un rango de 4.5% a 5.8% (Tabla 10) similares a los encontrados para el género *Bifidobacterium* considerando que fueron las mismas condiciones de secado para todos los materiales utilizados. Lieh-Chi y col. (2007) reportaron para microcápsulas obtenidas por secado por aspersion actividades de agua de 0.20, 0.17 y 0.17 con temperaturas de salida en el secador de 60°C, 70°C y 80 °C respectivamente. En general, los microorganismos presentan una mayor sobrevivencia a bajas actividades de agua; Sin embargo, después del estrés provocado por el secado podría disminuir la sobrevivencia (Lieh-Chi y col. 2007) reportaron que el bajo contenido de agua inducido por el

secado por aspersión, proporciona una reducción significativa en la difusividad y por lo tanto en el transporte de oxígeno al interior de las células (*Bifidobacterium bifidum*), lo que da como resultado un incremento en la sobrevivencia de los microorganismos. El bajo contenido de humedad y actividad de agua encontrados en la microcápsulas podría favorecer la sobrevivencia de los microorganismos encapsulados; Sin embargo, es necesario determinar las mejores condiciones en las que estos puedan mantener su viabilidad durante el almacenamiento a través del tiempo.

6.6.2 Morfología macroscópica de colonias y Tinción de Gram

En la Figura 17 se muestran las colonias de los microorganismos encapsulados en medio de cultivo MRS (medio de cultivo para el aislamiento y recuento de lactobacilos a partir de alimentos, productos lácteos y la flora intestinal) ambas colonias para los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* presentaron en la morfología de sus colonias una superficie ovalada, las colonias fueron de color blanco cremosas, con un tamaño mediano a grande.

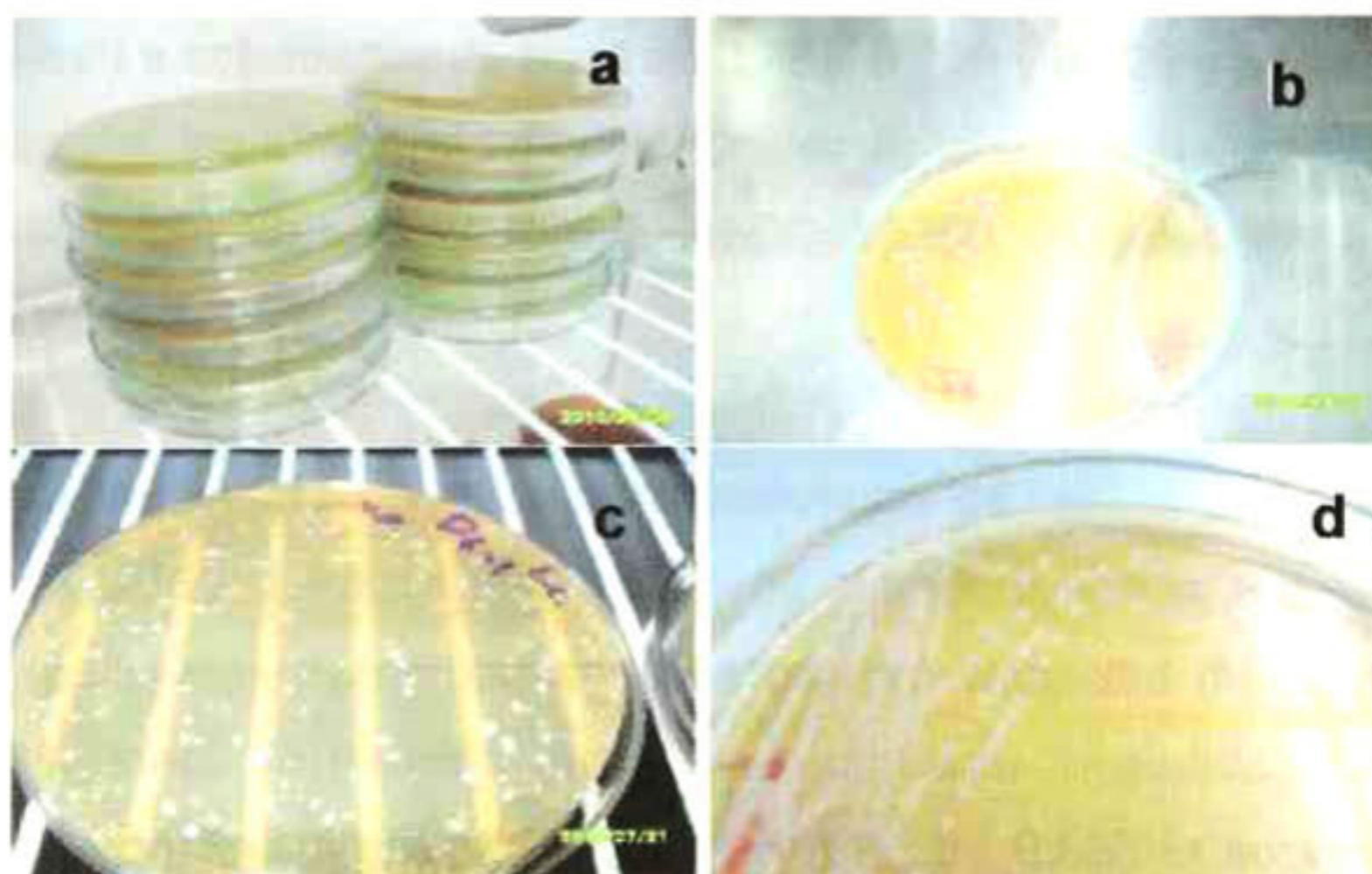


Figura 17. Morfología macroscópica de las colonias de (a y b) *Bifidobacterium breve* ATCC 15700; (c y d) *Lactobacillus casei* ATCC 334.

En las colonias obtenidas se realizó la tinción de Gram con el objetivo de verificar que las células desarrolladas fuera Gram positivo. La tinción de Gram o coloración de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, así como también para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacteria gram positiva a las bacterias que se visualizan de color morada y bacteria gram negativa a las que se visualizan de color rosa o rojo o grosella. La tinción de Gram de las células muestreadas después del proceso de secado por aspersión y para ambos géneros reveló una coloración morada-azul y una morfología de cocos y bacilos gram positivos.

6.7 Estabilidad de las microcápsulas con *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 a 25°C

La sobrevivencia para *B. breve* ATCC 15700 encapsulado durante el almacenamiento a 25°C fue reducida en todos los materiales utilizados. La Figura 18 muestra la sobrevivencia de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 usando almidones modificados como materiales de pared durante 35 días de almacenamiento a actividades de agua de 0.765, 0.536 y 0.329 y a temperatura de 25°C. En general, los almidones modificados de amaranto y el control no ofrecen una protección completa a *B. breve* ATCC 15700 después de 35 días de almacenamiento.

El almidón control presentó una sobrevivencia de células de 1.1 log (UFC/g) con una a_w de 0.765, después de 21 días de almacenamiento; Sin embargo, en almidones modificados de amaranto no se registró viabilidad de células (Figura 18a) durante todo el período de almacenamiento evaluado. Cuando las microcápsulas con *B. breve* se almacenaron a a_w de 0.536 la sobrevivencia en todos los materiales de pared aumentó en comparación con una a_w de 0.765, con valores en el rango de 1.01-3.80 log (UFC/g) a los 21 días de almacenamiento

(Figura 18b). Todos los materiales de pared evaluados mantuvieron los mejores valores de sobrevivencia de los microorganismos de *B. breve* ATCC 15700 cuando fueron almacenados a a_w de 0.329 a temperatura ambiente (Figura 18c).

Estos resultados son similares a los reportados por O'Riordan y col. (2001) quienes evaluaron la microencapsulación de PL1 *Bifidobacterium* usando almidón de maíz ceroso y encontraron que este material de pared no ofreció ninguna protección durante el almacenamiento cuando las microcápsulas con probióticos fueron adicionadas a un producto seco (malteada en polvo) a una temperatura de 19°C-24°C, durante 20 días.

Hsiao y col. (2004) reportaron que la población final de *B. infantis* encapsulado en almidón soluble durante su almacenamiento a 25°C en envases de vidrio fue mayor con relación a su almacenamiento en envases de poliéster en las mismas condiciones. Estos autores concluyeron que la sobrevivencia de *Bifidobacterium* fue superior a temperatura de almacenamiento de 4°C con relación a su almacenamiento a 25°C.

La Tabla 11 muestra el análisis estadístico para la sobrevivencia de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 encapsulado durante 21 días de almacenamiento a 25°C, este no se realizó hasta el final del almacenamiento (35 días) debido a la baja viabilidad presentada por *B. breve* en dichas condiciones. Se puede observar que los almidones presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) siendo el almidón control el que presentó una mayor sobrevivencia, en el caso del almacenamiento a a_w 0.329 no se presentó diferencia significativa entre el almidón control y el almidón succinatado de amaranto ($p < 0.05$). Se puede observar que en todas las actividades de agua se presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) y que con el incremento de la actividad de agua se presentó un decremento en la sobrevivencia del microorganismo.

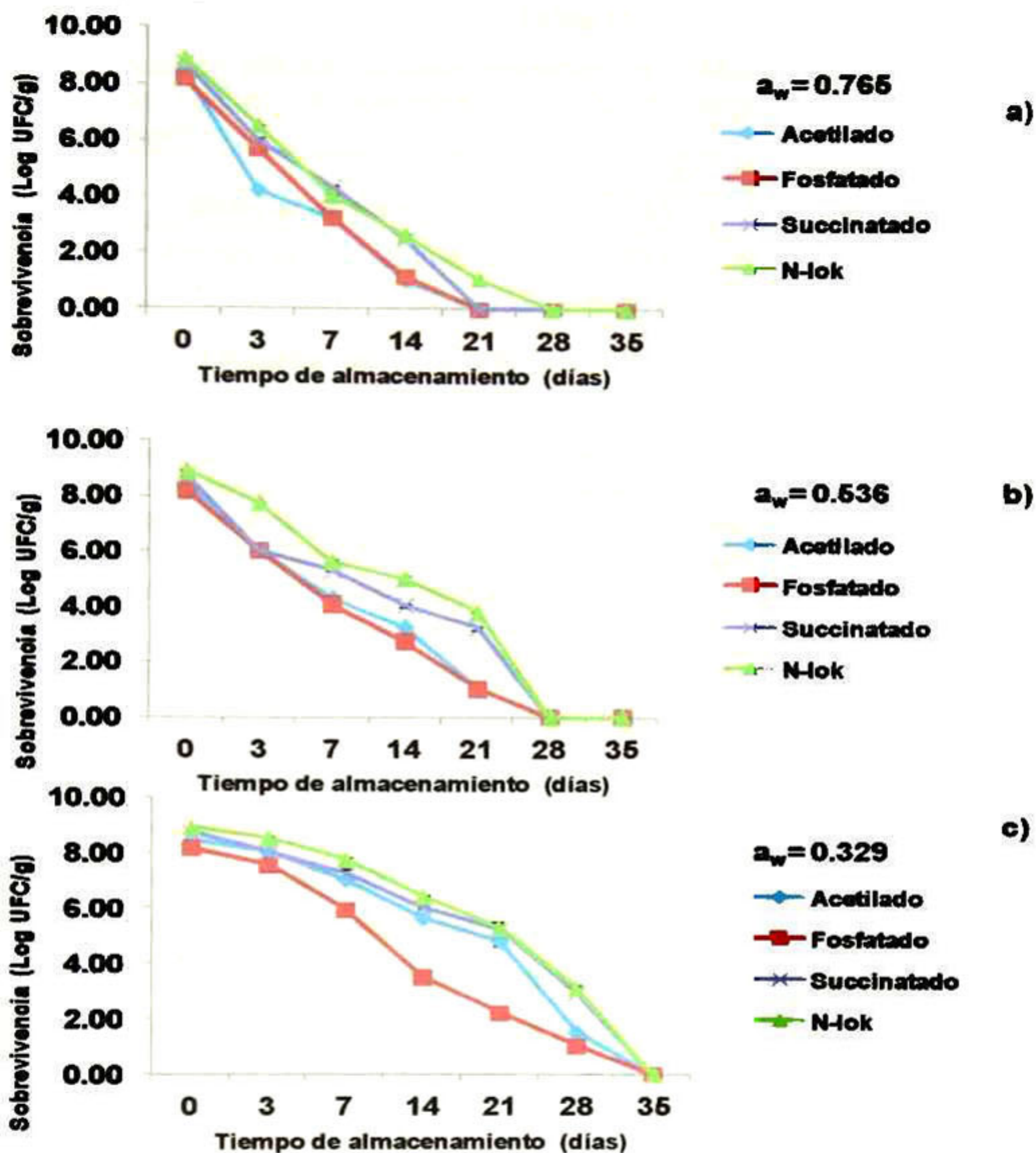


Figura 18. Supervivencia de de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 encapsulado durante el almacenamiento a 25°C. La barra de error representa la desviación estándar.

Tabla 11.

Sobrevivencia de células microencapsuladas de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 (Log UFC/g) almacenadas a 25°C de temperatura y 21 días de almacenamiento.

Material de pared	Actividad de agua		
	0.765	0.536	0.329
Almidón control (N-lok)	1.1a A	3.80a B	5.31a C
Almidón succinatado de amaranto	0.0b A ^a	3.22b B	5.28a C
Almidón acetilado de amaranto	0.0b A	1.04c B	4.80b C
Almidón fosfatado de amaranto	0.0b A ^a	1.01c B	2.21c C

Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre los almidones con la misma actividad de agua ($p < 0.05$).

Diferentes letras mayúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre actividades de agua en el mismo tipo de almidón ($p < 0.05$).

^a No fue detectada viabilidad de bifidobacterias.

L. casei ATCC 334 (Figura 19) mostró mayor sobrevivencia en las mismas condiciones de almacenamiento relacionado a *B. breve* a temperatura ambiente. Con una a_w de 0.765 los almidones acetilado y fosfato de amaranto presentaron menor sobrevivencia (hasta el día 21 de almacenamiento) en comparación con el almidón control y el almidón succinatado de amaranto que presentaron una viabilidad > 4.0 (UFC/g) en estas condiciones. Con una actividad de agua de 0.536 se observó un comportamiento similar a la obtenida con una a_w de 0.765 en todos los materiales evaluados. En general, los almidones succinatados de amaranto y control presentaron viabilidad mayor a 4 log (UFC/g) hasta el final del almacenamiento en todas las actividades de agua evaluadas (Figura 19 a, b y c).

Ying y col. (2010) reportaron que el almacenamiento en condiciones no refrigeradas, y a humedad relativa alta (70%) se disminuye la viabilidad de probióticos (género *Lactobacillus*) encapsulados. Estos autores evaluaron la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) microencapsulados con una mezcla de proteína de suero de leche y almidón, obteniendo resultados muy favorables durante el almacenamiento a 25°C; estos resultados probablemente sean atribuidos a que durante la microencapsulación mediante secado por

aspersión utilizaron el microorganismo liofilizado y así fueron encapsulados, lo que le aporta una doble protección; se obtuvieron viabilidades > a 5 UFC/g cuando se almacenaron en actividades de agua de 0.32 y 0.57; Sin embargo, en actividad de agua de 0.70 se presentó un decremento drástico en la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG); estos resultados son similares a los encontrados en este trabajo, a medida que se disminuyó la actividad de agua la sobrevivencia de *L. casei* ATCC 334 se incrementó. Golowczyc y col. (2010) evaluaron la estabilidad de células de *Lactobacillus kéfir* 8321 y *Lactobacillus kéfir* 8348 encapsuladas con leche reconstituida con y sin la adición de protectores como monoglutamato de sodio, sucrosa, y fructooligosacaridos a diferentes temperaturas de almacenamiento 20°C y 30°C durante 14 semanas de almacenamiento; estos autores obtuvieron que la viabilidad de ambas cepas fue significativamente mayor cuando fueron almacenadas a 0 y 11% de humedad relativa y cuando las bacterias fueron procesadas en presencia de monoglutamato de sodio y fructooligosacaridos; de esta manera concluyeron que la baja actividad de agua de almacenamiento y el uso de compuestos protectores podrían ser una estrategia para preservar la sobrevivencia de los microorganismos durante el secado por aspersión y su almacenamiento.

La Tabla 12 muestra el análisis de varianza para la sobrevivencia de células microencapsuladas de *Lactobacillus casei* ATCC 334 (Log UFC/g) almacenadas a 25°C de temperatura a 21 días de almacenamiento. Los almidones succinatado de amaranto y el almidón control presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) en todas las condiciones de a_w evaluadas. En el caso de actividades de agua de 0.536 y 0.765 los almidones acetilado y fosfatado no se detectó sobrevivencia del microorganismo, cuando las microcápsulas fueron evaluadas a actividad de agua de 0.329, esto probablemente atribuido al carácter hidrofílico de ambos almidones.

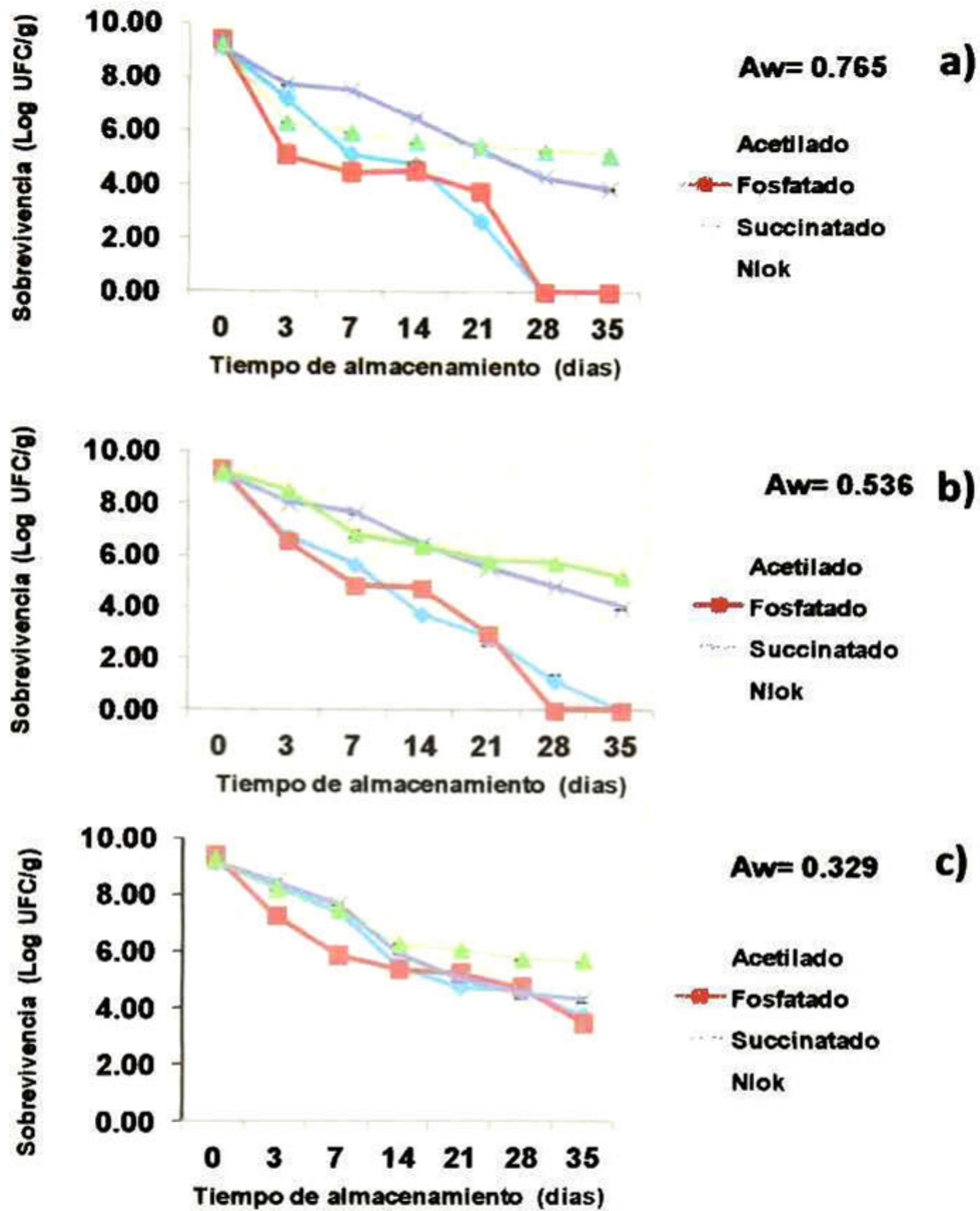


Figura 19. Sobrevivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 encapsulado durante el almacenamiento a 25°C. La barra de error representa la desviación estándar.

Tabla 12.

Sobrevivencia de células microencapsuladas de *Lactobacillus casei* ATCC 334 (Log UFC/g) almacenadas a 25°C de temperatura y 21 días de almacenamiento.

Material de pared	Actividad de agua		
	0.765	0.536	0.329
Almidón control (N-lok)	5.19aA	5.22aB	5.70 aB
Almidón succinatado de amaranto	3.92bA	4.03bB	4.31 bB
Almidón acetilado de amaranto	0.0cA ^a	0.0cA ^a	3.75cB
Almidón fosfatado de amaranto	0.0cA ^a	0.0cA ^a	3.46dB

Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre los almidones sobre la misma actividad de agua ($p < 0.05$).

Diferentes letras mayúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre actividades de agua en el mismo tipo de almidón ($p < 0.05$).

^a No fue detectada viabilidad de *Lactobacillus*.

Con respecto a las actividades de agua evaluadas se observó que en actividades de agua de 0.536 y 0.329 no se presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) cuando se utilizaron como material de pared los almidones control y el succinatado de amaranto. Es importante mencionar que el mecanismo por el cual la células microencapsuladas disminuyen su sobrevivencia no es muy claro aún, sin embargo, existe una substancial interacción entre la a_w con respecto al impacto sobre la viabilidad de los microorganismos. Uno de los principales factores de muerte de los microorganismos es el contenido de oxígeno ya que tanto el género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son anaerobios (Rodríguez-Hueso y col. 2007) por lo que estos resultados probablemente sean atribuidos a que el almidón succinatado como el almidón N-lok protegieron a los microorganismos probióticos de dicho factor adverso dando como resultado una mejor viabilidad durante el almacenamiento en comparación con los otros materiales evaluados.

Con respecto a los materiales de pared utilizados Murúa-Pagola (2009) reportó que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) cuando se evaluó la oxidación del compuesto D-limoneno durante el almacenamiento a 22°C estos autores encapsularon utilizando como material de pared almidón N-lok, almidón

succinatado de maíz y fosfatado de maíz. Sin embargo, en este trabajo se presenta diferencia significativa entre estas modificaciones químicas presentando mejores sobrevivencias cuando es utilizado el almidón N-lok (comercial) y el almidón succinatado de amaranto. Posiblemente estas diferencias sean atribuidas a la fuente del gránulo de almidón, tamaño de gránulo, composición química y grados de modificación química obtenidos.

Por otro lado Amiet-Charpentier y col. (1998) reportaron que la naturaleza hidrofílica del almidón puede causar la absorción de fluidos intracelulares de las bacterias en el interior de las microcápsulas por lo cual sugirió como factor de la pérdida de viabilidad de *Rizhobacteria* en tan solo una semana de almacenamiento. De acuerdo a la estructura química de los almidones modificados en este trabajo el almidón fosfatado presenta mayor carácter hidrofílico por lo que pudiera ser un factor en la notable disminución de la sobrevivencia de los probióticos evaluados con este material de pared.

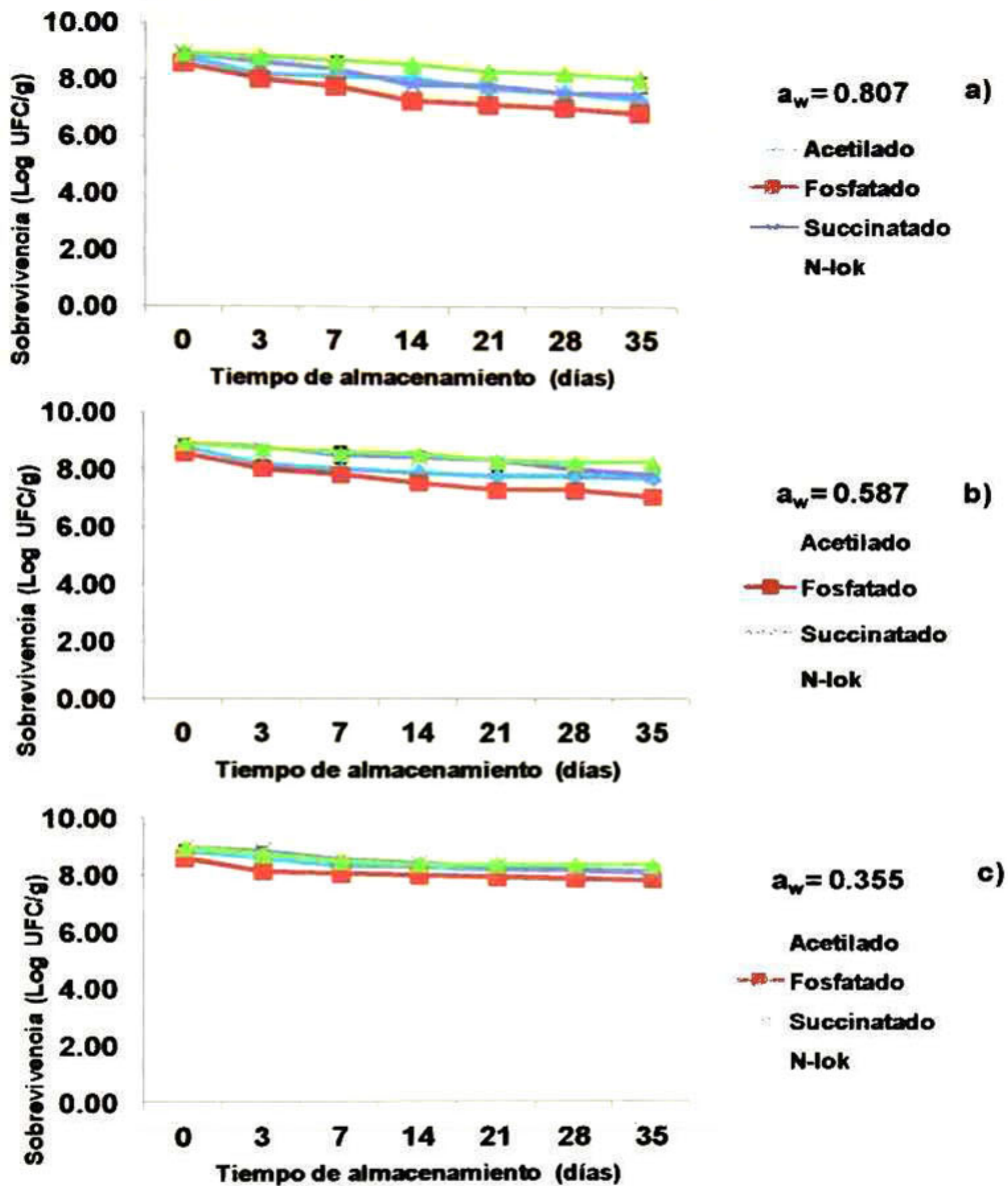


Figura 20. Supervivencia de de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 encapsulado durante el almacenamiento a 4°C. La barra de error representa la desviación estándar.

