EFECTO DEL ALMACENAMIENTO Y LAS CONDICIONES DE ESTRÉS SOBRE LA VIABILIDAD DE *Bifidobacterium animalis* MICROENCAPSULADO E INCORPORADO EN HARINA INSTANTÁNEA FORTIFICADA A BASE DE PLÁTANO DOMINICO HARTÓN (*MUSA* AABSIMMONDS)

JESSICA TRIVIÑO VALENCIA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2019

EFECTO DEL ALMACENAMIENTO Y LAS CONDICIONES DE ESTRÉS SOBRE LA VIABILIDAD DE *Bifidobacterium animalis* MICROENCAPSULADO E INCORPORADO EN HARINA INSTANTÁNEA FORTIFICADA A BASE DE PLÁTANO DOMINICO HARTÓN (*MUSA* AABSIMMONDS)

JESSICA TRIVIÑO VALENCIA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Magister en Microbiología Agroindustrial

Director:
EDUARDO JAVID CORPAS IGUARÁN

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2019

Nota de aceptación

_____
_____
_____
_____
_____
_____

_____

Firma de Director del Trabajo de Grado

_____

Firma del presidente del Comité de Programa

_____

Firma de integrante del Comité de Programa

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, a mis padres por ser el pilar más importante, por demostrarme su amor, apoyo incondicional y por enseñarme que antes de ser un buen profesional y tener todos los títulos que puedan existir, se debe tener presente la necesidad de ser una gran persona, con carisma y altruismo. A mi esposo por ser el apoyo incondicional en mi vida que, con su amor y respaldo, me ayuda a alcanzar mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

Instituciones y oficinas

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS), debido al apoyo brindado a través de la beca pasantía.

Universidad Católica de Manizales:

- Dirección de Investigaciones y Posgrados, por la cofinanciación del trabajo de grado.
- Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial, por el uso de los laboratorios y sus instalaciones para el desarrollo del trabajo de grado.
- Grupo de Investigaciones INDETSA, por el apoyo permanente durante el desarrollo de la investigación.
- Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional Sede Manizales, por su apoyo en equipos e infraestructura durante el desarrollo del trabajo de grado

Docentes e investigadores

- Dr. Eduardo Javid Corpas Igüaran, cómo director de trabajo de grado, por su disponibilidad de tiempo, constantes enseñanzas profesionales y personales, por la construcción de la propuesta de investigación y por la oportunidad de permitirme trabajar en el Instituto de Microbiología Agroindustrial como Joven Investigadora de Colciencias.
- Mgr. Jenniffer Gaviria Giraldo, por su apoyo técnico.

IMPACTOS ALCANZADOS

- Proyecto realizado en marco a la beca pasantía de Jóvenes Investigadores de Colciencias Convocatoria No 761 de 2016.

- Asistencia al IV Congreso Internacional del Investigación en innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos- IICTA 2018, realizado en la ciudad de Cali del 16 al 18 de mayo de 2018, para la presentación del trabajo titulado "Sobrevivencia de *Bifidobacterium animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano" en modalidad poster (Anexo 1).

- Premio LARKIN. 3er puesto a la investigación en modalidad de póster para el trabajo titulado "Sobrevivencia de *Bifidobacterium animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano" en el IV Congreso Internacional del Investigación en innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos- IICTA 2018 (Anexo 2).

- Artículo sometido a la revista Journal of Food Science and Technology (Q2) del trabajo titulado "Free and microencapsulated *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* through spray-drying process survival under stress conditions and viability during storage". (Anexo 3).

- Artículo sometido a la revista Dyna (Q3, A2 en Publindex) del trabajo titulado "Effect of storage and stress conditions on the *Bifidobacterium animalis* count microencapsulated and incorporated in plantain flour".

- Participación como organizadora del evento RREDSI Red Regional de Semilleros de Investigación. Llevada a cabo del 18 al 19 de octubre de 2017 en Manizales Caldas (Anexo 4)

- Participación en calidad de evaluadora del evento RREDSI Red Regional de Semilleros de Investigación. Llevada a cabo del 18 al 19 de octubre de 2017 en Manizales Caldas.(Anexo 5)

- Participación en el curso de "Análisis Bibliométrico" con una duración de 12 horas. Llevado a cabo los días 01 y 02 del mes de marzo de 2018 (Anexo 6).

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1.**INTRODUCCIÓN**	1
2.**OBJETIVOS**	6
2.1 Objetivos generales	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. **REFERENTE TEÓRICO**	7
3.1. Alimentos funcionales	7
3.2. Probióticos, antecedentes y definición	8
3.3 Microorganismos probióticos	11
3.4. Beneficios de los probióticos en la salud	13
3.5. Cultivo de Plátano	14
3.5.1. Harina de Plátano y sus Propiedades Nutricionales	15
3.5.2. Estimación de la Vida Útil en la Harina de Plátano Dominico Hartón	16
3.5. Análisis bibliométrico sobre microencapsulación en matrices alimentarias	15
3.6. Análisis Bibliométrico Sobre Microencapsulación en Matrices Alimentarias	17
3.6.1. Metodología, fuente de datos y análisis	17
3.6.2. Fuente de datos	18
3.6.3. Herramientas de análisis	20
3.6.3.1. Vosviwer	20
3.6..3.2. Bibexcel	20
3.6.4. Tendencias de la investigación	17
3.6.5. Frecuencias de países con mayor publicación	21
3.6.6. Autores	22
3.6.7. Palabras Clave	24
4. **MATERIALES Y MÉTODOS**	25
4.1. Preparación de la harina de plátano	25
4.2. Obtención de microcápsulas de *Bifidobacterium animalis* subs. *animalis*	26
4.2.1. Producción de biomasa	26
4.2.1. Preparación de material encapsulante	26
4.2.3. Microencapsulación *B. animalis* por el método de secado por aspersión	27
4.2.4. Incorporación del microencapsulado en la muestra de Harina de plátano Dominico Harón (*MUSSA AAB SIMMONDS)*	28
4.3. Método de diluciones seriadas y siembra en caja petri	30
4.3.1. Liberación de *Bifidobacterium animalis microencapsulado*	30
4.4. Diseño Experimental para la Evaluación de la viabilidad de *B. animalis* libre y microencapsulado e incorporado en Harina de Plátano Dominico Hartón (*MUSA AAB SIMMONDS*).	31

4.4.1. Unidad de muestra 31
4.4.2. Determinación muestral del efecto de la Tº de preparación del producto sobre el recuento de *B. animalis* 31
4.4.3. Determinación muestral del efecto del pH sobre el recuento de *B. animalis* 31
4.4.4. Determinación muestral del efecto de las sales biliares sobre el recuento de *B. animalis*. 32
4.4.5. Evaluación de la tasa de supervivencia de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano Dominico Hartón. 32
4.5. Diseño Experimental 32
4.5.1. Establecimiento del efecto de la Temperatura de la preparación del producto sobre el recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado. 32
4.5.2. Establecimiento del efecto del pH sobre el recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada. 33
4.5.3. Establecimiento del efecto de las sales biliares sobre el recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada. 34
4.6. Análisis estadístico 36
4.7. Observación microscopia electrónica 36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN EVALUACIÓN MICROENCAPSULADO SIN INCORPORAR. 36
5.1. Evaluación de la viabilidad de *B. animalis subs. animalis* microencapsulado mediante secado por aspersión 38
5.2. Estabilidad de almacenamiento de *B. animalis* subs. *animalis* microencapsulado 39
5.3. Evaluación de la supervivencia de *B. animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado sometido a tratamientos térmicos. 42
5.4. Evaluación de la supervivencia de *B. animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado en sales biliares. 46
5.5. Evaluación de la supervivencia de *B. animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado frente a diversas concentraciones de pH. 46
5.6. Morfología y tamaño del Microencapsulado 46
6. CONCLUISONES EVALUACIÓN MICROENCAPSULADO SIN INCORPORAR. 49

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN EVALUACIÓN *B. animalis* MICROENCAPSULADO E INCORPORADO EN HARINA DE PLÁTANO DOMINICO HARTÓN. 51

7.1. Análisis de confiabilidad de la concentración de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada. 51

7.1.1. Características microscópicas del microencapsulado. 51

7.1.2. Viabilidad durante el almacenamiento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada. 53

7.3. **Efecto de la temperatura sobre el recuento de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada.** 54

7.3.1. Establecimiento del efecto de la Tº de la preparación del producto sobre el recuento de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada. 56

7.4. **Efecto del pH sobre el recuento del B. *animalis* en harina de plátano instantánea fortificada.** 56

7.4.1. Establecimiento del efecto del pH sobre el recuento de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada. 56

7.5. **Efecto de la concentración de sales biliares sobre el recuento de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada.** 58

7.5.1. Establecimiento del efecto de las sales biliares sobre el recuento de *B. animalis* microencapsulado en incorporado en harina de plátano. 58

7.5.2. Evaluación de supuestos y efecto del factor concentración de sales biliares sobre el recuento de *B animalis.* 60

8. **DISCUSIÓN** 62

8.1. **Análisis de confiabilidad de la concentración de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada.** 62

8.2. Efecto de la temperatura de preparación sobre el recuento de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada. 64

8.3. Efecto del pH sobre el recuento de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada. 65

8.4. Efecto de la concentración de sales biliares sobre el recuento de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada. 67

9. CONCLUISONES EVALUACIÓN *B. animalis* MICROENCAPSULADO E INCORPORDO EN HARINA DE PLÁTANO DOMINICO HARTÓN. 70
10. RECOMENDACIONES 71
11. REFERENTES BIBLIOGRÁFICOS 72
12. ANEXOS 90

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Clasificación y tipos de alimentos probióticos. 11

Tabla 2. Microorganismos usados como probióticos. 12

Tabla 3. Ecuación de búsqueda con palabras claves en Web of Science 18

Tabla 4. Autores clave en Autores claves en Microencapsulación de Probióticos 22

Tabla 5. Diagrama de proceso de microencapsulación de *B. animalis* y su incorporación en Harina de Plátano Dominico Hartón (ABB SIMMONDS) instantánea. 29

Tabla 6. Conteo de cultivo *B. animalis* subs. a*nimalis* en solución encapsulante y microcápsulas. 38

Tabla 7. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey para la raíz cuadrada recuento de *B. animalis* a diferentes temperaturas. 58

Tabla 8. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey para el Ln del recuento de *B. animalis* a diferentes pH y tiempos de contacto. 60

Tabla 9. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey para el recuento de *B. animalis* a diferentes concentraciones de sales biliares y tiempos de contacto. 63

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Alcance de productos y usos probióticos. 14

Figura 2. Marco de Investigación para análisis bibliométrico 17

Figura 3. Tipo de documentos para el tema de interés "Probióticos y microencapsulación en la industria alimentaria". 19

Figura 4. Total número de publicaciones y Total citaciones para 2001 a 2017. 20

Figura 5. Número anual de publicaciones en relación a los 7 países más productivos. 22

Figura 6. Autores clave en los países más productivos según su número de publicaciones, índice H y citaciones. 23

Figura 7. Palabras clave en el tema de microencapsulación de probióticos (2001-2017). Nota: no se muestran todas las palabras clave en la imagen. 24

Figura 8. Material extruido (izquierda) y harina (derecha) producidos durante la transformación del plátano. 25

Figura 9. Equipo utilizado para el proceso de secado por aspersión de *B. animalis* 28

Figura 10. Metodología de diluciones seriadas. 30

Figura 11. Diseño experimental tiempo de permanencia media de la concentración de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada. 32

Figura 12. Diseño experimental para evaluar la influencia de la temperatura de preparación de la colada de harina de plátano sobre el recuento de *B. animalis* libre, encapsulado e incorporado. 33

Figura 13. Diseño experimental para evaluar el efecto del pH sobre la viabilidad de recuento de *B. animalis* libre, microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada. 34

Figura 14. Diseño experimental para evaluar el efecto de sales biliares sobre la viabilidad de recuento de *B. animalis* libre, microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada. 35

Figura 15. *B. animalis* subs. *animalis* microencapsulado por el método de secado por aspersión y almacenado 25°C durante 13 semanas. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n=3). 42

Figura 16. Resultados de la supervivencia de *B. animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado (semana 2 y 10) después de su exposición a 22°C, 55°C y 80°C durante 10 minutos. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los promedios. 44

Figura 17. Resultados de la supervivencia de *B. animalis* subs. a*nimalis* libre y microencapsulado después de 3 horas de exposición a sales biliares a 1, 3 y 5 g/L. 46

Figura 18. Resultados de la supervivencia de *B. animalis* subs. a*nimalis* libre y microencapsulado después de 3 horas de exposición a concentraciones de pH (2.5, 3.0 y 6.2. 48

Figura 19. Micrografías SEM de microcápsulas que contienen *B. animalis* subs. a*nimalis* obtenidas por el método de secado por aspersión con 25% de maltodextrina. 49

Figura 20. Micrografía E-SEM de *B. animalis* microencapsulado mediante secado por aspersión. 53

Figura 21. Área de las microcápsulas de *B. animalis* incorporadas en harina de plátano durante el tiempo de almacenamiento. 54

Figura 22. Micrografía E-SEM del microencapsulado de *B. animalis* en la primera y cuarta semana de almacenamiento. 55

Figura 23. Recuento y análisis de sobrevivencia de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina instantánea fortificada. 56

Figura 24. Recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano fortificada, sometido a diferentes temperaturas de preparación. 57

Figura 25. Recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano fortificada, sometido a diferentes pH. 59

Figura 26. Recuento de *B. animalis* en presencia de sales biliares a diferentes tiempos de contacto. 61

LISTA DE ANEXOS

Pág

Anexo 1. Certificado de asistencia al IV Congreso Internacional del Investigación en innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos- IICTA 2018, realizado en la ciudad de Cali del 16 al 18 de mayo de 2018. 90

Anexo 2. Premio LARKIN del 3er puesto a la investigación en modalidad poster del trabajo titulado Sobrevivencia de *Bifidobacterium animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano". 91

Anexo 3. Sumisión del artículo titulado "Free and microencapsulated *Bifidobacterium animalis* subsp, *animalis* through spray-drying process survival under stress conditions and viability during storage" a la revista Journal of Food Science and Tecnology. 92

Anexo 4. Artículo sometido Artículo sometido a revista Dynas (Pubindex): "Efecto del almacenamiento y condiciones de estrés sobre el recuento de *Bifidobacterium animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano" 93

Anexo 5. Certificado de participación en el curso de Análisis Bibliométrico con una dedicación de 12 horas. 94

1. INTRODUCCION

Según la FAO (2015), el 8,8 % de la población de Colombia se encuentra en prevalencia de subalimentación y 15,5 % de carencia de alimentos. El desperdicio en la producción de alimentos representa una oportunidad para alimentar a una población mundial cuyo número va en aumento (FAO, 2013). Para el año 2015 esta población alcanzó los 7.300 millones de personas, lo que significa que, en 12 años, el número de personas en el mundo ha aumentado en 1.000 millones (United Nations, 2015). Por lo tanto, los requerimientos alimentarios para suplir la rápida urbanización y evolución de estilos de vida han promovido la necesidad de generar alimentos con alto contenido nutricional y de fácil manejo en términos de transporte y conveniencia (Headey, 2016; Masters et al., 2016).

Desde el marco de la Reforma Rural de los acuerdos de paz, la seguridad alimentaria se enfoca a asegurar, para toda la población en Colombia tanto urbana como rural, suficiente acceso, calidad, cantidad y costo a los alimentos requeridos para una nutrición óptima, especialmente en población vulnerable como es la infantil, mujeres en etapa de gestación y lactantes, promoviendo prioritariamente la producción de alimentos (Acuerdo de Paz, 2016).

En relación con la población infantil, los efectos de la desnutrición se presentan especialmente en los niños menores de 5 años, mostrando grandes diferencias en áreas urbanas respecto a las rurales. Puesto que el 2,9 % de la población con desnutrición corresponde al área urbana y el 4,7 % al área rural. En efecto, el 13,2 % de la población infantil padece de desnutrición crónica (Carlos & Ballesteros, 2017). En esa Medida el infante con déficit nutricional y energético asociado a la desnutrición puede presentar secuelas en el desarrollo psicomotor, efectos funcionales e intelectuales (Bedoya & Quino Ávila, 2014). Se estima por lo tanto que una alta incidencia de los casos de desnutrición puede imponer una elevada carga económica a las familias y los países por la disminución de la productividad, la pérdida de posibilidades educativas debido a la disminución de la aptitud escolar en los infantes (García et al., 2002; Wisbaum et al., 2011).

La búsqueda de estrategias nutritivas bajo el desarrollo de productos en el mercado que brinden salud, nutrición y bienestar, constituye una mejora real en la dieta, ejerciendo una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y reduciendo el riesgo de padecer una enfermedad, estos alimentos que benefician la salud, han sido denominados genéricamente alimentos funcionales debido a que contienen recursos tecnológicamente desarrollados diseñados para mejorar la salud intestinal (Aguayo et al., 2017; Corrêa et al., 2017; Gonçalves et al., 2016).

Por lo tanto, es necesario la diversificación de los suministros industriales fundamentados en la transformación alimentaria, que favorezca las necesidades individuales y domésticas en la diversidad de las dietas mediante la reducción de desperdicios generados en la industria; lo que puede ser una medida útil y necesaria para promover alternativas nutricionales en los sistemas alimentarios o productos innovadores que le aporten valor agregado a las cadenas de producción agropecuaria, favoreciendo así las necesidades en la población (PECTIA, 2017).

Un producto básico y de exportación considerado como el cultivo más importante a nivel mundial es el plátano (SIPSA, 2014). Colombia, es uno de los productores más importantes en el mundo de frutas comestibles de especies de Musa, como plátano (Musa AAB, Dominico Hartón) (Gañan et al., 2008), su cultivo denota un mejoramiento continuo en el rendimiento de su producción. Departamentos como el Quindío, Meta, Antioquia, Tolima, Caldas, Córdoba, Risaralda, Valle, Nariño y Cauca, en su orden corresponden los mayores productores de plátano. Lo que representa un 80% de la producción y el 65% del área sembrada en el país, que para el año 2013 fue de 394.351 hectáreas (MinAgricultura, 2014).

Por lo tanto, la producción de plátano en Colombia para el 2013 alcanzó 3.4 millones de toneladas, de las cuales se exporta el 3,8%, cerca del 1% se destina al consumo de la agroindustria y se estiman pérdidas equivalentes al 10% de la producción (Lizarralde, 2014). Tal realidad amerita la adopción de nuevas tecnologías y el desarrollo de subproductos con significativo valor agregado. Es así como, durante los últimos años la industria agroalimentaria utiliza el plátano para la elaboración de snack, cuyo consumo creció más del 200%, así mismo el consumo para la producción de, hojuelas, cereales y harinas ha evolucionado de manera interesante, especialmente la producción de alimentos para la población infantil (MinAgricultura, 2014). No obstante, hasta la fecha no se ha estudiado la viabilidad de microorganismos probióticos incorporados en harina de plátano durante su almacenamiento y bajo condiciones de estrés. Estas indagaciones ayudarán a generar un valor de este producto obtenido a partir de la transformación del plátano.

Diversos microorganismos no solo favorecen el desarrollo de características fisicoquímicas y organolépticas de los alimentos, estos además pueden ejercer un impacto en la salud del consumidor, a través de la modulación de la microbiota intestinal, la estimulación del sistema inmune y la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles (Hamad et al., 2017; Panghal et al., 2018). Por esta razón, la industria alimentaria en las últimas décadas ha enfocado su interés al estudio de los aspectos nutricionales y terapéuticos mediante la incorporación de estos agentes biológicos en los alimentos (Adhikari et al., 2000; Burgain et al, 2011; Kailasapathy, 2002).

Los probióticos se definen como "*microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en una cantidad adecuada*" (FAO/ OMS, 2016). Esta definición aclara la necesidad de un probiótico para ser viable. Las células probióticas viables deben estar presentes en concentraciones requeridas hasta el momento del consumo, estas concentraciones difieren de un país a otro debido a su legislación; no obstante una cantidad requerida para ganar cualquier tratamiento terapéutico benéfico debe ser mayor o igual a 10^6 células probióticas viables por gramo o mililitro (Amakiri & Thantsha, 2016; Campaniello et al., 2018; Favarin et al., 2015; Sánchez et al., 2013; Samona & Robinson, 1994). La viabilidad de los microorganismos probióticos es de suma importancia, puesto que solo así se lograrán efectos beneficiosos sobre la salud del huésped (Li et al., 2016; Mattila-Sandholm et al., 2002; Moumita et al., 2017; Musikasang et al., 2009). Por lo tanto, estas células deben permanecer viables en relación a su sitio de acción.

La sobrevivencia se ve afectada por una variedad de factores que incluyen pH, oxígeno disuelto, concentración de sales biliares, temperatura de almacenamiento y post-acidificación (Fredua et al., 2015; Li et al., 2016; Shah, 2000). Con el fin de proteger los cultivos probióticos durante el procesamiento y almacenamiento en productos alimenticios y durante el tránsito gastrointestinal, se han implementado tecnologías innovadoras como la microencapsulación, permitiendo convertir estos cultivos en material sólido (polvo) para facilitar su uso, además, aumenta la sobrevivencia de las bacterias probióticas, siendo una práctica común para extender la viabilidad en el almacenamiento, tiempo de vida útil y bajo condiciones de estrés (Anal & Singh, 2007; Chandramouli et al., 2004; Chen et al., 2017; Heidebach et al, 2012; Picot & Lacroix, 2004).