6.8 Estabilidad de las microcápsulas con *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 a 4°C

Las Figuras 20a, 20b y 20c muestran la sobrevivencia de *B. breve* ATCC 15700 microencapsulado usando almidones modificados de amaranto y almidón control como materiales de pared durante 35 días de almacenamiento a 4°C y en actividades de agua de 0.807, 0.587 y 0.355 respectivamente. La sobrevivencia se mantuvo prácticamente constante en todas las actividades de agua estudiadas.

Se observa la diferencia en la sobrevivencia de las células *B. breve* ATCC 15700 con relación a la sobrevivencia obtenida a 25°C. La Tabla 13 muestra el análisis estadístico de la sobrevivencia de *B. breve* ATCC 15700 (Log UFC/g) a 35 días de almacenamiento y 4°C. El análisis de varianza mostró que en almidones modificados con una a_w de 0.807 los valores oscilaron entre 6.88 y 8.07 Log UFC/g después de 5 semanas de almacenamiento. Con una a_w de 0.587 los almidones succinatados presentaron valores de 7.87 log UFC/g y los almidones acetilados de 7.73 log UFC/g que fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) con relación al almidón control y con el resto de los almidones evaluados, mientras que, el almidón fosfatado presentó un valor de 7.08 log UFCg⁻¹ con la menor sobrevivencia y fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a los otros materiales de pared evaluados. Los almidones succinatados y acetilados almacenados a a_w de 0.355 presentaron valores de 8.07 y 8.06 log UFC/g respectivamente, y no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos. El almidón fosfatado presentó el menor valor de UFC/g (7.81 log UFC g⁻¹). La mayor sobrevivencia a los 4°C y a_w de 0.318 fue para los almidones de amaranto succinatados y acetilados. Las Figuras 21a 21b y 21c muestran la sobrevivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 microencapsulado usando almidones modificados de amaranto y almidón control como materiales de pared durante 35 días de almacenamiento a 4°C y en actividades de agua de 0.807, 0.587 y 0.355. De la misma manera que el género *Bifidobacterium* se obtuvieron buenos resultados en la viabilidad de *Lactobacillus*, con sobrevivencias mayores a 6 Log UFC/g.

Tabla 13.

Sobrevivencia de células microencapsuladas de *Bifidobacterim breve* ATCC 15700 (Log UFC/g) almacenadas a 4°C de temperatura.

Material de pared	Actividad de agua		
	0.807	0.587	0.355
Almidón control (N-lok)	8.07aA	8.24aB	8.33aB
Almidón succinatado de amaranto	7.51bA	7.87bB	8.07bC
Almidón acetilado de amaranto	7.32cA	7.73bB	8.06bC
Almidón fosfatado de amaranto	6.88dA	7.08cB	7.81cC

Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre los almidones sobre la misma actividad de agua ($p < 0.05$).

Diferentes letras mayúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre actividades de agua en el mismo tipo de almidón ($p < 0.05$).

La Tabla 14 muestra el análisis estadístico de la sobrevivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 (Log UFC/g) encapsulado a 35 días de almacenamiento y 4°C. El análisis de varianza indicó que después de 5 semanas de almacenamiento a a_w de 0.807 los valores oscilaron entre 6.41 a 8.04 log UFC/g; para una a_w de 0.587 variaron de 6.68 a 0.805 y finalmente con una a_w de 0.355 los valores de viabilidad oscilaron de 6.98 a 8.54. Las bacterias con mayores sobrevivencias fueron las que se encapsularon con almidones control y succinatado de amaranto con a_w 0.805 y a_w 0.587, y no presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellos.

Los materiales de pared utilizados en este estudio mostraron una mayor sobrevivencia de las células a 4°C durante todo el tiempo de almacenamiento evaluado. La concentración se mantuvo mayor a 10^6 - 10^7 UFC/g para ambos géneros, recomendada y necesaria para aplicaciones prácticas.

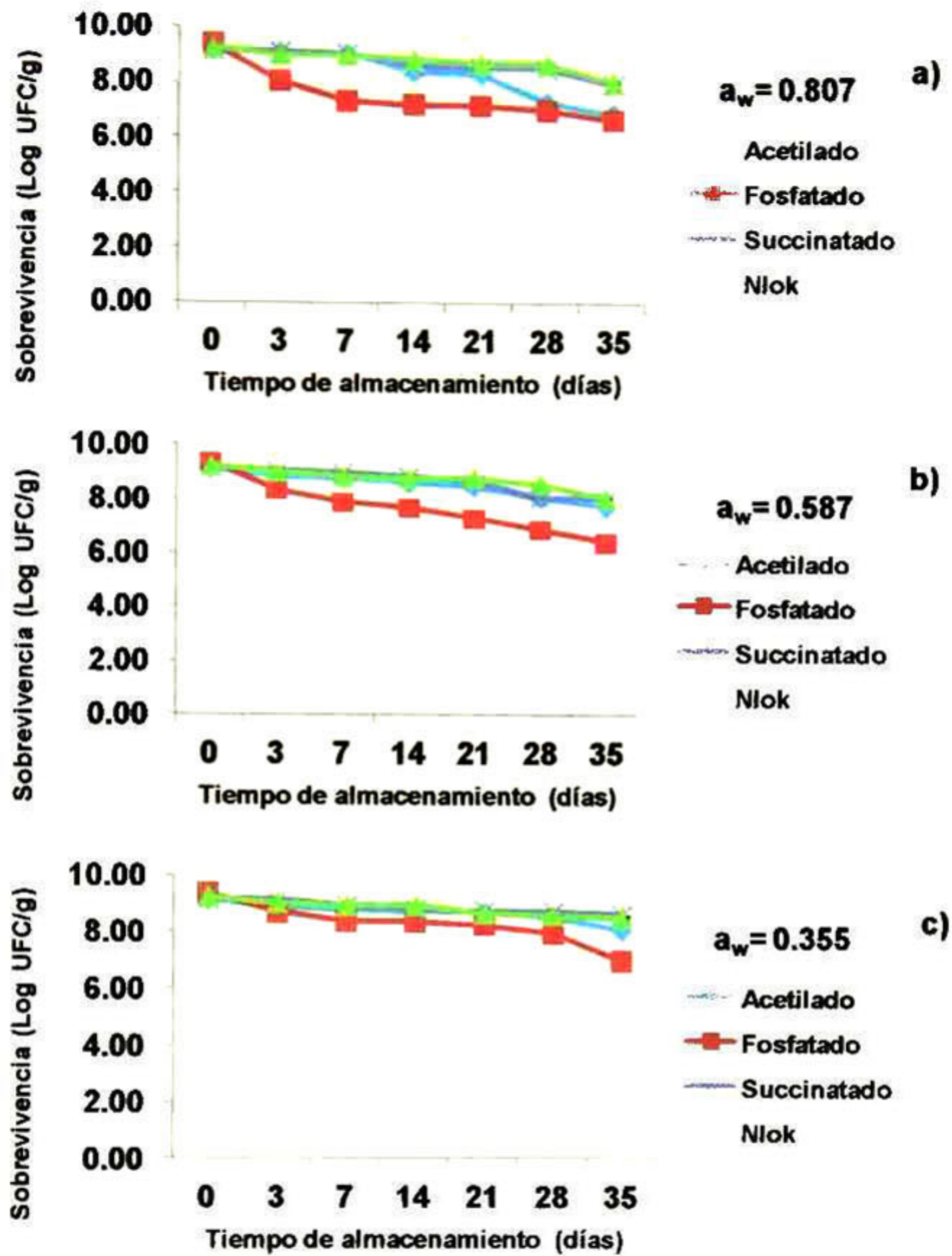


Figura 21. Supervivencia de microcápsulas de *Lactobacillus casei* ATCC 334 encapsulado durante el almacenamiento a 4°C. La barra de error representa la desviación estándar.

Contrario a estos resultados, algunos autores (Texeira y col. 1997, Anal y Singh 2007) quienes reportaron que la microencapsulación mediante secado por aspersion es poco recomendada debido a la alta mortalidad de los microorganismos por efectos simultáneos de deshidratación e inactivación térmica. El aumento de la actividad de agua disminuyó la sobrevivencia de los microorganismos encapsulados de *B. breve* ATCC 15700 y *L. casei* ATCC 334 en los almidones modificados de amaranto con ambas temperaturas de almacenamiento.

Tabla 14.

Sobrevivencia de células microencapsuladas de *Lactobacillus casei* ATCC 334 (Log UFC/g) almacenadas a 4°C de temperatura.

Material de pared	Actividad de agua		
	0.807	0.587	0.355
Almidón control (N-lok)	8.04aA	8.05aA	8.54aB
Almidón succinatado de amaranto	7.98aA	8.03aA	8.61ab
Almidón acetilado de amaranto	6.93bA	7.73bB	8.07bC
Almidón fosfatado de amaranto	6.41bA	6.68cA	6.98cB

Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre los almidones sobre la misma actividad de agua ($p < 0.05$).

Diferentes letras mayúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre actividades de agua en el mismo tipo de almidón ($p < 0.05$).

Las mejores estabilidades durante el almacenamiento fueron presentados por el almidón succinatado de amaranto y el almidón control (N-lok), para ambos géneros, estos almidones se seleccionaron como materiales de pared para ser incorporados en un sistema modelo alimentario. Este sistema alimentario estuvo basado en una harina de avena comercial-instantánea adicionada con los microorganismos encapsulados, la mezcla se utilizó para evaluar la sobrevivencia de los probióticos durante el almacenamiento del producto a 25°C y la tolerancia a condiciones gastrointestinales simuladas (TGI).

6.9 Supervivencia de los microorganismos encapsulados *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 en un sistema modelo alimentario (avena instantánea)

Se utilizó como sistema modelo alimentario avena-precocida comercial instantánea, con un pH de 6.1, una humedad de 11.1% y una actividad de agua de 0.428. Se prepararon dos mezclas con avena pre-cocida comercial (instantánea) como sistema matriz en una con las microcápsulas de *B. breve* y otra con microcápsulas de *L. casei* y fueron almacenadas a 25°C (Figura 22) las mezclas fueron selladas herméticamente y almacenadas durante 35 días.

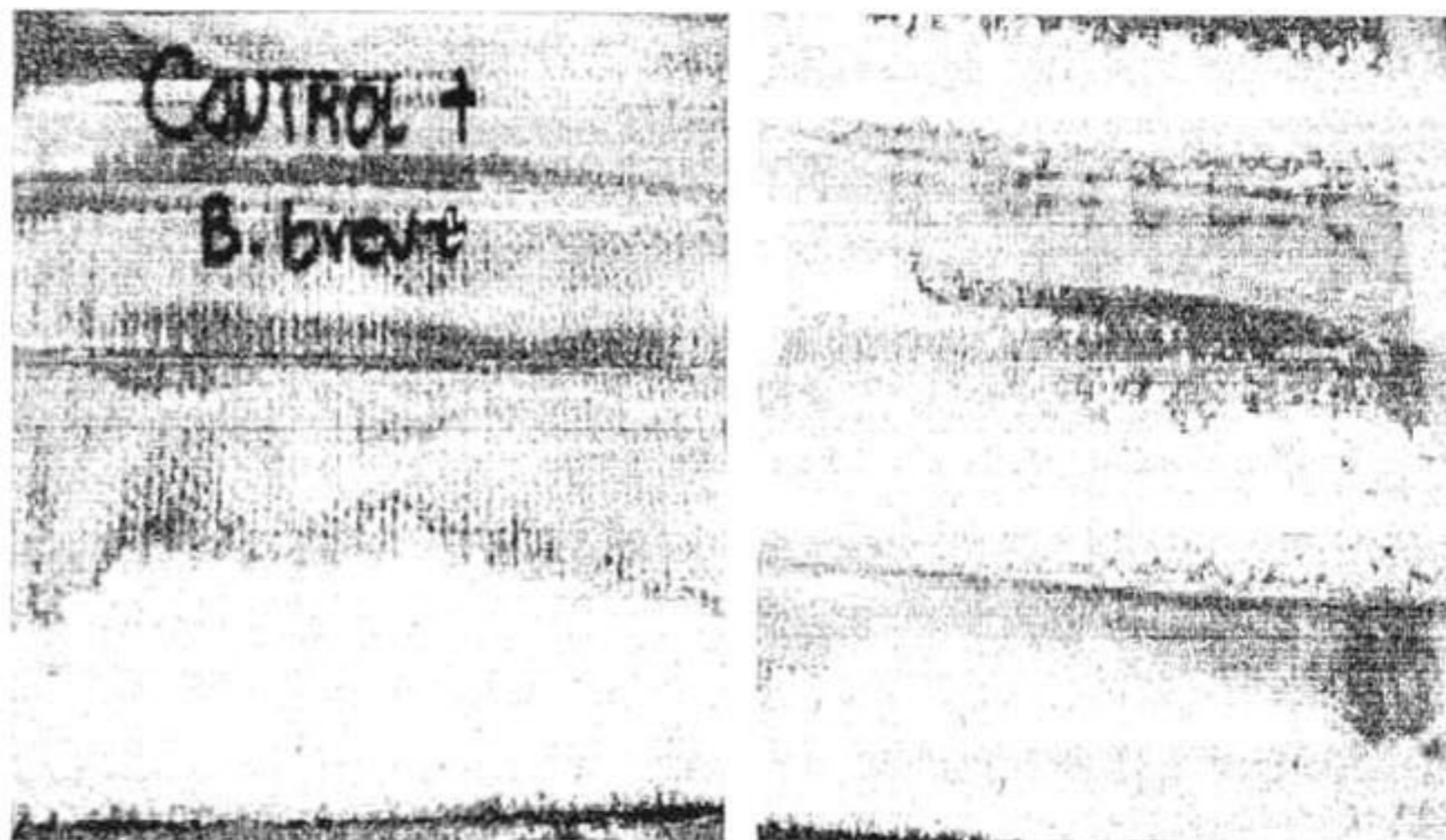


Figura 22. Sistema alimentario modelo de microcápsulas con probióticos y avena comercial instantánea.

Ambos almidones succinatado y control presentaron concentraciones finales de 4.10 Log UFC/g para el almidón control y 6.17 UFC/g para el almidón de amaranto succinatado con *B. breve* (Figura 23a) mientras que, en el caso de *L. casei* ambos almidones presentaron concentraciones finales mayores a los 6.0 Log UFC/g (Figura 23b), durante un periodo de 35 días de almacenamiento a 25°C. Estos resultados en comparación con los mostrados durante el almacenamiento en diferentes actividades de agua fueron superiores para ambos

géneros, por lo que la combinación con la matriz alimentaria favoreció la sobrevivencia de ambos microorganismos durante su almacenamiento. Esto probablemente al sellado hermético de las mezclas. Ha sido reportado que cuando los microorganismos probióticos son adicionados a matrices con elevada actividad de agua estos decrementan su viabilidad ($a_w > 0.25$) (Teixeira y col. 1995) así como la temperatura de almacenamiento, el contenido de oxígeno son factores que contribuyen a la reducción de las células viables (Anal y Singh 2007).

Cabe destacar que no se modificó la apariencia de la avena con la adición de las microcápsulas con ambos probióticos. Es importante resaltar que el comportamiento del almidón de amaranto succinatado fue superior con relación al almidón control en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C). Además de las propiedades benéficas de la avena, se ha adicionado el efecto benéfico de *B. breve* y *L. casei* como probióticos (prebiótico-probiótico).

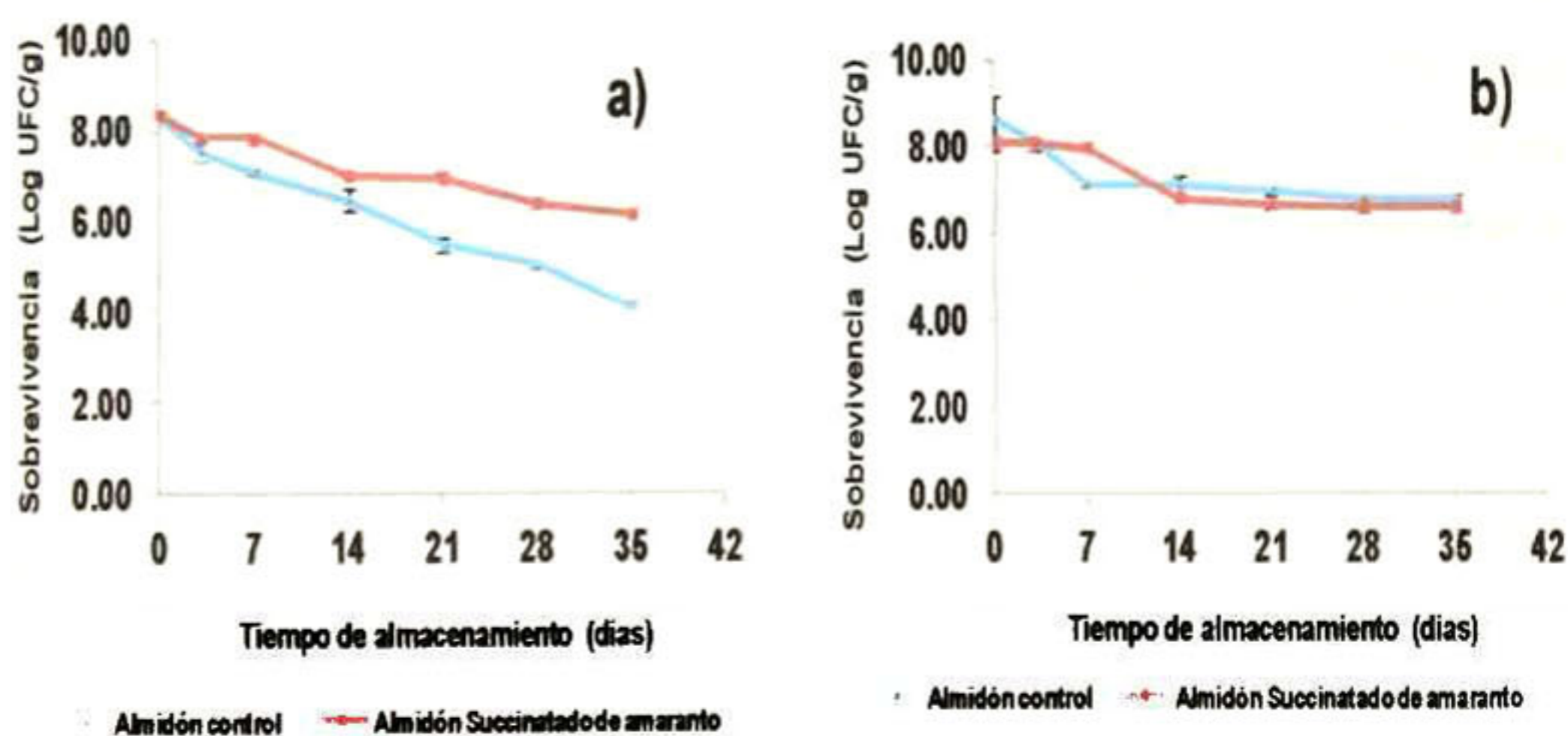


Figura 23. Sobrevivencia de mezcla de avena con microcápsulas de a) *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y b) *Lactobacillus casei* ATCC 334 microencapsulados *La barra de error representa la desviación estándar.

Weinbreck y col. (2010) microencapsularon *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) con proteína de suero de leche y aceite de palma como materiales de pared y evaluaron las células microencapsuladas en una fórmula láctea infantil durante el almacenamiento a 37°C utilizando diferentes actividades de agua. Estos autores reportaron que la microencapsulación utilizando estos materiales no ofrece protección sobre el microorganismo probiótico durante el almacenamiento en productos secos evaluados a esta temperatura.

Al final del almacenamiento de las mezclas de avena conteniendo los probióticos encapsulados (*B. breve* y *L. casei*) no mostraron cambios visuales en la apariencia física del alimento. Existe poca información sobre la sobrevivencia de los microorganismos probióticos en productos con baja actividad de agua (Weinbreck y col. 2010). Sin embargo, es bien conocido que las proteínas, grasas/ceras de un sistema alimentario podrían ser buenas barreras en la difusión de oxígeno y humedad. O'Riordan y col. (2001) han reportado la microencapsulación de probióticos y han incorporado sus microcápsulas en sistemas alimenticios en productos secos (malteada en polvo y muesli). Sin embargo, estos autores reportaron que no se tuvo éxito en la sobrevivencia de los microorganismos. Existen pocos reportes de la incorporación de probióticos en productos secos, sin embargo, es un gran reto para los investigadores mantener e incrementar la viabilidad de los microorganismos con el fin de incrementar la funcionabilidad de los alimentos.

6.10 Tolerancia de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 microencapsulado a condiciones simuladas del Tracto Gastrointestinal (TGI)

Las mismas mezclas de almidones modificados (succinatado y control) con avena fueron evaluadas en condiciones simuladas de tracto gastrointestinal. La Figura 23a y 23b muestra la sobrevivencia inicial de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 respectivamente, antes de someter las

muestras a condiciones del tracto y a la sobrevivencia final después de realizar las pruebas *in vitro*.

Para *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 el almidón control presentó una reducción en la sobrevivencia de 1.42 Log UFC/g, mientras que, el almidón de amaranto modificado presentó una reducción en la sobrevivencia menor a 1.29 Log UFC/g. En el caso de *Lactobacillus casei* ATCC 334 se puede observar que para el almidón control se obtuvo una reducción de 1.7 Log UFC/g del inicio al final de la prueba; Sin embargo, el almidón de amaranto modificado presentó una reducción en la sobrevivencia de 0.36 Log UFC/g, con mayor resistencia a las condiciones evaluadas.

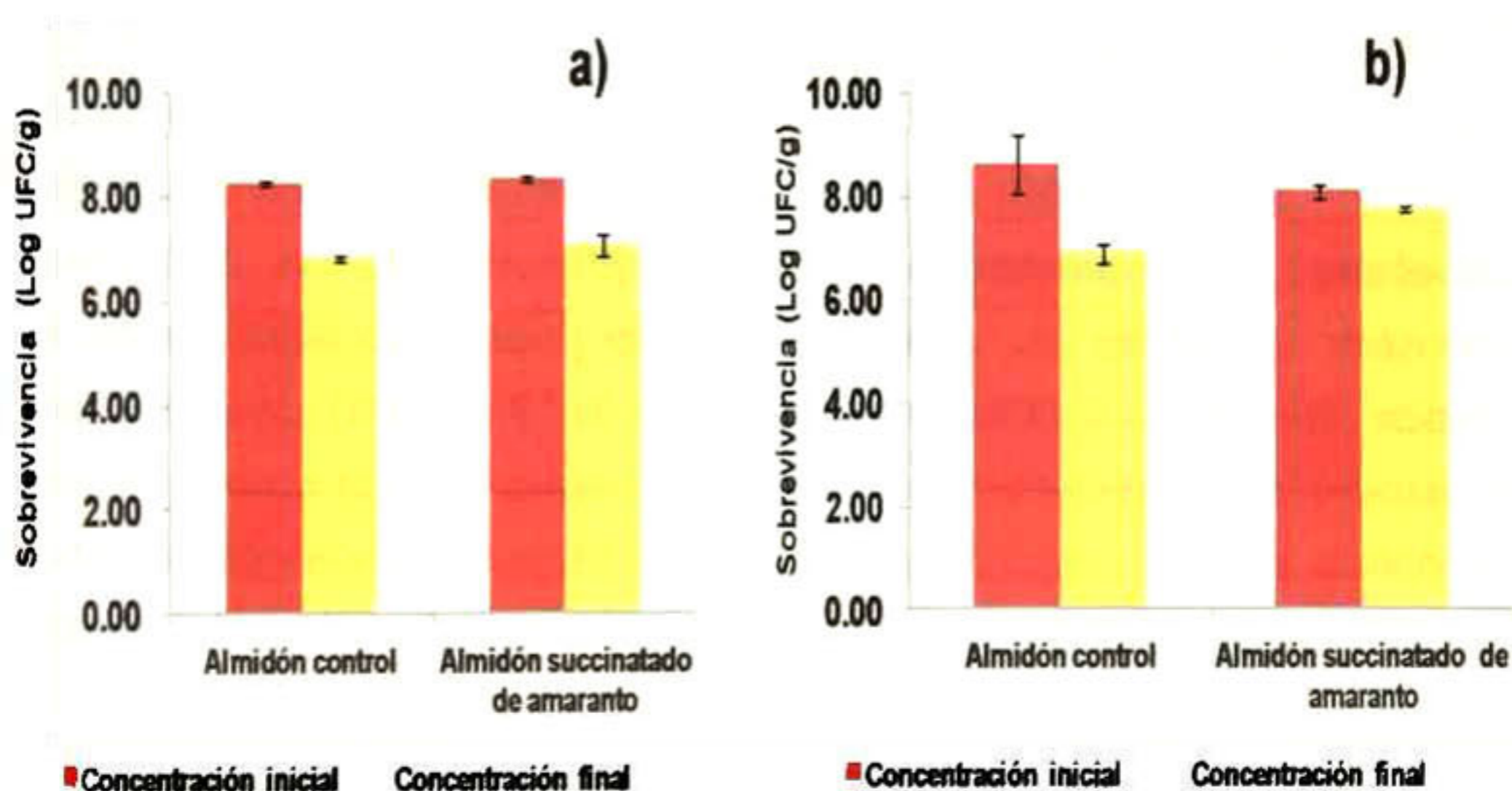


Figura 24. Tolerancia a condiciones simuladas del Tracto Gastrointestinal (TGI) de a) de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y b) *Lactobacillus casei* ATCC 334 microencapsulados *La barra de error representa la desviación estándar.