El secado por pulverización hace parte del grupo de tecnologías de microencapsulación, incluyendo los métodos de extrusión, liofilización, emulsión, enfriamiento por aspersión, entre otros (Burgain et al., 2011; Kaila Kailasapathy, 2002). No obstante, el secado por pulverización es una de las técnicas más comúnmente utilizadas en la industria alimentaria. Es un método flexible que se lleva a cabo en equipos de fácil operación que permiten el secado de productos termo sensibles sin afectar drásticamente la calidad y viabilidad microbiológica. Por lo tanto, esta es una técnica ampliamente utilizada para la encapsulación de probióticos debido a su económico costo de operación y mayor capacidad de producción (Avellone et al., 2018; Francisco et al., 2018; Lira de Medeiros et al., 2014; Rodríguez-Restrepo et al., 2017)

La microencapsulación de microorganismos del género *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* Ha sido ampliamente estudiada en matrices alimentarias, tales como chocolate (Silva et al., 2017), miel (Favarin et al., 2015) lácteos como el yogurt (Adhikari et al., 2000; Picot

&Lacroix, 2004), leche de cabra (Verruck et al., 2017), helados (Champagne et al., 2015; Noori et al., 2017), suero de queso (Ilha et al., 2015), queso (Fortin et al., 2011), además de jugos de fruta (Ding & Shah, 2008; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014; Pereira-caro et al., 2015), barras de cereales (Bampi et al., 2016) y mantequilla de cacao (Pedroso et al., 2013).

No obstante, hasta la fecha no se ha reportado un estudio donde se efectúe la inclusión de probióticos específicamente *Bifidobacterium animalis* en harina de plátano, producto que presenta una actividad de agua (a_w) reducida, condición que puede afectar la funcionalidad probiótica durante el almacenamiento, puesto que la estabilidad del producto en forma de polvo está inversamente relacionado con la temperatura y el tiempo de almacenamiento (FAO/OMS, 2006). Por esta razón, se hace necesario realizar evaluaciones de sobrevivencia de *B. animalis* una vez incorporado en la matriz alimentaria (Harina de plátano Dominico Hartón) durante el almacenamiento y las condiciones de estrés causadas por temperatura, ácidos estomacales y sales biliares (Dianawati & Shah, 2011; Liserre et al., 2007), parámetros que nos permitirán inferir la funcionalidad del probiótico después de su preparación y consumo. Evaluaciones que apoyan las declaraciones de propiedad de salud relacionadas al consumo de probióticos sobre etiquetado nutricional y rótulo, documentadas en el Artículo 22 de la resolución 288 de 2008 por el INVIMA (Ministerio de la protección Social, 2008).

En el marco de estas temáticas se ha consolidado un trabajo colaborativo con la Universidad Católica de Manizales y la Universidad Nacional sede Manizales entre los grupos en Investigaciones (Investigación y Desarrollo Tecnológico para el Sector Agroindustrial) INDETSA y (Bacterias Acido Lácticas y sus Aplicaciones Biotecnológicas –Industriales) GIBALABI. El cual, tiene como propósito dar continuidad en su fase práctica al proyecto " Desarrollo y apropiación social de un producto funcional de harina instantánea fortificada-probiótica a base de plátano Dominico Hartón" según propuesta de investigación enmarcada a los objetos de estudio de la línea en Desarrollo Agroindustrial del grupo INDETSA, propuesta que tiene como uno de sus propósitos la evaluación del efecto del almacenamiento y condiciones de estrés sobre la viabilidad de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina instantánea fortificada a base de plátano Dominico Hartón.

La importancia del estudio planteado radica en que la exploración de la supervivencia del probiótico microencapsulado se efectuará en este producto con características fisicoquímicas que difieren con las demás matrices alimentarias que normalmente se utilizan para su incorporación. Por tal motivo, esta investigación permitirá el desarrollo de una alternativa nutricional, a través de la cual se pretende tener un impacto social mejorando las condiciones de desnutrición aguda en la población infantil (niños mayores de dos años) en la capital de Caldas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento y de las condiciones de estrés sobre la viabilidad de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina instantánea fortificada a base de plátano Dominico Hartón (Musa AAB SIMMONDS).

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la viabilidad de almacenamiento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina instantánea fortificada a base de plátano Dominico Hartón.

- Establecer el comportamiento del recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina instantánea fortificada a base de plátano Dominico Hartón, frente a diferentes condiciones de temperatura de preparación para consumo del producto, pH y sales biliares

3. REFERENTE TEÓRICO

3.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

En las últimas décadas, el campo de la producción alimentaria debido a la demanda de los consumidores ha evolucionado considerablemente. Además, el concepto de nutrición gracias a la constante investigación en áreas a fines, establece prioridades que no se centran solo en satisfacer las necesidades biológicas alimentarias del hombre debido a carencias de nutrientes; más bien se enfoca en prevenir enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas con la nutrición y sus efectos en el desarrollo psicomotor y cognitivo, metabolismo, crecimiento, inmunidad, entre otros (Olagnero et al., 2007).

Los consumidores modernos cada vez están más conscientes en el cuidado de su salud y bienestar personal, razón por la que buscan estrategias nutritivas de productos en el mercado que sean capaces de prevenir enfermedades que pueden derivarse de factores como el aumento del estrés debido a agitados estilos de vida y posibles cambios en los hábitos alimenticios y dietéticos (Páez, 2013; Siró et al, 2008). Siguiendo esta tendencia, los consumidores cada vez más se exponen a abundante información sobre las características saludables de los alimentos, específicamente de aquellos que promueven reducir el riesgo de padecer alguna enfermedad y/o beneficiar diversos procesos fisiológicos.

En este sentido, los alimentos funcionales juegan un papel destacado; un alimento funcional *es un suplemento alimenticio que contiene un componente nutritivo y no nutritivo que afectan funciones del organismo de una manera positiva y específica, aportando beneficios psicológicos y fisiológicos, cuyas acciones benéficas justifican su carácter funcional o incluso saludable* (Doyon & Labrecque, 2008; Joseph et al., 2018; Roberfroid, 2002). No obstante, este concepto aún no está definido legalmente en la comunidad científica mundial (Silveira et al., 2016), a excepción de Japón, país en el que se utilizó por primera vez el término “alimento funcional” hace aproximadamente 3 décadas para productos alimenticios fortificados con constituyentes especiales que poseen efectos fisiológicos ventajosos, concepto dado debido a la necesidad de reconocer estos productos cuando los estudios demográficos mostraron una población envejecida con expectativas de calidad de vida y con necesidad de atención médica costosa (Mark-Herbert, 2004; Stanton et al., 2005).

La evolución de los hábitos nutricionales ha variado a través del tiempo, pero siempre ha estado soportada con el criterio básico de mantener la salud (Cortés et al., 2005). En el pasado, el poder funcional de los alimento en la salud fue considerado de gran importancia dado su valor dietético natural. En la actualidad, las evidencias sobre ellos apoyan la

hipótesis de que una alimentación adecuada puede desempeñar un papel fundamental en la modulación de funciones fisiológicas que favorecen nuestra salud. Para el desarrollo futuro se estima que la ingeniería genética y la comprensión de la nutrición molecular serán las principales tecnologías en expansión capaces de cambiar la oferta alimentaria hacia una clase de nutrición personalizada (Cabañas, 2015; Corté et al., 2005).

Actualmente, tanto en Japón como en Europa el mercado del sector alimentario está dominado por productos para la salud intestinal, en particular los probióticos(Siró et al., 2008). Un estudio en el mercado global de los probióticos estimó un crecimiento anual del 7%, impulsado particularmente por un constante aumento en la solicitud de consumidores asiáticos y europeos, con un pronóstico de 48 mil millones de dólares en los próximos cinco años (Foligné et al., 2013; Klein et al., 2010). El crecimiento constante del mercado de este tipo de alimento funcional se expande de manera paralela con la necesidad que exponen los consumidores para la prevención, conservación y mantenimiento de la salud (Kapsak et al., 2011; Van Der Zanden et al., 2014). No obstante, se está reconociendo que no todas las bacterias probióticas son iguales. Ahora ya no se trata solo de proporcionar cantidades suficientes de bacterias viables en un producto, el éxito dependerá de una buena calidad en la investigación por parte de la industria alimentaria para encontrar la cepa funcional más segura, además de la dosis óptima, el modo de administración y la evaluación de sobrevivencia bajo condiciones de estrés. Planteando la necesidad de generar nuevos métodos, optimizando así la producción, conservación, seguridad, funcionalidad y calidad de los mismos (Dekker et al., 2007).

3.2. PROBIÓTICOS, ANTECEDENTES Y DEFINICIÓN

Diversas fuentes médicas y populares han indicado el primer uso de probióticos en la historia, en el año 2000 a de C los primeros fabricantes de alimentos descubrieron por primera vez como preservar leche por períodos más prolongados, transformando la leche en productos lácteos fermentados mucho antes de conocer la existencia de bacterias y levaduras, agentes que fueron descubiertos tiempo después por Leewehoek en 1683 y Louis Pasteur en 1857, quienes identificaron y aislaron las bacterias ácido lácticas de la leche (Ozen & Dinleyici, 2015).

Estas bacterias han cambiado paulatinamente el panorama de la nutrición y la alimentación, hasta la fecha se han considerado parte fundamental en la dieta de las personas debido a sus grandes beneficios(Health, 2017; Smarkusz et al., 2017). Los beneficios de consumir alimentos probióticos son abundantes y notorios en individuos con deficiencias en el metabolismo intestinal, como el tránsito lento, síndrome de colon irritable y estreñimiento,

enfermedades donde se ha reportado que la ingesta de estos agentes biológicos genera cambios positivos en su salud (Principi et al., 2017).

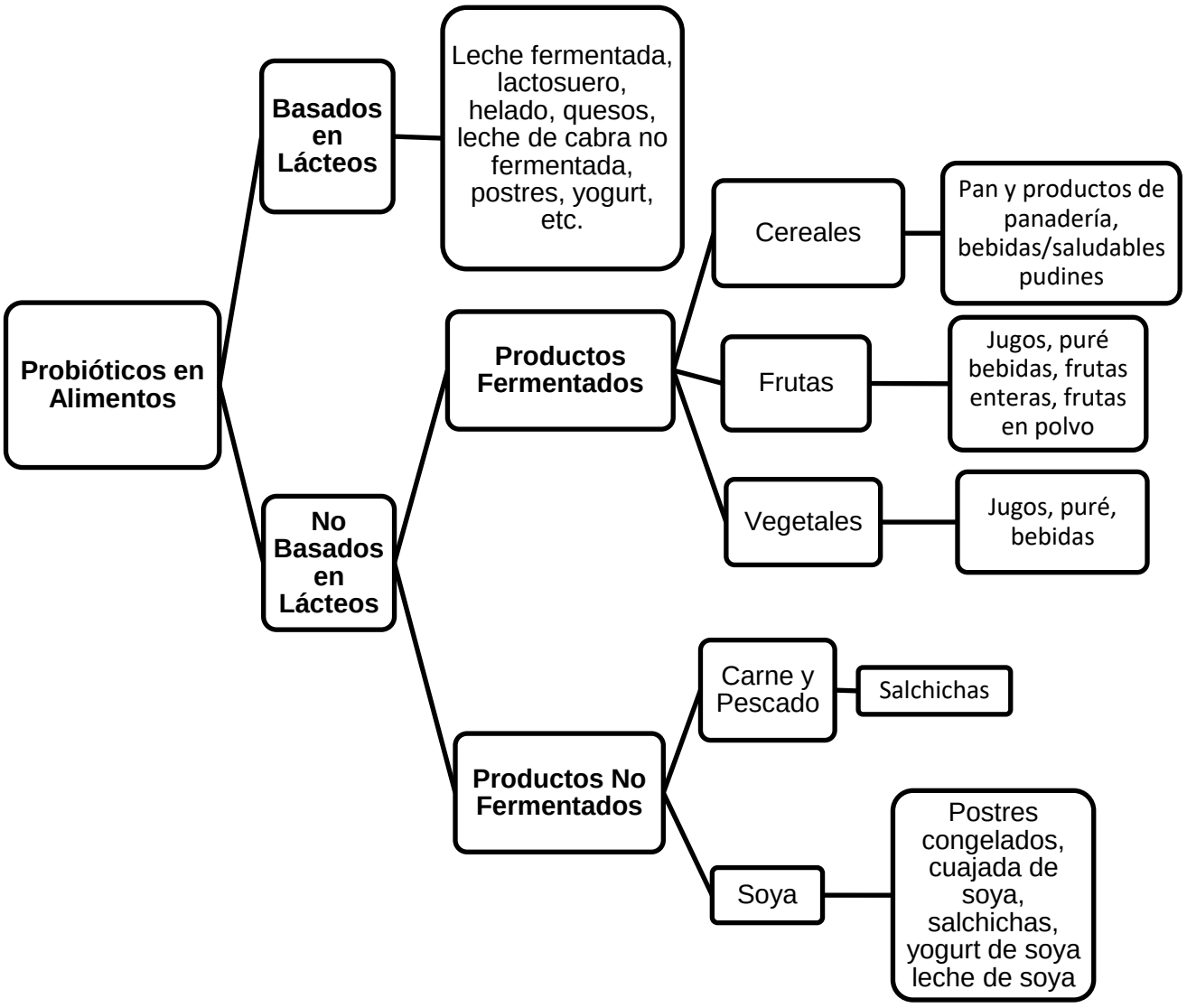
La definición de probióticos está en un progreso constante, puesto que esta incluye microorganismos vivos como comensales del tracto digestivo humano, sus productos secretados como enterotoxinas, cepas genéticamente modificadas y productos derivados de la biotecnología (Paganelli et al., 2002). Todos estos organismos y sustancias colectivamente reciben el nombre de probióticos. Sin embargo, el Panel de Expertos encargado en 2001 por la Organización de las Naciones Unidas y la Agencia de Alimentos y Agricultura con el apoyo de la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS por sus siglas en inglés), definieron el término probióticos como **"microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas otorgar un beneficio de salud al huésped".** Consecuentemente, diversos géneros pueden considerarse potencialmente probióticos (*Bacillus subtilis, Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae (boularii, Enterococcus,* entre otros), sin embargo, los géneros más usados son *Bifidobacterium* y *Lactobacillus,* debido a sus propiedades intrínsecas de resistencia en el tracto intestinal y su capacidad de adherirse a los enterocitos, se incluyen comúnmente en productos lácteos fermentados (Adhikari et al., 1299; Forssten et al., 2011; Samona & Robinson, 1994; Shah, 2000). No obstante, el consumo de estos alimentos probióticos puede generar inconvenientes en consumidores con intolerancia a concentraciones altas de grasa y lactosa, lo que hace inaccesible la ingesta de probióticos a través de estos productos.

En consecuencia, existe un aumento actual en la demanda de alimentos no lácteos con probióticos, como suplementos dietarios en forma de tabletas, preparaciones liofilizadas y cápsulas (Michael de Vrese et al., 2008; Schrezenmeir, 2001). No obstante, algunos estudios muestran que las cepas reconocidas como probióticos también se encuentran en sustratos fermentados no lácteos (Vijaya Kumar et al., 2015). Puesto que la fermentación debido a la necesidad de cultivos mixtos tales como levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL), ha sido utilizada para mejorar o modificar la calidad y el sabor de frutas, cereales, legumbres, verduras y carnes. Por lo tanto, los alimentos tradicionales fermentados son abundante fuente de microorganismos, en su mayoría con características probióticas (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

Para un probiótico se requieren dos esenciales áreas de funcionalidad. Por un lado está el beneficio de salud en el consumidor y por el otro las propiedades tecnológicas que incluyen: seguridad, estabilidad genética, capacidad de ser producido a gran escala, estabilidad en el producto (mantenimiento de la viabilidad), contribución al sabor (alimentos fermentados) (Forssten et al., 2011). No obstante por definición estos deben ser viables en el momento del consumo, los probióticos no viables, no necesariamente carecen de efectos para la salud

(Lahtinen, 2012); estudios indican que se debe administrar una cantidad adecuada, considerándose como regla general un límite inferior a 10^6 – 10^9 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por dosis. Esto puede ser diferente en relación al efecto en la salud, las condiciones de estrés e incluso la matriz, razón por la que este aspecto es considerado un desafío tecnológico en la industria alimentaria (Ouwehand, 2017).

Tabla 1. Clasificación y tipos de alimentos probióticos. Fuente: Vijaya Kumar et al., (2015).



3.3. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS:

La *mayoría* de los microorganismos probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium.* Sin embargo, otras bacterias y algunas levaduras pueden tener también propiedades probióticas (Tabla 2). Los *lactobacillus y bifidobacterias* son bacterias grampositivas generadoras de ácido láctico que constituyen una parte importante del microbiota intestinal normal en humanos y animales.

Tabla 2. Microorganismos usados como probióticos.

Lactobacillus[a]	*Bifidobacterium*	Otros
Grupo *L. acidophilus*	*B. longum*(BB536)	*Enterococcus fecalis*[b]
***L. acidophillus*(LA-5)**	*B. longum*(SP 07/3)(SBT-2928)	
L. crispatus	*B. bifdum*(MF 20/5)	*Enterococcus faecium*[c]
***L. johnsonii (*LA1)**	*B. essencis*	*Streptoccoccus thermophilus*
***L.casei* (Immunitas®)**	*B.breve*	*Propionibacteria E.coli*
L. delbrueckiissp. Bulgaricus	*B. lactis (Bb-02/ B94)*	*Sporo lactobac. Inulinus*[c]
***L. fermentum*(RC-14)**	*B. animalis (B. animalis ssp. Lactis*BB-12*)*	Esporas de *Bacillus cereus*
***L. heveticus (*B02)**	*Bifidobacterium adolescentIs* (ATCC 15703)	*Saccharomyces boulardii*[d]
***Lactobacillus reuteri* (SD2112/MM2)**	*Bifidobacterium* (CRL 431)	*Bacillus lactis*(DR10)
***Lactobacillus rhamnosus* (GG/GR-1/LB21)**	*B.infantis* (ShirotaInmunitas®)	*Lactococcuslactis*
***Lactobacillus plantarum*(299v/Lp01)**		
Lactobacillus salivarius		

a. Entre paréntesis se presentan los nombres comerciales de las cepas
b. Utilizado en preparaciones farmacéuticas
c. Utilizado principalmente en alimentos para animales
d. Re- clasificado como cepa *S. cerevisiae.*

Fuente: Michael de Vrese & Schrezenmeir, (2008), Soccol C.M. et al., (2013)

3.4. BENEFICIOS DE LOS PROBIÓTICOS EN LA SALUD:

El tracto gastrointestinal humano está colonizado por un ecosistema complejo de microorganismos. Las bacterias intestinales presentan constantemente una coevolución simbiótica con su hospedero, estas tienen numerosas e importantes funciones, un ejemplo es la producción de nutrientes para su huésped, la modulación de una respuesta inmunológica normal para la prevención de infecciones causadas por patógenos intestinales. En consecuencia, es necesario lograr mantener y restaurar un equilibrio favorable en la actividad y el ecosistema de microorganismos en el tracto gastrointestinal, para mejorar la condición de salud del anfitrión (Markowiak et al., 2017).

Actualmente hay una creciente evidencia de que las cepas probióticas seleccionadas pueden proporcionar beneficios para la salud de sus huéspedes humanos. No obstante, solo un pequeño porcentaje de médicos conocen los probióticos o comprenden su posible aplicabilidad a la atención del paciente. Razón por la que estos aún no forman parte del conjunto de tratamientos clínicos para el manejo y la prevención de enfermedades (Reid et al., 2003).

En la última década se ha observado una nueva era en la ciencia médica con un mayor uso de probióticos benéficos para la salud especialmente en enfermedades diarreicas (Geoffrey et al., 2011), enterocolitis necrotizante en recién nacidos de muy bajo peso al nacer (Aceti et al., 2015; Johnson et al., 2016; Yang et al, 2015), tratamiento de afecciones entéricas inflamatorias como el síndrome de colon irritable (Didari et al., 2015), tratamiento de intolerancia a la lactosa(Misselwitz et al., 2013; Pakdaman et al., 2016), prevención de cáncer (Azcárate-peril et al., 2011; Yang et al., 2016), alergias en niños (Paganelli et al., 2002), prevención de infecciones y mejoras en el crecimiento infantil generado por la deficiencia de nutrientes, puesto que se ha demostrado que mejoran la absorción de ciertos nutrientes como la vitamina B12, calcio y zinc(Sazawal et al., 2010). Además, se ha demostrado que el uso de terapias para erradicar la bacteria *Helicobacter pylori* (causante de úlceras estomacales e infecciones) mediante la ingesta de algunos probióticos(Pacifico et al., 2014; Zhang et al., 2015).

Teniendo en cuenta su papel en la inhibición de algunas enzimas bacterianas, los probióticos pueden reducir el riesgo de carcinoma colorrrectal en animales, efecto que no se ha confirmado en humanos mediante ensayos clínicos (Markowiak et al., 2017); los beneficios asociados con el uso de los probióticos se relacionan además con el efecto positivo sobre el sistema urogenital (tratamiento y prevención de las infecciones del tracto urinario y la vaginitis bacteriana). No obstante, el manejo de las infecciones urinarias logrado con el consumo de probióticos es menos pronunciada en comparación a la reducción del nivel de colesterol, niveles que se ven reducidos debido al consumo de productos lácteos que

contiene probióticos, efecto útil en la prevención de diabetes, enfermedades cardiovasculares y obesidad (Cho & Kim, 2015; Simons et al., 2006).

Si bien existe un número considerable de estudios sobre el uso de probióticos en diversas enfermedades humanas, la calidad de la evidencia para su uso es variable. La literatura sobre probióticos para beneficios en la salud, a menudo se ha centrado en los estados de enfermedad y en modelos animales. Sin embargo hace falta evidencia para muchas indicaciones, una de estas es demostrar la asociación entre alimentos probióticos y sus beneficios como resultados de investigación clínica en la población humana, aunque este objetivo sigue siendo aún un verdadero desafío para establecer la credibilidad en la promoción y prevención de la salud, no socaba el inmenso poder de los probióticos para promover la salud humana mediante la protección y control de enfermedades. Además de ser una muy buena alternativa para generar valor agregado a diversos alimentos con perspectivas nutricionales (Grover et al., 2012).

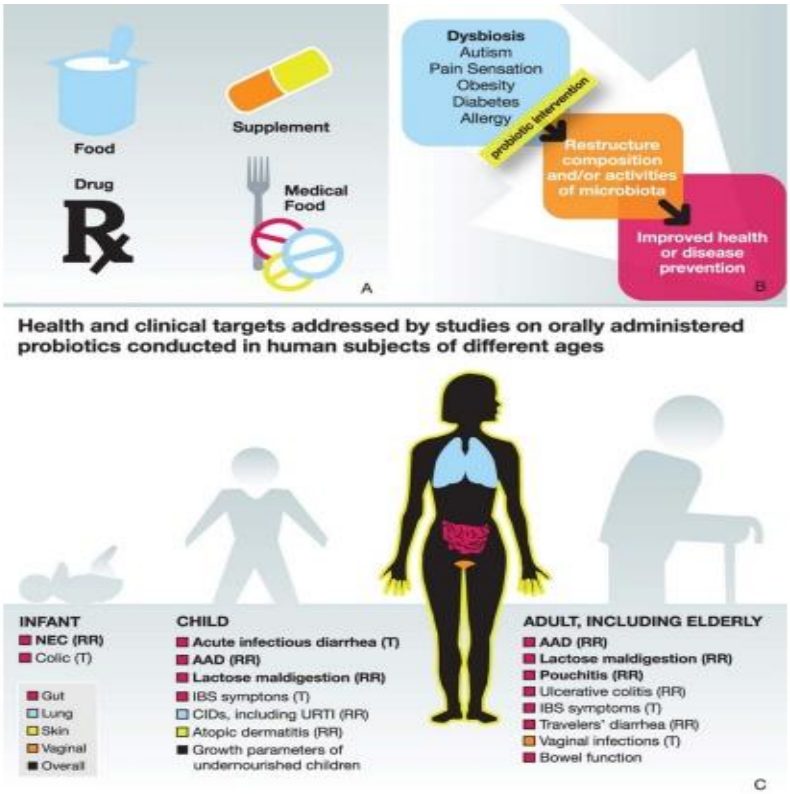


Figura 1: Alcance de productos y usos probióticos. Fuente: Sanders M,E. et al, (2015).

3.5 CULTIVO DE PLÁTANO

El plátano considerado como el cuarto cultivo más importante del mundo, es una planta herbácea monocotiledónea, perteneciente al género Musa; a la familia Musaceae y al orden de las zingiberáceas, originario del sudeste asiático y traído a nuestro país por los españoles del siglo XVI, es considerado un producto básico en la canasta familiar que genera numerosos ingresos y fuentes de empleo en países del trópico y subtrópico (DANE, 2014). El grupo de musáceas Plantín (AAB) que cuenta con las variedades Hartón, Dominico Hartón y Dominico como las más representativas, son considerados los más exportados y los más utilizados en procesos agroindustriales; estos aportan el 25.4% de la producción mundial, donde Cuba y Colombia aportan respectivamente el 4.9 y 3.1 MT (Castellanos, 2011). Es así como entre e los cultivos permanentes y semipermanentes que siguen en importancia en el Departamento de Caldas es el plátano, especialmente las variedades de plátano Dominico-Hartón, Hartón ya que han demostrado buena adaptación a sus condiciones agroecológicas (Gobernación de caldas, 2006).

3.5.1. HARINA DE PLÁTANO Y SUS PROPIEDADES NUTRICIONALES

El plátano presenta gran importancia desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y de importancia socieconómica. En el contexto comercial, predomina la produción y distribución del fruto fresco, aunque un alto volumen del producto se comercializa a bajo costo debido a que el 18.3% de este se deteriora por daños mecánicos al ser manipulados inadecuadamente y un 25.9% corresponde a daños por causas patológicas (Duque, A.L., y Bohorquez, 2001).

Las pérdidas de plátano fresco mencionadas, establecen la necesidad de generar estudios que articulen el cultivo y la poscosecha del plátano con estrategias relacionadas al aprovechamiento agroindustrial tanto de los frutos que no son comercializados como de los residuos de poscosecha, por esta razón la búsqueda de alternativas de diversificación, han permitido contribuir al desarrollo de la cadena productiva del plátano, ofreciendo posibilidades de utilidad de cada uno de sus subproductos, razón por la que se han reportado matrices alimentarias para humanos en la elaboración de cremas, tortas, helados, batidos, purés, salsas, y en alimentos concentrados para la alimentación animal (Delgado Fernández, 2017; Quiceno., et al. 2014).

Una de alternativas para el aprovechamiento de los subproductos es la obtención de harinas para platos típicos de alimentación básica como: sopas, purés, tortillas y productos de panificación (Bustillo, M.V., et al. 2018; Espitia-Pérez., et al. 2013; Flores Navarrete. 2018; Mazzeo, Alzate G, & Marín, 2008). Es así como el común denominador en la elaboración de cada uno de estos productos es el desarrollo de alimentos con caraterísticas altamente

nutritivas y funcionales.

Por esta razón, el desarrollo de investigaciones para obtener un valor agregado en los productos autóctonos y típicos tanto a nivel nacional como departamental cada vez va en aumento (Mazzeo- Menese., et al. 2010). Estudios enfocados en el aprovechamiento industrial de los residuos de poscosecha del plátano verde Dominico Hartón (*Musa AAB SIMMONDS),* buscan mejorar la competitividad de la cadena productiva de este fruto y aprovechar las características altamente nutricionales que aporta.

El plátano presenta muchos beneficios para la salud debido a su gran aporte principalmente hidratos de carbono complejos, fibra dietética total gracias al contenido de almidón retrogrado, es decir que actúa como fibra ayudando de esta manera a la digestibilidad ya que sus almidones son protectores de la mucosa gástrica y tienen un efecto positivo en el control de gastritis, acidez estomacal y úlceras. Además, es rico en vitamina C, vitaminaB6, magnesio, hierro, potasio y fósforo (Araya-Quesada, Y., *et al.,* 2014). Por lo tanto, el alto contenido de estas vitaminas en el plátano verde, ayuda al correcto funcionamiento del sistema inmunitario y el aporte de potasio de este fruto estimula las contracciones musculares por lo que se recomienda que deportistas lo ingieran (Qu et al., 2018).

Estudios realizados establecen a la harina de plátano como un producto funcional, con propiedades que ayudan en el fortalecimiento del cuerpo, contribuye al beneficio del metabolismo en general (Clemente, 2008). Por lo tanto, generar un alimento sano y nutritivo a base de tecnológica con enfoque a la elaboración de harina de plátano verde, debe contar con una cocción, y un proceso térmico de deshidratación, posee cierta relevancia frente a otros sistemas de conservación de alimentos. Esta conservación, es considerada como una medida estratégica puesto que es uno de los procesos más utilizados debido a que aumenta el tiempo de vida útil y es una ventaja en cuanto a costos de almacenamiento y transporte, (Pacheco, 2001).

3.5.2. Estimación de la Vida Útil en la Harina de Plátano Dominico Hartón:

La vida útil se define como el período de tiempo en condiciones definidas de almacenamiento, después de su fabricación o empaque, para lo cual un producto alimenticio permanecerá seguro y será apto para su consumo. Es así como durante este período, la matriz alimentaria deberá conservar sus características físicas, químicas o microbiológicas deseadas y, cuando corresponda, cumplir con cualquier declaración de la información nutricional cuando se almacene de acuerdo con las condiciones recomendadas (Dominic, M. 2002).

Es obvio, por lo tanto, que la vida útil es un requisito muy importante de todos los productos alimenticios fabricados y procesados. Cada producto alimenticio debe tener una vida útil microbiológica y una vida útil fisicoquímica porque todos los alimentos se deterioran, aunque

a diferentes velocidades. En última instancia, la vida útil de un producto alimenticio está destinada a reflejar el efecto general de estos diferentes aspectos, idealmente bajo un conjunto de condiciones de almacenamiento específicas. Debido a esto, el estudio de la vida útil de los alimentos a menudo solo puede tratarse correctamente mediante el empleo de recursos multidisciplinarios (Olivares-tenorio, Dekker, & Boekel, 2017).

Al establecer el tiempo de vida útil de la harina instantánea fortificada a base de plátano Dominico Hartón, respecto de la concentración de *B. animalis* microencapsulado, se tendrá un modelo aplicable para la determinación de vida útil relacionada con la designación probiótica del producto (harinas precocidas y cereales). Igualmente, la evaluación de las temperaturas de preparación y la resistencia a condiciones extremas de pH y sales biliares permitirán explorar una metodología de trabajo para evaluar la supervivencia del probiótico posterior al consumo del producto, la cual se podrá ofertar como servicio a empresas del sector que lo requieran.

Debido a que hasta la fecha no se han reportado estudios a nivel nacional donde se establezca este enfoque, el intento de dar una visión en el sector académico e industrial sobre los atributos de calidad y los cambios que puedan afectar la vida útil de la harina de plátano incorporada con un microorganismo probiótico permitirá realizar más estimaciones precisas basadas en las perspectivas del producto y del consumidor.

3.6. ANÁLISIS BIBLIOMÉTRICO SOBRE MICROENCAPSULACIÓN EN MATRICES ALIMENTARIAS.

3.6.1 Metodología, fuente de datos y análisis

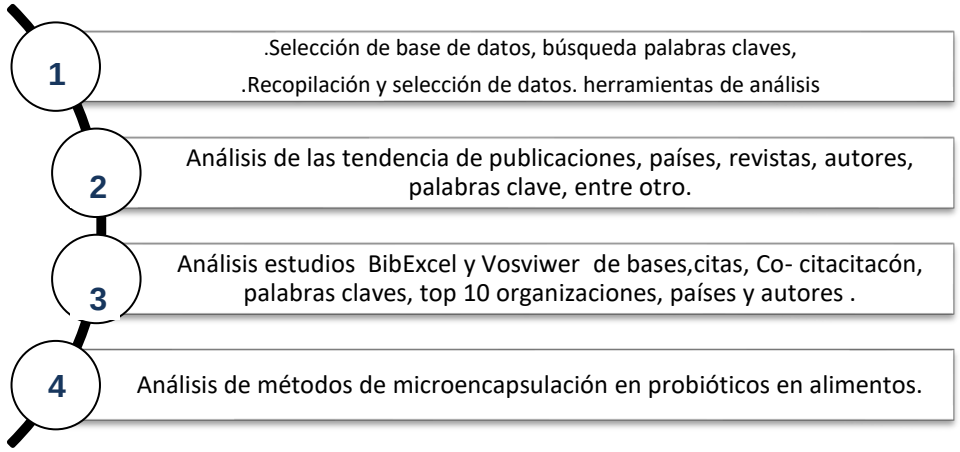


Figura 2. Marco de Investigación para análisis bibliométrico.

El análisis bibliométrico, es una herramienta poderosa, considerada como un eslabón fundamental para los procesos de investigación. Esta disciplina se ha categorizado como una herramienta fuerte y ampliamente preferida debido a la flexibilidad y capacidad que brinda para examinar datos de publicaciones y así indicar y evaluar la producción científica de diversas organizaciones (Escorcia, 2008; Filser et al., 2017; Geng et al., 2017). Estos análisis son por lo tanto valiosos, puesto que ofrecen información objetiva de forma comprensible y concisa, sin importar cuán amplio sea el campo de investigación analizado (Filser et al., 2017)

En este estudio se realizó un análisis bibliométrico en publicaciones del 2001 hasta 2017 sobre "microencapsulación en probióticos". Los datos para el análisis bibliométrico se recopilaron utilizando una de las principales fuentes de datos, utilizado comúnmente en análisis biliométricos: Web of Science (Wos) de Thomson Reuters. Como indicador de calidad de las publicadas, se tuvo en cuenta el índice h, considerándose este como un balance entre el número de publicaciones y las citas realizadas a estas(Geng Y. et al., 2017), la influencia de los autores y el enfoque cuantitativo en el área de investigación y los países más productivos en el estudio de microencapsulación también fue necesario evaluarlo mediante la información suministrada por la base de datos(Mongeon & Paul-Hus, 2016).

3.6.2 Fuente de datos

Web of Science se encuentra catalogada como una de las bases de datos en línea con más 18.000 revistas líderes mundiales en las artes, humanidades, ciencias sociales, básicas y de la salud, además está equipada con herramientas útiles e inteligentes que permiten la visualización básica y análisis estadísticos de las investigaciones publicadas, proporcionando un registro completo de la información necesaria para la investigación de los sistemas de información que son relevantes para efectuar revisiones bibliométricas mediante herramientas de software para su posterior análisis. Una vez seleccionada la base de datos, fue crucial definir con precisión el tema de investigación de interés para identificar las palabras claves más apropiadas para una búsqueda adecuada. Para la recopilación de información relevante, Web of Science ofrece diversas opciones de búsqueda tales como palabras claves, referencia citada y búsqueda avanzada (autores, tílulos de estudios, DOI, organización, país entre otros). En este estudio la opción con "palabras clave" fue efectuada para tal fin, la selección de estas se muestra en la tabla 2.

Tabla 3. Ecuación de búsqueda con palabras claves en Web of Science

Tipo de palabras clave	Palabras claves seleccionadas	Tipo de búsqueda	Total publicaciones	Total Refinado
Búsqueda principal de palabras claves	microencapsulation and probiotic* or "microencapsulation and lactobacillus" or" microencapsulation and Bifidobacterium" or "microencapsulation and enterococcus" or "microencapsulation and saccharomyces" or "microencapsulation and peptococcus"	Búsqueda Básica	586	582

El período de búsqueda se fijó a partir del año 2001 a 2017, obteniendo una colección de resultados inicial de 582 de documentos, entre ellos el 88,5% corresponde a artículos originales, como la principal contribución para el tema de interés "Probióticos y microencapsulación en la industria alimentaria". Aproximadamente el 12% restante corresponde a revisiones, artículos de procedimiento, resúmenes y capítulos de libros (Figura 2). Debido a que los artículos de investigación proporcionan información sobre las afiliaciones, países, organizaciones y entidades, solo las revistas y publicaciones en inglés, español, francés, alemán y portügues fueron consideradas para su análisis. Por lo tanto, una vez filtrada la información mencionada, las publicaciones fueron procesadas en diversos software (Vosviwer, Bibexcel) para su respectivo análisis bibliométrico.

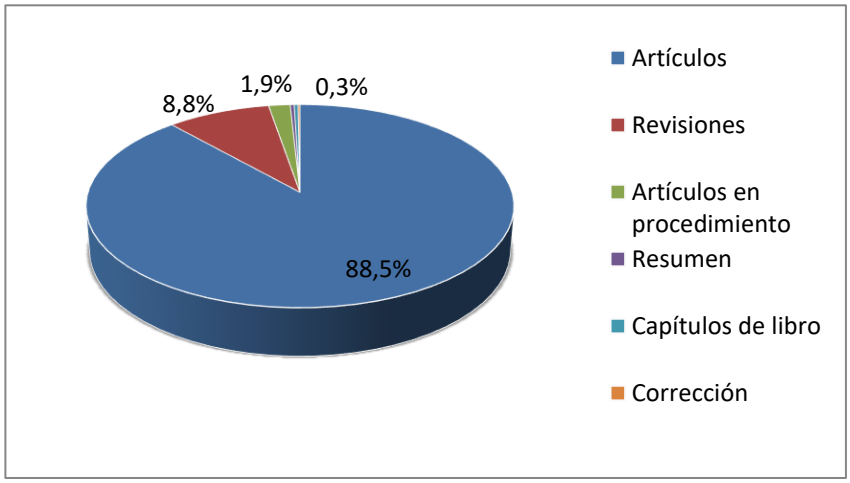


Figura 3. Tipo de documentos para el tema de interés “Probióticos y microencapsulación en la industria alimentaria”.

3.6.3. Herramientas de Análisis

3.6.3.1. Vosviwer

En este estudio el programa VOSviewer se usó para construir y visualizar las publicaciones suministradas en la base de datos Web of Science, debido a que permitirá el desarrollo de mapas Bibliométricos basados en la Co- ocurrencia de datos (mapas basados en la distancia y en gráficos), lo que permitirá una fácil identificación de elementos relacionados.

3.6.3.2. Bibexcel

En este estudio, bibexcel se ha catalogado como una herramienta bibliométrica útil para extraer información estadística general de publicaciones relacionadas, este software por lo tanto genera diversos archivos en el proceso de análisis.

3.6.4. Tendencia de la Investigación

El comportamiento del número de publicaciones por año relacionado con la microencapsulación de probióticos y su aplicación en la industria alimentaria, se muestra en la figura 3. Los resultados demuestran que las publicaciones anuales presentan un crecimiento directamente proporcional, al igual que el número de citas en este campo por año, este resultado puede deberse al creciente interés mundial en la producción de alimentos funcionales que contengan bacterias probióticas encapsuladas, debido a sus beneficios para la salud**.** Una vez obtenido este resultado, se hace evidente el comportamiento general de publicaciones en esta área, puesto que se observa claramente la división de dos etapas, una tendencia relativamente lenta entre los años 2001- 2004 (con una tasa anual de crecimiento de 3.1%) y un lapso con fase exponencial rápida del 10.8%). Razón por la que es evidente el interés sobre este tema en la actualidad.

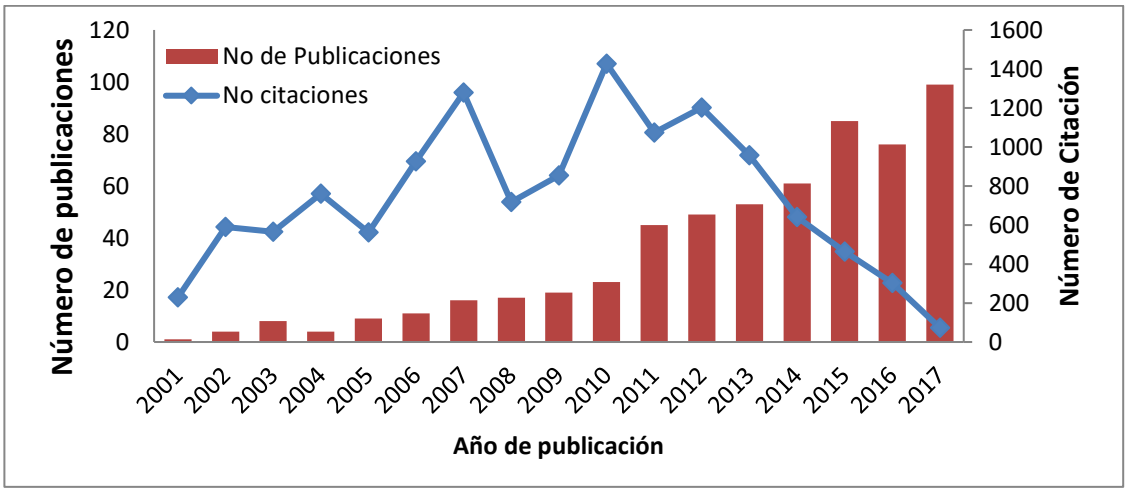


Figura 4. Total, número de publicaciones y Total citaciones para 2001 a 2017.

3.6.5. Frecuencias de Países con Mayor Publicación:

En la figura 4 se muestra los países más productivos según una variedad de indicadores como el número de publicaciones, el número de artículos involucrados en las principales instituciones de cada país. Siete de estos son China, Brasil, Canadá, Australia, Irán, India y Estados Unidos. Siendo Australia el primer y único país en el que se reportó número de publicación en el año 2001, seguido de Brasil quien inició la publicación de artículos relacionados en el tema para el año 2002. No obstante, a partir del año 2003 se evidencia la mayor producción en Canadá con un reporte de indicadores para este año. Cabe resaltar que la institución Agri & Agri Food Canadá ha sido la pionera en este país en temas de productividad científica, seguido de la Universidad de McGill y la Universidad Laval con índices H de 5, y un número de publicaciones de 10 aproximadamente.

Como se muestra en la Figura 4, entre las 10 instituciones de investigación más productiva, dos son de Canadá, tres de Brasil, una de Inglaterra, Irán, Australia y Portugal. Teniendo en cuenta que la proporción de artículos involucrados, se delimita a partir del año 2012 un incremento exponencial con un número de publicaciones que va desde 20 artículos para el años 2012 a 65 aproximadamente para el año 2017, lo que indica el aumento de interés a nivel mundial en relación a probiótico y su microencapsulación o no en matrices alimentarias, países como Brasil, Australia, Canadá Irán, India, China Estados unidos han sido los responsables en generar el mayor número de publicaciones a durante estos años.

Esto indica que el rápido desarrollo de la bibliografía relacionada a la microencapsulación en probióticos fue impulsado en parte por países altamente productivos. El rápido aumento

de las publicaciones totales implica que se ha prestado mucha más atención a la investigación en esta área en los últimos años en Canadá, Brasil, China e Irán. Brasil experimentó un crecimiento espectacular en 2014 y llegó a ser el país con uno de los mayores índices H (Aproximadamente 10) evidenciado en la Universidad Estadual Campinas.