Estos resultados fueron favorables con el fin de ejercer sus efectos beneficiosos en el huésped, se acepta que las bacterias probióticas deben estar vivas en el producto en el tiempo de consumo y también ser capaces de alcanzar el intestino grueso en cantidades adecuadas, suficientes para facilitar la colonización y la proliferación. El almidón modificado químicamente es un tipo de almidón resistente RS₄, como es el caso de los almidones succinatados usados como materiales de pared los cuales pudieron actuar como agente protector contra las condiciones adversas en el tracto gastrointestinal que por definición el almidón resistente no es degradado por las enzimas pancreáticas y no es digerible en el intestino delgado (Mortazavian y col. 2007).

Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por Sultana y col. (2000) quienes microencapsularon células de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con alginato de calcio-almidón y reportaron una disminución de la sobrevivencia de 2 log para *Lactobacillus* y únicamente una ligera disminución de *Bifidobacterium* cuando las partículas se expusieron en condiciones *in vitro* simulando condiciones de alta cantidad de sales biliares. Favaro-Trindade y Grosso (2002), evaluaron microcápsulas con *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* microencapsulados con acetato ftalato de celulosa y obtuvieron buenos resultados (alta viabilidad) después de someterlas a condiciones ácidas y biliares similares a las del intestino. Estos autores concluyeron que el proceso de secado por aspersión no modificó la tolerancia de *B. lactis* y *L. casei acidophilus* en presencia de sales biliares.

Brennan y col. (1986) utilizaron la liofilización como método para el secado de *L. acidophilus*. Estos autores reportaron condiciones intolerantes a condiciones simuladas de altas concentraciones de bilis, probablemente atribuido a la pérdida de componentes específicos desde la membrana celular durante el proceso de secado.

6.11 Caracterización morfológica de las microcápsulas (SEM)

Las microcápsulas de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 (Figuras 25 y 26 respectivamente) fueron similares en morfología y tamaño. Presentaron una cobertura uniforme de las células y no se observa evidencia de la presencia de células en el exterior de las microcápsulas. La forma de las microcápsulas en todos los materiales de pared fue característica de microcápsulas producidas por secado por aspersion con indentaciones en la superficie como resultado de la evaporación rápida del agua. Dichas morfologías de microcápsulas obtenidas por secado por aspersion son similares a las reportadas por O'Riordan y col. (2001), Crittenden y col. (2006), Rodriguez-Huezo y col. (2007), Murúa-Pagola col. (2009) y Ying y col. (2010) entre otros. A temperaturas más elevadas de secado por aspersion el efecto de indentaciones en la superficie de las microcápsulas disminuye por un efecto de expansión rápida de las partículas. La presencia de indentaciones afecta negativamente el libre flujo de los polvos debido a que conduce a la formación de agregados (Rosenberg y Young 1993).

El tamaño de las microcápsulas fue menor a 20 micras en todos los almidones modificados, esta característica puede contribuir a reducir el impacto sobre la textura cuando se incorporan en un sistema alimenticio. Los probióticos son demasiado grandes (generalmente 4.1 μm) para la nanotecnología, por lo que la microencapsulación es una herramienta útil para mejorar la viabilidad de los probióticos activos (Akhlar, 2010).

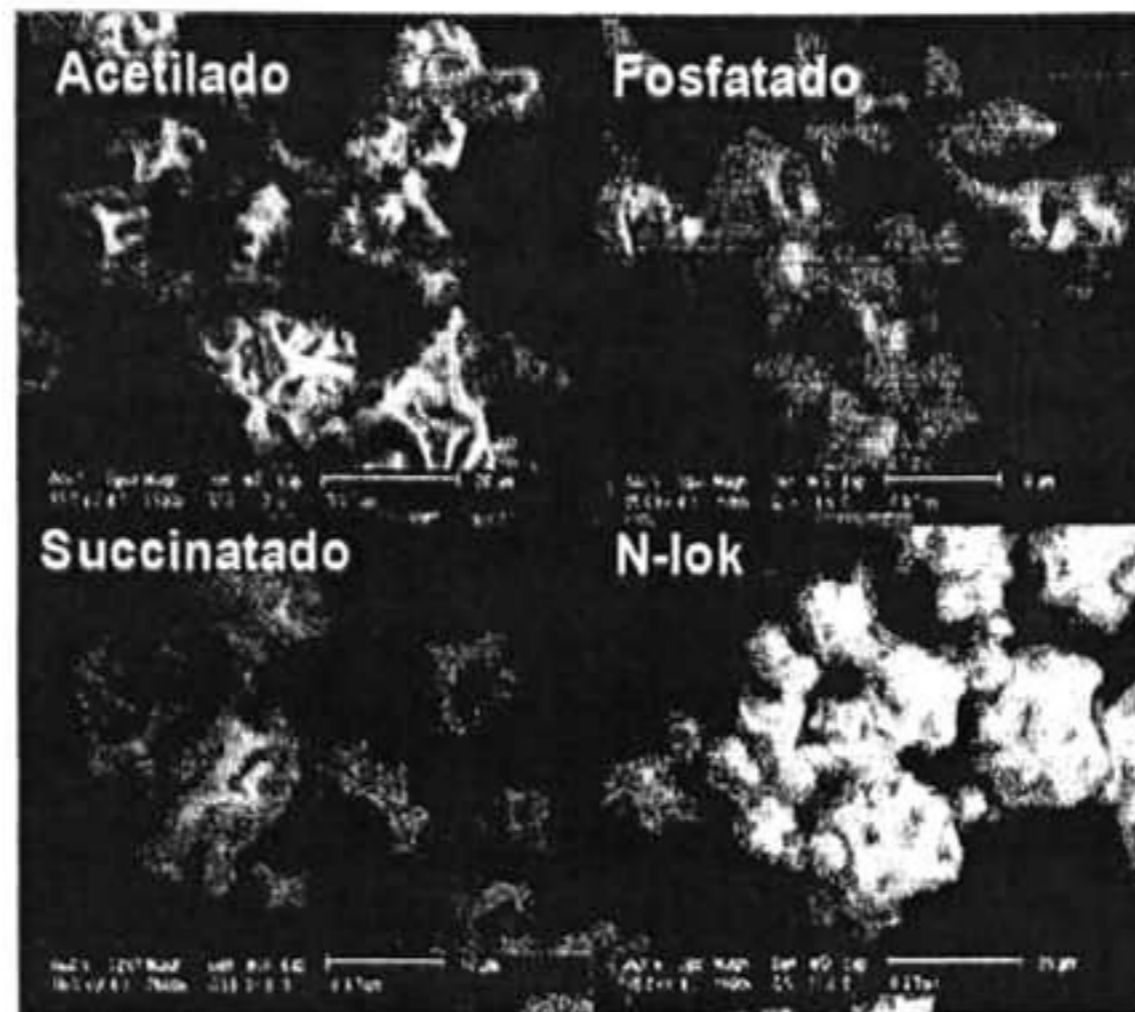


Figura 25. Microfotografías de microcápsulas con *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 después del secado por aspersión.

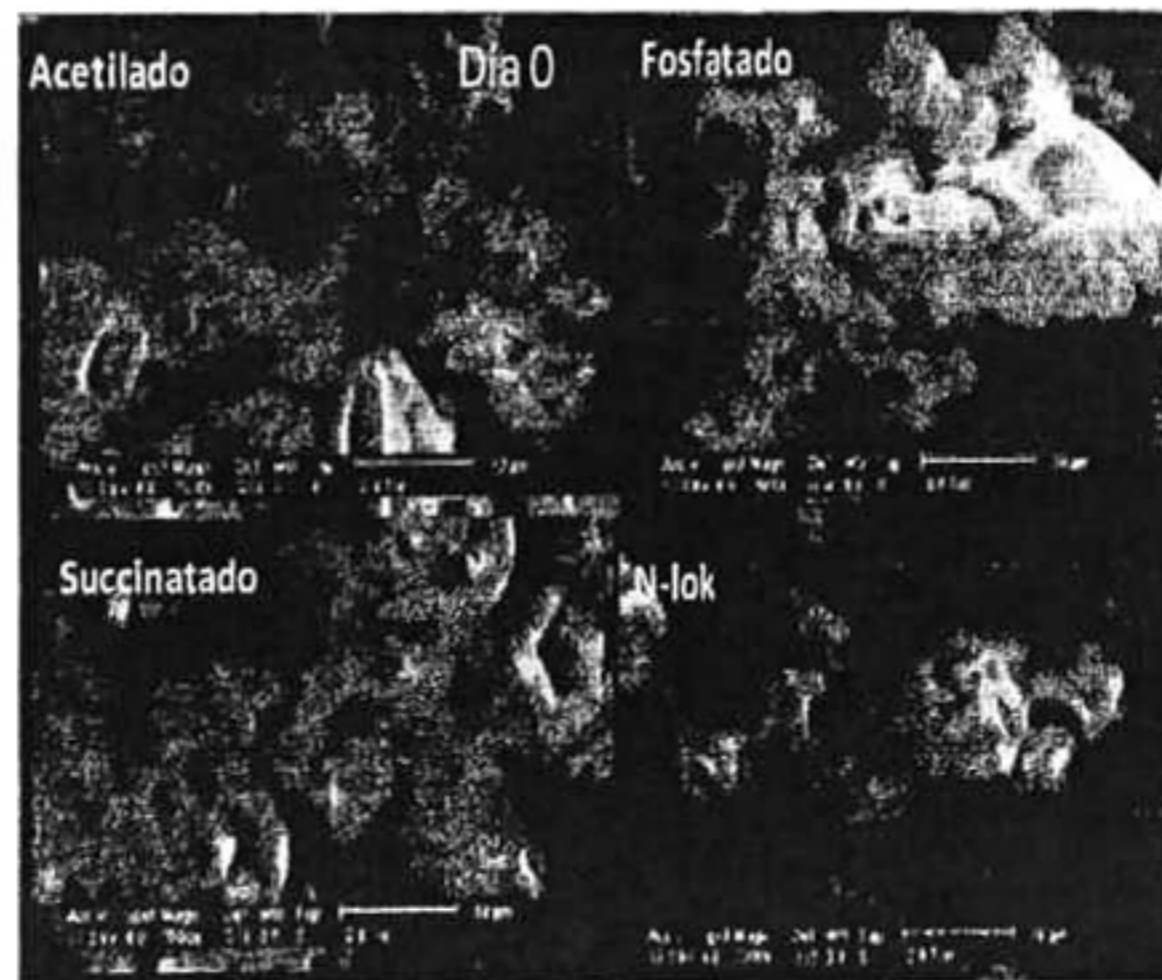


Figura 26. Microfotografías de microcápsulas con *Lactobacillus casei* ATCC 334 después del secado por aspersión.

La Figura 27 muestra las microfotografías de las microcápsulas durante su almacenamiento de 21 días, a 25°C y 0.329 de actividad de agua para el género *Bifidobacterium breve* ATCC 15700. A baja actividad de agua durante el almacenamiento las microcápsulas mostraron cambios severos en la superficie externa.

Las microcápsulas de almidón fosfatado de amaranto (Figura 27b) mostraron una pérdida completa de su forma original, probablemente, esta estructura está asociada con la pérdida de viabilidad significativa de las células encapsuladas en este almidón modificado. Sin embargo, las mismas microcápsulas almacenadas a 4°C (Figura 28) mantuvieron la integridad morfológica durante todo el período de almacenamiento.

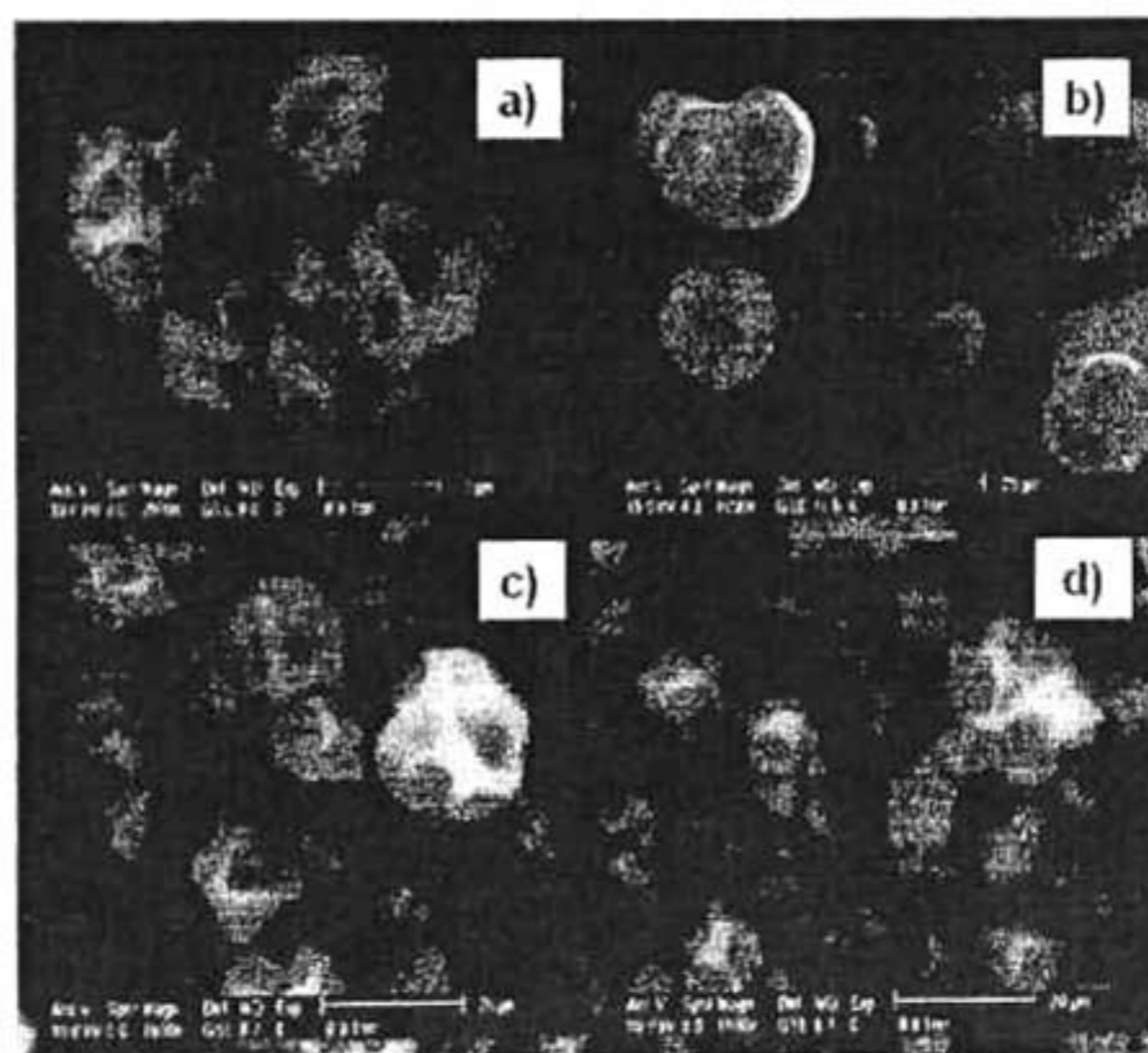


Figura 27. Microfotografías de microcápsulas con *B. breve* ATCC 15700 después de 21 días de almacenamiento a a_w de 0.329 y 25°C de almacenamiento: a) almidón acetilado b) almidón fosfatado c) almidón succinatado y d) almidón control.

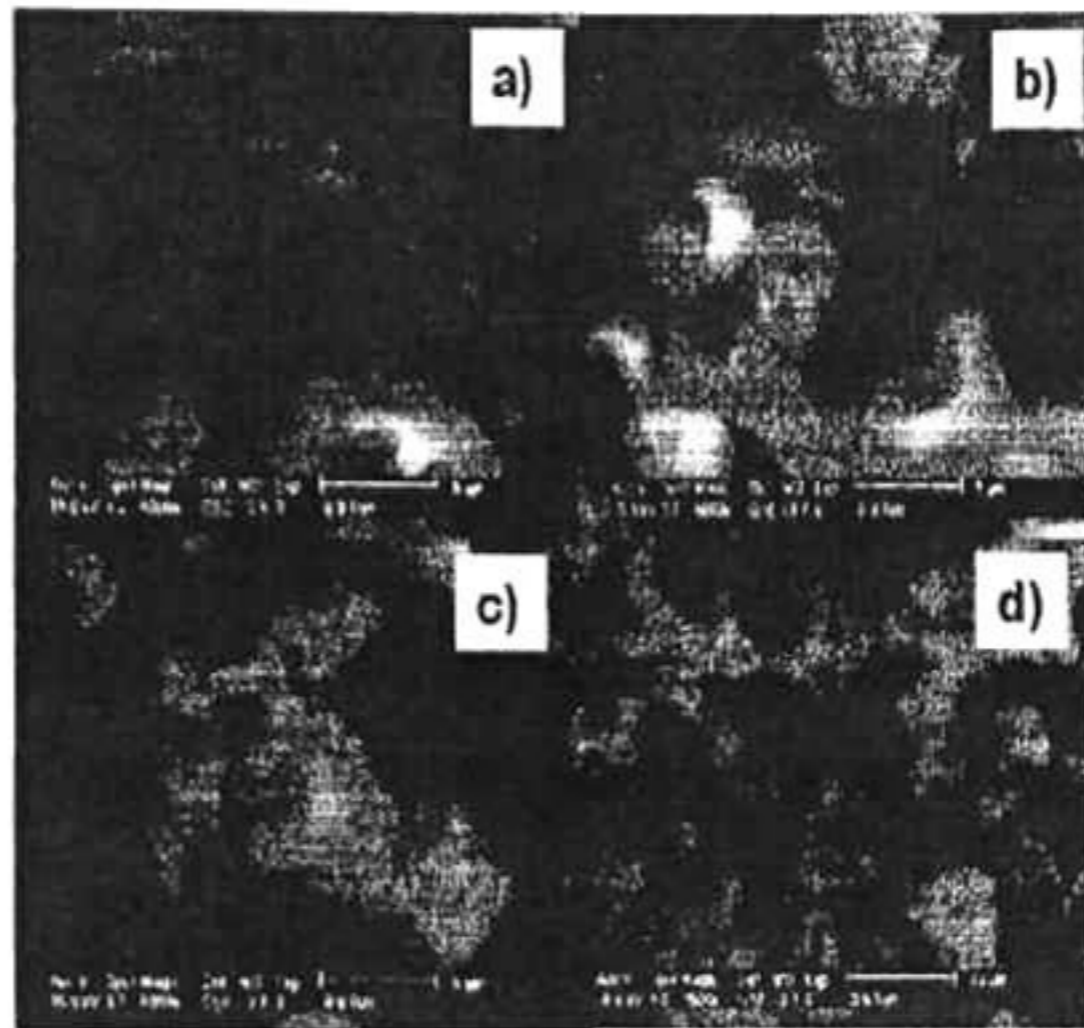


Figura 28. Microfotografías de microcápsulas con *B. breve* ATCC 15700 después de 21 días de almacenamiento a a_w de 0.355 y 4°C de almacenamiento: a) almidón acetilado b) almidón fosfatado c) almidón succinatado y d) almidón control.

7. CONCLUSIONES

El amaranto es una nueva alternativa para la obtención de almidón de amaranto con características propias como un alto contenido de amilopectina y un tamaño de gránulo pequeño que le confiere características importantes en aplicaciones tecnológicas. El aislamiento de gránulos de almidón de amaranto es posible mediante el procesamiento que incluye la molienda húmeda-alcalina, proceso por el cual se obtuvieron gránulos de almidón con buenas características químicas, reológicas, térmicas y morfológicas. Dichas características pueden ser modificadas a través de la esterificación y previa hidrólisis del almidón originando almidones derivatizados (almidones succinatados, acetilados y fosfatados) con buenas características tecnológicas entre las que destacan un incremento en la solubilidad y absorción de agua del gránulo de almidón así como la reducción de la viscosidad, y la obtención de almidones que de acuerdo a las regulaciones alimentarias establecidas por la FDA cumplen con los parámetros establecidos de grado de sustitución.

El almidón de amaranto modificado químicamente y por extrusión termoplástica cumple con excelentes características para su aplicación como material de pared en la tecnología del secado por aspersion. Además de mantener la sobrevivencia de microorganismos probióticos durante el almacenamiento a 4°C de temperatura. No obstante de acuerdo a las condiciones de almacenamiento evaluadas los almidones modificados de amaranto y el almidón comercial utilizado como control N-lok no muestran buenas características de protección de la sobrevivencia de microorganismos probióticos (*Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y de *Lactobacillus casei* ATCC 334) cuando son almacenados a 25°C, condición que conduce a pensar en posibles mejoras en esta investigación. Los resultados obtenidos durante el almacenamiento de las microcápsulas con *B. breve* ATCC 15700 y *L. casei* ATTCC 334 demuestran que la viabilidad de los microorganismos varía de acuerdo a la temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento, actividad de agua y material de pared.

Bifidobacterium breve ATCC 15700 y *Lactobacillus casei* ATCC 334 encapsuladas en mezclas con avena (comercial) almacenadas a temperatura ambiente durante 35 días presentaron una baja reducción de la sobrevivencia a través del tiempo, por lo que la introducción de los polvos con microcápsulas en el sistema modelo alimentario fue favorable con relación al valor funcional del alimento, la sobrevivencia fue mejor para el género *Lactobacillus casei*-avena. Los almidones succinatados de amaranto mostraron alta resistencia a la simulación de condiciones similares al tracto gastrointestinal por lo que esto le da un valor funcional al almidón utilizado como material de pared.

8. REFERENCIAS

- AACC, (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10 th Ed., Vol II, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. y Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal Food Microbiology*. 123:121–129.
- Akalu, G., Tufvesson, F., Jonsson, G. y Nair, B. (1998). Physico-chemical characteristics and functional properties of starch and dietary fiber in grass pea seeds. *Starch/Stärke*. 50:374-382.
- Akhiar, M. (2010). Enhancement of Probiotics Survival by Microencapsulation with Alginate and Prebiotics. *Basic Biotechnology Journal*. 6:13-18.
- Anal, A.K. y Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery review. *Trends Food Science. Technology*. 18:240-251.
- Ananta, E., Volkert, M. y Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*. 15:399-409.
- Anderson, R.A., Conway, H.F., Pfeifer, V.F y Griffin, E.L., Jr. (1969). Gelatinization of corn grits by roll-and extrusion-cooking. *Cereal Science Today*. 14(1): 4-12.
- Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S. y Miki, T. (1998). *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal Food Science*. 63:544–547.
- Aszalos, A. y Prey, V. A. (1962). New acetylation reaction for sugars. *Die Stärke*. 14:50–52.
- Axelsson, L. T. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen and A. Von Wright (Eds.). New York, USA: Marcel Dekker. Pp.1-64.
- Badui, S. (1995). Química de los alimentos. 2da. reimpresión: Alambra mexicana, S.A. de C. V. (Ed.) México, D. F. Pp. 92-117.
- Baker, A. A., Miles, M. J. y Helbert, W. (2001). Internal structure of the starch granule revealed by AFM. *Carbohydrate Research*. 330(2):249-256.

- Barba, A. P. R., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G. y Olvera, L. M. (2009.) Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*. 49:117-121.
- Becker, R., Wheeler, E. L., Lorenz, K., Stafford, A. E., Grosjeans, O. K., Betschart, A. A. y Saunders, R. M., (1981). A compositional study of amaranth grain. *Journal Food Science*. 46:1175.
- Bello, L. A., Colonna, P., Roger, P. y Paredes, O. (1998). Macromolecular features of amaranth starch. *Cereal Chemistry*. 75(4): 395-402.
- Bello, L. A. y Paredes, O. (1999). El almidón, lo comemos pero no lo conocemos. *Ciencia: Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. 50(3): 29-33.
- Bello-Pérez, L. A., De León, Y. P. Agama-Acevedo, E. y Paredes-López, O. (1998). Isolation and Partial Characterization of Amaranth and Banana Starches. *Starch/Stärke*. 10:409-413.
- BeMiller, J. N. (1965). Acid hydrolysis and other lytic reactions of starch. In R. L. Whistler, y E. F. Paschall (Eds.), (Vol. 1) *Starch: Chemistry and Technology*, New York: Academic Press. Pp. 495.
- Bhandari, P. y Singhal, R. (2002). Effect of succinylation on the corn and amaranth starch pastes. *Carbohydrate Polymers*. 48:233-240.
- Bhosale, R. y Singhal, R. (2006). Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn and amaranth starches. *Carbohydrate Polymers*. 66:521-527.
- Bhosale, R. y Singhal, R. (2007). Effect of octenylsuccinylation on physicochemical and functional properties of waxy maize and amaranth starches. *Carbohydrate Polymers*. 68:447-456.
- Biliaderis, C. G. (1992). Characterization of starch networks by small strain dynamic rheometry. In R. J. Alexander, y H. F. Zobel (Eds.), *Developments in carbohydrate chemistry*. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc. Pp. 87-135.

- Biliaderis, C.G. (1998). Structures and phase transitions of starch polymers. In: Walter, R.H. (Ed.). *Polysaccharide Association Structures in Foods*, Marcel Dekker, New York. Pp. 57-168.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S. S., Cantero, D. y Webb, C. (2003). Review. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*. 36:527-543.
- Brashears, M. M., Gilliland, S. E. y Back, L. M. (1998). Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *Journal Dairy Science*. 81: 2103-2110.
- Brennan, M., Wanismail, B., Johnson, M. C. y Bibek, R. (1986). Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of food Protection*. 49:47-53.
- Brown, S. B. y Orlando C. M. (1988). Reactive extrusion, in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Vol. 14 (Eds. H. F. Mark, N. M. Bikales, C.G. Overberger, G. Menges, J. I. Kroschwitz) Wiley, New York. Pp. 169-170.
- Buléon, A., Gallant, D. J., Bouchet, B., Mouille, C., D'Hulst, C., Kossman, J. y Ball, S. (1998). Starch granules structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 23:85-112.
- Calixto, C. y Amao, S. (2004). Aislamiento y caracterización parcial (I) del almidón nativo de *Amaranthus caudatus* Linneo. *Revista Química del Perú*. 70(1):48-54.
- Calzetta A., Tolaba, M. P. y Suarez, C. (2006). Effects of steeping conditions on wet-milling attributes of amaranth. *International Journal of Food Science and Technology*. 41:70-76.
- Champagne, C. P. y Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Biotechnology*. 18:184-190.
- Chang, R. P. y Sosulski, F. W. (1985). Functional properties of dry milled fractions from wild oats (*Avena sativa*). *Journal Food Science*. 50:1143-1148.
- Chang, Y. H. y Lii, C. Y. (1992). Preparation of starch phosphates by extrusion. *Journal of Food Science*. 57(1):203-205.

- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morell, L. y Collins, J. K. (1998). Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal Applied Microbiology*. 84:759–768.
- Chinnaswamy, R. y Hanna, M.A. (1991). Extrusion grafting starch onto vinylic polymers. *Starch* 43:396–402.
- Choi, S. G. y Kerr, W. L. (2004). Swelling characteristics of native and chemically modified wheat starches as a function of heating temperature and time. *Starch*. 56:181-189.
- Colonna, P. y Roger, P. (1992). The influence of chain length on the hydrodynamic behaviour of amylase. *Carbohydrate Research*. 227:73-83.
- Conway, P. L. (1996). Selection criteria for probiotic microorganisms. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*. 10-14.
- Cousidine, D. M. (1982). *Foods and food production encyclopedia*. NY:John Wiley Inc. Pp. 142.
- Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L. y Augustin, M. (2006). Symbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:2280–2282.
- Curry, B. y Crow, V., (2003). *Lactobacillus spp*: general characteristics. *Encyclopedia Dairy Science*. 3:1479–1484.
- Dave, R. I. y Shah, N. P. (1996). Evaluation of media for selective enumerations of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii spp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. *Journal Dairy Science*. 79:1529-1539.
- Del Re, B., Busetto, A., Vignola, G., Sgorbati, B. y Palenzona, D. L. (1998). Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *Letters in Applied Microbiology*. 27:307–310.
- Desmond, C., Ross, R. P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G. y Stanton, C. (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei NFBC 338* in spray-dried powder containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*. 1003-1011.

- Desmond, C. B., Corcoran, M., Coakley, M., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. y Stanton, C. (2005). Development of dairy-based functional foods containing probiotics, and prebiotics. *Australian Journal of Dairy Technology*. 60:121-126.
- De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C. y Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*; 73:421S-429S.
- Dimantov, A., Greenberg, M. y Kesselman, E. (2003). Study of high amylase corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model system. *Innovation Food Science Engineering Technology*. 5:93-100.
- Dinakar, P. y Mistry, V. V. (1994). Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. 77: 2854-2864.
- Durrani, C. M. y Donald, A. M. (1995). Physical characterization of amylopectin gels. *Polymer Gels and Networks*. 3(1):1-27.
- Dziezak, J.D. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*. 42:36-151.
- FAO/WHO Experts' Report (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- Favaro-Trindale, C. S. y Grosso, C. R. F (2002). Microencapsulation of *L acidophilus* (La-05) and *B lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*. 19:485-494.
- Gamel, T. H., Linssen, J. P., Mesallam, A. S., Damir, A. A. y Shekib, L. A. (2006). Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species: oil, sugars, fibres, minerals and vitamins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86:82-89.
- Gilliland, S. E. y Speck, M. L. (1977). Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food borne pathogens in associative cultures. *Journal Food Protection*. 40:820-823.

- Gimmler, N., Lawn, F. y Meuser, F., (1994). Influence of extrusion cooking conditions on the efficiency of the cationization and carboxymethylation of potato starch granules. *Starch*. 46:268–276.
- Gismondo, M. R., Drago, L. y Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal Antimicrobiology Agents*. 12:287-292.
- Golowczyc, A. M., Gerez, L. C., Silva, J., Abraham, A. G., De Antoni, L. G. y Teixeira, P. (2010). Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. *Biotechnol Lett*.
- González, R., Carrara, C., Tosi, E., Añón, M. C. y Pilosof, A. (2007). Amaranth starch-rich fraction properties modified by extrusion and fluidized bed heating. *LWT*. 40:136-143.
- Gunning, Y. M., Gunning, P. A. y Kemsley, E. K. (1999). Factors affecting the release of flavour encapsulated in carbohydrate matrixes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47:51989-5205.
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of standards-a. Physics and Chemistry*. 81A:89-96.
- Hagen, M. y Narvhus, J. A. (1999). Production of ice cream containing probiotic bacteria. *Milchwissenschaft*. 54:265–268.
- Hauptli, H. (1977). Agronomic potencial and breeding amaranth. *Proc. First Amaranth Semin*. Emmaus, Pa.
- Harper, J. M. (1990). Extrusión of foods. In: *Biotechnology and food process engineering*. Institute of Food Technologists, U. S. A. Pp. 295-308
- Hevia, F., Berti, M., Wilckens, R. y Yévenes, C. (2002). Contenido de proteína y algunas características del almidón en semillas de amaranto (*Amaranthus spp.*) cultivado en Chillan, Chile. *Agro Sur*. 30 (1): 24-31.
- Hermansson, A. M. y Svegmarm, K. (1996). Developments in the understanding of starch functionality. *Trends in Food Science and Technology*. 7(11): 345-353.
- Hoover, R. (2000). Acid-treated starches. *Food Reviews International*. 16:369–392.

- Hooper, L. V., Midtvedt, T. y Gordon, J. I. (2002). How host microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*. 22: 283-307.
- Hsiao, H. C., Lian, W. C. y Chou, C. C. (2004). Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84:134–139.
- Hughes, D. B. y Hoover, D. G. (1995). Viability and enzymatic activity of *bifidobacteria* in milk. *Journal Dairy Science*. 78: 268–76.
- Irving, D. W. y Becker R. (1985). "Seed structure and composition of potencial new crops". *Food Microstructure*. Pp. 443-53.
- Jackson, L. S. y Lee, K. (1991). Microencapsulation and the food industry. *Food Science Technology*. 24: 289-297.
- Jarowenko, W. (1986). Acetylated starch and miscellaneous organic esters. In: O.B. Wurzburg, ed. *Modified Starches: Properties and Uses*. Boca Raton, FL: CRC Press. Pp. 55–78.
- Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S. y Arvilommi, H. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatric Research*. 32: 141-144.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential application. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 3: 39-49.
- Kailasapathy, K. y Rybka, S. (1997). *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*-their therapeutic potential and survival in yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*. 52: 28-33.
- Kim, C. T., Kyonggi, D., Shin, F. F., Champagne, E. T. y Diagle, K. (1999). Effects of phosphorylating salts and temperature on the preparation of rice starch phosphates by extrusion. *Starch/Stärke*. 51(8-9):260-286.
- Kim, H. R., Muhrbeck, P y Eliasson, A. C. (2003). Changes in rheological properties of hydroxypropylated potato starch pastes during freeze-thaw treatments. III. Effect of cooking conditions and concentration of the starch paste. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 61:109-116.

- Kim, R. E. y Ahn, S. Y. (1996). Gelling properties of acid-modified red bean starch gels. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 39:49–53.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13: 3-13.
- Kshirsagar, A. C. y Singha, R. S. (2008). Preparation of hydroxypropyl corn and amaranth starch hydrolyzate and its evaluation as wall material in microencapsulation. *Food Chemistry*. 108(3):958-964.
- Labuza, T. P., Kaanane, A. y Chen, J. Y. (1985). Effect of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity shift of two dehydrated foods. *Journal of Food Science*. 50:385-391.
- Lai, L. S. y Kokini, J. L. (1991). Physicochemical changes and rheological properties of starch during extrusion. *Biotechnology. Progress*. 7:251-266.
- Landerito, N. A. y Wang, Y. J. (2005). Preparation and properties of starch phosphates using waxy, common, and high-amylose corn starches. II. Reactive extrusion method. *Cereal Chemical*. 82(3): 271-276.
- Laroia, S. y Martin, J. H. (1990). *Bifidobacteria* as possible dietary adjuncts in cultured dairy products: A review. *Cult. Dairy Products Journal*. 25:18-22.
- Laroia, S. y Martin, J. H. (1991). Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cultured Dairy Products Journal*. 26:13–21.
- Lehmann, J. W. (1996). Case history of grain amaranth as an alternative crop. *Cereal Foods World*. 41: 399-403.
- Lian, W. C., Hsiao, H. C. y Chou, C. C. (2002). Survival of *bifidobacterium* after spray drying. *International Journal Food Microbiology*. 74:79-86.
- Lieh-C, S., Chin-Wen, L. y Ming-Ju, C. (2007). Development of an Oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. *Society of Dairy Technology*. 60(1):1-10.
- Liu, Q. (2005). Understanding Starches and Their Role in Foods. In “Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications” Chapter 7. Taylor and Francis Group LLC.

- Liu, H., Yu, L., Xie, F. y Chen, L. (2006). Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymers*. 66(3):357–363
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. (2001). Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*. 34:791–796.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M. y Vesikari, T. (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition*. 20:333-339.
- Mäkinen, A. M. y Bigret, M. (1993). Industrial use and production of LAB. In S. Salminen, y A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria* New York, USA: Marcel Dekker. Pp. 65 y 96.
- Manni, D., Santiago, L., Andrich, O. y Grosso C. (2008). 2do Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales. Misiones, Argentina. 16-10.
- Marteau, P. R., De Vrese, M., Cellier, C. J. y Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal Clinical of Nutrition*. 73: 430S-436S.
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., Saarela, M. (2002). Technical challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 12:173-182.
- Mauriello, G., Aponte, M., Andolfi, R., Moschetti, G. y Villani, F. (1999). Spray-drying of bacteriocin producing lactic acid bacteria. *Journal Food Protection*. 62: 773-777.
- McIntosh, G. H. (1996). Probiotics and colon cancer prevention. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*. 5:48–52.
- Merk, K., Borelli, C. y Korting, H. C. (2005). *Lactobacilli*-bacteria–host interactions with special regard to the urogenital tract. *International Journal of Medical Microbiology*. 295: 9–18.
- Mishra, C. y Lambert, J. (1996). Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*. 5:20–4.
- Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Reinheimer, J. A., Emamdjomeh, Z., Sohrabvandi, S. y Rezai, K. (2006). Preliminary

- investigation of the combined effect of heat treatment incubation temperature on the viability of the probiotics microorganisms in freshly made yoghurt. *International Journal Dairy Technology*. 59:8-11.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R. y Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Mua, J. P. y Jackson, D. S. (1997). Fine structure of corn amylase and amylopectin fractions with various molecular weights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:3840-3847.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I. y Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 91:380-386.
- Myers, D. J. y Fox, S. R. (1994). Alkali wet-milling characteristics of pearled and unpearled amaranth seed. *Cereal Chemistry*. 71:96-99.
- Narváez, E. D., Figueroa, J. D., Taba, S. y Rincón, F. (2006). Kernel microstructure of Latin American races of maize and their thermal and rheological properties. *Cereal Chemistry*. 83(6): 605-610.
- Narváez, E. D., Figueroa, J. D., Taba, S., Castaño, E. y Martínez, R. A. (2007). Efecto del tamaño del gránulo de almidón de maíz en sus propiedades térmicas y de pastificado. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30(3):269-277.
- Nieto, A. (1999). Prevención primaria de la alergia alimentaria –probióticos– tolerancia oral. *Anales Españoles de Pediatría*. 126: 31-34.
- O'Brien, S. J., Wang, Y. J., Vervaet, C. y Remon, J. P. (2009). Starch phosphates prepared by reactive extrusion as a sustained release agent. *Carbohydrate Polymers*. 76:557–566.
- O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K. y Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 1059-1066.

- Ortega-Ojeda, F. E., Larsson, H. y Eliasson, A. C. (2005). Gel formation in mixtures of hydrophobically modified potato and high amylopectin potato starch. *Carbohydrate Polymers*. 59:313-327.
- Ouwehand, A. C. y Salminen, S. J. (1998). The Health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*. 8:749-758.
- Ozbas, Z. Y. y Aytac, S. A. (1995). Behaviour of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in yogurt made with probiotic bacteria *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*. 50:626–9.
- Paredes-López, O., Schevenin, M. L., Hernández-López, D. y Cárabez-Trejo A. (1989). Amaranth starch-isolation and partial characterization. *Starch/Stärke* 41:205-207.
- Paredes-López, O., Bello-Pérez, L. A. y López, M. G. (1994). Amylopectin: structural, gelatinization and retrogradation studies. *Food Chemistry*. 50:411-417.
- Parra, H. R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias agropecuarias*. 8(1):93-105.
- Pedersen, B., Kalinowski, L. S. y Egum, B.O. (1987). The nutritive value of grain (*Amarantus caudatus*): 1. Protein and mineral of raw and processed grain. *Plant Foods for Human Nutrition*. 36:309-324.
- Penna, A. L. B., Rao-Gurram, S. y Barbosa-Canovas, G. V. (2007). Effect of milk treatment on acidification, physicochemical characteristics, and probiotic cell counts in low fat yogurt. *Milchwissenschaft*. 62:48–52.
- Peñaranda, C. O. I., Perilla, P. J. E. y Algecira, E. N. A. (2008). A review of using organic acids to chemically modify starch. *Revista ingeniería e investigación*. 28:47-52.
- Pereira, D. I. A., McCartney, A. L. y Gibson, G. R. (2003). An «in vitro» study of the probiotic potencial of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain and determination of its cholesterol lowering properties. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 4.743-4.752.

- Pérez, E., Bahnassey, Y. A. y Breene, W. M. (1993) A simple Laboratory Scale Method for isolation of *amaranthus*. *Starch/Stärke*. 45(6):211-214.
- Phillips, D. L., Liu, H., Pan, D. y Corke, H. (1999). General application of Raman spectroscopy for the determination of level of acetylation in modified starches. *Cereal Chemistry*, 76 (3):439–443.
- Qian, J. Y. y Kuhn, M. (1999). Characterization of *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* starch. *Starch/Stärke*. 51(4):116-120.
- Radosavljevic, M., Jane, J. y Johnson, L. A. (1998). Isolation of Amaranth Starch by Diluted Alkaline-Protease Treatment. *Cereal Chemistry*. 75(2): 212–216.
- Rascón, M. P., Beristain, C. I., García, S. H. y Salgado, A. M. (2010). Carotenoid retention and storage stability of spray dried encapsulated paprika oleoresin. *LWT - Food Science and Technology*. 44(2):549-557.
- Riaz, M. N. (2000). *Extruders in food applications*. (Ed). Technomic Publishing Co. Inc. Pp. 127-131.
- Risch, S. J. (1995). Encapsulation: Overview of uses and techniques. En: *Encapsulation and controlled released of food ingredient*. Risch, S.J., Reineccius, G.A., Eds. ACS Sym Ser 590. Washington, D.C. American Chemical Society. Pp. 2-7,
- Robinson, R. K. (1987). Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products-afrikanse. *Suid A Frikaanse Tydskrif Vir Suiwelkunde*. 19:25-27.
- Robinson, R. K. y Tamime, A. Y. (1990). Microbiology of fermented milks. In: Robinson RK (Ed.). *Dairy Microbiology*. London: Elsevier Science Publishers Ltd. Pp. 247–80.
- Rodríguez, E., Gamboa, M. M., Hernández, F y García, J. D. (2006). *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. 1ª ed. EUCR, Costa Rica: 63-67.
- Rodríguez-Hueso, M. E., Duran-Lugo, R., Prado-Barragan, L., A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J. y Vernon-Carter, E. J., (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotics. *Food Research International*. 40:1299-1306.

- Rosenberg, M. Y Young, S. L. (1993). Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat – structure evaluation. *Food Structure*. 12:31-41.
- Rohwer, R. G. y Klem, R. E. (1984). Acid-modified starch: Production and uses. In J. N. BeMiller, y E. F. Paschall (Eds.), *Starch: Chemistry and technology* Orlando, FL: Academic Press. Pp. 529–541.
- Rutenberg, M. W. y Solarek, D. (1984). Starch derivatives: Production and uses. In: R. Whistler, J.N. BeMiller and E.F. Paschall, eds. *Starch: Chemistry and Technology*. New York: Academic Press, Inc. Pp. 314–388.
- Salijata, M. G., Singhal, S. R. y Kulkarni, R. P. (2006). Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 5:1-17
- Sanders, M. y In't Veld. H. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 293–315.
- Sanz, Y., Collado, M.C., Haros, M. y Dalmau, J. (2004). Funciones metabólicas nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediátrica Española*. 62:520-526.
- Saunders, R. M. y Becker R. (1984). “*Amaranthus*: A potential food and feed resource”, in *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. 6. “Ed. Y. Pomeranz. American Association of cereal Chemists. St. Paul, MN. Pp. 357-396.
- Schrezenmeir, J. y De Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 77:361–364.
- Shah, N. P (2000). Probiotics bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 83: 894-907.
- Shah, N. P. (2003). Yogurth: the product and its manufacture. In: Trugo, L., Finglas, P., Caballero, B. (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, second ed. Academic Press, London, UK. Pp. 6252–6260.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17:1262–1277.

- Shah, N. P. y Rarula, R. R. (2000). Microencapsulations of probiotics bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*. 55:139-144.
- Sheu, T. Y. y Marshall, R. T. (1993). Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gel. *Journal Food Science*. 54:557-561.
- Shi, Y. C. y Seib, P. A. (1992). The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. *Carbohydrate Research*. 227:131–145.
- Shogren, R. L., Viswanathan, A., Felker, F. y Gross, R. A. (2000). Distribution of octenyl succinate groups in octenyl succinic anhydride modified waxy maize starch. *Starch/Stärke*. 52:196-204.
- Singh, J., Kaur, L. y McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physicochemical morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications – A review. *Food hydrocolloids*. 21:1- 22.
- Singhal, R. S. y Kulkarni, P. R. (1990). Utilization of *Amaranthus paniculatus* (*Rajgeera*) starch in salad dressing. *Starch/ Stärke*. 42:52-53.
- Sitohy, M. Z., El-Saadany, S. S., Labib, S. M. y Ramadan, M. F. (2000). Physicochemical Properties of Different Types of Starch Phosphate Monoesters. *Starch/Stärke*. 52(4):101-105.
- Smith, R. J. y Caruso, J. L. (1964). Determination of phosphorus and ash. In: Whistler, R.L. (Ed.), *Methods in Carbohydrate Chemistry* Springer, Berlin. Pp. 311.
- Sodhi-Sodhi. N. y Singh, N. (2005). Characteristics of acetylated starches prepared using starches separated from different rice cultivars. *Journal of Food Engineering*. 70:117–127.
- Song, X., Guoqing, H., Hui, R. y Qihe, C. (2006). Preparation and Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Early *Indica* Rice Starch. *Starch/Stärke* 58:109–117.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Sinderen, D. V. (2005). Fermented functional foods base don probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion of Biotechnology*. 16:198-203.

- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P y Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Microbiology*. 62:47–55.
- Sung, J. H., Park, D. P., Park, B. J., Choi, H. J. y Jhon, M. S. (2005). Phosphorylation of potato starch and Its electrorheological suspension. *Biomacromolecules*. 6:2182-2188.
- Sutas, Y., Hume, M. y Isolauri, E. (1996) Down-regulation of anti-CD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolized with *Lactobacillus GG* derived enzymes. *Scandinavian Journal of Immunology*. 43: 697-689.
- Takeda, Y., y Priess, J. (1993). Structures of B90 (sugary) and W64A (normal) maize starches. *Carbohydrate Research*. 24:265–275.
- Tapia, B. D., Mauri, A. N., Menegalli, F. C., Sobral, P. J. A. y Añón, M. C. (2007). Contribution of the starch, protein, and lipid fractions to the physical, thermal, and structural properties of amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. *Journal of Food Science*. 72 (5): E293-E300.
- Teixeira, P., Castro, H. Mohacsi-Farkas, C. y Kirby, R. (1997). Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaris* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology*. 83:219-226.
- Tesch, S., Gerhards, Ch. y Schubert, H. (2002). Stabilization of emulsions by OSA starches. *Journal Food Engineering*. 54:167-174.
- Tester, R. F., Karkalas, J. y Qi, X. (2004). Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 29:151-165.
- Tharanathan, R. N. (2005). Starch – Value Addition by Modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45:371-384.
- Thirathumthavorn D. y Choroenrein, S. (2006). Thermal and pasting properties of native and acid-treated starches derivatized by 1-octenyl succinic anhydride. *Carbohydrate polymers* 66:258-265.
- Thomas, D. J. y Atwell, W. A. (1999). Special Topics: Encapsulating Agents. Capítulo 9, and Starch Modification. Capítulo 4, In: *Starch*. American Association of Cereal Chemists. Pp. 31-39 y 84-85.

- Tojo, M., Oikawa, T., Morokawa, Y., Yamashita, N., Iwata, S., Satoh, Y., Hanada, J. y Tanaka, R. (1987). The effects of *Bifidobacterium breve* administration on *Campylobacter enteritis*. *Acta Pediatric Japon.* 29: 160–7.
- Tomasik, P., Wang, Y. J. y Jane, J. L., (1995). Facile route to anionic starches. Succinylation, maleination and phthalation of corn starch on extrusion. *Starch/ Stärke.* 47: 96–99.
- Uriyapongson, Y. y Rayas-Duarte, P (1994). Comparison of yield and properties of amaranth starches using wet and dry-wet milling processes. *Cereal Chemistry.* 71:571-577.
- Vasanthan, T., Sosulski, F. W. y Hoover, R. (1995). The reactivity of native and autoclaved starches from different origins towards acetylation and cationization. *Starch.* 4:135-143.
- Vinderola, C. G. y Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International.* 36:895–904.
- Wang, Y. J., Truong, V.D. y Wang, L. (2003). Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers.* 52:327-333.
- Weinbreck, F., Bodnár, I. y Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products?. *International Journal Food Microbiology.* 136:364-367.
- Whistler, R. L. y Paschall, E. F (1967). *Starch chemistry and technology* New York, London: Academic Press. Pp. 369-389.
- Williams, P. C., Kuzina, F. D. y Hlynka, L. (1970). A rapid colorimetric procedure for estimating the amylase content of starches and flour. *Cereal Chemistry.* 47:411.
- Wing, R. E. y Willett, J. L., (1997). Water soluble oxidized starches by reactive extrusion. *Industrial Crops and Products.* 7: 45–52.
- Wu, H. X., Yue, S. X., Sun, H. L. y Corke, H. (1995). Physical properties of starch from two genotypes of *Amaranthus cruentus* of agricultural significance in China. *Starch/Stärke,* 47: 295–297.

- Wurzburg, O. B. (1978). Starch, modified starch and dextrin. Products of the corn refining industry: Seminar proceedings. Washington, DC: Corn Refiners Association, Inc. Pp. 23–32.
- Wurzburg, O. B. (1986). Nutritional aspects and safety of modified food starches. *Nutrition Reviews*. 44:74-79.
- Wurzburg OB. 1989. *Modified Starch: Properties and Uses*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Wurzburg, O. B. (1995). Modified starches. In A. M. Stephen (Ed.), *Food Polysaccharides and Their Applications* New York: Marcel Dekker, Inc. Pp. 67-97.
- Yangzhou, J. Q. y Stuttgart, M. K. (1999). Characterization of *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* Starch. *Starch-Stärke*. 51:116-1120.
- Ying, D.Y., Phoon, M. Ch., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I. y Augustin, M. A. (2010). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. *Journal of Food Science*. 75(9):588-595.
- Xie, X, S., Liu Q., Cui W.S. (2005). *Starch modifications and applications*. Taylor and Fracias group, LLC.
- Xie, F., Yu, L., Liu H. y Chen L. (2006). Starch Modification using Extrusion. *Starch/ Stärke*. 58:131-139.
- Young, J. (1998). European market developments in prebiotic and probiotic containing food stuffs. *British Journal of Nutrition*. 80: 231–233.

ANEXO I.



TRABAJO DE ESTANCIA DE DOCTORADO
Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

Título:

Micropartículas producidas por gelificación iónica utilizando alginato de sodio y pectina recubiertas con ovoalbúmina y proteína de suero

1. INTRODUCCIÓN

La microencapsulación es una técnica que permite la protección de los compuestos y se utiliza en diversos campos como la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética. El principal objetivo de la técnica es proteger los materiales encapsulados de las condiciones adversas del medio y ser liberado en su sitio de acción en la cantidad y en el momento adecuado para ejercer una función deseada (Shahidi y Han 1993, Gibbs 1999). Los materiales encapsulados pueden ser de diferente naturaleza incluyendo pesticidas, células vivas, ácidos grasos esenciales y microorganismos probióticos (Chandramouli y col. 2004, De Vos y col. 2006, Patten y col. 2009). Una de las técnicas de microencapsulación donde los biopolímeros tales como pectina y alginato se utilizan es la gelificación iónica.

La gelificación iónica es una técnica simple, donde las micropartículas se producen por goteo de una solución de polímero en una solución catiónica, típicamente con calcio, bajo agitación constante (Reis y col. 2006, Silva y col. 2006). La gelificación iónica está basada en una reacción de un hidrocoloide que se toma a gel en presencia de iones, normalmente cationes divalentes. La interacción de iones, como el calcio Ca^{2+} , con los grupos carboxilos de las cadenas poliméricas de polisacáridos da como resultado la formación de geles insolubles. Por lo tanto, la adición gota a gota de una dispersión de polisacárido conteniendo material para ser encapsulado sobre una solución iónica, lleva a la formación de micropartículas. Las gotas al entrar en contacto con los iones, lleva a la formación de micropartículas en forma instantánea, estructuras de gel conteniendo el material a ser encapsulado disperso por toda la matriz del polisacárido (Smrdel y col. 2008). Durante el encapsulamiento con polisacáridos como alginato y pectina son comúnmente realizados por la dispersión de una solución de alginato-pectina en un medio de gelificación por ejemplo cloruro de calcio. El contacto entre el polisacárido y el ión calcio en una solución induce a una polimerización interfacial iónica inmediata por medio de una ligación de residuos galacturónicos, formando una partícula polianiónica (Dai y col. 2005).

Una de las alternativas para mejorar la estabilidad y minimizar la porosidad de las micropartículas obtenidas por gelificación iónica es mediante el recubrimiento por interacción electrostática entre biopolímeros cargados opuestamente que interactúan entre sí (Allan-Wojtas y col. 1999). Polisacáridos y complejos de proteínas se forman espontáneamente en solución acuosa y se mantienen generalmente estables en un amplio rango de valores de pH, debido a la aparición de la interacción electrostática entre los grupos con cargas opuestas de los polímeros (Tolstoguzov 1991). La adsorción de proteínas sobre micropartículas de hidrogel a través de interacción electrostática es ampliamente estudiada para evaluar la inmovilización de células del páncreas, producción de insulina y su aplicación fisiológica (De Vos y col. 2006).