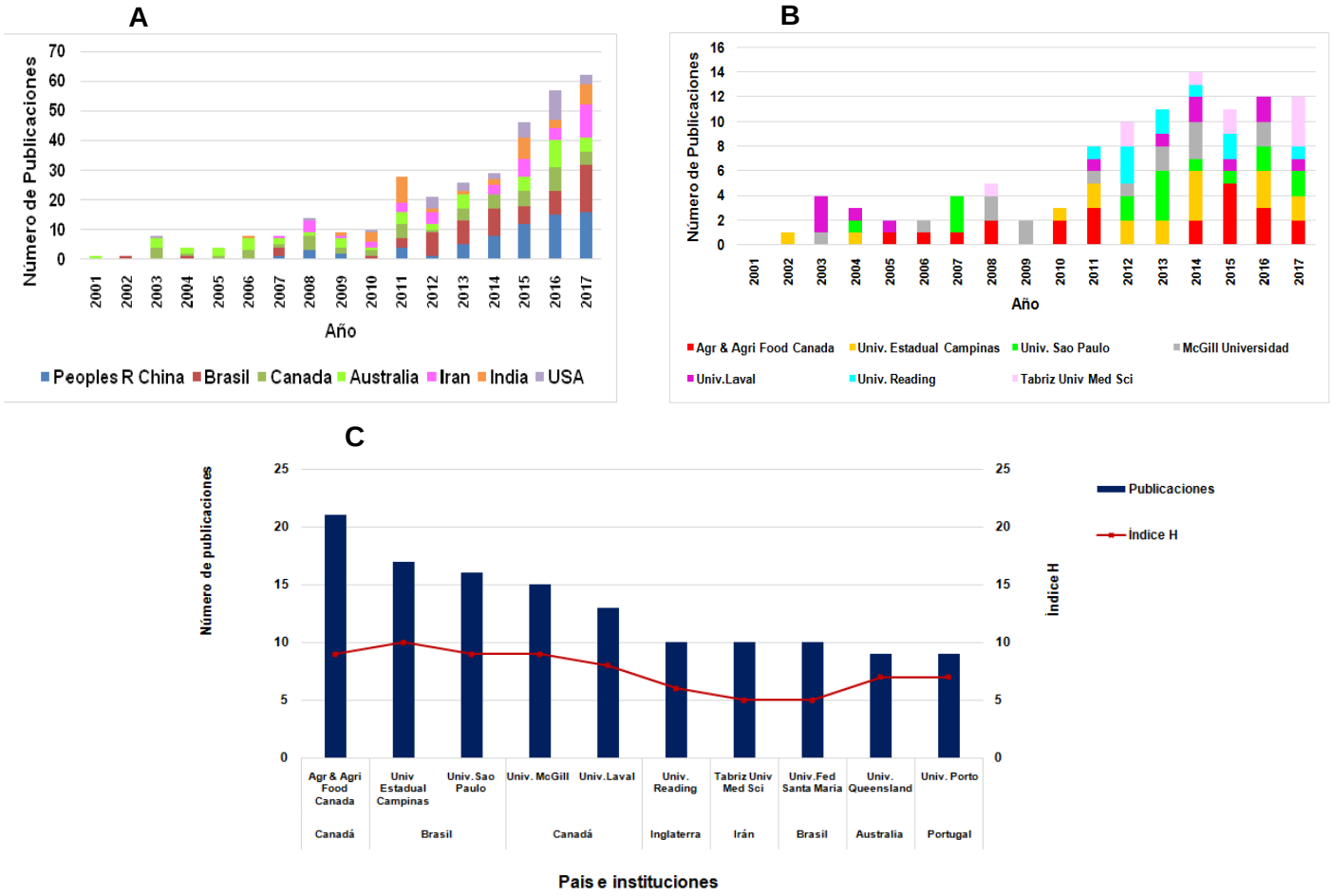


Figura 5. Número anual de publicaciones en relación a los 7 países más productivos. **A.** Países con mayor número de publicaciones por año (2001 a 2017). **B.** Instituciones con mayor número de publicaciones por año (2001 a 2017). **C.** Países e instituciones de acuerdo a su número de publicación, Índice H y Total de Citaciones.

3.6.6. Autores

Se reconoció un total de 1823 autores que realizaron sus contribuciones a este tema, resaltando que el número de publicación mínima reportada fue de 9 artículos. Los autores clave en la temática de microencapsulación en probióticos, incluyendo el número de

publicaciones y el índice h se evidencian en la tabla. 3. El índice h reportado para cada autor se obtuvo de la base de datos Web of Science, ésta se reportó con el propósito de medir la productividad y el impacto en investigación de cada autor, en este orden de ideas el autor Shah N.P. con 9 publicaciones y un índice- h de 8 fue el más productivo, seguido de Prakash, S con un índice –h de 8 y un total de 12 publicaciones.

Tabla 4. Autores clave en Autores claves en Microencapsulación de Probióticos

#	Autor	Pubs[a]	*h*-index	País	#	Autor	Pubs[a]	*h*-índex	País
1	Shah,NP	9	8	Australia	**11**	Rodrigues , D	6	6	Portugal
2	Prakash, S	12	8	Canadá	**12**	Bhandari, B	8	6	Australia
3	Grosso, CRF	13	8	Brasil	**13**	Khutoryanskiy, VV	8	6	Reino Unido
4	Amaral, MH	7	7	Portugal	**14**	Soukoulis, C	7	6	Reino Unido
5	Gomes, AM	7	7	Portugal	**15**	Sousa, S	6	6	Portugal
6	Costa, P	7	7	Portugal	**16**	Charalampopulos, D	8	6	Reino Unido
7	Freitas, AC	7	7	Portugal	**17**	Champagne, CP	13	6	Canadá
8	Favaro-Trindades,CS	13	7	Brasil	**18**	Mortazavian, AM	7	6	Irán
9	Pintado, MM	7	7	Brasil	**19**	Lacroix, C	6	6	Suiza
10	Silva, JP	6	6	Portugal	**20**	Kailasapathy, K	8	6	Australia

[a]Publicación (Pubs): total número de publicaciones de un autor

En la figura 6. Se evidencialos 10 principales autores productivos según una variedad de indicadores como el número total de publicaciones, el número de citaciones involucradas y su índice H. Dos de estos diez son de Brasil, siendo estos los pioneros con un número de publicación de 13 y con un número de citaciones entre 300 y 400 aproximadamente, debido a la cantidad de artículos publicados por estos dos autores, Brasil se consolida en el primer puesto de países con mayor producción, seguido de Canadá con un total de dos autores Champagne, CP (Total de Citaciones de 400 aproximadamente) y Prakash, S. (Total de Citaciones de 200 aproximadamente). Cabe resaltar que el autor con mayor número de citaciones (800) se es Bhandari, B. Lo que consolida al país de Australia como el país más citado.

Por lo tanto, Brasil, Canadá y Australia son los países más productivos con el mayor número en todos los indicadores, lo que señala su posición de liderazgo en términos de construcción de investigación en probióticos y microencapsulación. Vale la pena teniendo en cuenta que la proporción de artículos involucrados genera estrategias de cooperación internacional con estos países y autores que favorezcan no solo el intercambio de conocimiento relacionado a la investigación académica en esta área de interés si no avance en la adquisición de herramientas te tecnológicas que favorezcan la operación en el sector industrial con el fin de generar productos con valor agregado que impacten a la población.

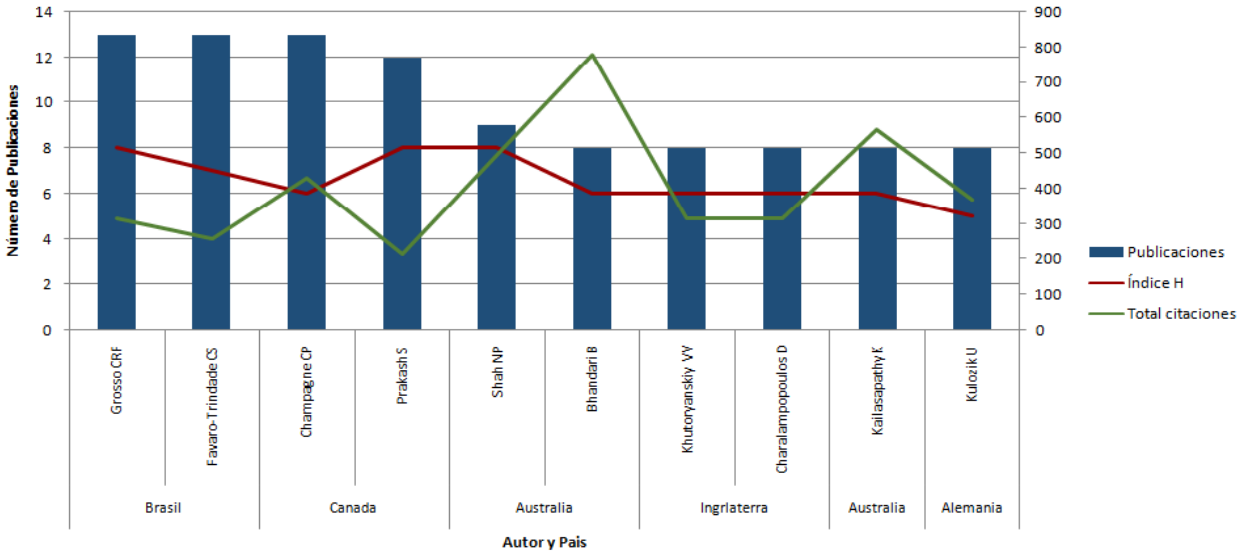


Figura 6. Autores clave en los países más productivos según su número de publicaciones, índice H y citaciones.

3.6.7. Palabras Claves

Para comprender las áreas de enfoque de un tema de interés en un período particular, es necesario estudiar las palabras claves relacionadas, puesto que pueden proporcionar información valiosa (Y. Geng et al., 2017). En total se extrajeron 222 palabras claves de nuestro conjunto de datos. La mayoría de estas presentan una similitud con leves variaciones como "gastrointestinal conditions", "simulated gastrointestinal conditions". La adopción más frecuente con un número de ocurrencias de 462 fue para la palabra clave "microencapsulación", seguido de "survival" con una escala en ocurrencia de 297. La búsqueda de palabras claves permiten identificar los principales temas de investigación, donde los temas más frecuentes se ven enmarcados en diferentes colores donde las palabras claves relevantes se vinculan entre sí (Figura 7).

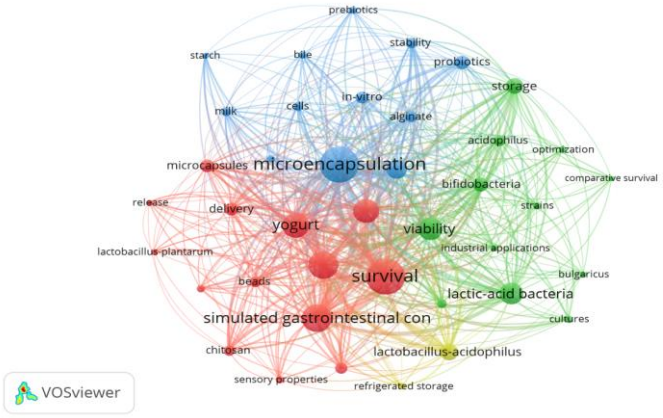


Figura 7. Palabras clave en el tema de microencapsulación de probióticos (2001-2017). Nota: no se muestran todas las palabras clave en la imagen.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Preparación de la harina de plátano.

Procedimiento de secado, extrusión y molienda. Inicialmente, se escogieron los plátanos, considerando su grado de maduración (estadio uno de maduración, completamente verde) para la variedad Dominico Hartón. Luego, se realizó el lavado de los plátanos con agua potable y se procedió a efectuar su desinfección con un desinfectante comercial (Dioxy San al 0,0025%, preparado al mezclar 2,5 ml del desinfectante y 1000 ml de agua potable). Después del lavado, las unidades fueron sometidas a escaldado, generando una temperatura interna de 72 ºC durante 30 minutos, para luego separar manualmente las cáscaras de la pulpa con un cuchillo. Posteriormente, se realizó el troceado de la pulpa, mediante corte de las unidades en rodajas de aproximadamente 4 mm, que posteriormente fueron cortadas en 4 partes iguales. Los trozos generados se sometieron a deshidratación en secador de convección forzada a 80 ºC por 5 horas, llevando el producto a una humedad entre 15 y 25%. Luego se realizó la molienda del plátano seco, con diámetro de partícula entre la malla 4 (U.S. STD. Sieve) (4,76mm) y número 10 (U.S. STD. Sieve) (2 mm). Para el proceso de extrusión se usó un equipo EX0113 a una temperatura de 40 ºC y velocidad de tornillo de 800 rpm, llevando el producto a una humedad de 15-25% en peso seco. El extrusor fue condicionado con 300 g de avena, adicionando 30 ml de agua y 20 ml de aceite de oliva. Finalmente, se realizó la molienda del material en un molino doméstico. Las harinas fueron almacenadas a vacío y a temperatura ambiente hasta su uso. La figura 8 muestra el producto generado a partir del procesamiento del plátano, posterior a la extrusión (izquierda) y al obtenerse la harina en su estado final (derecha).

Figura 8. Material extruído (izquierda) y harina (derecha) producidos durante la transformación del plátano.

4.2. Obtención de Microcápsulas de *Bifidobacterium animalis* subs. *animalis*

4.2.1. Producción de biomasa

La obtención del inóculo y del preparado líquido bacteriano para la producción de biomasa se realizó en tres etapas. En la primera etapa correspondiente a la activación de la bacteria, se partió de un vial control de *Bifidobacterium animalis* subs. a*nimalis* ATCC 25527 liofilizado y preservado de 2°C a 8°C, el cual, se rehidrató bajo condiciones establecidas por ATCC. Posteriormente se realizó una siembra masiva en el medio de cultivo MRS suplementado con 0,05% de L- Cysteina; éste se incubó durante 36 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Luego de observarse crecimiento bacteriano y de verificarse la morfología bacteriana de la cepa (Bacilos gramnegativos) mediante la coloración diferencial Gram, se efectuó la segunda etapa que tiene como objetivo la preparación del inóculo en medio líquido, para lo cual se tomó la cepa obtenida anteriormente y se preparó una suspensión en solución salina 0.9% estéril ajustada al patrón 0.5 de la escala de Mc Farland. Luego, se realizó una inoculación de este agente activo en un pre-inóculo al 10% v/v en caldo MRS enriquecido con L- Cysteine al 0,05% (1.5 Litros) éste preparado se incubó durante 36 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis y en constante agitación a 150 rpm, posteriormente se verificó el crecimiento y la viabilidad bacteriana mediante la medición de densidad óptica (OD, 600 nm) hasta obtener un valor de 1,0 (Espectofotómetro Biomate 5, Thermo).

Posteriormente, se preparó la tercera y última etapa (obtención de biomasa), en la cual se tomó la totalidad (1.5 Litros) del caldo MRS inoculado y se transfirió a tubos Falcón estériles de 50 ml con el propósito de recuperar la biomasa por método de centrifugación a 5500 rpm durante 15 minutos (Centrífuga Specia, Indula Medellín), para esto fue necesario efectuar este procedimiento hasta recuperar la totalidad del medio líquido. Una vez obtenido el pellet total, se realizaron tres lavados con solución salina estéril al 0.9 % (p/v) para cada lavado se descartó el sobrenadante, se agregó nuevamente la solución salina y se centrifugó a 5500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se resuspendió el producto final en 10 ml de agua peptonada 0,1% (p/v).

4.2.2. Preparación de material encapsulante

Para la microencapsulación se utilizó una emulsión estéril al 25% p/v de una mezcla de maltodextrina, la solución se agitó durante una hora en agitador magnético y se esterilizó por calor, sometiéndola a una temperatura de 121°C en autoclave.

Finalmente, la solución de Malodextrina se dejó en reposo durante 1 hora a 22°C, con el propósito de agregar la biomasa total recuperada. Para este ensayo fue necesario realizar una solución total de maltodextrina (1 Litro), a la que posteriormente se le agregó el inóculo (5%) de biomasa fresca y viable de *B. animalis* previamente lavado con solución salina al 0.9%. Con el propósito de evaluar la carga microbiana total, se realizó un recuento bacteriano en placa extendida (siembra por superficie) de la solución final (maltodextrina 25% + biomasa agente activo 5%), el conteo del número de células (UFC/mL) se determinó mediante siembra en agar MRS enriquecido con L-cisteina al 0,05%.

4.2.3. Microencapsulación *B. animalis* por el método de Secado por Aspersión

Para la microencapsulación de *B. animalis*, la suspensión de la biomasa y Maltodextrina fue sometida al secado por aspersión, a escala de laboratorio en el equipo Buchi-290 (Flawil, Suiza). Utilizando una bomba de vacío atomizada, la suspensión que contenía la cepa de *B. animalis* se transportó a través de una manguera estéril hacia la cámara de secado del equipo. Se suministró un porcentaje de aspiración del 75%, aire comprimido de 0,05 Mpa, temperatura de entrada de 80 ºC y una temperatura de salida entre el 40 y 43%. La suspensión de biomasa y Maltodextrina fue constantemente agitada, antes de pasar al proceso de secado, mediante un agitador magnético. Posterior al secado, las microcápsulas que contenían el microorganismo se separaron a través del ciclón colector del equipo y se concentraron en el recipiente recolector. Finalmente, con la ayuda de una espátula estéril y garantizando un ambiente aséptico con la ayuda de un mechero, se recolectó el microencapsulado (18 a 20 gramos), y se transfirió a un empaque estéril de aluminio que posteriormente se sometió a vacío para evitar ganancia de humedad durante el tiempo hasta su incorporación en la harina precocida. La figura 9 muestra el equipo de microencapsulación utilizado para el proceso de microencapsulación de *B. animalis* (izquierda) y el microorganismo dentro del empaque de aluminio utilizado (derecha).

Figura 9. Equipo utilizado para el proceso de secado por aspersión de *B. animalis* (izquierda) y empaque del microencapsulado (derecha).

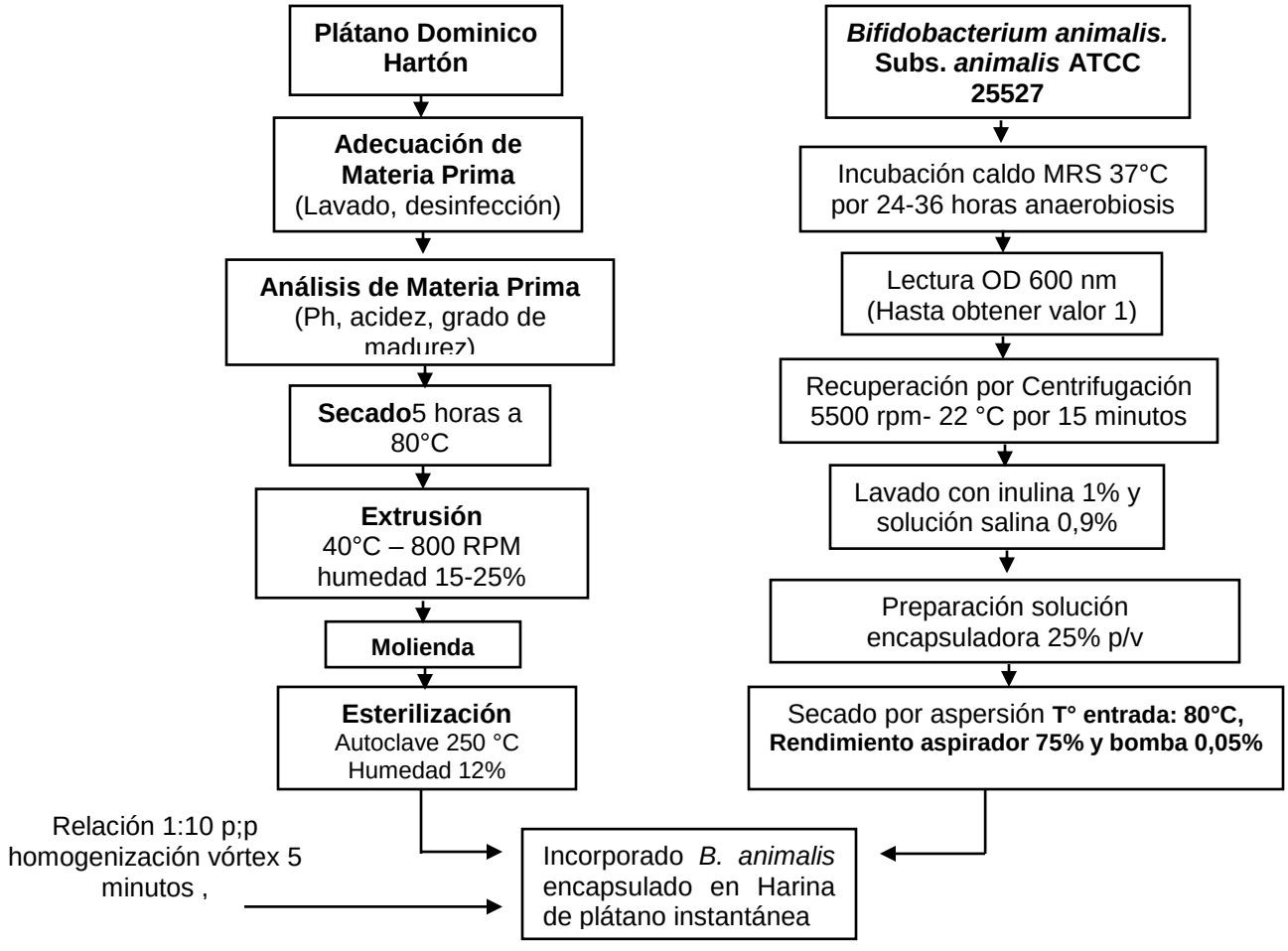
4.2.4. Incorporación del microencapsulado en la muestra de Harina de Plátano Dominico Hartón (*MUSA AABSIMMONDS*)

La harina de plátano suministrada por la Universidad Nacional sede Manizales con quien se ejecuta en convenio este proyecto, fue sometida a un tratamiento de modificación física de almidones mediante extrusión, en un equipo de un solo eje a temperatura de 40°C y 800 rpm y una humedad 12 y 15%. Luego se esterilizó en autoclave durante 20 min a 250°C y 15 psi, se llevó a una humedad final del 12% (Rodriguez-Barona et al., 2016).

Las microcápsulas de *B. animalis* fueron mezcladas en 380 gramos de harina de plátano modificada. Para garantizar una incorporación óptima de la muestra microencapsulada en la matriz alimentaria, fue necesario partir en una relación 1:10 p: p, posteriormente se realizó homogenización constante en vórtex durante 5 minutos; este proceso fue necesario desarrollarlo consecutivamente hasta lograr una incorporación total del producto (400 gramos incorporado final). La muestra final incorporada fue alicuotada (10 gramos) y almacenada a temperatura ambiente en recipientes Falcon estériles (30 tubos) bien sellados.

El proceso de obtención de *B. animalis* subs. *animalis* microencapsulado por el método de secado por aspersión e incorporado en harina de plátano Dominico Hartón (*MUSA AAB SIMMONDS*) se describe en la siguiente tabla.

Tabla 5. Diagrama de proceso de microencapsulación de *B. animalis* y su incorporación en Harina de Plátano Dominico Hartón (ABB SIMMONDS) instantánea



4.3. Método de Diluciones Seriadas y Siembra en Caja Petri

Para evaluar el recuento de *B. animalis* encapsulado e incorporado en harina de plátano Dominico Hartón instantánea se desarrolló lo siguiente:

4.3.1. Liberación de *Bifidobacterium animalis* Microencapsulado

Para la liberación de *B. animalis* microencapsulado, se trabajó con la metodología descrita por (Brinques & Ayub, 2011) donde un gramo de muestra incorporada se diluye en 9 ml de agua peptonada 0,1% (p/v). No obstante, para la liberación de este encapsulado e incorporado en harina de plátano Dominico Harón (*Musa ABBSIMMONDS*), se tomó solo 0,1 gramo de la muestra y se diluyó igualmente en 9 ml de agua peptonada (0,1%). Ambos procedimientos se sometieron a agitación en vórtex a 180 gravedades durante 1 minuto y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Posterior a la rehidratación y solubilización de las cápsulas se tomó un mililitro y se efectuaron diluciones seriadas (hasta 10^{-12}) en 9 ml de agua peptonada (0,1%). Finalmente, se realizó la siembra en cajas de Petri utilizando la técnica de siembra por profundidad, para esto se agregó de cada dilución 1 ml en cada una de las cajas de 28, luego se agregó aproximadamente 20 ml de agar MRS (45 ± 3 °C) enriquecido con L-Cysteine y se agitó suavemente la caja para homogenizar la solución. Posteriormente se dejó en reposo hasta la solidificación del agar para luego incubarlos a 37°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis (Guimaraes et al., 2013).

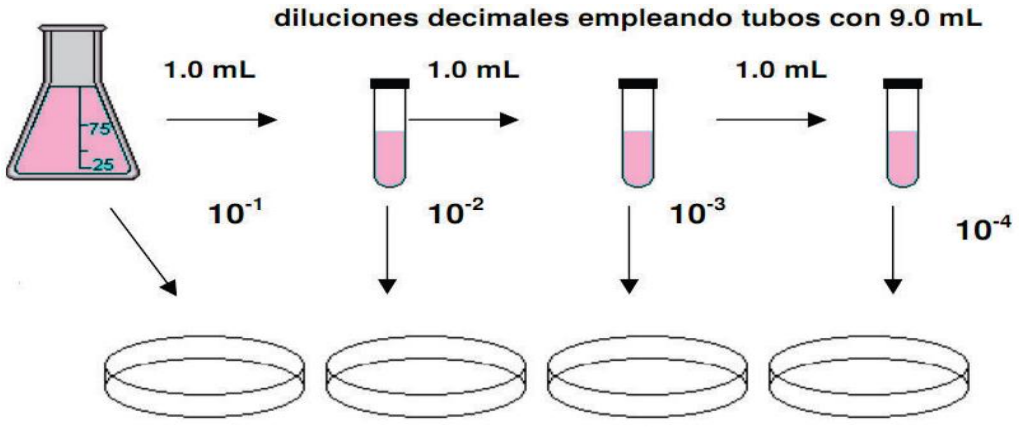


Figura 10. Metodología de diluciones seriadas. Fuente: (Ramon Molina, 2009)

La incubación se realizó en anaerobiosis a 37 ºC durante 72 horas.

La estimación del recuento de *B. animalis* se realizó en las siguientes etapas:

- Inmediatamente después de la preparación de la suspensión de la biomasa con el encapsulante.

- Inmediatamente después de la obtención del microencapsulado de *B. animalis*.

- Inmediatamente después de la incorporación de *B. animalis* en la harina de plátano.

- Semanalmente, hasta el día 84 para el experimento destinado al análisis del tiempo de falla.

4.4 Diseño Experimental para la Evaluación de la viabilidad de *B. animalis* libre y microencapsulado e incorporado en Harina de Plátano Dominico Hartón (*MUSA AAB SIMMONDS*).

4.4.1 Unidad de Muestra

- Harina instantánea fortificada a base de plátano Dominico Hartón, con incorporación del microencapsulado de *Bifidobacterium* subs. *animalis* envasado
- Microencapsulado de *Bifidobacterium animalis* subs. *animalis* envasado

4.4.2 Determinación muestral del efecto de la Tº de preparación del producto sobre el recuento de *B. animalis*.

Las unidades de muestra se evaluaron después de reconstitución en medio líquido y cocción utilizando tres Temperaturas (22, 50 y 80 ºC). Se analizaron seis repeticiones por tratamiento.

4.4.3 Determinación muestral del efecto del pH sobre el recuento de *B. animalis*.

Las unidades de muestra se analizaron después de reconstitución en medio líquido, se realizó el ajuste a tres rangos de pH (2,5, 3,5 y 6,2). Se analizaron seis repeticiones.

4.4.4 Determinación muestral del efecto de las sales biliares sobre el recuento de *B. animalis*.

Las unidades de muestra se analizaron después de reconstitución en medio líquido y ajuste a tres concentraciones de sales biliares (1, 3 y 5 g/L). Se realizaron seis repeticiones de cada unidad de muestra.

4.4.5 Evaluación de la tasa de supervivencia de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano Dominico Hartón

Para calcular el tiempo de permanencia media del producto el cual tiene como variable de respuesta el recuento de *B. animalis* (UFC/g), con una concentración inicial de 10^9 UFC al inicio de la evaluación, se evaluó el porcentaje falla (recuentos $<10^6$) cada semana desde la producción del lote (Semana 0) y durante cada semana hasta la semana número 12 como se muestra en la figura 11. Las evaluaciones se realizaron por el método de placa extendida explicado anteriormente.

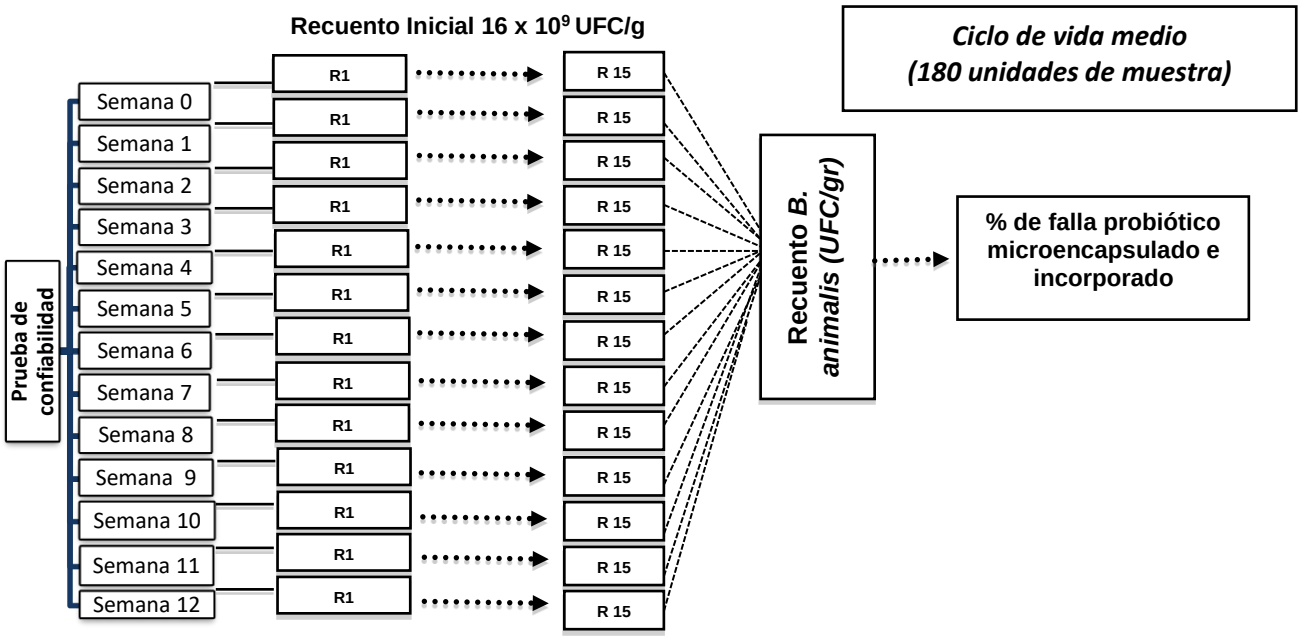


Figura 11. Diseño experimental tiempo de permanencia media de la concentración de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada.

4.5. Diseño Experimental:

4.5.1. Establecimiento del efecto de la Temperatura de la preparación del producto sobre el recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado.

Para evaluar la tolerancia del microorganismo a condiciones de temperatura de cocción de la harina fortificada, se sometió el probiótico libre, encapsulado e incorporado a tres condiciones de temperaturas (22, 50 y 80 °C) durante 10 minutos. Para realizar el ensayo, fue necesario tomar 1 gramo de la muestra microencapsulado, 0,1 gramos de muestra incorporada y transferirlo a tubos de ensayo, cada uno con 9 ml de agua peptonada 0,1% (p/v) utilizada como medio de suspensión. Estas muestras fueron sometidas a tratamientos térmicos en baño de agua. Después de que las muestras fueron rápidamente enfriadas a temperatura ambiente (25 °C) se realizó la siembra por el método de placa extendida en agar MRS con L-Cysteine 0,05% y se procesó según se especifica en el numeral 4.2.1, realizando 6 repeticiones (figura 10).

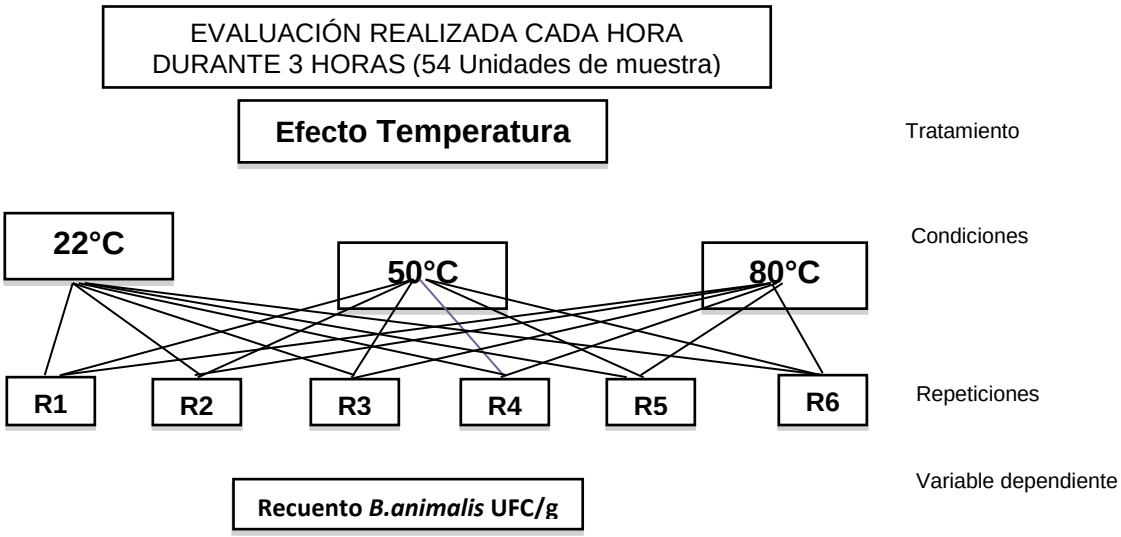


Figura 12. Diseño experimental para evaluar la influencia de la temperatura de preparación de la colada de harina de plátano sobre el recuento de *B. animalis* libre, encapsulado e incorporado.

4.5.2. Establecimiento del efecto del pH sobre el recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada.

Para evaluar la viabilidad del probiótico libre, encapsulado e incorporado bajo estrés por ácido, se simularon condiciones de acidez gastrointestinal sometiendo los lotes de muestras preparados a diferentes niveles de pH ajustado en 9 ml de PBS estéril a niveles de 2,5, 3,5, y 6,2 usando HCL 1M y NaOH usando un medidor de pH (Modelo 7110, InoLab). Estas condiciones fueron sometidas a tres tiempos de incubación (37 °C) 1, 2 y 3 horas según (Arslan et al., 2015).

Para establecer diferencias en la reducción del recuento de *B. animalis* por efecto del pH (Figura 13) se evaluó la viabilidad celular para cada tratamiento por el método de siembra de placa extendida, realizando bajo diluciones seriadas y sembrando en agar MRS con L-Cysteine 0,05%.

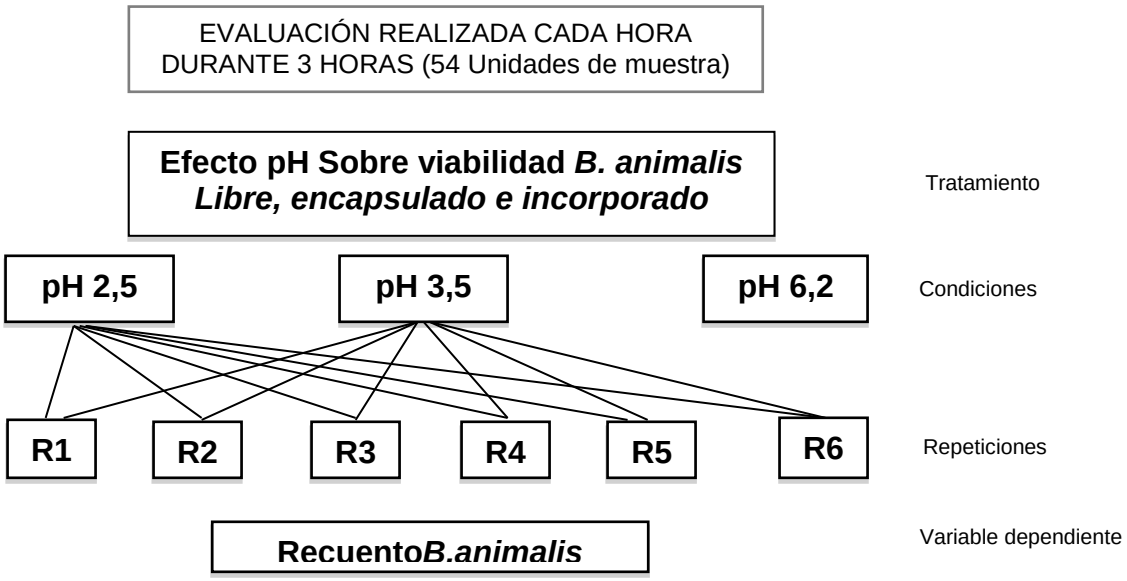


Figura 13. Diseño experimental para evaluar el efecto del pH sobre la viabilidad de recuento de *B. animalis* libre, microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada.

4.5.3. Establecimiento del efecto de las sales biliares sobre el recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada.

La evaluación del efecto de las sales biliares sobre *B. animalis* se planteó considerando una metodología previamente descrita, pero con cambios ajustados a la naturaleza del estudio (Sabikhi et al., 2010). Para evaluar la viabilidad del probiótico libre, encapsulado e incorporado bajo estrés por ácido, se prepararon jugos gástricos simulados mediante la suspensión de Bile Salts (OXOID LTDA) en peptona 0,1 % (p/v) a una concentración final de 1, 3 y 5 g/L, cada suspensión en 9ml se resuspendió con el lote de microorganismos libres, microencapsulado e incorporados, sometidas posteriormente a incubación (37 °C) durante 1, 2 y 3 horas.

Para establecer diferencias en la reducción del recuento de *B. animalis* por efecto de estas sales (Figura 14) se realizó conteo de células viables UFC/g mediante el método de siembra por placa extendida en agar MRS con L-Cysteine 0,05%, por 6 repeticiones para cada

condición.

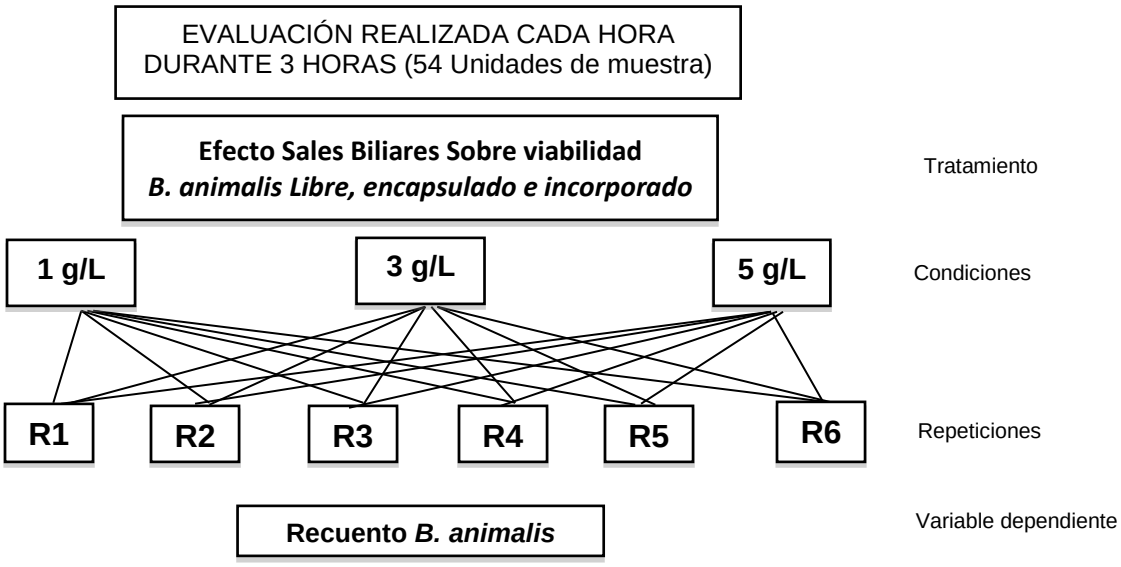


Figura 14. Diseño experimental para evaluar el efecto de sales biliares sobre la viabilidad de recuento de *B. animalis* libre, microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada.

Condiciones específicas al aplicar el diseño de dos factores. se han establecido las siguientes consideraciones:

- Las unidades de muestra provenían del mismo lote de producción de la harina con el probiótico.

- Se garantizaron idénticas condiciones de almacenamiento (Tº y HR) a las muestras.

- Se realizó un procedimiento de homogenización del microencapsulado de *B. animalis* en el producto, para reducir las variaciones en las concentraciones obtenidas (expuesto más adelante).

- Las muestras analizadas para evaluar el efecto del pH fueron ajustadas a tres valores de pH (2,5, 3,5 y 6,2) según el tratamiento. Para ello se utilizó HCL y NAOH 0.1 N según la necesidad.

- Las muestras analizadas para evaluar el efecto de las sales biliares fueron ajustadas a tres concentraciones (1, 3 y 5 g/l) según el tratamiento.

Adicionalmente, para los experimentos relacionados con el efecto de la temperatura, pH y sales biliares, se realizó un análisis control con tres repeticiones, estableciendo el recuento a tener en cuenta como referencia, a manera de indicar el porcentaje de sobrevivencia del microorganismo en los tratamientos del respectivo experimento.

4.6. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis no paramétrico con la prueba Kruskal Wallis para comparar medias entre los tratamientos con nivel de significancia del 5%. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS 15.0 para Windows.

4.7. Observación microscopia electrónica.

La caracterización morfológica y dimensional de las micropcápsulas se realizó en un microscopio electrónico E-SEM marca Tescan Modelo VEGA 3 del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. Las muestras del microencapsulado se almacenaron en desecador para evitar la hidratación y para reducir la contaminación, se abrieron en cámara de flujo laminar. Antes de utilizar el microscopio electrónico (E-SEM) fue necesario preparar las muestras colocándolas en una pieza de cinta doble de carbono con el propósito de fijarlas sobre el portaobjetos. La verificación estructural de las cápsulas se efectuó a 500 y 20 µm, así mismo las mediciones de diámetro se analizaron a 20 µm. Estos análisis se realizaron tomando una muestra aleatoria de 50 microcápsulas, además se estudió la variabilidad de estas en función del tiempo tomado en semanas.

EVALUACIÓN *B. animalis* MICROENCAPSULADO SIN INCORPORAR

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de la viabilidad de *B. animalis subs. Animalis* microencapsulado mediante secado por aspersión

Se reportan los resultados de células viables de *B. animalis* en la solución de alimentación (antes del secado por aspersión) y en las microcápsulas (después de la microencapsulación en secado por aspersión) obtenidos por diversas replicas, con el propósito de evidenciar la reproducibilidad del método.

Tabla 6. Conteo de cultivo *B. animalis* subs. *animalis* en solución encapsulante y microcápsulas

	UFC/ml-g	**Log (UFC/ml-g)**
Solución maltodextrina 25% y biomasa 5% (*B. animalis* subs. *Animalis*)	$1{,}465 \times 10^{13}$	13,16
B. animalis subs. a*nimalis* liofilizado	$6{,}2 \times 10^{10}$	10,79

La FAO/OMS (2006) recomienda que para que un producto se clasifique como probiótico, el recuento celular debe ser igual o superior a $10e^6$ UFC/g-l. Teniendo en cuenta esto, se consideró que el recuento de células probióticas viables (Solución de alimentación y microcápsulas) fue superior a los niveles recomendados para alimentos probióticos, puesto que se evidenció concentraciones superiores a las establecidas por la FAO, aunque se observó diferencias que van desde 13,16 a 10,79 Log UFC/ml-g, con una reducción logarítmica en $10e^3$ después del secado por aspersión. Estos mismos resultados fueron obtenidos por (Fritzen-Freire *et al.,* 2013) para microcápsulas generadas con leche desnatada reconstituida y prebióticos con inulina enriquecida con oligofructosa .