El proceso de la coacervación compleja involucra por lo menos dos polímeros de cargas distintas en condiciones específicas, en su mayoría de los casos, los biopolímeros incluye una proteína y un polisacárido (Jun-Xia y col. 2011). La coacervación compleja utilizando proteínas globulares, por ejemplo β -lactoglobulina, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, proteína de soya han sido estudiadas a detalle (Schmitt y col. 2000, Weinbreck y col. 2004). Los complejos proteína-polisacárido pueden ser utilizados para encapsular materiales líquidos y sólidos. Las interacciones electroestáticas entre dos biopolímeros pueden ser afectadas por diversos parámetros físico-químicos, tales como pH, fuerza iónica, temperatura que afectan a la formación del complejo (Weinbreck y col. 2004). El pH ejerce una gran influencia en la fuerza de interacción electroestática una vez determinada la densidad de carga en solución, estas interacciones pueden llevar a la formación de complejos insolubles, principalmente cuando el pH se encuentra por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, estando cargada negativamente (Dubin y col. 1994, De Vries y col. 2003). Cuando el pH se encuentra por debajo de punto isoeléctrico de la proteína está cargada positivamente, facilitando la interacción con cargas negativas del polisacárido (Prata 2006).

El alginato es un polisacárido obtenido principalmente a partir de algas marrones. Químicamente (Figura 1) es un co-polímero, posee estructura lineal de alta masa molar con

secciones rígidas y flexibles, formados por dos tipos de ácidos urónicos, la unidad de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), homopoliméricos y por bloques donde ambos residuos ocurren alternadamente (Cottrell y Kovacs 1980).

La composición de la cadena de alginato resumida en el valor de la relación de la fracción molar de residuos de D-manurónico a L-gulurónico (ratio M/G) es determinante en las propiedades fisicoquímicas y funcionales del alginato (Smidsrod y Skjak-Break 1990). Conclusiones recientes muestran que no solo las unidades G, también las unidades secuenciales M y G (MG-bloques) forman entrecruzamiento con calcio (Donati y col. 2005). El alginato es un polielectrolito con carga negativa encima del pH correspondiente a su pKa (3.38 – 3.65), y en valores menores la disociación de los grupos carboxilos es suprimido (Simsek-Ege y col. 2003).

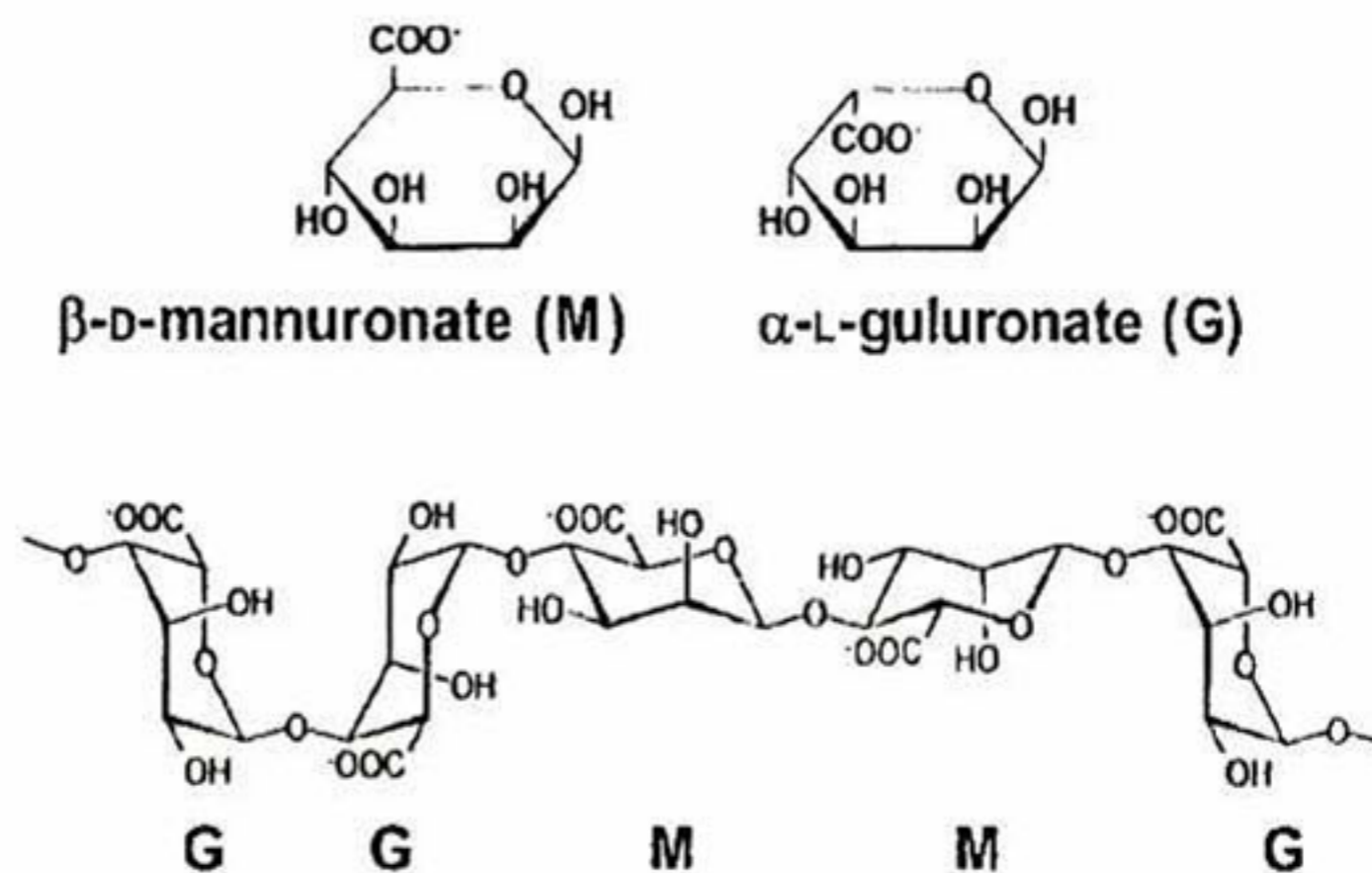


Figura 1. Composición de la cadena de alginato.

Hidrogeles de alginato son comúnmente formados por la adición de iones multivalentes, el calcio es ampliamente utilizado en la industria de alimentos debido a su característica hidrofílica y sus propiedades gelificantes y espesantes. Además del gel iónico, también pueden formar "geles ácidos" cuando el pH de la solución está abajo del pKa de los grupos urónicos. Geles iónicos son más firmes

que los geles ácidos, ya que los geles ácidos tienden a ser más débiles y más elásticos. Fue asumido que las unidades G son las únicas moléculas del alginato que forman entrecruzamiento con iones divalentes y por lo tanto, es la principal característica estructural determinante que contribuye a la formación de gel (Draget y col. 1994, Norton y col. 2006). Ha sido demostrado que el alginato representa un ambiente químicamente inerte en las micropartículas que permite cargar una amplia banda de compuestos bioactivos, células y fármacos (Griffith 2000). En general, alginatos con alto contenido de unidades G muestran que forman geles estables con alta permeabilidad cuando comparado con alginatos con alto contenido de unidades M (Martinsen y col. 1989).

Las pectinas (Figura 2) se constituyen por medio de a) enlaces glucosídicos alfa- (1-4), b) estos ácidos urónicos tienen grupos carboxyl, c) algunos de los cuales están presentes naturalmente como ésteres de metilo y d) otros que son comercialmente tratados con amoníaco para producir grupos carboxiamida (pectinas amidadas).

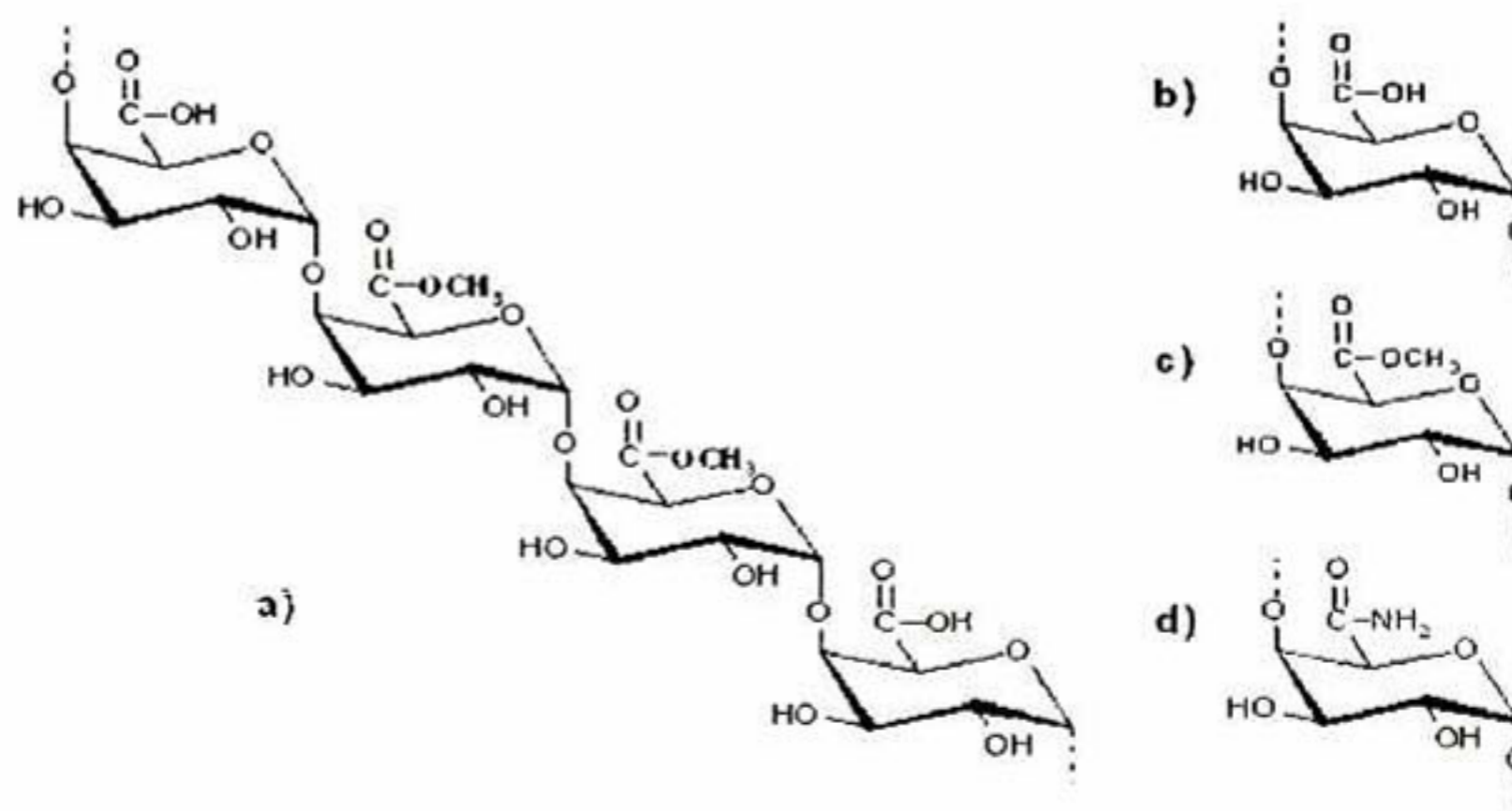


Figura 2. Composición de la cadena de molécula de pectina.

Las pectinas de bajo contenido de esterificación amidadas o no, son polisacáridos utilizadas industrialmente, en el sector de alimentos por su capacidad de formar gel en presencia de iones Ca^{2+} en un amplio rango de pH. Calcio bivalente Ca^{2+} se combina con los grupos carboxílicos de la pectina encajándose en las estructuras de ácido galacturónico formando una estructura tridimensional denominada "egg-box" (Figura 3) (Thahur y col. 1997, Ngouémazong y col. 2011).

La ovoalbúmina es una proteína altamente funcional que frecuentemente es usada como alimento matriz. Químicamente es una fosfoglicoproteína monomérica que consiste en 385 residuos de aminoácidos, con cada molécula posee una unión disulfuro y 4 grupos sulfidrilos libres. Tiene un peso molecular de 47.00 kDa y punto isoeléctrico de 4.8 (Oakenfull y col. 1997). Exhibe varias funcionalidades interesantes, su capacidad de formar redes de gel y de estabilizador de emulsiones y espumas.

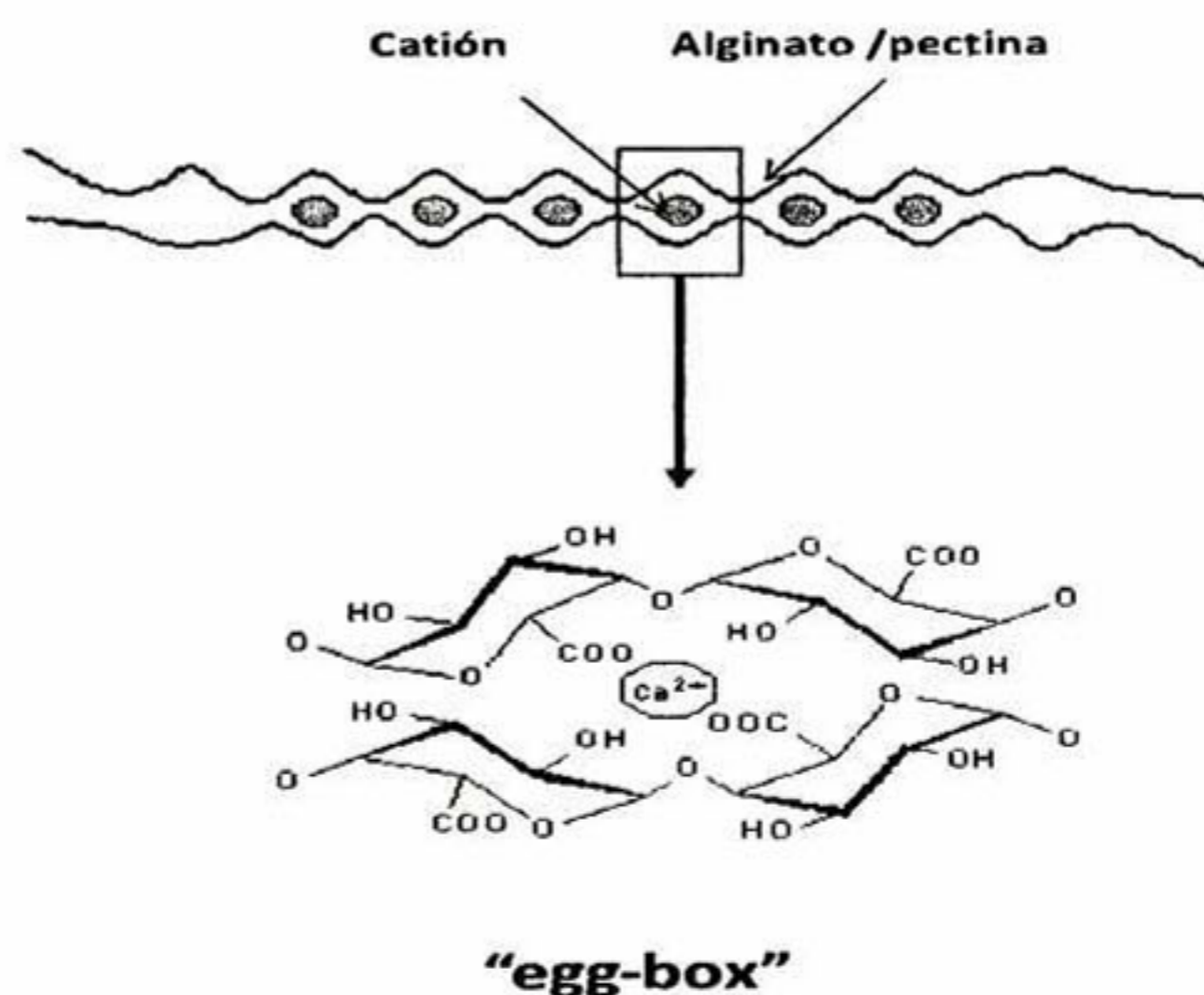


Figura 3. Estructura tridimensional denominada "egg-box"

2.1 Producción de micropartículas mediante gelificación iónica

Para la preparación de la emulsión, se utilizó una solución acuosa de alginato o pectina (2% p/p solución), pH 4 y la adición de aceite de soya (1.65 g de solución/100). La emulsión se homogenizó en un homogenizador marca Turrax a 14000 rpm / 3 min (IKA Works de Río de Janeiro Brasil.). La emulsión se pulverizó en una solución de cloruro de calcio, 2% (p/v), pH 4, en agitación constante durante la atomización. Se utilizó un atomizador de fluido doble de 1 mm de diámetro, altura 12 cm entre el atomizador y la solución de cloruro de calcio, la presión de aire de 0.125 kgF / cm² y la velocidad de atomización de 555 mL / h, y la emulsión fue atomizada con la ayuda de una bomba peristáltica. Después de la atomización, las micropartículas se mantuvieron en solución de cloruro de calcio durante 30 min para el tiempo de endurecimiento. Las micropartículas se separaron y se lavaron a través de un tamiz (diámetro de 125 µm) con agua desionizada ajustada a pH 4.

2.2 Recubrimiento con proteínas por interacción electroestática (coacervación compleja)

Las micropartículas obtenidas por las soluciones de gelificación iónica se transfirieron entonces a concentrado de proteína de suero de leche y/o ovoalbúmina a diferentes concentraciones: 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16% (p/p) de producto, también con pH ajustado a 4, donde se mantuvieron durante 30 min en agitación constante. Después de este tiempo, las micropartículas se separaron y se llevó a pH 4 con agua desionizada para eliminar la proteína no adsorbida sobre la superficie de las micropartículas. Tres producciones se hicieron independientes de cada micropartícula y el contenido de humedad y proteína adsorbida se determinó por triplicado. Uno de micropartículas húmedas se congeló y se liofilizó (Mod. 501 Pirani Edwards, Reino Unido); temperatura inicial: -40°C, presión: 0,1 mmHg, temperatura final: 25°C Tiempo / 2 h de ciclo total: 48 h y se almacena en el refrigerador.

2.3 Caracterización de las micropartículas

2.3.1 Contenido materia seca y adsorción de proteína

Las micropartículas producidas para la evaluación de la adsorción de proteína se caracterizaron con respecto a la proteína (factor, 6.38 y 6.68 para CPS y ovoalbúmina respectivamente) y la humedad (AOAC 2006), (materia seca = 100% %humedad). El contenido de nitrógeno presente en micropartículas de pectina sin cobertura se determinó para corregir el cálculo de la proteína total adsorbida en micropartículas.

2.3.2 Microscopia óptica y electrónica de barrido

La observación de la morfología de las micropartículas recubiertas con proteínas fue observada por un microscopio óptico JENAVAL, utilizando objetivos de 12.5 x 1.25 x. La colección de imágenes se realizó usando el software EDN-2 imagen de microscopía de procesamiento del sistema. Las micropartículas liofilizadas se observaron en un microscopio electrónico de barrido. Las muestras fueron fijadas en una cinta de metal con cobre de doble cara y recubierta con una capa delgada de oro (180 s y la corriente de 40 mA) mediante un evaporador Baltzer (Baltec SCD50, Austria). Se utilizó un microscopio electrónico de barrido modelo JMS - T330 Joel, con voltaje de aceleración de 15 y 20 kV.

2.3.3 Microscopia confocal

La microscopía confocal se realizó en base a lo reportado por (Lamprecht y col. 2000), con algunas modificaciones. Las micropartículas fueron producidas usando materiales coloreados previamente. Una solución de ovoalbúmina se tiñó con 2 colorantes diferentes: isotiocianato de fluoresceína (FIT C) y rodamina B isotiocianato (RBITC), la solución de PSL se tiñó con isotiocianato de fluoresceína (FIT C) y aceite de soya se tiñeron con Rojo Nilo (Sigma Aldrich). La morfología de las micropartículas producidas como biopolímeros húmedos asociados con el aceite y el tinte se observó en el modelo de microscopio confocal Zeiss LSM780 - NLO (Carl Zeiss, Alemania), objetivo Plan de CE - Neofluar 40x/1.3 aceite DIC. Las imágenes se realizaron usando láser con longitud de onda de 488 y 543 nm

para la excitación del colorante rodamina FIT C, respectivamente, y 528 nm para Rojo Nilo imágenes fueron adquiridas a la mitad de la altura de las micropartículas.

2.3.4 Tamaño medio

La determinación del tamaño medio (d 0.5) de las micropartículas recién procesadas y rehidratadas después de la liofilización se midió en el equipo Mastersizer 2000 (Malvern, Alemania), Hydro unidad de muestreo 2000S (Malvern, Alemania), utilizando agua como medio de suspensión añadida y la cantidad de muestra suficiente para producir oscurecimiento 3-20% de acuerdo con lo sugerido por el fabricante. Las micropartículas liofilizadas fueron evaluados con respecto a su capacidad de adsorción de retención de agua y midiendo el tamaño promedio de 3 valores de pH diferentes: 2, 4 y 7. Aproximadamente 0.5 g de micropartículas recubiertas con proteínas se rehidrataron en 12 mL de agua desionizada con el pH valores ajustados se han mencionado anteriormente. Los tubos se mantuvieron en un agitador rotatorio (modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) durante 2 h. Se determinó el tamaño medio de las micropartículas.

2.3.5 Electroforesis

Se pesaron micropartículas que contenían aproximadamente 0.4% de contenido de proteína y se añadió a un tubo que contenía una solución de citrato sódico al 3%, las muestras se agitaron durante 10 min hasta la disolución completa. La electroforesis se realizó de acuerdo con lo reportado por Laemmli (1970) y Svasti y Panijpan (1997), llevado a cabo en 10% de gel (SDS-PAGE) a 120 V, con muestras de 0.1 mg de proteína reductor dispersa en tampón (Tris-HCl pH 0.5, 6.8, 5% β -mercaptoetanol, 20% de glicerol, 10% SDS, 0.1% azul de bromofenol) y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min. En los canales de gel se aplicaron 10 de muestra. El análisis se llevó a cabo en un sistema Miniprotean II (Biolaboratories Ltd., cod. 165-2.940) con geles de espesor 0.75 mm. El gel se tiñó en una solución que contenía metanol (40%), ácido acético (10%) y de Coomassie Brilliant Blue-G250 (0.1%), y el exceso de colorante eliminado con la misma solución sin colorante. Las bandas de masas molares observadas se estimó por

comparación con patrones de peso molecular que contienen la fosforilasa b (95 kDa), ovoalbúmina serina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa), lizozima (16.5 kDa) y proteína (6.5 kDa) (normas, BIO RAD).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los contenidos de proteína en el concentrado de proteína de suero de leche (PSL) y ovoalbúmina fueron de $73.74 \pm 0.92\%$ y $85.86 \pm 0.78\%$ en base seca, presentando contenidos de humedad de $6 \pm 0.35\%$ e $2.28 \pm 46\%$ respectivamente. Los valores determinados para el concentrado proteico de suero de leche se encuentran dentro de los valores para concentrados que varían de 25% a 80% de proteína (FAO 2009, Baldasso y col. 2011).

3.1 Caracterización de las micropartículas

3.1.1 Determinación de la materia seca de las micropartículas

En la Figura 4 se muestran los gráficos para el contenido de materia seca de micropartículas producidas con el sistema alginato revestidas con las diferentes mezclas de proteínas (ovoalbúmina (100%), ovoalbúmina (75%) y PSL (25%), ovoalbúmina (50%) y PSL (50%), ovoalbúmina (25%) e PSL (75%) y PSL (100%)). En general se observa un incremento de la materia seca en todas las combinaciones de proteína antes mencionadas y un incremento conforme incrementó la concentración de la mezcla de proteína con la cual se realizó la coacervación compleja. Para concentraciones de 1% (menor concentración de la solución) en todas las mezclas utilizadas se obtuvieron contenidos de materia seca en un rango de 3.36% a 5.12%, dichas micropartículas presentaron altas humedades. En el caso de las soluciones del 12% (mayor concentración de la solución) se obtuvieron contenidos de materia seca entre 11.98% a 15.30%. En la Figura 5 se muestran los gráficos para el contenido de materia seca de micropartículas producidas con el sistema pectina revestidas con las diferentes mezclas de proteínas (ovoalbúmina (100%), ovoalbúmina (75%) y PSL (25%),

ovoalbúmina (50%) y PSL (50%), ovoalbúmina (25%) e PSL (75%) y PSL (100%). Al igual que con el sistema alginato se observa un incremento en el contenido de materia seca de acuerdo al incremento de la concentración de la solución de proteína.

En concentraciones de 1% en las diferentes mezclas se obtuvieron contenidos de materia seca de entre 3.36% a 5.12% resultado similar a los obtenidos con el sistema alginato; Sin embargo, para concentraciones mayores el contenido de materia seca incrementó en comparación con el primer sistema utilizado (alginato). Se obtuvieron para concentraciones de 12% de proteína en solución contenidos de materia seca en un rango de 15.53% a 21.31%, pudiera indicar que se obtuvo mayor adsorción de proteína comparado con el sistema alginato.

3.1.2 Adsorción proteica en micropartículas

Inicialmente fueron ensayadas diferentes concentraciones de soluciones (0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16%), cuando fue utilizada la menor concentración la cantidad adsorbida fue no significativa, a concentraciones mayores el tamaño de las micropartículas fue reducido imposibilitando su retención en el tamiz (125 μm), obteniéndose bajo rendimiento de las micropartículas. Con base en los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se realizaron las pruebas para cuantificar el contenido de la proteína adsorbida sobre las micropartículas de gelificación iónica. Fueron producidas micropartículas conforme descrito en el apartado 2.2 con proteínas de suero de leche y ovoalbúmina. Siendo definidos las concentraciones siguientes (1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12%) en solución para ser ensayadas como medio para verificar la capacidad de las micropartículas producidas por gelificación iónica en adsorber moléculas de proteína por interacción electrostática sobre su superficie, a fin de alcanzar elevado valor nutricional.