A juzgar por el conteo final (microcápsulas) en relación al inicial (solución de alimentación), la microencapsulación por el método de secado por aspersión funciona como una barrera física para los agentes probióticos, no obstante la tasa supervivencia después del proceso de encapsulación se puede ver afectada debido al manejo de temperaturas de entrada mayores a

100 °C (Alves et al., 2016). Además, en un estudio realizado por (Shokri*et al.*, 2015) en el que se evaluó la viabilidad de *Bifidobacterium* microencapsulado con sacarosa y maltodextrina como solución encapsulante, se concluyó que la temperatura de aire presenta un impacto sobre la humedad residual de los agentes bacterianos causando daños graves, por esta razón la temperatura durante el método de secado por aspersión no debería estar por encima de 80 °C. Temperatura en la que además de afectar poco la viabilidad del agente biológico, se ve favorecido el contenido de humedad en un rango entre 4–7%.

Por lo tanto, en este estudio se trabajó con una temperatura de entrada de 80 °C (Temperatura de salida 40–45°C), con el propósito de disminuir la letalidad de las células probióticas. No obstante, para el desarrollo de procesos de encapsulación se requiere además de propiedades adecuadas para la protección de probióticos sensibles al calor (Dianawati *et al.*, 2017). En este estudio, al trabajar con la solución encapsulante maltodextrina se evidenció un efecto termoestable protector que proporcionó una barrera durante el proceso de secado por pulverización, esto en relación al recuento de células viables microencapsuladas con una concentración mayor a $10e^6$. Los almidones hidrolizados, llamados maltodextrinas se han utilizado como material de soporte y encapsulante en muchos estudios debido a su alta solubilidad en agua (hasta 75%) baja viscosidad cuando está en solución, sabor suave y su bajo costo (Bustamante *et al.*, 2017; Cook *et al.*, 2012; Sohai *et al.*, 2013; Turchiuli *et al*., 2005), estos autores concluyeron que la adición de maltodextrina efectivamente mejora la supervivencia de un microorganismo probiótico al calor durante el proceso de secado por aspersión. Resultados similares reportaron una eficiencia mayor en los procesos de secado por aspersión utilizando exclusivamente maltodextrina como agente encapsulante en lugar de inulina (Saikia*et al.*, 2015).

El proceso de microencapsulación a través del secado por aspersión utilizando el material encapsulante maltodextrina brinda una barrera física protectora para los agentes biológicos. Sin embargo, es necesario evaluar la eficacia del agente probiótico mediante el análisis de la tasa de supervivencia una vez están en contacto con condiciones gastrointestinales simuladas, esperando que la microencapsulación permita el mínimo impacto de las células, brindado una protección en las condiciones gastrointestinales y de almacenamiento sobre el recuento de células viables de *Bifidobacterium animalis* subs. *animalis.*

5.2. Estabilidad de almacenamiento de *B. animalis* subs. *animalis* microencapsulado

Es importante obtener una viabilidad alta de los agentes biológicos encapsulados mediante la técnica de secado por aspersión, pero es incluso más relevante mantener esta viabilidad durante el almacenamiento del producto encapsulado durante un largo período (Broeckx et al., 2017).

La viabilidad de *Bifidobacterium animalis* subs. a*nimalis* microencapsulado disminuyó durante su almacenamiento a temperatura ambiente (25°C a 28 °C) (Figura 15). No obstante, la concentración se mantuvo alta y constante (> $10e^{8}$UFC/g) observándose una concentración del microorganismo suficientemente aceptable como probiótico según lo establecido por la FAO/OMS> 10e6UFC/g(FAO/OMS,2016). El producto mantuvo la viabilidad descrita durante las primeras tres semanas tal como lo describe la FAO, después de este período se observó una disminución de la viabilidad bacteriana. Por lo tanto, la concentración celular del agente probiótico evaluado en relación al tiempo presentó una pérdida de viabilidad considerable de 24,44 Log N UFC/g (semana 0) a 8.46 Log N UFC/g (semana 12).

Cabe resaltar que la estabilidad en el recuento bacteriano se evidenció entre la semana 0 hasta la semana cinco con un Log N UFC/g promedio de 16,883. La pérdida de viabilidad de *B. animalis* microencapsulado fue de 15,98 unidades desde la semana inicial (semana 0) hasta la semana 12, evidenciándose para esta última semana un recuento 4,7x $10e^{3}$, registro que demuestra que con el tiempo la viabilidad disminuyó durante el almacenamiento a 25°C. No obstante, el efecto protector de las microcápsulas no afectó drásticamente la tasa de supervivencia de *B. animalis.*

De acuerdo con Corcoran et al. (2004) la resistencia al proceso de microencapsulación depende de la cepa probiótica; *B. animalis* puede ser considerada como resistente al método de secado por aspersión (Lira de Medeiros *et al.*, 2014b), aunque la presencia del material encapsulante puede generar una protección al microorganismo durante el proceso. El objetivo principal de usar maltodextrina en este estudio, fue aumentar la temperatura de transición y así reducir la viscosidad y la deposición de la pared de los productos de secado por aspersión (Fazaeli et al., 2012). Sin embargo, la maltodextrina sola no fue efectiva para mantener la viabilidad bacteriana durante las 12 semanas, esto pudo ser debido a su alto peso molecular que resulta en su incapacidad para interactuar por completo con el sitio polar de la bicapa fosfolipídica de la membrana bacteriana (Oldenhof et al.,2005), que para procesos de microencapsulación, puede generar límites para la formación de hidrógeno en la pared celular bacteriana, necesario para sustituir las moléculas de agua eliminadas, esta limitación conlleva a que la membrana microbiana no pueda estabilizarse, ocasionando su muerte celular (Broeckx et al., 2017).

Está bien establecido que la asociación entre el estado de la matriz, el estado físico y la temperatura de almacenamiento afecta drásticamente la viabilidad de los agentes probióticos secados por aspersión. Por lo tanto, la retención de la viabilidad probiótica es un desafío puesto que se debe combatir la combinación de factores exógenos y endógenos tales como la humedad, temperatura de almacenamiento, deshidratación, exposición al oxígeno, estrés

osmótico, e incluso el estado físico de las microcápsulas como la formación de su estructura. Estos aspectos influyen de manera directa en la estabilidad y el almacenamiento de bacterias probióticas (Fu & Chen, 2011; Khem *et al.*, 2015; Salar-behzadi *et al*., 2013).

En consecuencia la reducción de tasa de supervivencia con relación al aumento del tiempo de almacenamiento del agente bacteriano evaluado en este estudio fue inevitable, lo que indica que el efecto protector de la maltodextrina fue bajo, resultados que coinciden con lo reportado por (Soukoulis, *et al.*, 2014) estudio en el que se informó una reducción de 3 y 7 veces en la supervivencia a temperaturas de almacenamiento entre 25 °C y 35 °C de *L. acidophilus* con microcápsulas basadas en maltodextrina y caseinato de sodio.

En este estudio se observó que la efectividad de *B. animalis* microencapsulado en maltodextrina se mantuvo solo hasta la semana 4, y dado que la seguridad del consumo de probióticos en la salud humana está estrechamente relacionada con su viabilidad, es necesario asegurar una pérdida mínima de la viabilidad de las bacterias microencapsuladas durante su almacenamiento. Los resultados evidenciados en este estudio mostraron que el almacenamiento de *B. animalis* subs. *animalis* microencapsulado en maltodextrina y almacenado en el rango de temperatura 25°C a 28°C, conllevó a una inestabilidad drástica en relación al tiempo durante el almacenamiento. En consecuencia, la temperatura y el material encapsulante fueron factores importantes que influyeron en la viabilidad celular de agente biológico evaluado

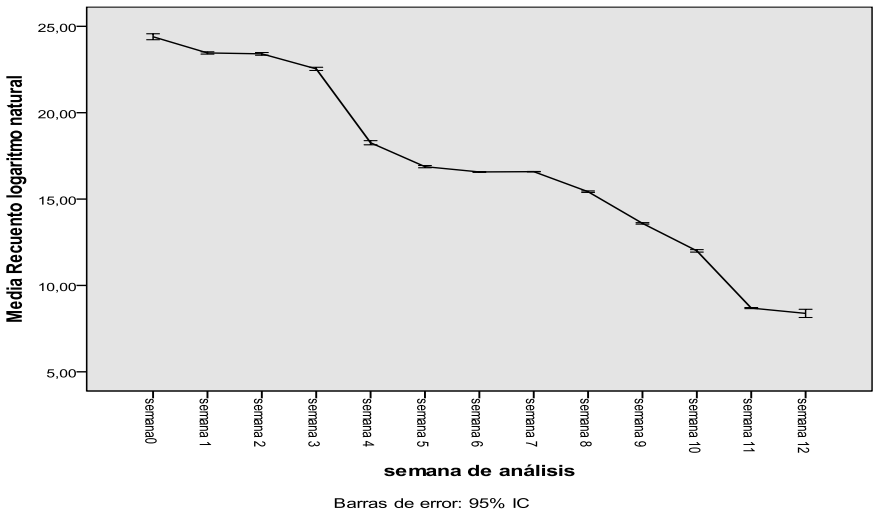


Figura 15. *B. animalis* subs. *animalis* microencapsulado por el método de secado por aspersión y almacenado 25°C durante 13 semanas. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n=3).

5.3 Evaluación de la supervivencia de *B. animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado sometido a tratamientos térmicos

Los resultados para el comportamiento de tolerancia térmica de *B. animalis* libre y microencapsuladas en las semanas 2 y 10 (Figura 5), evidenciaron una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los % de supervivencia en cada temperatura evaluada. La supervivencia para las células libre y microencapsuladas disminuyó a medida que la temperatura iba aumentando, si bien se observó que al someter el microorganismo sin la protección de la microcápsulas (BL) a 55 °C el porcentaje de supervivencia solo alcanzó el 20%, viéndose afectado más del 50% de la viabilidad del agente microbiano; no obstante esta supervivencia demostró estar en un 0% cuando se sometieron las células viables a 80 °C.

Uno de los principales factores que determinan el uso de una bacteria probiótica es su capacidad de tolerar diversas temperaturas empleadas para la preparación de alimentos. Se requieren estudios que evalúen la supervivencia térmica de bacterias microencapsuladas con diversas composiciones del material encapsulante. En consecuencia, los valores generados en este estudio para *B. animalis* subs. *animalis* libre y encapsulado con maltodextrina, pueden ser de aporte para futuros estudios en los que se requiera una producción de productos realizados con este mismo material encapsulante.

Como es de esperarse, el recuento de células viables para *B. animalis* libre disminuyó severamente bajo los tratamientos térmicos empleados (55 °C y 80 °C durante 10 minutos) en relación al conteo inicial. No obstante, al usar tratamiento térmico de 22 °C el porcentaje de supervivencia fue cercano al 100%, comportamiento semejante a lo evidenciado en el conteo de *B. animalis* encapsulado en la semana 2 y 10 después de proceso de microencapsulación.

Sin embargo, al usar tratamiento térmico a 55 °C y 80 °C durante 10 minutos, se observó que a diferencia de las microcápsulas evaluadas en la semana 2, la semana 10 demostró menor porcentaje de supervivencia (0,77% respectivamente). Las evaluaciones realizadas en el agente microencapsulado a la semana 2 mantuvieron un porcentaje de supervivencia en un promedio de 43,44% al ser tratadas a 55 °C y mantuvieron un recuento de células viables ($3,75 \times 10e^{9}$) mayores a lo establecido para que un producto se considere probiótico.

En general, la microencapsulación demostró un efecto protector contra temperaturas iguales o inferiores a 55°C durante 10 minutos bajo condiciones de almacenamiento a 25°C no superiores a dos semanas. No obstante, el tratamiento térmico usando temperaturas de 80°C

durante 10 minutos, afectó significativamente tanto células libres como las microencapsuladas y evaluadas en la semana 10, observándose para ambas, porcentajes de supervivencia inferiores al 1% a diferencia de lo obtenido en la semana 2 donde se evidenció un porcentaje promedio de supervivencia de 11,87%.

Estos resultados sugieren que el último tratamiento térmico (80 °C) contribuyó a la disminución dramática en la supervivencia de las bacterias. Según lo descrito por Pinto et al. (2015) la razón principal por la que las microcápsulas generan poca protección frente a condiciones de calor, podría deberse a los daños previos ocasionados a las células durante el proceso de secado por aspersión, lo que genera microcápsulas con baja capacidad para soportar condiciones altas de temperatura. Además, el calor excesivo despliega de las células bacterianas las estructuras de macromoléculas como ácidos y proteínas, debido a que se genera una ruptura entre las unidades monoméricas, causando la destrucción de estos y por ende la muerte bacteriana (M. Chen, Tang, & Chiang, 2017; Corcoran, Stanton, Fitzgerald, & Ross, 2008).

Este estudio demuestra que la microencapsulación presenta un efecto protector frente a condiciones de temperatura. Sin embargo, no se recomienda para *B. animalis* subs. a*nimalis* microencapsulado y almacenado en un lapso superior a dos semanas el uso de tratamientos a temperaturas superiores a 55 °C. Pocos estudios han comparado la protección generada por la microencapsulación frente al calor; no obstante, Ding & Shah (2007), encontraron resultados semejantes para bacterias probióticas encapsuladas con alginato, los resultados indican que las células microencapsuladas sobrevivieron bien a 65 °C durante 30 minutos en comparación con las bacterias libres. Estos resultados se ajustan con los datos obtenidos en estudios semejantes de estabilidad térmica por microencapsulación (Khosravi Zanjani, Ehsani, Tarzi, & Sharifan, 2018).

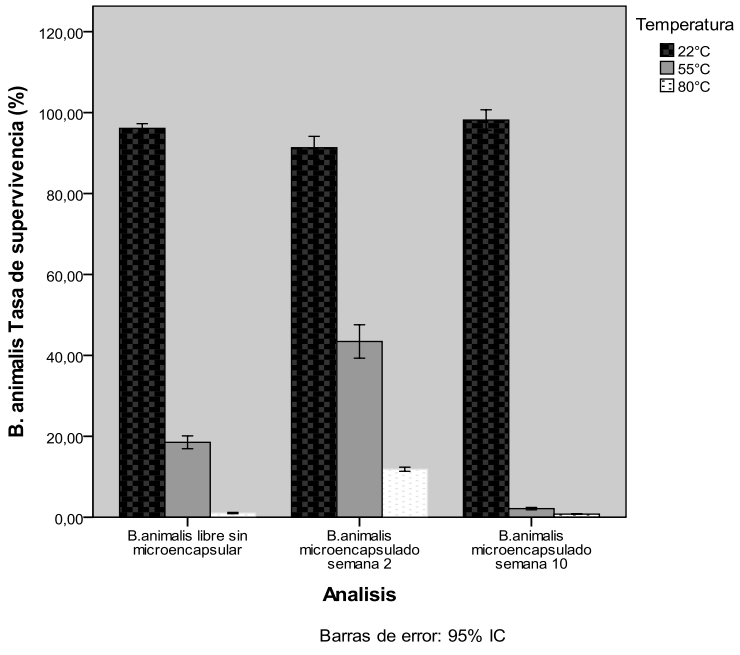


Figura 16. Resultados de la supervivencia de *B. animalis* subs. *Animalis* libre y microencapsulado (semana 2 y 10) después de su exposición a 22°C, 55°C y 80°C durante 10 minutos. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los promedios.

5.4 Evaluación de la supervivencia de *B. animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado en sales biliares

Las altas concentración de sales biliares en el sistema gastrointestinal es uno de los principales obstáculos para la supervivencia de los organismos probióticos. Para evaluar si la microencapsulación mejora o no la resistencia de *B. animalis* subs. *animalis* a las sales biliares, fue necesario someter a diferentes concentraciones de sales biliares (1,3 y 5 g/L) bacterias libres (BL) y microencapsuladas (BM) e incubarlas durante un período de tres horas.

Los resultados de la pérdida de viabilidad de *B. animalis* sub. *animalis* libre y microencapsulado durante tres horas de exposición a jugos gástricos simulados permitieron evidenciar que el material encapsulante maltodextrina confiere un efecto protector sobre la viabilidad del microorganismo microencapsulado, debido a la diferencia significativa encontrada ($p < 0,05$) entre el porcentaje de supervivencia de *B. animalis* libre y microencapsulado después de la exposición al fluido gástrico y al tiempo de incubación evaluado (1,2 y 3 horas), aunque la viabilidad de las bacterias libres y las microencapsuladas disminuyeron a medida que la concentración de sales biliares disminuían y el tiempo de incubación aumentaba, las células microencapsuladas sobrevivieron en mayor número y durante más tiempo, observándose para el tiempo de incubación de 1 hora una supervivencia que osciló entre 19% (8.39 Log10 UFC/g) en 1g/L y 10% (8.13 Log10 UFC/g) en 5 g/L, a diferencia de un 17%(1g/L) y 5% (5 g/L) en *B. animalis* libre.

Así mismo, la supervivencia de las células probióticas libres se redujo significativamente en los tiempos evaluados (2 y 3 horas) para las concentraciones de sales biliares de 3 y 5 g/L en comparación con las bacterias microencapsuladas. El porcentaje de supervivencia de las células libres no disminuyó de manera notoria durante la exposición en sales biliares a una concentración de 1 g/L en la primera hora de incubación, no obstante, a medida que este tiempo aumentó el porcentaje de supervivencia del agente biológico disminuyó significativamente, puesto que a partir de una concentración inicial de *B. animalis* subs. *animalis* en estado libre correspondiente a 7,37 UFC/g, se observó una pérdida total de viabilidad de este agente durante 3 horas de exposición a fluidos gástricos simulados, alcanzando porcentajes de supervivencia de 0,8% (2 horas) y 0% (3 horas), lo que indica que

el microorganismo libre solo presentó capacidad de resistencia a concentraciones bajas de sales biliares (1 g/L) y en cortos tiempos de incubación (1 hora).

A diferencia de las células libres, las células encapsuladas conservan una viabilidad del 9% al 5 % que equivale a 8,0 y 7,83Log10 UFC/g frente a las concentraciones de sales biliares de 1 y 3 g/L durante 2 horas de incubación, lo que muestra que, bajo estas condiciones las microcápsulas proporcionaron una barrera entre las sales biliares y las células probióticas, convirtiendo al material de encapsulación (Maltodextrina 25%) como un agente prometedor para proteger probióticos frente a fluidos gástricos intestinales.

En un estudio realizado por Cuello, Mendoza, & Alcázar (2015), se evaluó el efecto de las sales biliares en 10 bacterias probióticas libres y encapsulados, estos autores observaron que el agente microencapsulado mantuvo una viabilidad del 50% después de 4 h de exposición a fluidos gástricos simulados, mientras que los microorganismos en estado libre perdieron completamente su viabilidad a los 180 minutos de exposición; estudios similares soportan que las bacterias probióticas encapsuladas presentaron mejor supervivencia que las bacterias libres bajo condicionesde estrés como la acidez y las sales biliares (Bosnea, Moschakis, & Biliaderis, 2014; Chandramouli, Kailasapathy, Peiris, & Jones, 2004b; Divya & Nampoothiri, 2015; K. Kailasapathy, 2006; Moumita et al., 2017).

Los resultados encontrados en este estudio concuerdan y corroboran con lo anterior y permiten recomendar el uso del proceso de encapsulación que garanticen la viabilidad de las bacterias incluidas en alimentos probióticos, en este caso se ve como una alternativa promisoria el uso de la microencapsulación utilizando la maltodextrina como material de protección.

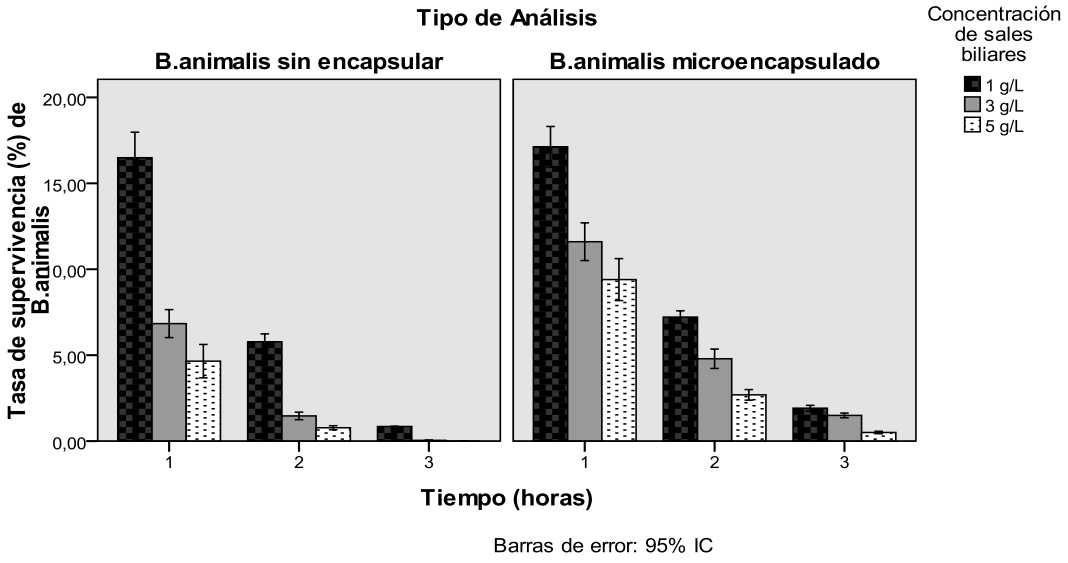


Figura 17. Resultados de la supervivencia de *B. animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado después de 3 horas de exposición a sales biliares a 1, 3 y 5 g/L. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los promedios.

5.5 Evaluación de la supervivencia de *B. animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado frente a diversas concentraciones de pH

Un criterio fundamental para considerar a un agente microbiano como probiótico es evaluar su capacidad de tolerancia a niveles altos de ácido presentes en el tracto intestinal. En este sistema, la secreción de jugo gástrico evita la colonización frecuente del intestino por un gran número de microorganismos transmitido por los alimentos. El punto de umbral para evaluar la resistencia a las condiciones ácidas se estableció mediante valores de pH 2,0 y 3,0 y a un período de incubación de 3 horas, puesto que simula el tiempo de residencia en el estómago (Haddadin, 2004).

La simulación in vitro es considerada por lo tanto una herramienta útil para evaluar la supervivencia de agentes probióticos en diversas matrices durante el tránsito en el tracto gastrointestinal. El efecto de las condiciones ácidas de pH sobre la viabilidad de *Bifidobacterium animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado se muestra en la figura18.

Tanto el agente biológico libre como el microencapsulado registraron un recuento microbiano en cada concentración evaluada. Se evidenció una reducción de ambos grupos al

ser expuestos a pH ácidos de 2,5 y 3,5 respectivamente, en contraste con el recuento constante en condiciones de pH 6,2 (tratamiento control) para ambas condiciones arrojó valores superiores a 8 Log10 UFC/g después de dos horas de incubación a 37 °C.

La viabilidad de las células libres disminuyó significativamente, observándose un promedio de 5,38% (3,04 Log10 UFC/g) en la tasa de supervivencia cuando se expuso a un pH de 2,5 durante 3 horas, de igual manera se evidenció una disminución en las células microencapsuladas, no obstante, el porcentaje de supervivencia alcanzado por el microorganismo después de 3 horas de exposición a pH de 2,5 fue superior al observado en las células libres con 11,87% (9,84 Log10 UFC/g), indicando que, el material encapsulante jugó un papel importante en la protección del agente microbiano cuando fue sometido a un pH ácido. Al respecto Li *et al*. (2011) recalcaron en estudios similares, la supervivencia de las células encapsuladas fue más alta que la obtenida en el recuento de bacterias libres después de la exposición a jugos gástricos simulados con valores de pH 2,0 y 3,0.

De igual forma, bajo concentraciones de pH de 3,5 se obtuvo una disminución notable del microorganismo libre, observándose un porcentaje de supervivencia cada vez más reducido a medida que el tiempo de exposición aumentaba, aproximadamente una tasa de supervivencia de 14,5% fue alcanzada por el agente biológico sin encapsular después de 3 horas de incubación, no obstante, en el tiempo de exposición de 1 hora este grupo presentó una tasa de supervivencia de 28,11%. Mientras que la cepa microencapsulada mantuvo su viabilidad en este tiempo con un porcentaje de supervivencia de 71%, este resultado se redujo después de tres horas con una viabilidad del 23% y con un número de recuentos de Log10 4,23 UFC/g, valor que demuestra que el agente probiótico encapsulado y bajo condiciones de pH de 3,5 no es útil para cumplir con el requisito mínimo de 10e6 células probióticas viables por cada mililitro.

La tasa de supervivencia observada en las condiciones de pH de 3,5 tanto para *B. animalis* libre como microencapsulado, tal vez pueda deberse a una concentración de pH no muy elevada que pueda generar una completa destrucción de todos los agentes biológicos. No obstante, al evaluar esta variable con relación al tiempo de incubación se evidencia una disminución de células viables, donde la tasa de reducción bacteriana después de 3 horas de incubación supera a la tasa de supervivencia.

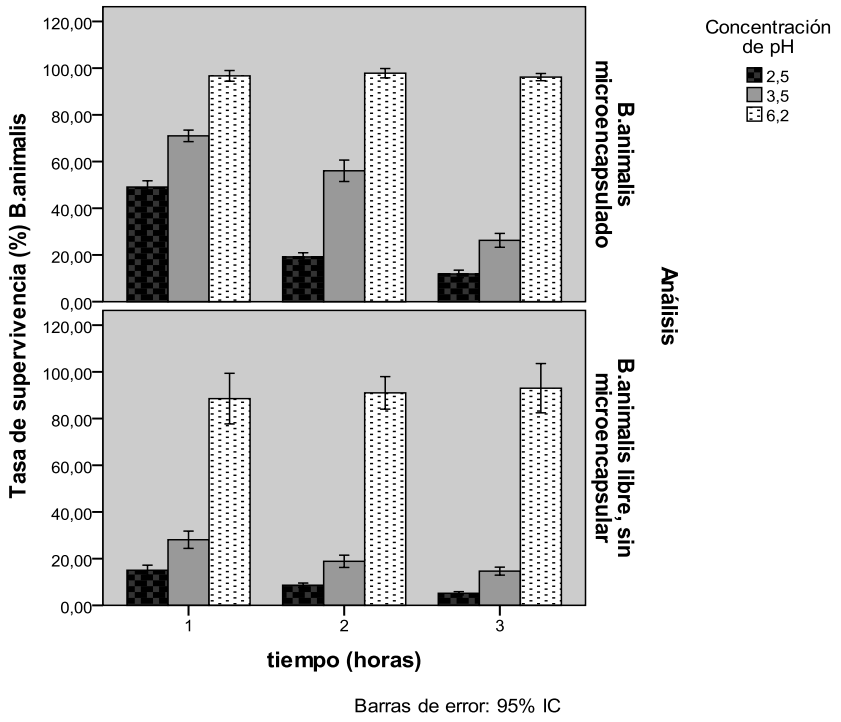


Figura 18. Resultados de la supervivencia de *B. animalis* subs. *animalis* libre y microencapsulado después de 3 horas de exposición a concentraciones de pH (2.5, 3,0 y 6.2). Las barras de error representan las desviaciones estándar de los promedios.

5.6. Morfología y tamaño del Microencapsulado

Las imágenes SEM para *B. animalis* subs. *animalis* microencapsulado por el método de secado por aspersión (Fig. 8) confirmaron la formación de microcápsulas y la ausencia de bacterias libres.

Las evaluaciones de las microcápsulas exhibieron microesferas con formas lisas y con una estructura íntegra debido a que no se evidenciaron fisuras o rupturas superficiales. No obstante se observó concavidades y hendiduras en la superficie que pueden ser el resultado de la temperatura de secado moderadas (entrada 140 °C y salida 60 °C) (Rodríguez-Huezo et al., 2007). Imágenes morfológicas de frutos secos usando maltodextrina como agente de secado fueron similares en rugosidad, partículas fusionadas y esfericidad (Manickavasagan et al., 2015), la misma morfología se evidenció en las microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 con diversos agentes encapsulantes (Fritzen-Freire et al., 2012). Además la evidencia de cápsulas con leven concavidades se corrobora en otros estudios de microencapsulación por el método de secado por aspersión (Lian, Hsiao, & Chou, 2002; Yonekura, Sun, Soukoulis,

& Fisk, 2014). Las partículas secadas por aspersión, exhiben una amplia distribución de tamaño, con un grado aparente de agregación de partículas relacionadas con la temperatura de salida y contenido de humedad e higroscopicidad de la muestra, factor que podría estar afectando en mayor proporción su morfología (Anandharamakrishnan, Rielly, & Stapley, 2007; Rodríguez-Restrepo et al., 2017).

En este estudio las microcápsulas presentaron una amplia distribución de las esferas que correspondió a un tamaño promedio de 9 a 22 µm. En partículas con estas características es poco probable que se vea afectada la textura de los alimentos que son incorporados (Champagne & Fustier, 2007).

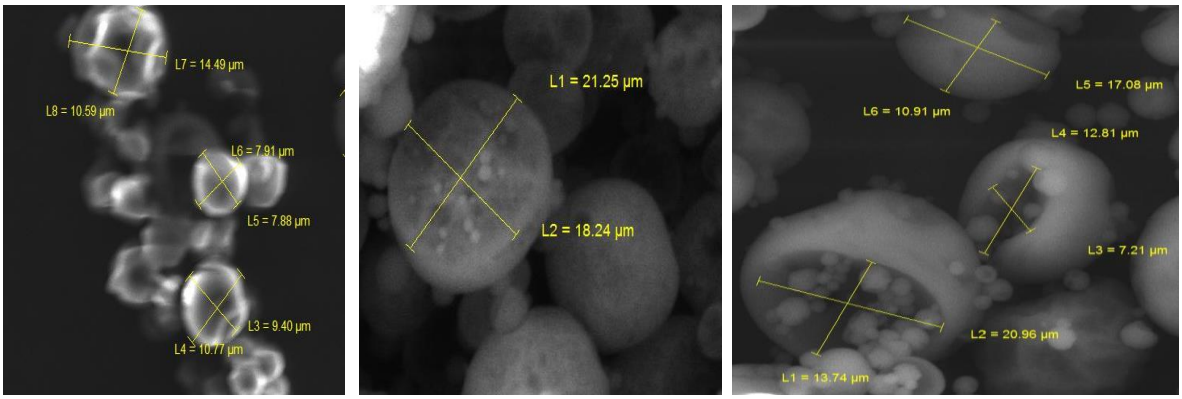


Figura 19. Micrografías SEM de microcápsulas que contienen *B. animalis* subs. *animalis* obtenidas por el método de secado por aspersión con 25% de maltodextrina.

EVALUACIÓN *B. animalis* MICROENCAPSULADO SIN INCORPORAR

6. CONCLUSIONES

- La estabilidad durante el almacenamiento de *B. animalis* subs. a*nimalis microencapsulado* con maltodextrina al 25% por el método de secado por aspersión se mantuvo solo hasta la cuarta semana, con una pérdida de supervivencia que pasó del 66% al 2%, lo que conllevó a una inestabilidad drástica en relación al tiempo del almacenamiento.

- Los resultados para el comportamiento de tolerancia térmica de *B. animalis* libre y microencapsuladas mostraron una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los % de supervivencia en cada temperatura evaluada. La microencapsulación demostró un efecto protector contra temperaturas iguales o inferiores a 55°C con un porcentaje de supervivencia en un promedio de 43,44%. No obstante, el tratamiento térmico usando temperaturas de 80°C, afectó significativamente tanto células libres como las microencapsuladas, observándose para ambos porcentajes de supervivencia inferiores al 1%.

- La exposición de B. *animalis* sub. *animalis* libre y microencapsulado concentraciones de sales biliares simuladas de 1, 3 y 5 g/L confirieron una disminución en su viabilidad en relación al tiempo de exposición. Sin embargo, las células microencapsuladas sobrevivieron en mayor número y durante más tiempo, observándose para el tiempo de incubación de 1 hora una supervivencia que osciló entre 19% (1g/L) y 10% (5 g/L), a diferencia de un 17% (1g/L) y 5% (5 g/L) en *B. animalis* libre.

- Al evaluar la capacidad de tolerancia frente a niveles de pH de 2,5 y 3,5 tanto del agente biológico libre como el microencapsulado, se registró una reducción en la viabilidad de ambos grupos. No obstante, la cepa microencapsulada mantuvo su viabilidad bajo concentraciones de pH de 3.5 con un porcentaje de supervivencia de 71%, resultado que se redujo después de tres horas de exposición con una viabilidad del 23% y una pérdida en el recuento de Log10 4,23 UFC/g, disminución que puede generar un efecto en la capacidad probiótica del agente evaluado.

Resultados y Discusión

EVALUACIÓN *B. animalis* MICROENCAPSULADO E INCORPORADO EN HARINA DE PLÁTADO DOMINICO HARTÓN

7. RESULTADOS

7.1. ANÁLISIS DE CONFIABILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DE *B. animalis* EN HARINA DE PLÁTANO INSTANTÁNEA FORTIFICADA

7.1.1. Características microscópicas del microencapsulado

Después del proceso de microencapsulación de *B. animalis* y a la preparación de la harina de plátano instantánea fortificada, se procedió a la observación de las características microscópicas, mediante el microscopio electrónico de barrido (E-SEM). En la figura 8 (izquierda) se observan las microcápsulas, con apreciable homogeneidad en cuanto a diámetro y estructura externa. De otra parte, la harina de plátano se observó con un mayor tamaño que el de las microcápsulas y con estructura irregular que sin embargo, tuvo homogeneidad en sus dimensiones generales (figura 15, derecha).

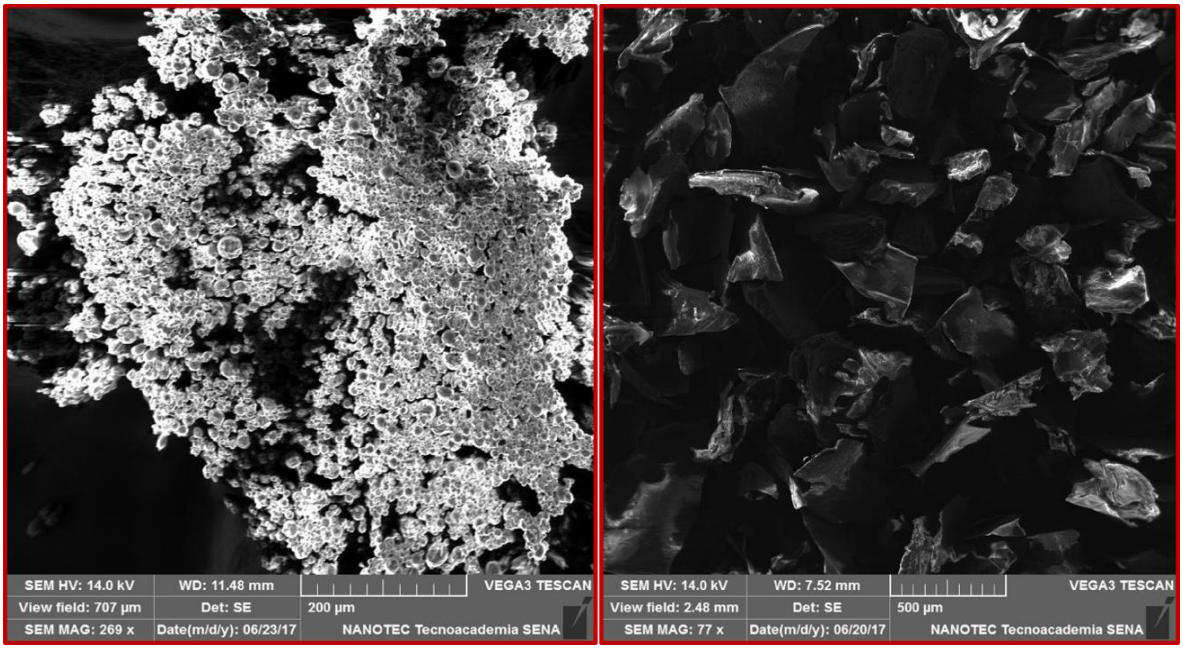


Figura 20. Micrografía E-SEM de *B. animalis* microencapsulado mediante secado por aspersión (izquierda) y de la harina de plátano instantánea fortificada (derecha).

Las mediciones del área de las microcápsulas se realizaron durante un tiempo de almacenamiento de siete semanas. Durante este lapso, las variaciones solo fueron significativamente apreciables en la última semana de análisis, sin embargo, el área promedio tuvo una disminución constante hasta el día 28, seguida de un incremento leve en los días 35 y 42 y una posterior disminución en el día 49, donde se obtuvo el menor promedio entre las áreas que semanalmente se midieron (figura 21). Es importante contrastar que inmediatamente después de la microencapsulación, se obtuvieron áreas que fluctuaron entre 61 y 336 μm^2, mientras que en la medición final realizada en el día 49, las áreas estuvieron entre 16 y 39 μm^2.

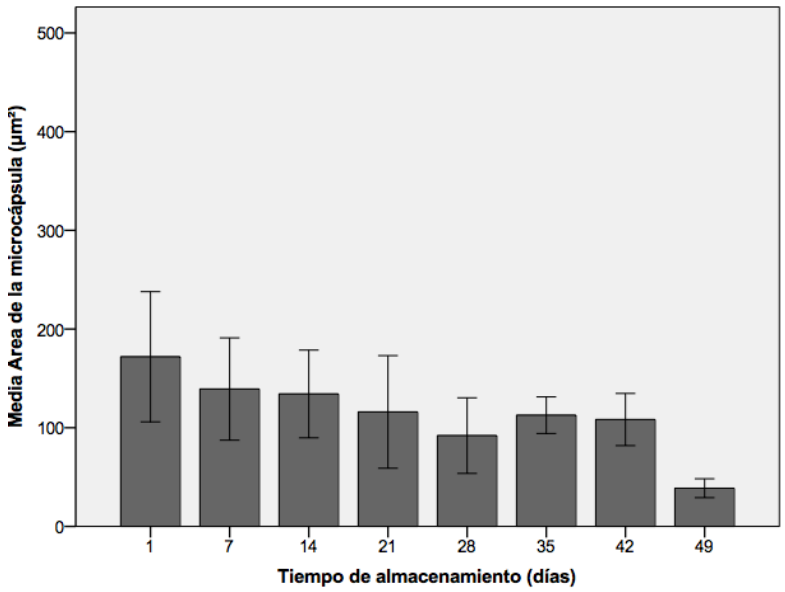


Figura 21. Área de las microcápsulas de *B. animalis* incorporadas en harina de plátano durante el tiempo de almacenamiento.

Además de las variaciones en el área de las microcápsulas de *B. animalis* se realizó un seguimiento morfológico a su morfología. En la figura 17 (izquierda) obtenida en la primera semana se aprecia la integridad de la cápsula, de morfología semicircular y ligeros hundimientos en los costados. De manera contrastante, en la figura 10 (derecha) conseguida en la cuarta semana de almacenamiento, cuando se presentó una disminución drástica del porcentaje de falla del microorganismo, se aprecia una capsula semicircular, con estructura superficial irregular y contenido expuesto con zonas claras que podrían corresponder al microorganismo en estudio.

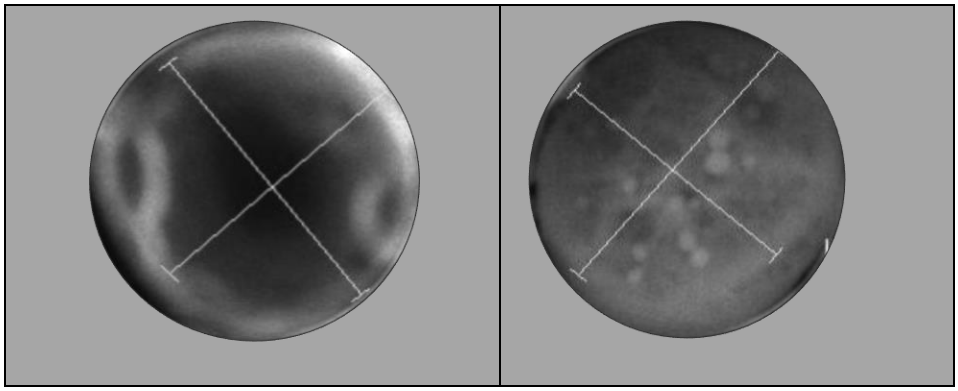


Figura 22. Micrografía E-SEM del microencapsulado de *B. animalis* en la primera (izquierda) y cuarta (derecha) semana de almacenamiento.

7.1.2. Viabilidad durante el almacenamiento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano instantánea fortificada.

Para establecer el comportamiento durante el almacenamiento del recuento de *B. animalis* incorporado en la harina de plátano, se analizaron semanalmente 15 unidades de muestra. En general, se presentó una disminución invariable del microorganismo durante el almacenamiento. Luego de la microencapsulación, se tuvo una concentración media de *B. animalis* de 20,5E9 UFC/g, que hacia el día 7 disminuyó a 2,6E8, lo cual correspondió a una sobrevivencia del 12,7% respecto del día 1. En los días 14 y 21 se tuvieron concentraciones promedio de 12E7 y 7,4E5 respectivamente, momento temporal hasta el cual, el contenido de *B. animalis* por gramo del producto en todas las unidades de muestra analizadas era superior al exigido por la legislación respectiva en Colombia. En el día 28, solo el 27% de las muestras analizadas cumplían con el criterio mencionado, con una concentración promedio de 8.5E4, mientras que desde el día 35 en adelante, la totalidad de las muestras analizadas (15 por día de análisis) tuvieron concentraciones de *B. animalis* menores a 1E6 UFC/gr. A partir del día 49 el recuento no tuvo variaciones apreciables (figura 23, izquierda).

De manera complementaria, se realizó un análisis de sobrevivencia a partir de los recuentos obtenidos en cada tiempo de almacenamiento y considerando el recuento mínimo que debe tener cada gramo del producto para denotar su potencialidad probiótica (1E6). La función de sobrevivencia indicó que a partir de los 30 días de almacenamiento del producto no se puede dar garantía de su sobrevivencia en concentraciones propicias para facilitar la actividad probiótica (figura 23, derecha). Los resultados del análisis de sobrevivencia mostraron que

el producto no podría tener una denominación alusiva a la presencia de microorganismos probióticos posterior al mes transcurrido después de su elaboración.