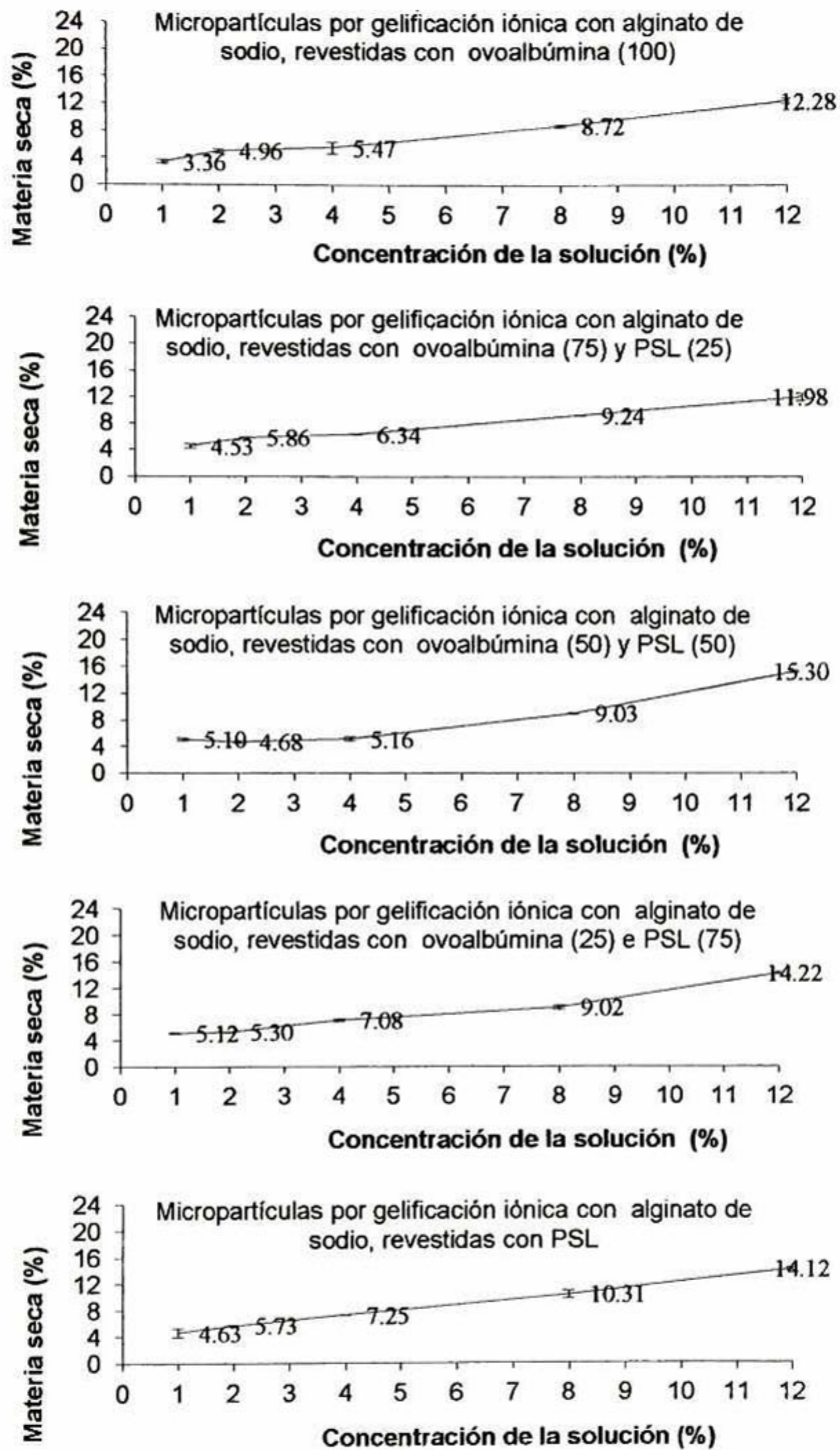


Figura 4. Materia seca de micropartículas producidas con el sistema alginato

Las micropartículas producidas utilizando la combinación de métodos presentaron cantidades crecientes de proteína adsorbida en función de la concentración utilizada, micropartículas revestidas con soluciones de 1% y 2% presentaron menor cantidad de proteína adsorbida en todas las mezclas evaluadas con ambos polisacáridos (pectina y alginato). Para las concentraciones de 6, 8 y 12% todas las micropartículas presentaron adsorción superior al 50%. Las proteínas que fueron evaluadas en este estudio poseen alto valor biológico y nutricional. La ovoalbúmina y concentrado de proteína de suero de leche se comportaron de manera diferente respecto a la solubilidad.

Fue observado material insoluble en la solución conteniendo ovoalbúmina, siendo necesario realizar un filtrado después del ajuste del pH de coacervación (pH 4). La adsorción de proteína sobre la superficie de micropartículas producidas por gelificación iónica utilizando alginato y pectina y posterior adsorción por interacción electrostática a pH 4 se muestra en las Figuras 6 y 7 respectivamente. Las micropartículas presentan elevada cantidad de proteína adsorbida sobre la superficie de micropartículas de gelificación iónica, independiente de la fuente proteica ovoalbúmina o PSL y de las combinaciones de las mismas hubo adsorción sobre la superficie de las micropartículas de gelificación iónica.

El contenido de proteína adsorbida en la superficie de las micropartículas fue alto. Para micropartículas producidas con proteínas de suero de leche la adsorción fue superior cuando comparado con las micropartículas recubiertas con ovoalbúmina. La adsorción de proteína puede variar en cantidad, densidad, conformación y orientación, también es influenciada por las características físico química de la superficie (Roach y col. 2005).

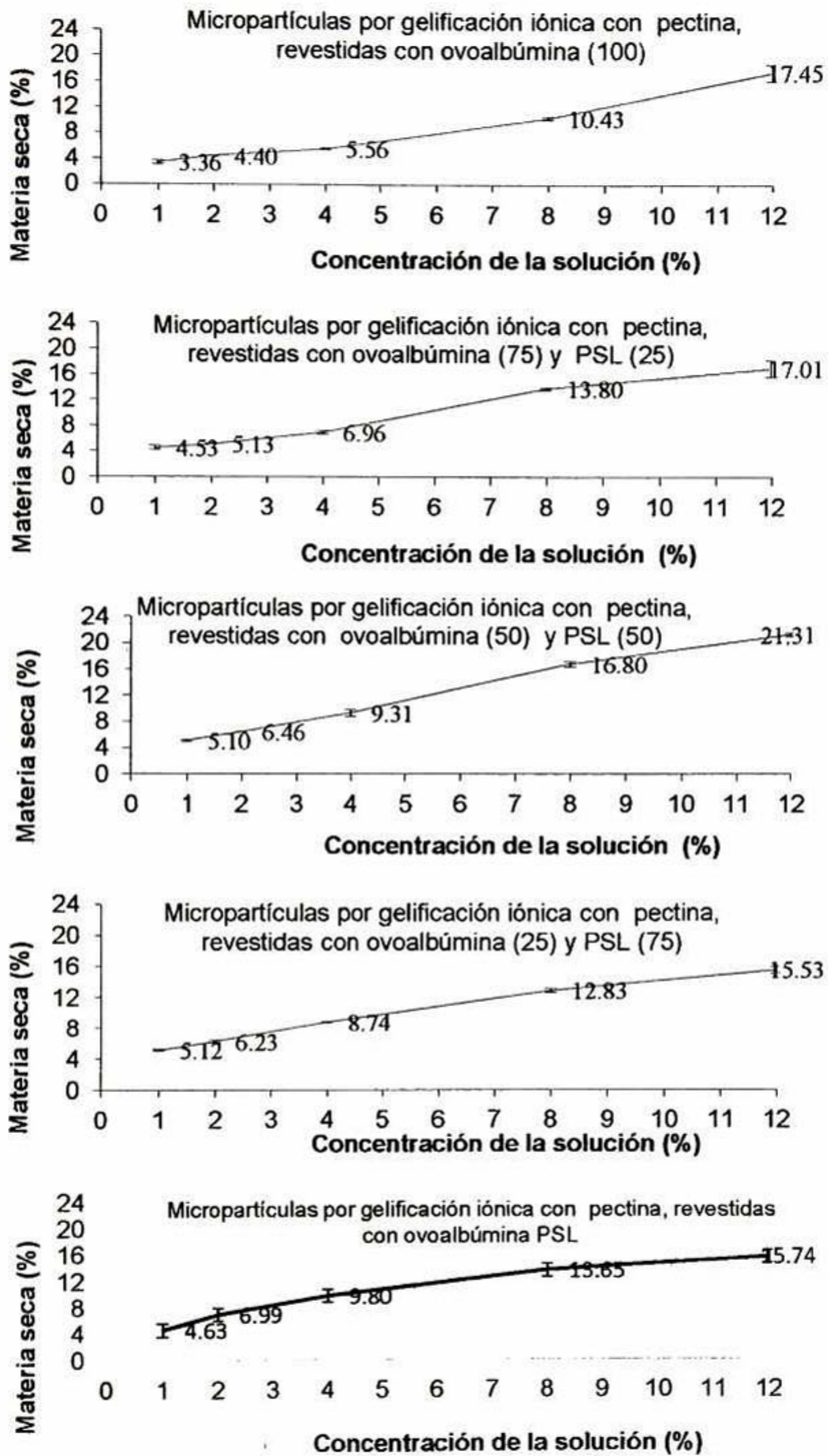


Figura 5. Materia seca de micropartículas producidas con el sistema pectina

En la Figura 6 se observa que con el incremento en la concentración de la solución de proteínas incrementó la adsorción de proteína en la micropartículas de alginato. En los niveles de 1, 2 y 4% de proteínas en solución, las micropartículas con PSL alcanzaron poca adsorción, presentaron los menores valores en comparación con un incremento marcado en concentraciones del 8% y 12% lo cual indica que la cantidad de proteína disponible aún no era suficiente para alcanzar electrostáticamente con todos los grupos carboxílicos disponibles en la superficie de las micropartículas. Se obtuvieron rangos de adsorción máxima entre 51.26% a 54.39%.

Se obtuvo que la máxima adsorción fue obtenida utilizando una mezcla de ovoalbúmina (50%) con PSL (50%) en una concentración de dicha mezcla del 12%. Un estudio realizado con micropartículas de alginato inmersos en diferentes concentraciones de quitosano mostró que el aumento de adsorción quitosano sobre la superficie de la partícula fue mayor en soluciones donde la concentración de quitosano fue también mayor. Sin embargo, en este estudio las concentraciones de quitosano utilizadas fueron muy bajas, debido a la alta viscosidad producida por la disolución de quitosano (Xie y col. 2009). La adsorción de proteínas es un proceso complejo, que ha sido sugerido como resultado de interacciones de uno más proteínas y la superficie de biomateriales incluyendo las interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals (Ambjær-Pedersen y Jørgensen 1991, Braudo y Antonov 1993, Samant y col. 1993).

Una de las alternativas para mejorar la protección e incrementar su estabilidad, es el recubrimiento de micropartículas con proteínas a través de interacciones electrostáticas. Interacciones electrostáticas ocurren entre biopolímeros cargados opuestamente que interactúan entre sí, la carga eléctrica de dos biopolímeros depende de pH de la solución en relación a los valores de pKa o pI de los grupos ionizables (Jones y McClements 2010). La aplicación de una capa externa protectora sobre micropartículas para actuar como barrera protectora además de la barrera física viene siendo estudiada hace algunos años (Roseenberg y Lee 2004, Teoh y col. 2011).

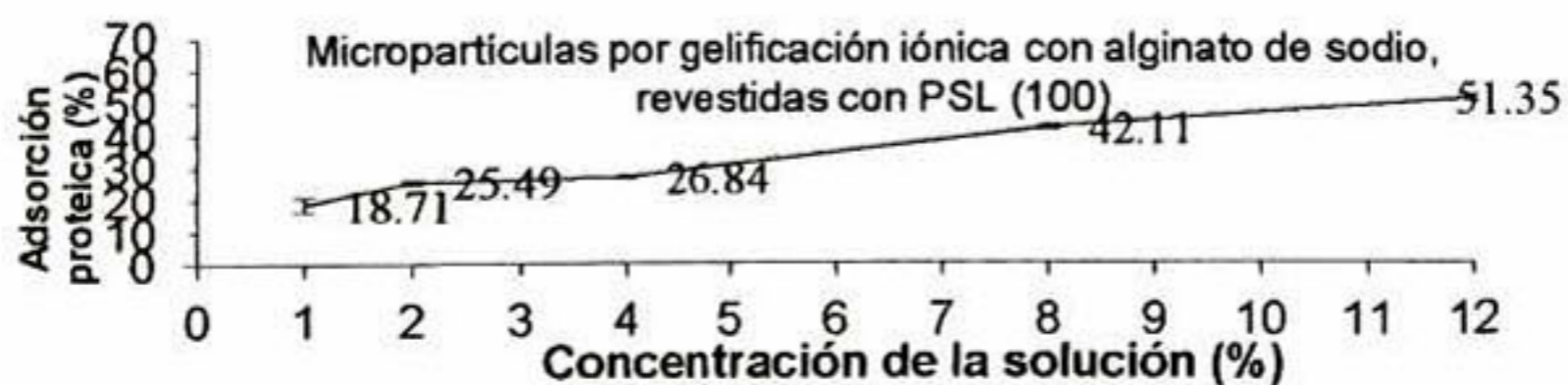
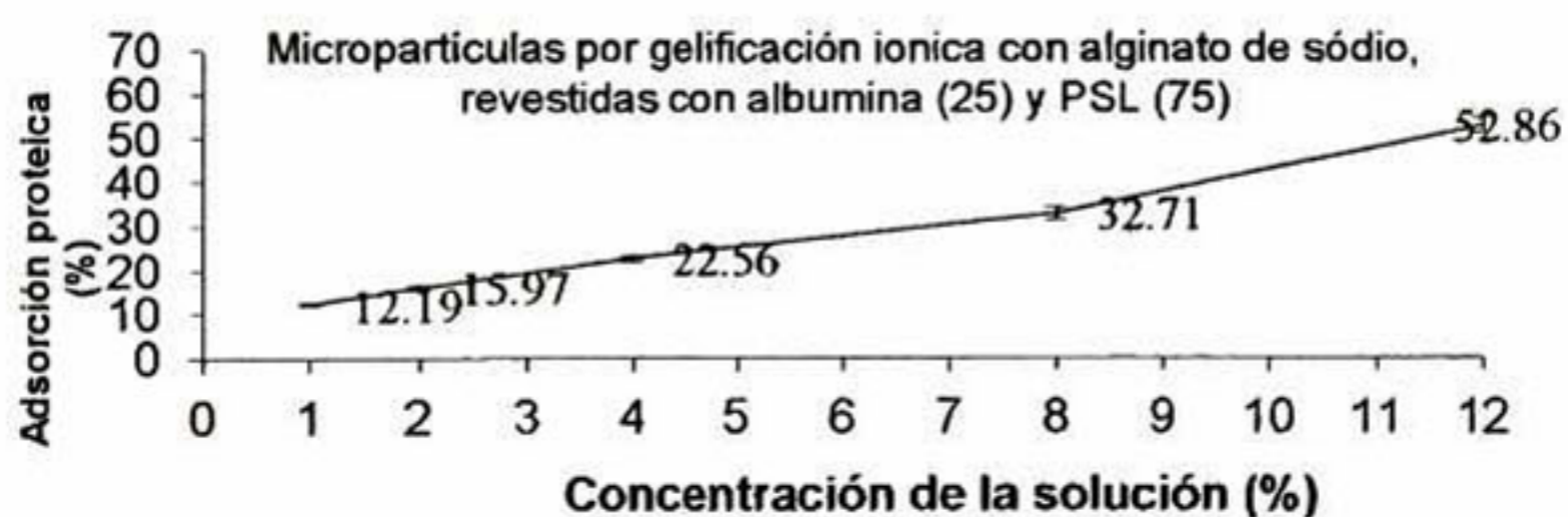
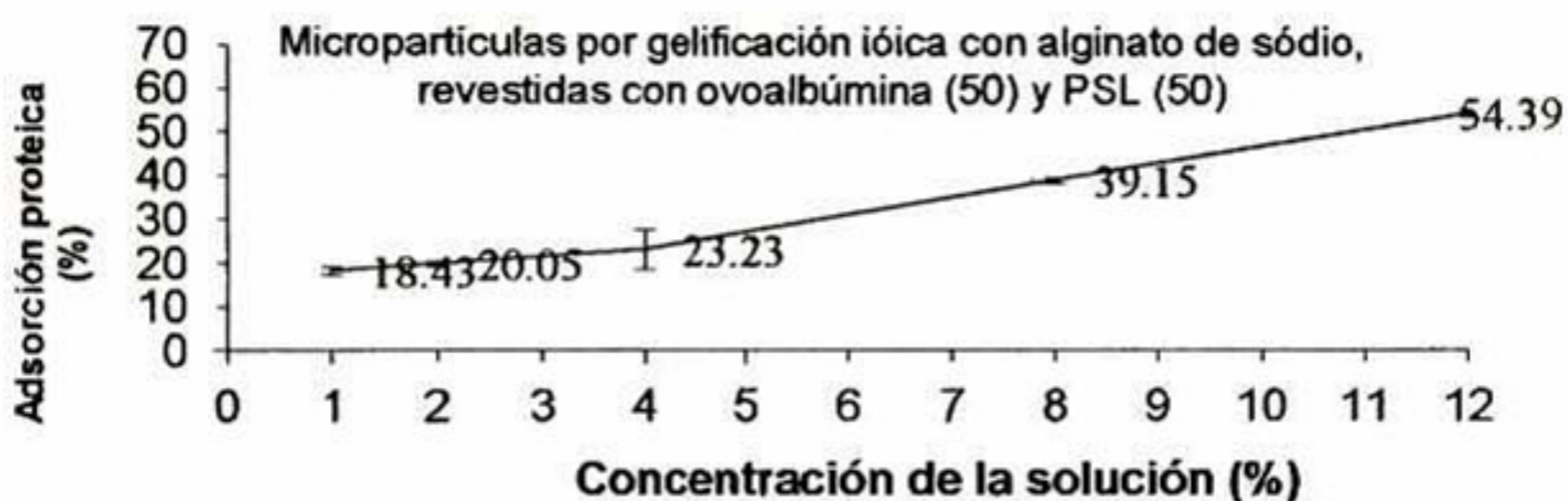
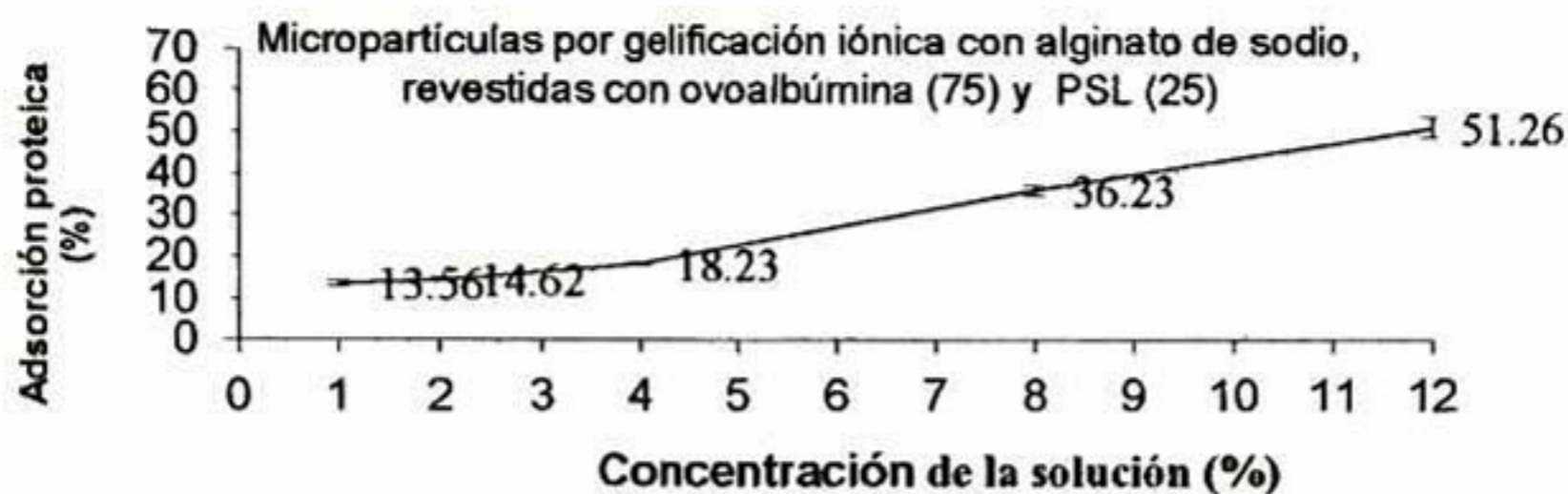
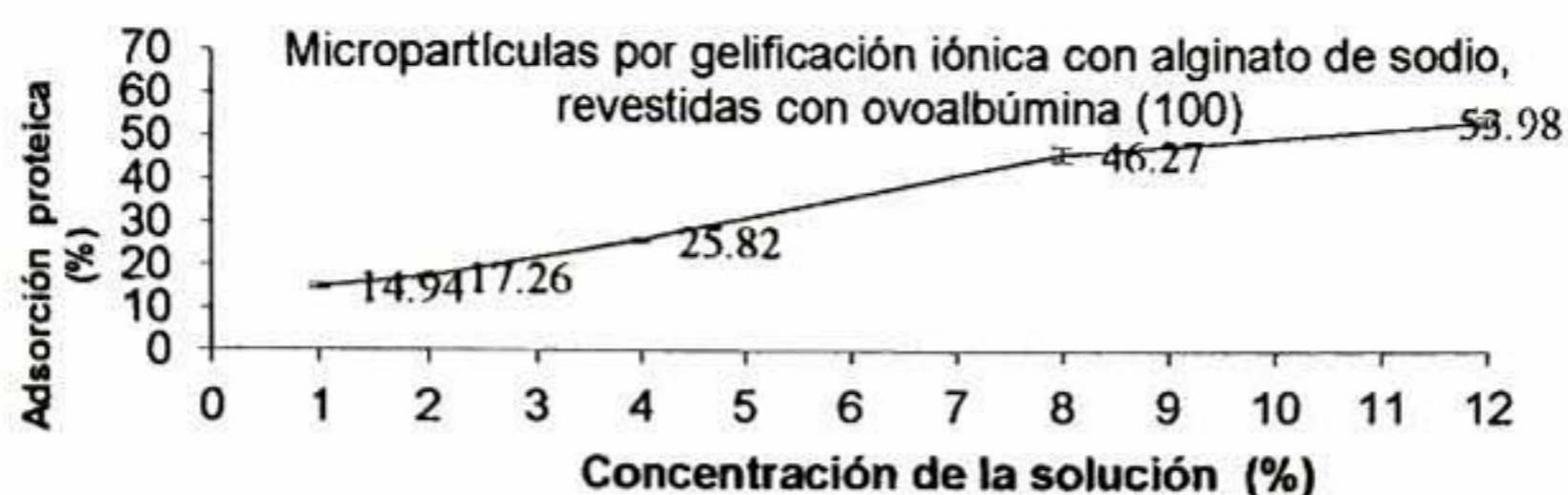


Figura 6. Adsorción proteica de micropartículas producidas con el sistema alginato.

En la Figura 7 se observa que con el incremento en la concentración de la solución de proteínas se incrementó la adsorción de proteína en la micropartículas de alginato. Con el sistema pectina se obtuvieron mayores porcentajes de adsorción de proteína cuando se utilizaron soluciones de proteína al 12% valores entre 58.90% a 65.35%. Comparado con el sistema alginato la adsorción de proteína fue mayor en el sistema de pectina ya que los valores máximos alcanzados con el sistema de alginato corresponden aproximadamente a valores obtenidos con un 8% en el sistema utilizando pectina (~50%). Probablemente esta diferencia se deba a las características de densidad de carga de las micropartículas de pectina después de la obtención por gelificación iónica. Bedie y col. (2008) mencionaron que la interacción entre pectina y β -lactoglobulina es mayoritariamente causada por puentes de hidrógeno entre el grupo carboxil de la pectina y uniones peptídicas de la proteína. La compatibilidad de la β -lactoglobulina en solución acuosa es mayoritariamente influenciada por el pH, fuerza iónica y estructura química de la pectina.

3.1.3 Morfología de las micropartículas

3.1.3.1 Microscopia óptica

Las morfologías de las micropartículas de alginato y la cobertura con diferentes mezclas fueron observadas por microscopia óptica. En la Figura 8 se muestra buena formación de las matrices, con pared definida y continua, alrededor de la macropartícula tanto para las micropartículas obtenidas por gelificación iónica (GI) así como para aquellas que fueron coacervadas en las diferentes soluciones de proteína (ovoalbúmina (100%), ovoalbúmina (75%) y PSL (25%), ovoalbúmina (50%) y PSL (50%), ovoalbúmina (25%) e PSL (75%) y PSL (100%)). Las micropartículas presentaron bordes multinucleados de aceite de soya en el interior de esta, resultado del material activo que se fue encapsulando.

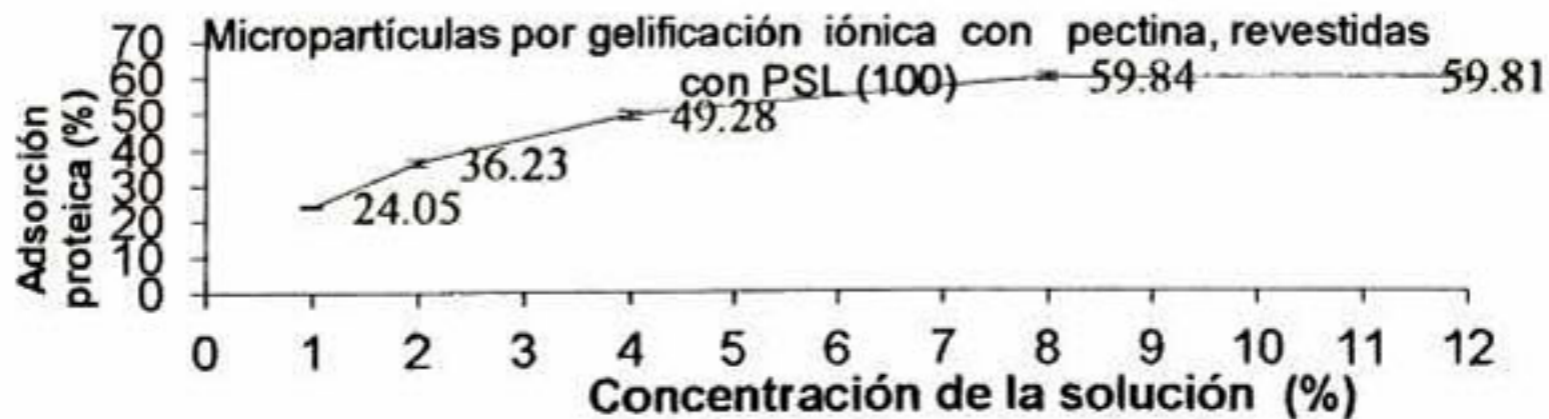
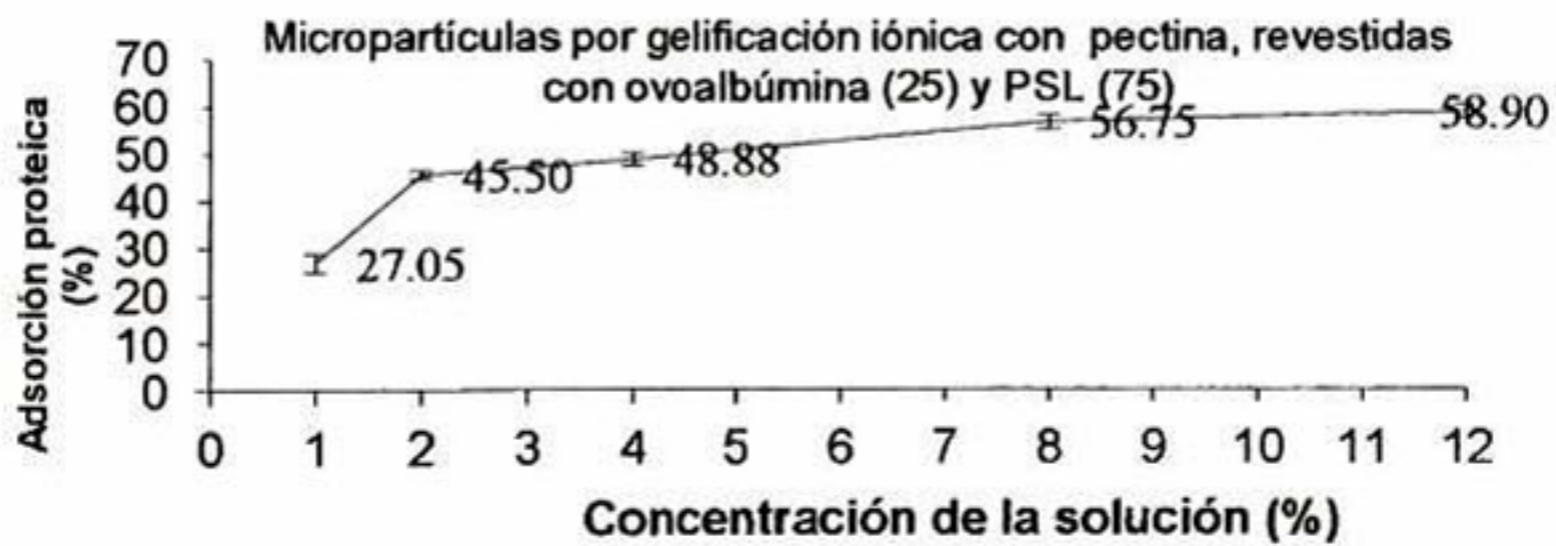
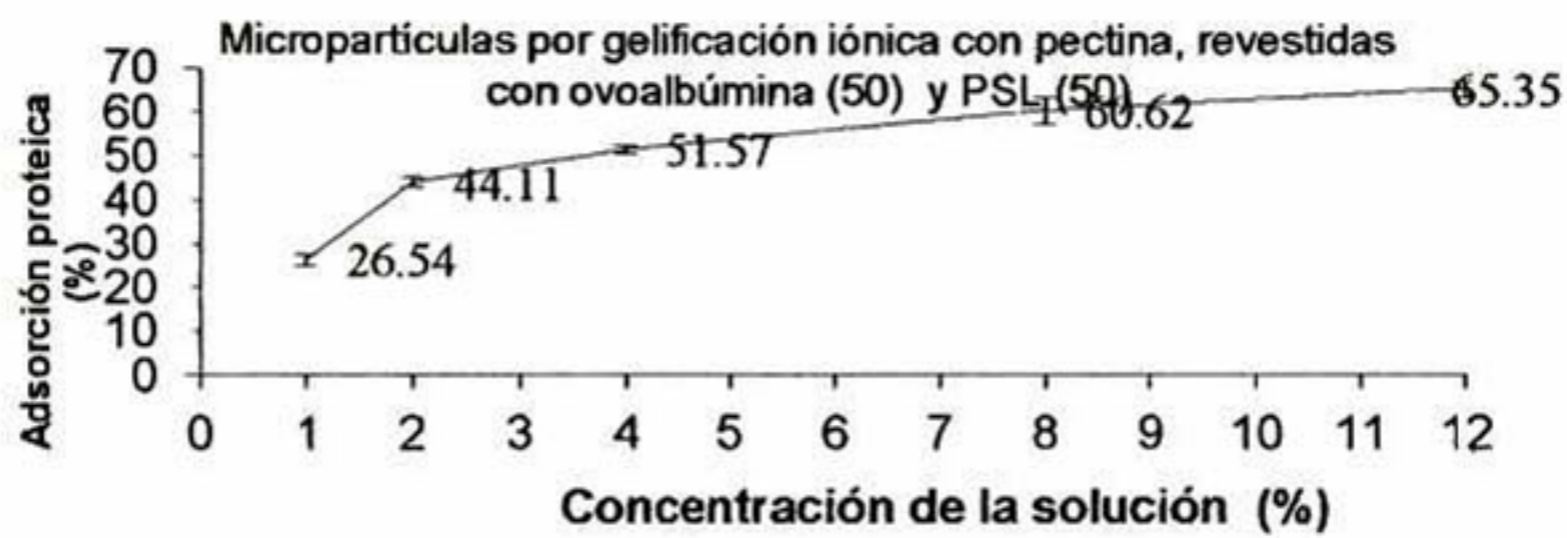
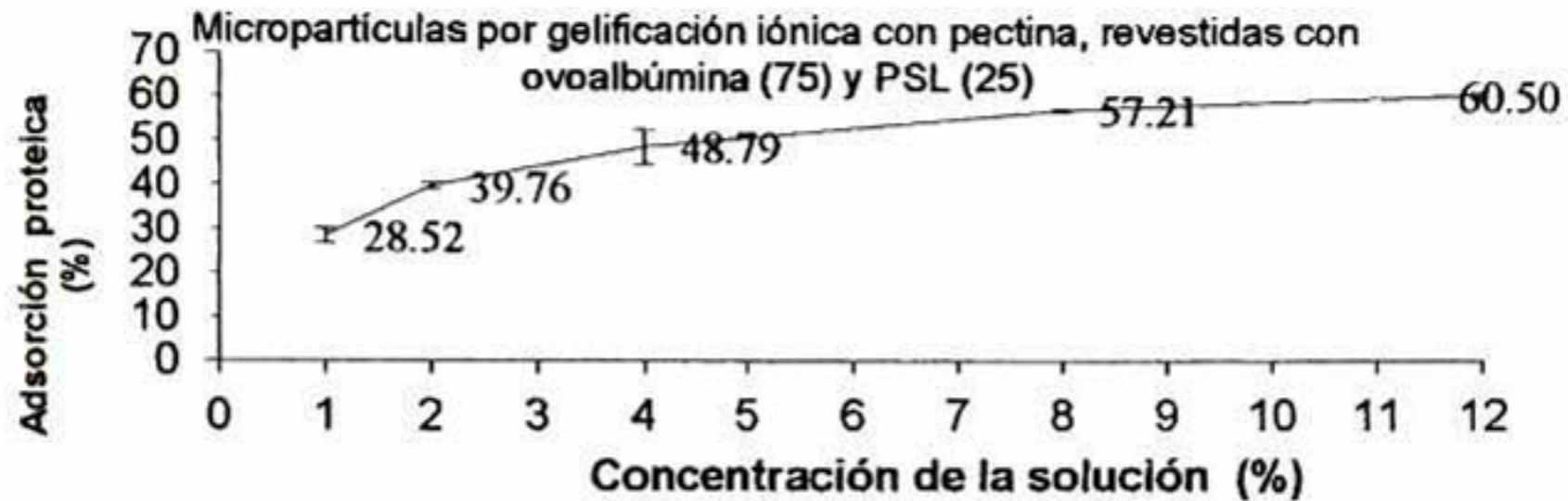
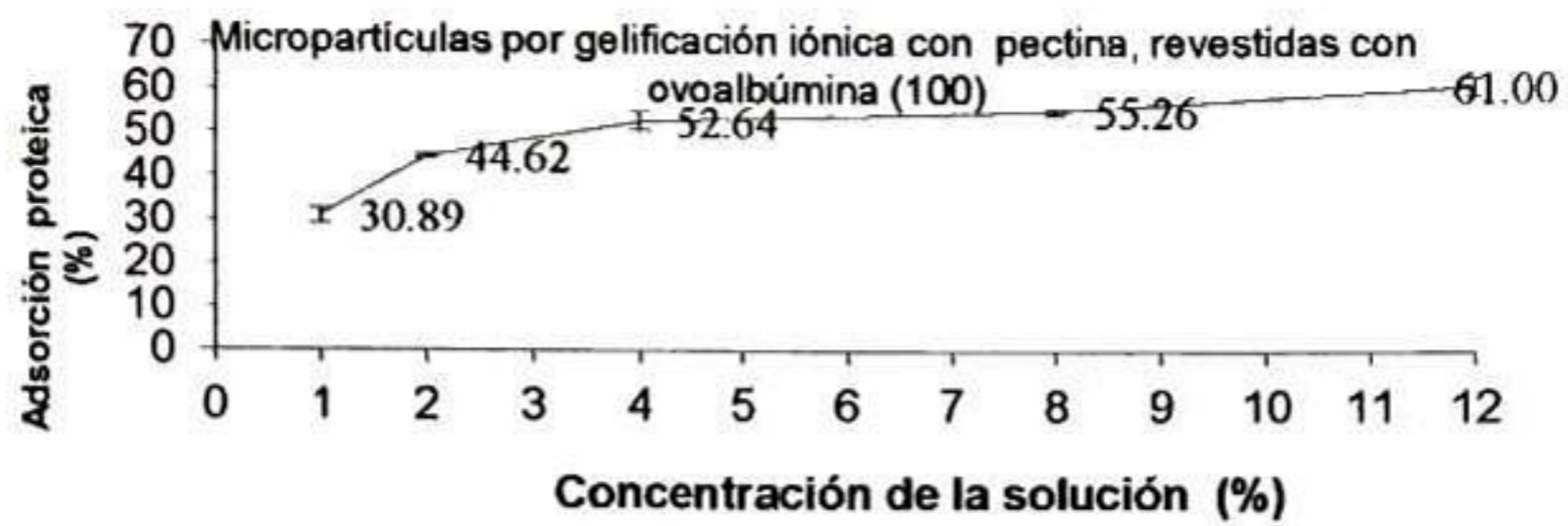


Figura 7. Adsorción proteica de micropartículas producidas con el sistema pectina.

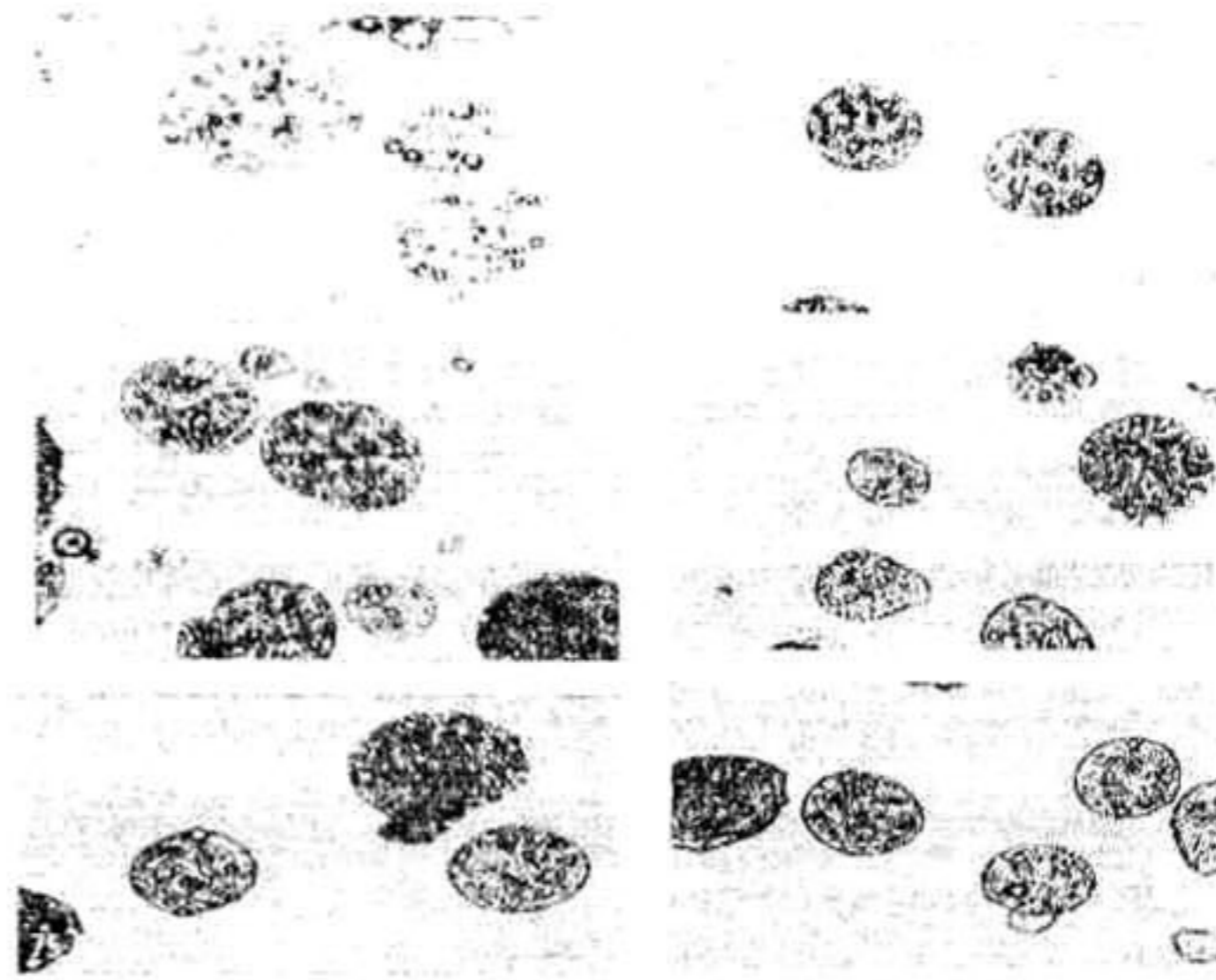


Figura 8. Micropartículas de alginato y coacervadas con ovoalbúmina, proteína de suero de leche y mezclas de ambas proteínas.

En la Figura 9 se muestran las micropartículas de pectina y micropartículas revestidas con las diferentes proteínas, las micropartículas obtenidas por gelificación iónica (GI) presentan una morfología similar a las obtenidas con alginato de sodio, sin embargo, se puede observar que aquellas que fueron coacervadas no presentaron una forma definida con relación al sistema de alginato, se observó que el contenido lipídico está distribuido uniformemente en la matriz producida por ambos polisacáridos, donde se observa distribución de los diferentes tamaños de gotas lipídicas por toda la extensión de la micropartícula. Las micropartículas presentan, en su mayoría, forma esférica o aproximadamente esféricas. En el sistema con únicamente concentrado de proteína de suero de leche (PSL) la morfología de las micropartículas no fue muy definida, estas se observan ligeramente más pequeñas que las obtenidas con las otras mezclas de proteína utilizadas.

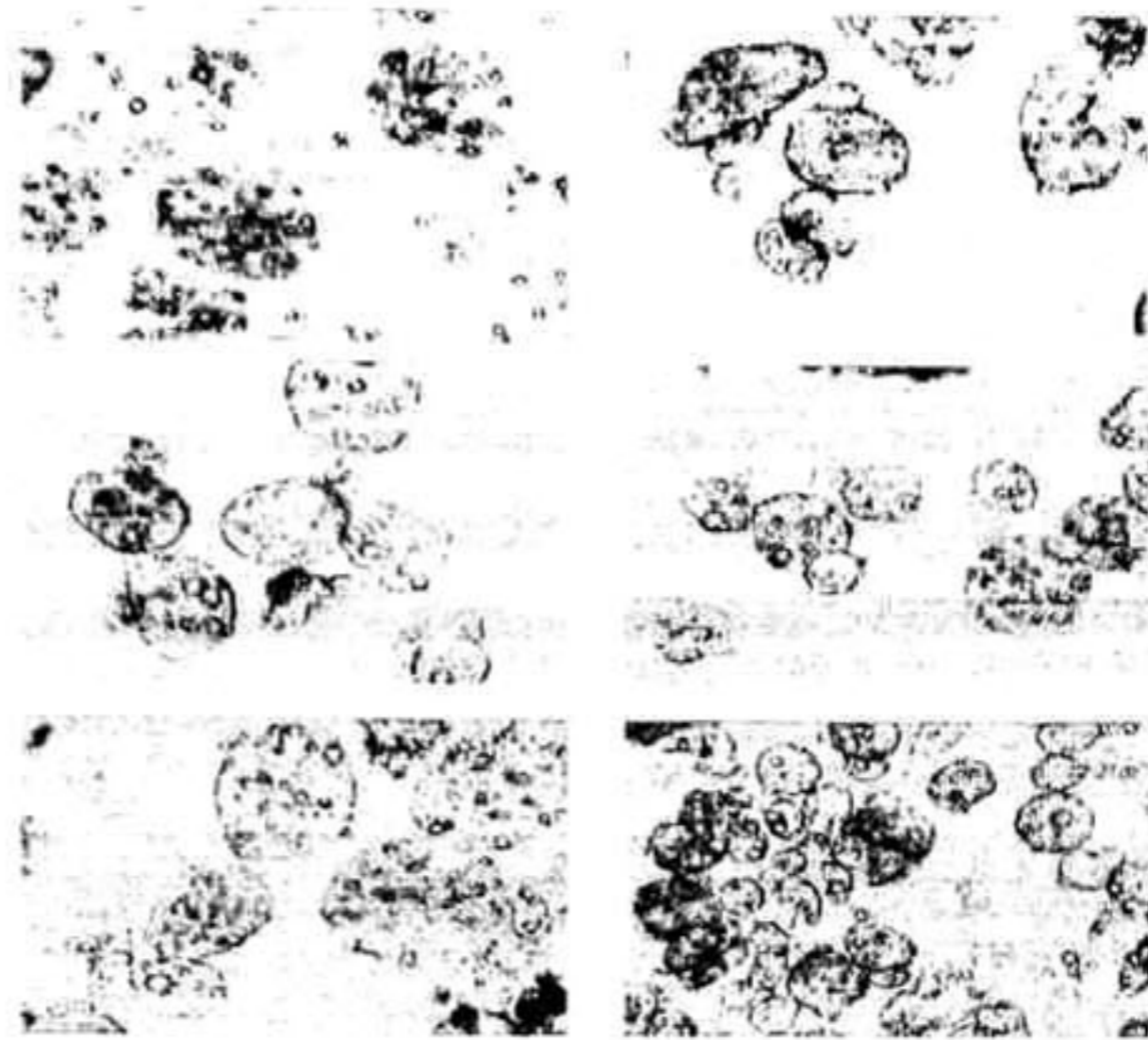


Figura 9. Micropartículas de pectina y coacervadas con ovoalbúmina, proteína de suero de leche y mezclas de ambas proteínas.

La mayoría de las micropartículas producidas por biopolímeros presentan formato esférico, pero pueden presentarse en forma de fibras, esferoides o aglomerados (Jones y McClements 2010). La forma esférica de las micropartículas puede ser influenciada por la concentración de la pectina, una vez que, un estudio realizado con micropartículas de alginato muestra que las micropartículas obtuvieron una forma esférica más estable en mayores concentraciones de alginato, para concentraciones de solución iónica constante. Con relación a la estructura interna de las micropartículas, el material encapsulado (aceite) se distribuyó a través de la matriz, caracterizando una distribución homogénea del activo. El estudio de la estructura interna, necesario toda vez que influencia en las características funcionales de la micropartículas, como la eficiencia de encapsulación, permeabilidad, integridad y digestibilidad (Jones y McClements 2010).

Para micropartículas acarreadores de fármacos tanto el formato cuanto la distribución del activo por la matriz es importante para influenciar la cinética de liberación. Para micropartículas acarreadores de microorganismos y células vivas

la forma y la distribución del activo no son tan importantes (Talei-Franzese y col. 2006, Teoh y col. 2011). Así como ya había sido observado en la microscopia las micropartículas de gelificación iónica después del recubrimiento con proteína se mantuvieron esféricas y homogéneas. Después de 30 min de inmersión en solución de proteína la morfología de la superficie de las micropartículas se mostró lisa, homogénea, sin arrugas o poros visibles con diferencia de proteína adsorbida entre tratamientos. Las imágenes permiten afirmar la totalidad de la superficie de las micropartículas recubiertas, garantizando una protección integral del material encapsulado.

3.1.3.2 Microscopia electrónica de barrido

La observación de las micropartículas secas mediante microscopia electrónica de barrido muestra que las micropartículas presentaron formas semejantes y se mantuvieron parcialmente integras después del proceso de secado (liofilización), presentando un contorno esférico, con micropartículas con gotas de aceite presentes en el material de pared. Se observó también aglomeración, a pesar de la aglomeración observada las micropartículas después de la rehidratación, volvieron a asumir una forma aproximadamente esférica y aparentemente con paredes continuas sin grietas cuando estas fueron rehidratadas en diferentes pH 2, 4 y 7 (Figura 10), lo que demuestra su integridad después del proceso de liofilización. Diversos factores pueden estar involucrados en la fragilidad de las micropartículas durante el secado como la gran cantidad de agua que estas poseen. Sagis y col. (2008) realizaron la coacervación con proteína de suero de leche con partículas de pectina de alto grado de esterificación y observaron que las partículas recubiertas soportaron el proceso de secado por aspersion. Albertini y col. (2010) realizaron la liofilización de micropartículas producidas con alginato, las cuales mostraron alteraciones en la forma de la micropartícula ya que presentaron rugosidades en la superficie, resultado del proceso y secado.

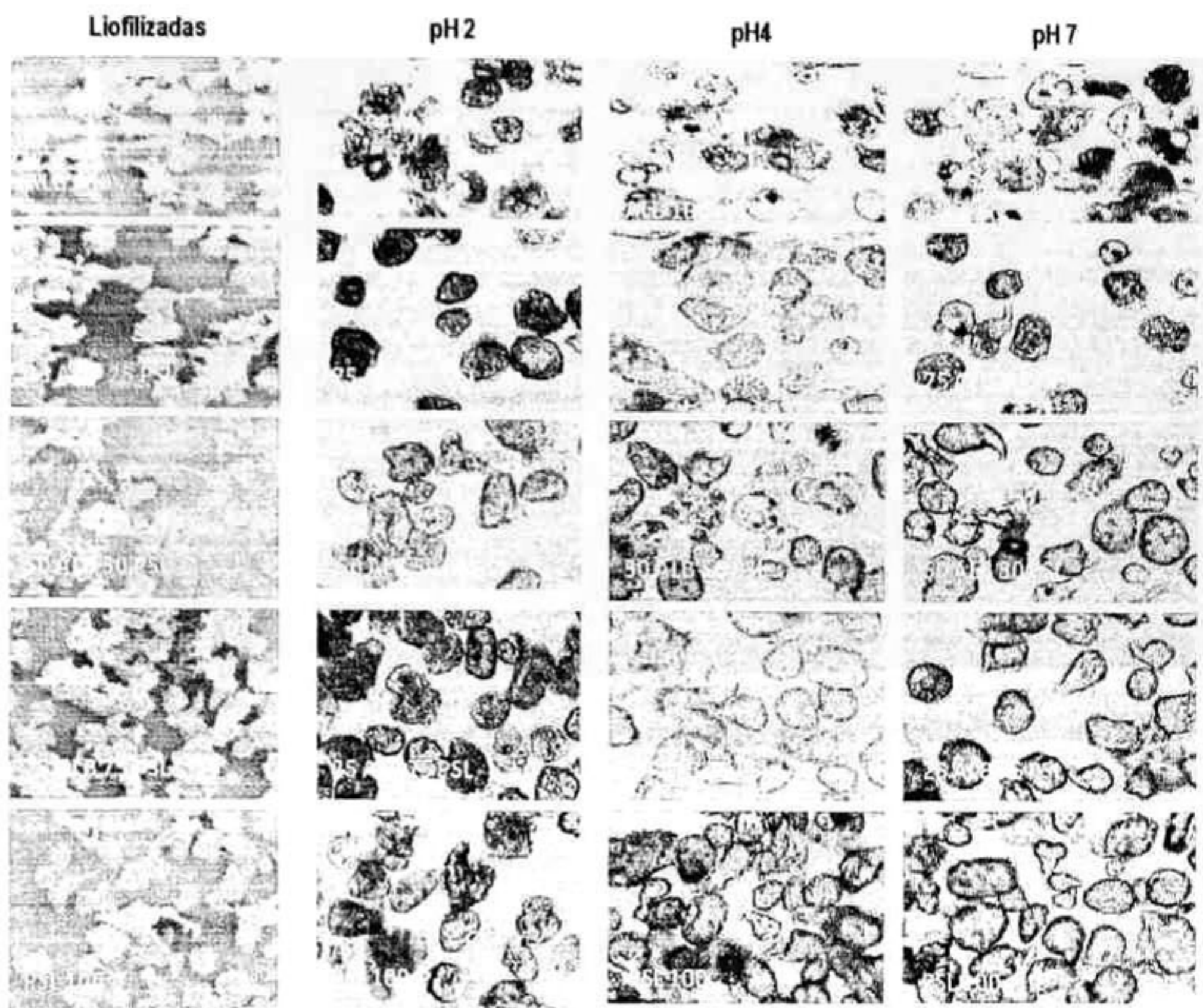


Figura 10. Micropartículas de alginato coacervadas liofilizadas y rehidratadas pH 2, 4 y 7.

3.1.3.3 Microscopia confocal

La Figura 11 muestra las micropartículas teñidas: Una solución de ovoalbúmina se tiñó con dos colorantes diferentes: isotiocianato de fluoresceína (FIT C) y rodamina B isotiocianato (RBITC), la solución de PSL se tiñó con isotiocianato de fluoresceína (FIT C) y aceite de soya se tiñó con rojo nilo. Las imágenes de microscopia confocal permiten observar mejor la distribución de las gotas de aceite por toda la matriz con tamaños heterogéneos indicando que la emulsión podría ser mejorada. Esta técnica permite confirmar que las micropartículas presentaron una forma definida, esférica-ovular.

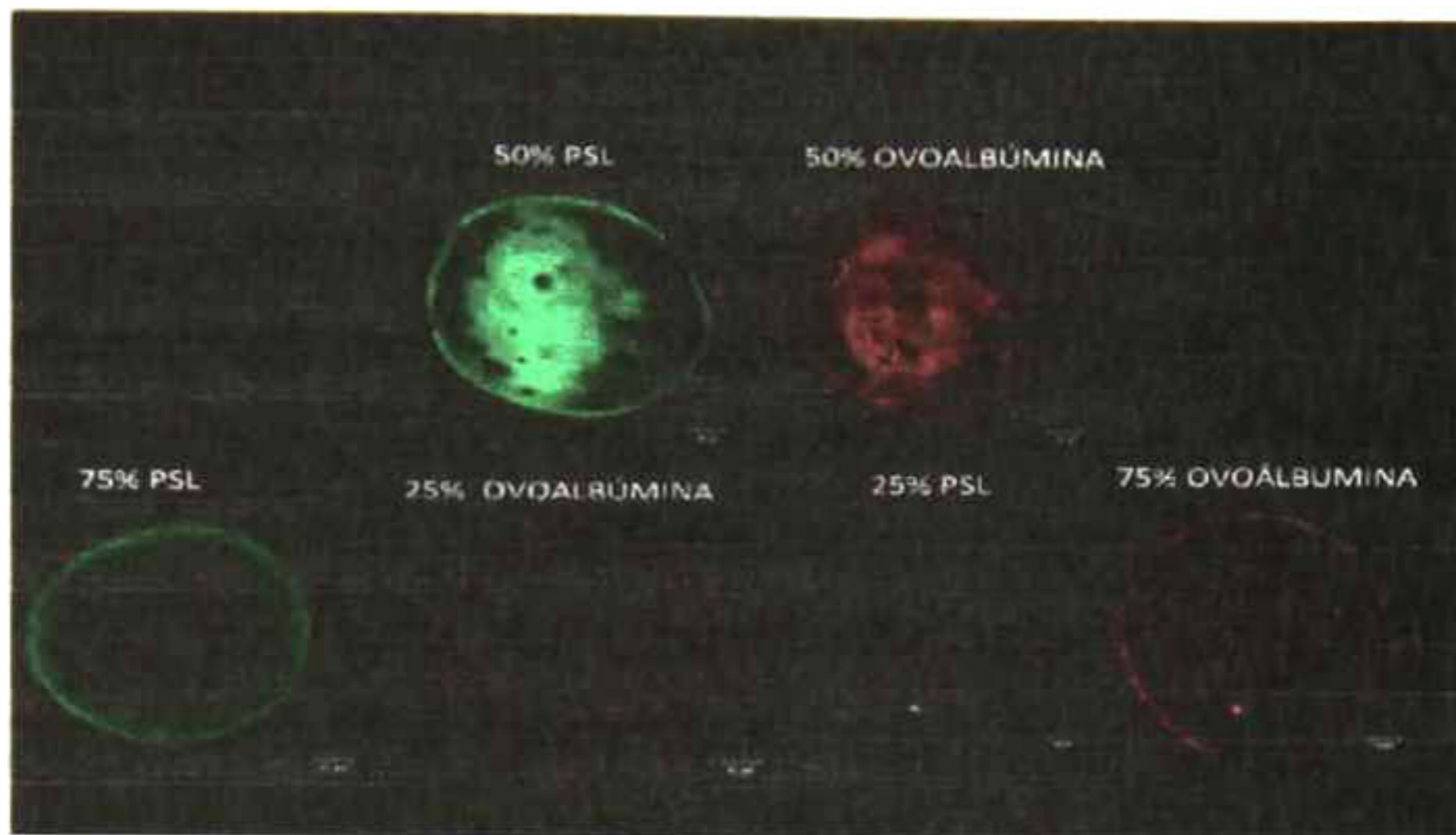


Figura 11. Micropartículas de alginato coacervadas con ovoalbúmina y PSL al 12%.

3.1.4 Diámetro medio de las micropartículas

Los diámetros medios de las micropartículas gelificadas revestidas con proteína, húmedas y rehidratadas, fueron determinadas por dispersión de luz utilizando medidor masterzaser y son presentados en las Figuras 12 y 13. El tamaño de las micropartículas producidas por gelificación iónica, utilizando biopolímeros como la pectina o alginato son afectados por varios parámetros, tales como el diámetro de la aguja del atomizador, concentración de los polímeros, distancia de la aguja al nivel de la solución catiónica. El diámetro medio de las micropartículas obtenidas por gelificación iónica utilizando alginato y pectina fueron 114.85 y 203.81 μm respectivamente. En la Figura 12 para las micropartículas elaboradas con alginato se observa que después de realizar la coacervación compleja con las diferentes mezclas de proteínas el tamaño de las micropartículas (húmedas) incrementó, sin embargo, para el sistema pectina el tamaño de la micropartícula se redujo (Figura 13).

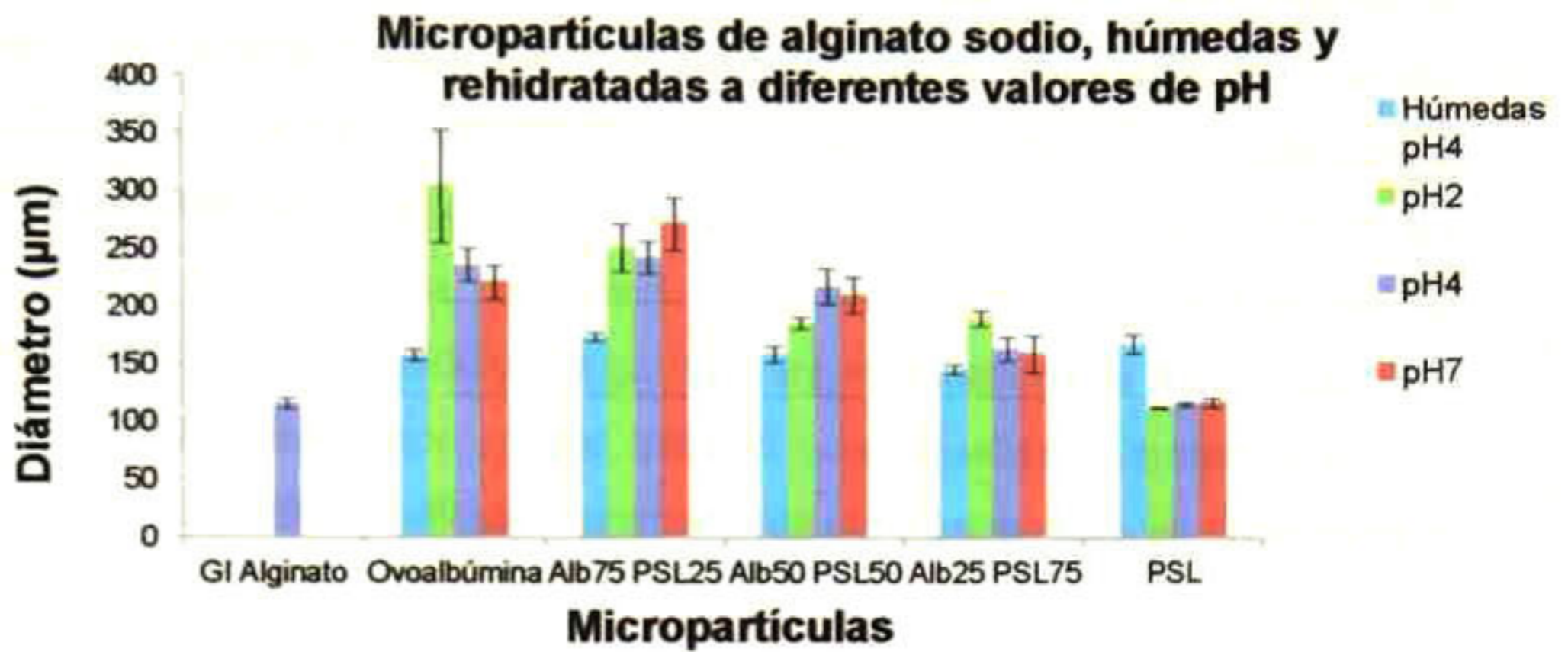


Figura 12. Diámetro medio de las micropartículas de alginato producidas por gelificación iónica e interacción electrostática con ovoalbúmina, concentrado proteico de suero de leche y combinaciones de las mismas.

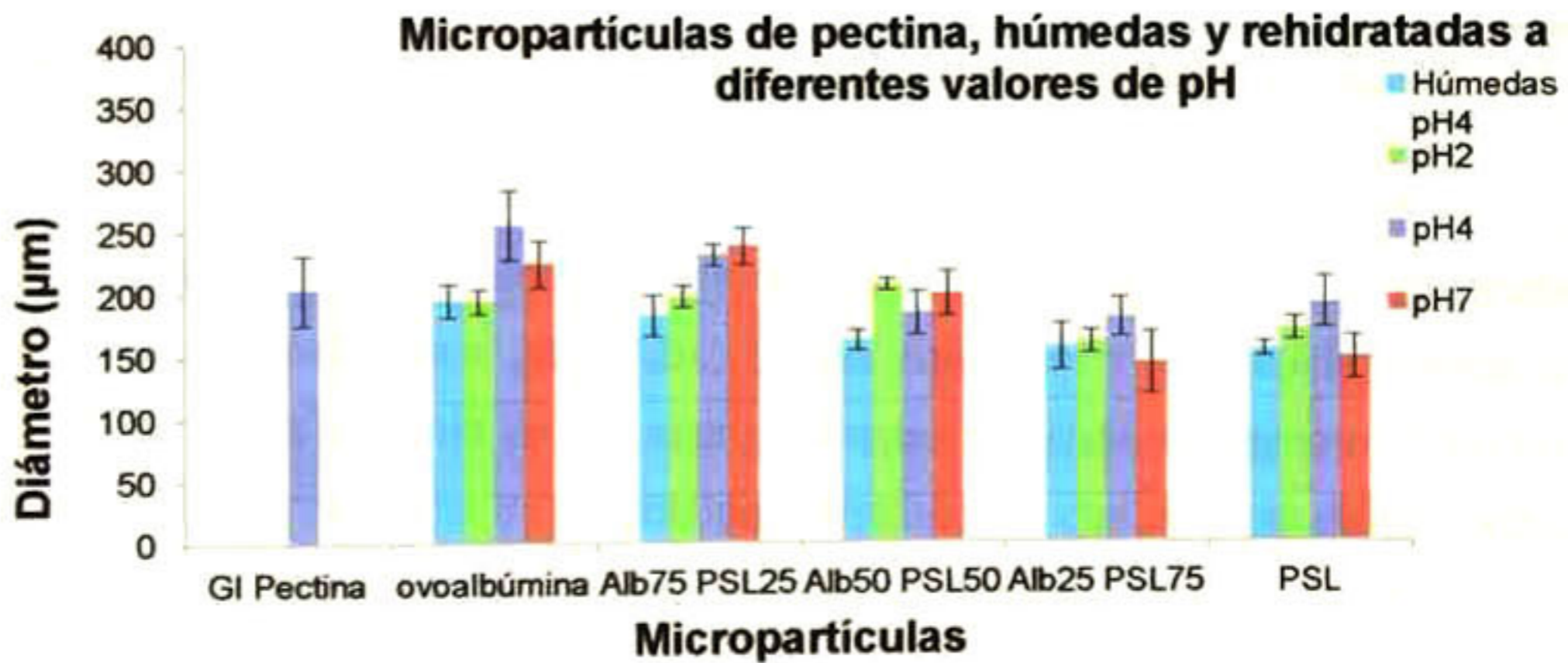


Figura 13. Diámetro medio de las micropartículas de pectina producidas por gelificación iónica e interacción electrostática con ovoalbúmina, concentrado proteico de suero de leche y combinaciones de las mismas.

Esto probablemente como resultado de una mayor absorción de proteína que presentó el sistema pectina sobre la superficie de la micropartícula obtenida por gelificación iónica, indicando que la proteína al interactuar electroestáticamente con los grupos carboxílicos negativos de la partícula de pectina presiona a la partícula reduciendo su tamaño posiblemente expulsando agua presente en la micropartícula. En general las micropartículas elaboradas con el sistema pectina presentaron mayor tamaño que aquellas elaboradas con el sistema alginato. Las micropartículas rehidratadas alcanzaron valores superiores a los 200 μm .

3.1.5 Electroforesis de las micropartículas

SDS-PAGE fue utilizado para confirmar la adsorción de las proteínas (ovoalbúmina y CPS) en la superficie de las micropartículas gelificadas por interacción electrostática. La Figura 14 muestra en la columna P un padrón de bajo peso molecular, en la columna 1 la fracción de micropartículas recubiertas de ovoalbúmina 100%, de la columna 2 corresponde a la mezcla ovoalbúmina (75%) y PSL (25%), la columna 3 a ovoalbúmina (50%) y PSL (50%), columna 4 a la ovoalbúmina (25%) y PSL (75%) y finalmente la columna 5 a PSL (100%).

A partir del gel electroforético con ambos sistemas se observó la presencia de la proteína ovoalbúmina (45.0 kDa) en las columnas 1 a 4, evidenciando la absorción de dicha proteína en las micropartículas del sistema alginato. Y en las columnas 5 a 2 la presencia de la proteína seroalbúmina con un peso de 66.2 kDa. El ancho de las bandas en las micropartículas de pectina presentó mayor grosor con respecto a las observadas para el sistema alginato, lo cual confirma que la adsorción proteína es mayor en el sistema elaborado con pectina con relación al sistema elaborado con alginato.

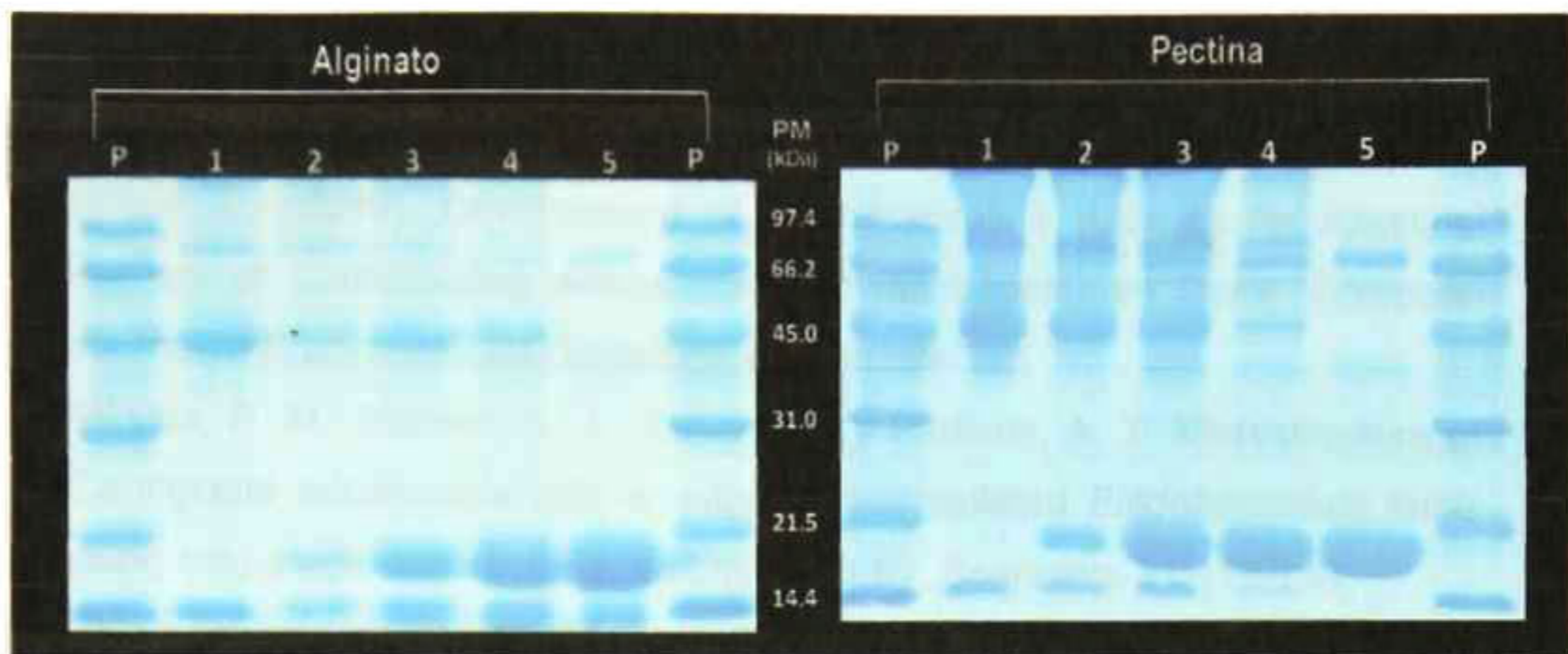


Figura 14. Electroforesis en gel SDS-PAGE de micropartículas de alginato y pectina. P- padrones de peso molecular, 97.4 kDa fosforilasa b, 66.2 kDa seroalbúmina, 45.0 kDa ovoalbúmina, 31.0 kDa anhidrasa carbónica, 21.5 kDa inhibidor de tripsina y 14.4 kDa lisozima. Muestras de 1 a 5 de ovoalbúmina 100%, ovoalbúmina 75%, ovoalbúmina 50%, ovoalbúmina 25% y concentrado de proteína de suero de leche 100% respectivamente.

4. CONCLUSIONES

El sistema analizado con pectina presentó mejor absorción proteica con relación al sistema con alginato lo cual le da mejores propiedades nutricionales por alto contenido de proteína adsorbida sobre la superficie. Las micropartículas obtenidas presentaron características de tamaño, solubilidad, forma, y capacidad de hinchamiento adecuado para la encapsulación de diferentes principios activos que más adelante pueden ser estudiados en diferentes disciplinas como la alimentaria, farmacéutica y medica.

5. REFERENCIAS

- Albertini, B., Vitali, B., Passerini, N., Cruciani, F., Di Sabatino, M., Rodriguez, L. y Brigidi, P (2010). Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 40(49):359-366.
- Allan-Wojtas, P. M., Hansen, L. T., Carbyn, S. y Paulson, A. T. Microstructure of Ca-alginate microbeads with or without encapsulated *Bifidobacterium lactis* using cold-stage scanning electron microscopy. *Scanning*. 21:118-119.
- Ambjerg-Pedersen, H. C. y Jorgensen, B. B. (1991). Influence of pectin on the stability of casein solutions studied in dependence of varying pH and salt concentration. *Food Hydrocolloids*. 5:323.
- AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. Official Methods of Analytical Chemists of the Association Chemistry, 2006.
- Baldasso, C., Barros, T. C., Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*. 278:381-386.
- Bedie G. K., Turgeon, S. L. y Makhlouf, J. (2008). Formation of native whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocolloids*. 22: 836–844.
- Braudo, E. E. y Antonov, Y. A. (1993). Non-coulombic complex formation of proteins as a structure forming factor in food systems. In *Proteins, Structure and Functionality*; Schwenke, K. D. and Mothes, R., Eds.; VCH: Weinheim, 210 pp.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P y Jones M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*. 56:27–35.
- Dai, C., Wang, B., Zhao, H. (2005). Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*. 41:117-120.
- De Vos, P., Faas, M. M., Strand, B., Calafiore. R. (2006). Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials*. 27(32):5603-5617

- De Vries, R. J., Weinbreck, F. y De Kruif, C. G. (2003). Theory of polyelectrolyte adsorption on heterogeneously charged surfaces applied to soluble protein polyelectrolyte complexes. *Journal of Physical Chemistry*, 118: 4649-4659.
- Donati, S., Holtan, Y. A., Morch, M., Borgogna, M., Dentini, G. y Skjk-Brk. (2005) New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules*, 6:1031–1040
- Donnelly, J. L., Decker, E. A. y McClements, D. J. (1998). Iron-catalyzed oxidation of menhaden oil as affected by emulsifiers. *Journal Food Science. Technology*. 63:997–1000.
- Dubin, P. L., Gao, J., Mattison, K. (1994). Protein purification by selective phase separation with polyelectrolytes. *Separation and Purification Methods*. 23:1-16.
- Draget, K. I., Skjak, Break, G. y Smidsrod, O. (1994). Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. *Carbohydrates Polymers*. 25:31-38.
- FAO, (2009) Ed. Compendium of food additive specifications, seventy-first meeting. : FAO JECFA Monographs.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I. y Mulligan, N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 50:213-24.
- Griffith, L. G. (2000). Polymeric biomaterials. *Acta Mater.*, 48:263–277.
- Jones, O. G. y McClements, D. J. (2010). Biopolymer Nanoparticles from Heat-Treated Electrostatic Protein–Polysaccharide Complexes: Factors Affecting Particle Characteristics. *Journal of Food Science*. 75(2):N36-N43
- Jun-Xia, X., Hai-Yan, Y., Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125:1267-1272.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lamprecht, A., Schäfer, U. F., Lehr, C. M. (2000). Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall

- composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 49(1):1-9.
- Mcclements, D. J. (2005). *Food emulsions - Principles, Practices, and Techniques*. CRC Press, ISBN 978-0-8493-2023-1. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1201/9781420039436.ch12> . Acesso en: 2011/09/14.
- Martinsen, A., Skjak-Braek, C. y Smidsrod, O. (1989). Alginate as immobilization material I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*. 33(1): 79–89.
- Ngouémazong, D. E., Kabuye, G., Fraeye, I., Cardinaels, R., Loey, A. V., Moldenaers, P., Hendrickx, M. (2011). Effect of debranching on the rheological properties of Ca²⁺ pectin gels. *Food Hydrocolloids*.26:1-10.
- Norton, I. T., Frith, W. J. y Ablett, S. (2006). Fluid gels, mixed fluid gels and satiety. *Food Hydrocolloids*, 20 (2–3): 229–239
- Oakenfull, D., Pearce, J. y Burley, R. W. (1997). Protein gelation. S. Damodaran, A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications*, Marcel Dekker, Inc, New York pp. 111–142.
- Patten, G. S., Augustin, M. A., Sanguansri, L., Head, R. J. y Abeywardena, M. Y. (2009). Site Specific Delivery of Microencapsulated Fish Oil to the Gastrointestinal Tract of the Rat. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(3): 511-521.
- Prata, A. S. (2006). Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa. Tesis de doctorado (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Vilela, S., Ribeiro, A. J. y Veiga, F (2006). Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation*. 23(3):245-257.
- Roach, P., Farrar, D. y Perry, C. C. (2005). Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *Journal of the American Chemical Society*. 127(22):8168-8173.

- Rosenberg, M. y Lee, S. J. (2004). Calcium-alginate coated, whey protein-based microspheres: preparation, some properties and opportunities. *Journal of Microencapsulation*. 21(3):263-281.
- Sagis, L. M. C., De Ruiter, R., Miranda, F. J. R., De Ruiter, J., Schroen, K., Van Aelst, A. C., Kieft, H., Boom, R. y Van Der Linden, E. (2008). Polymer Microcapsules with a Fiber-Reinforced Nanocomposite Shell. *Langmuir*. 24(5):1608-1612.
- Samant, S. K., Singhal, R. S., Kulkarni, P.R., Rege, D. V. (1993). Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. Review. *International Journal Food Science Technology*. 28:547-548.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Thomas, F y Hardy, J. (2000). Effect of protein aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*. 14:403-413.
- Shahidi, F. y Han X. Q. (1993) Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33:501-547.
- Silva, C. M., Ribeiro, A. J., Figueiredo, I. V., Gonçalves, A. R., Veiga, F. (2006). Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 311(1-2):1-10.
- Simsek-Ege, F. A., Bond, G. M. y Stringer, J. (2003). Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. *Journal Applied Polymer Science*. 88:346-351.
- Smidsrod, O. y Skjak-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*. 8(3):71-78.
- Smrdel, P., Bogataj, M., Zega, A., Planinšek, O., Mrhar, A. (2008). Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation*. 25(2):90-105.
- Svasti, J. y Panijpan, B. (1997). SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of chemical Education*. 54:560
- Talei-Franzese, G., Ni, B., Ling, Y. y Khademhosseini, A. A. (2006). Controlled-Release Strategy for the Generation of Cross-Linked Hydrogel

- Microstructures. *Journal of the American Chemical Society*. 128(47):15064-15065.
- Teoh, P. L., Mirhosseini, H., Mustafa, S., Hussin, A. S. M., Manap, M. Y. A. (2011). Recent approaches in the development of encapsulated delivery systems for probiotics. *Food Biotechnology*. 25(1):77-10.
- Thakur, B. R., Singh, R. K. y Handa, A. K. (1997). Chemistry and uses of pectin – A Review In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 37(1):47-73.
- Tolstoguzov, V. B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*. 4:429–468.
- Weinbreck, F., Tromp, R. H. y De Kruif, C. G. (2004). Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates, *Biomacromolecules*. 5(4):1437-1445.
- Xie, H. G., Zheng, J. N., Li, X. X., Liu, X. D., Zhu, J., Wang, F., Xie, W. Y., Ma, X. J. (2009). Effect of Surface Morphology and Charge on the Amount and Conformation of Fibrinogen Adsorbed onto Alginate/Chitosan Microcapsules. *Langmuir*. 26(8):5587-5594.

EL JURADO DESIGNADO POR LA UNIDAD QUERÉTARO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, APROBÓ LA TESIS DOCTORAL DEL LA C. REYNA NALLELY FALFAN CORTES TITULADA: "MICROENCAPSULACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS UTILIZANDO ALMIDÓN DE AMARANTO COMO MATERIAL DE PARED", FIRMAN AL CALCE DE COMÚN ACUERDO LOS INTEGRANTES DE DICHO JURADO, EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO, QRO., A LOS 17 DÍAS DEL MES DE FEBRERO DEL AÑO 2014




Dr. Fernando Martínez Bustos



Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde



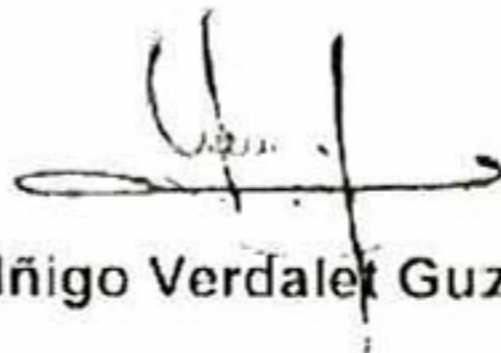
Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas



Dra. Silvia Lorena Amaya Llano



Dr. Gerónimo Arámbula Villa



Dr. Iñigo Verdalet Guzmán



CINVESTAV - IPN
Biblioteca Central



SSIT0012391