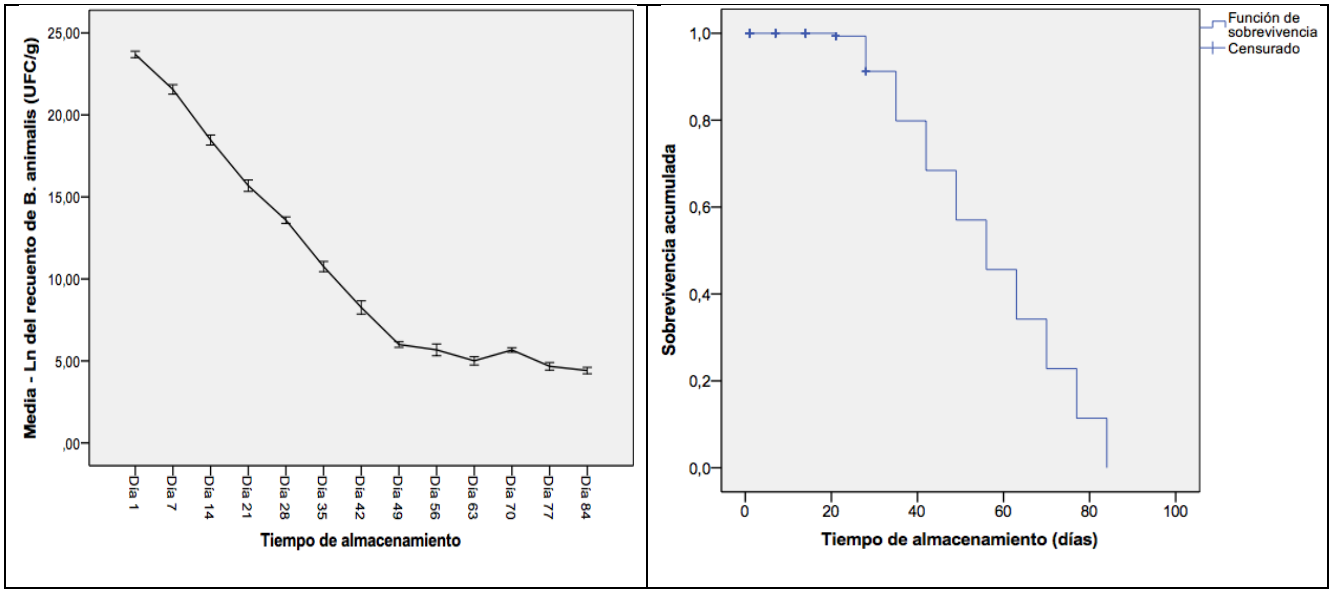


Figura 23. Recuento (izquierda) y análisis de sobrevivencia (derecha) de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina instantánea fortificada.

7.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL RECUENTO DE *B. animalis* EN HARINA DE PLÁTANO INSTANTÁNEA FORTIFICADA

7.3.1. Establecimiento del efecto de la Tº de la preparación del producto sobre el recuento de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada

Considerando que la exposición térmica es un factor limitante para la sobrevivencia del microorganismo se buscó establecer el efecto generado a diferentes temperaturas durante un tiempo de 10 minutos. Respecto del recuento control promedio, el mayor recuento se obtuvo a 22 ºC, el cual osciló entre 4500 y 7400 UFC/g, cuyo promedio representó una recuperación del 100%. A 55 ºC, se obtuvo un recuento promedio de 2560 UFC/g, que respecto del recuento control promedio representó una reducción del 60,1%. Además, el recuento promedio de *B. animalis* sometido a 80 ºC fue de 630 UFC/g, indicando una reducción del 90,2% (figura 24).

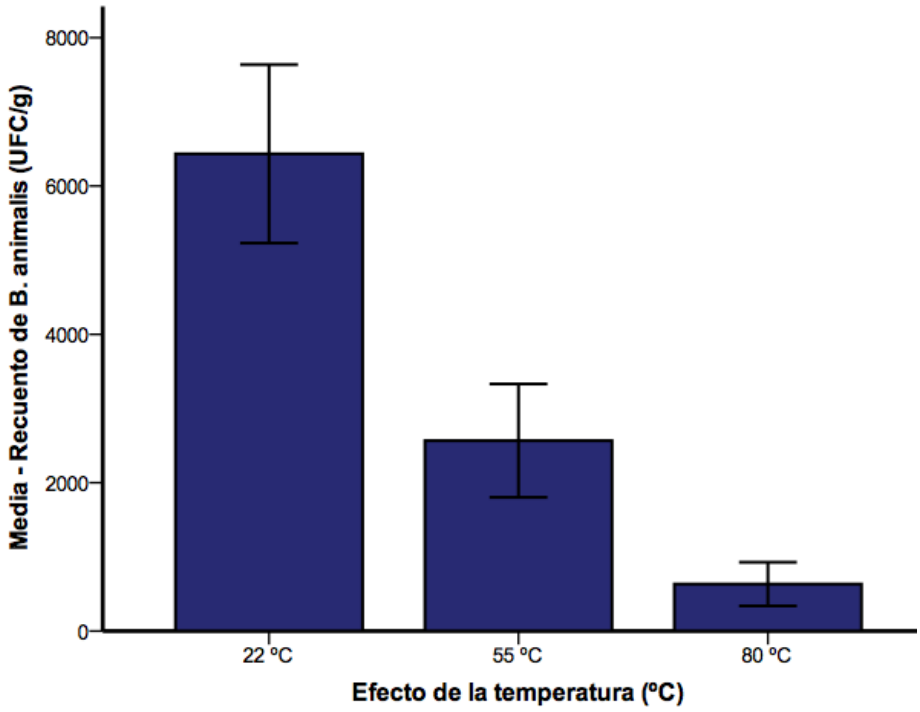


Figura 24. Recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano fortificada, sometido a diferentes temperaturas de preparación.

Debido a la violación del supuesto de homocedasticidad, los datos del recuento de *B. animalis* fueron sometidos a transformaciones (logaritmo en base 10, logaritmo natural y raíz cuadrada), entre las cuales, la raíz cuadrada permitió el cumplimiento subsecuente de los supuestos estadísticos. Consecuentemente, los recuentos fueron sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, obteniéndose valores P de 0,98, 0,20 y 0,20 para las temperaturas de 22, 55 y 80 ºC respectivamente, indicando la normalidad de los datos. Además, se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas, a partir del estadístico de Leven arrojó un valor P de 0,794, indicando la homocedasticidad de los datos.

Posterior a la evaluación de supuestos se realizó el análisis de varianza a la raíz cuadrada de los recuentos promedio de *B. animalis*, indicó diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados (P= 0,00). Así mismo, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ubicó en diferentes subgrupos los datos de la raíz cuadrada del recuento de *B. animalis* obtenidos a 3 diferentes temperaturas. Consecuentemente, los datos promedio obtenidos en los diferentes tratamientos fueron estadísticamente diferentes, de manera que a mayor temperatura hubo un menor recuento del microorganismo probiótico (tabla 7).

Tabla 7. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey para la raíz cuadrada recuento de *B. animalis* a diferentes temperaturas.

	Efecto de la temperatura (ºC)	N	Subconjunto		
			1	2	3
HSD Tukey[a,b]	80 ºC	6	24,627		
	55 ºC	6		50,239	
	22 ºC	6			79,917
	Sig.		1,000	1,000	1,000

7.4. EFECTO DEL pH SOBRE EL RECUENTO DE *B. animalis* EN HARINA DE PLÁTANO INSTANTÁNEA FORTIFICADA

7.4.1. Establecimiento del efecto del pH sobre el recuento de *B. animalis* en harina de plátano instantánea fortificada.

Teniendo en cuenta que los microorganismos probióticos deben superar el pH del estómago, que en adultos oscila entre 2 y 3, y que el tiempo de digestión de productos con predominio de carbohidratos oscila entre 60 y 120 minutos, se evaluó el efecto del pH sobre el recuento de *B. animalis*. Se tuvieron en cuenta los pH 2,5, 3,5 y 6,2 durante diferentes tiempos (60, 120 y 180 minutos). Independiente del pH utilizado, los recuentos disminuyeron invariablemente a mayor tiempo de contacto. Considerando el recuento control promedio, que correspondió a 6400 UFC/g, el conteo de *B. animalis* fue menor a pH 2,5 en comparación con los obtenidos en los demás pH; además, se resalta una disminución del 82,8% después de 60 minutos de exposición a pH 2,5, en comparación con una disminución del 21,4% a pH 3,5 en el mismo tiempo de contacto. Otro aspecto por denotar es que a pH 6,2 hubo una disminución leve del recuento de *B. animalis* al transcurrir el tiempo, hasta alcanzar un 21,9% después de 180 minutos (figura 25).

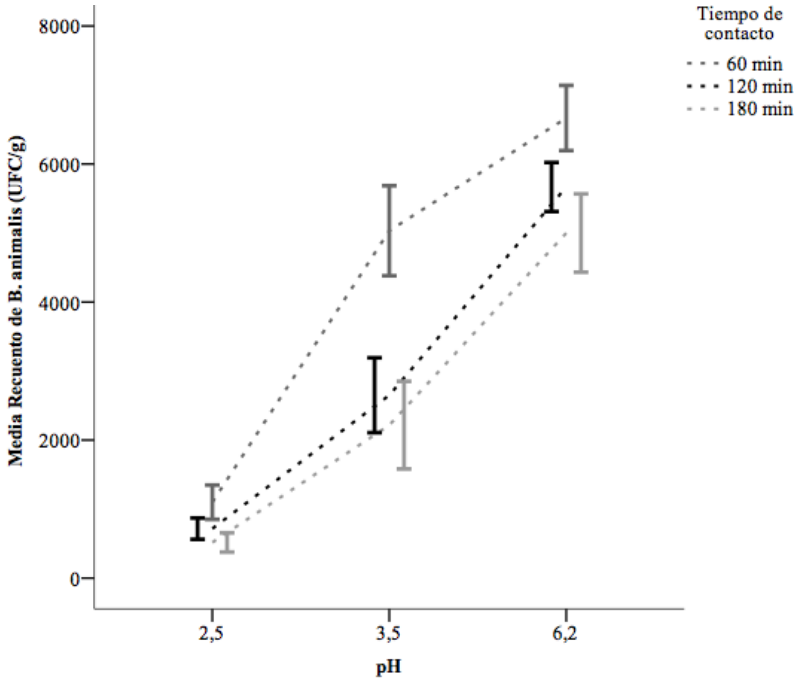


Figura 25. Recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano fortificada, sometido a diferentes pH.

Debido a que los datos de los recuentos no cumplieron con el supuesto de normalidad, se realizó una transformación mediante el logaritmo natural y se procedió al análisis formal de los datos. Previo al análisis de varianza, se evaluó el supuesto de normalidad a través del estadístico de Shapiro-Wilk, con valores P de 0,081, 0,108 y 0,755 para los grupos de datos de los pH 2,5, 3,5 y 6,2 respectivamente; mientras, que para los tiempos 60, 120 y 180 minutos se obtuvieron valores P de 0,051, 0,072 y 0,084 respectivamente. Además, se verificó la homogeneidad entre las varianzas, a través del estadístico de Levene, con un valor P= 0,056.

Verificados los supuestos, se procedió al análisis de varianza respectivo, mediante el cual se determinó la existencia de interacción entre los factores pH y tiempo de contacto (P= 0,00). Posteriormente, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey evidenció que los valores promedio eran estadísticamente diferentes al variar el pH y el tiempo de contacto (tabla 8).

Tabla 8. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey para el Ln del recuento de *B. animalis* a diferentes pH y tiempos de contacto.

	(I) Efecto del pH	(J) Efecto del pH	Diferencia de medias (I-	Sig.	Intervalo de confianza (95%)

			J)		Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	2,5	3,5	-0,409*	,000	-0,567	-0,251
		6,2	-1,555*	,000	-1,713	-1,397
	3,5	2,5	0,409*	,000	0,251	0,567
		6,2	-1,146*	,000	-1,304	-0,988
	6,2	2,5	1,555*	,000	1,397	1,713
		3,5	1,146*	,000	0,988	1,304

	(I) Tiempo de contacto (min)	(J) Tiempo de contacto (min)	Diferencia de medias (I-J)	Sig.	Intervalo de confianza (95%)	
					Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	60 min	120 min	0,414*	,000	0,255	0,572
		180 min	0,635*	,000	0,477	0,793
	120 min	60 min	-0,414*	,000	-0,572	-0,255
		180 min	0,221*	,004	0,629	0,379
	180 min	60 min	-0,635*	,000	-0,793	-0,477
		120 min	-0,221*	,004	-0,379	-0,629

7.5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SALES BILIARES SOBRE EL RECUENTO DE *B. animalis* EN HARINA DE PLÁTANO INSTANTÁNEA FORTIFICADA

7.5.1. Establecimiento del efecto de las sales biliares sobre el recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano.

Teniendo en cuenta que los microorganismos probióticos deben sobrevivir en concentraciones de sales biliares cercanas al 1%, y que el tiempo de contacto es de alrededor de 120 minutos, se evaluó el efecto de las sales biliares sobre el recuento de *B. animalis*,

partiendo de un recuento control promedio cercano a 5900 UFC/g. Se obtuvo un recuento significativamente superior de *B. animalis* al utilizar 1 g/L, con una disminución máxima del 70,7% en un tiempo de contacto de 180 minutos, comparado con concentraciones mayores (3 y 5 g/L), para las cuales se obtuvieron reducciones del 90,1 y 94,3%, respectivamente. Además, en presencia de 1 g/L las reducciones fueron del 27,8 y 35,2% en los tiempos de contacto de 60 y 120 minutos, respectivamente. Así mismo, en todas las concentraciones de sales biliares probadas frente a *B. animalis*, las reducciones fueron apreciablemente mayores con un tiempo de contacto de 180 minutos, en comparación con las obtenidas en tiempos menores (Figura 26).

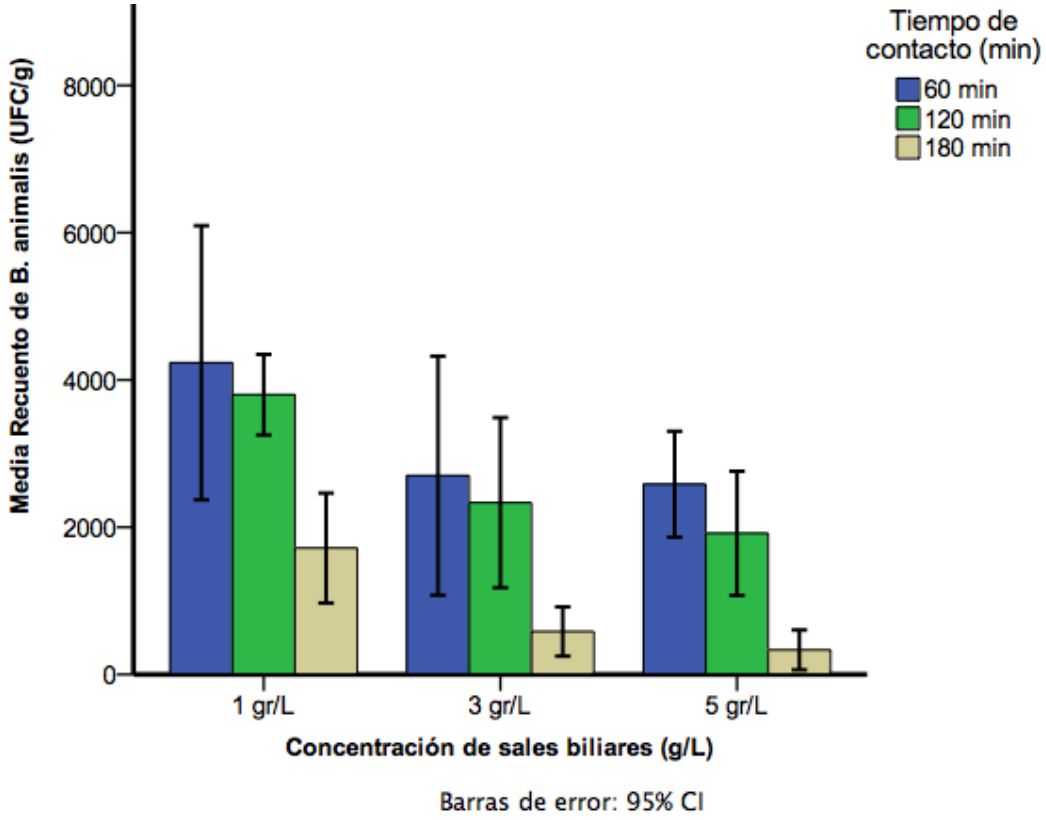
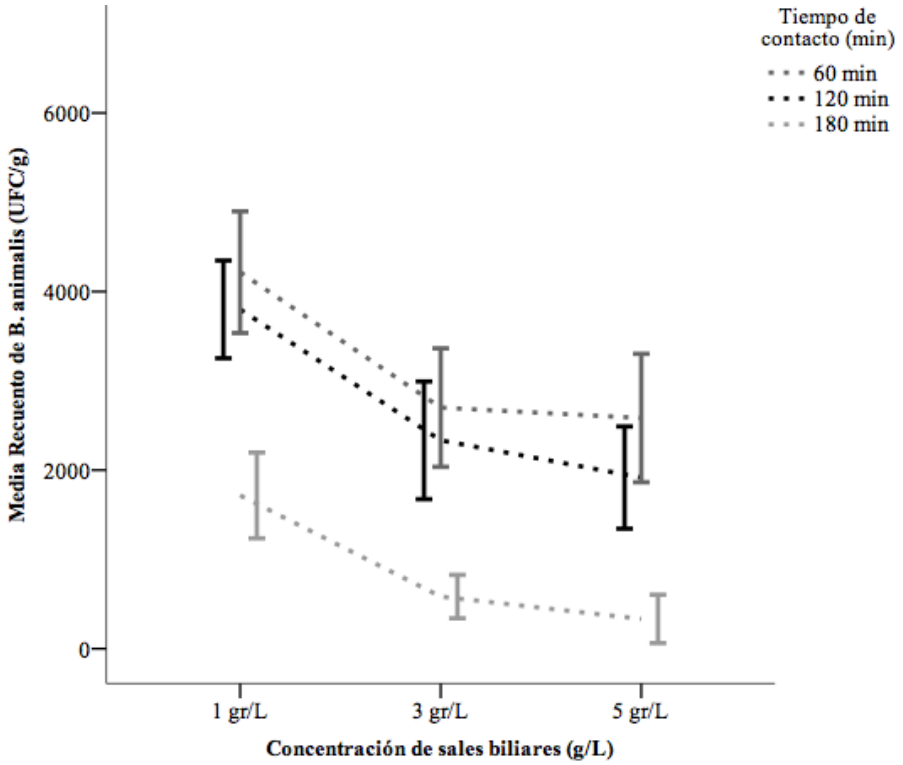


Figura 26. Recuento de *B. animalis* en presencia de sales biliares a diferentes tiempos de contacto.



7.5.2. Evaluación de supuestos y efecto del factor concentración de sales biliares sobre el recuento de *B animalis*

Respecto a la evaluación de los supuestos estadísticos, a partir de los datos del estudio, sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se obtuvieron valores P de 0,63, 0,50 y 0,55 para los tiempos de contacto de 60, 120 y 180 minutos respectivamente; mientras que, para las concentraciones de sales biliares de 1, 3 y 5 g/L se obtuvieron valores P de 0,279, 0,051 y 0,372 respectivamente. Consecuentemente, los datos de los residuos para la variable de respuesta "Recuento de *B. animalis*" fueron normales. Así mismo, los datos se sometieron a la prueba de igualdad entre varianzas de Levene, obteniéndose un valor P de 0,77 el cual implicó su homocedasticidad.

Los resultados del análisis de varianza, aplicados mediante la prueba de efectos inter-sujetos para la variable dependiente "Recuento de *B. animalis*", indicaron la asociación de esta variable a los factores concentración de sales biliares y tiempo de contacto (P= 0,000) sin evidencia de interacción entre estos factores (P= 0,969). Además, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey demostró que los recuentos alcanzados en presencia de sales biliares en concentración de 1g/L eran estadísticamente mayores a los obtenidos frente a concentraciones superiores y que los recuentos obtenidos con 3 y 5 g/L eran

estadísticamente similares (tabla 9). Por otra parte, los recuentos resultaron significativamente menores con un tiempo de contacto de 180 min, en comparación con los demás tiempos utilizados, mientras que no hubo diferencias estadísticas al comparar los recuentos a 60 y 120 minutos.

Tabla 9. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey para el recuento de *B. animalis* a diferentes concentraciones de sales biliares y tiempos de contacto.

	(I) Conc sales biliares (g/L)	(J) Conc sales biliares (g/L)	Diferencia de medias (I-J)	Sig.	Intervalo de confianza (95%)	
					Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	1 g/L	3 g/L	1377,78*	,000	578,45	2177,11
		5 g/L	1638,89*	,000	839,56	2438,22
	3 g/L	1 g/L	-1377,78*	,000	-2177,11	-578,45
		5 g/L	261,11	,710	-538,22	1060,44
	5 g/L	1 g/L	-1638,89*	,000	-2438,22	-839,56
		3 g/L	-261,11	,710	-1060,44	538,22

	(I) Tiempo de contacto (min)	(J) Tiempo de contacto (min)	Diferencia de medias (I-J)	Sig.	Intervalo de confianza (95%)	
					Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	60 min	120 min	488,89	,309	-310,44	1288,22
		180 min	2294,44*	,000	1495,12	3093,77
	120 min	60 min	-488,89	,309	-1288,22	310,44
		180 min	1805,56*	,000	1006,23	2604,88
	180 min	60 min	-2294,44*	,000	-3093,77	-1495,12
		120 min	-1805,56*	,000	-2604,88	-1006,23

8. DISCUSIÓN

8.1. ANÁLISIS DE CONFIABILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DE *B. animalis* EN HARINA DE PLÁTANO INSTANTÁNEA FORTIFICADA

La microencapsulación ha constituido en los últimos años una estrategia útil para contribuir a la sobrevivencia de los microorganismo durante su almacenamiento (Parra, 2010;De Araújo et al., 2015). Sin embargo, es posible que ocurran reducciones dramáticas durante la encapsulación, producto de la disrupción de la membrana celular, desnaturalización de proteínas y ácidos grasos e interferencia con rutas bioquímicas claves (Zhang et al., 2015; Tanzina et al., 2017). Además de la resistencia intrínseca del microorganismo, el efecto térmico depende de la composición del material encapsulante, que además, debe tener la denominación "Generalmente Reconocido como Seguro" (GRAS) y no generar toxicidad para el microorganismo. En efecto, se ha demostrado una relación entre la tolerancia al calor y la complejidad de las estructuras de encapsulación (Arslan-Tontul & Erbas, 2017). Así mismo, las condiciones ambientales suministradas durante el almacenamiento influyen en la sobrevivencia de la célula encapsulada (Rodrigues et al., 2011), incluyendo la temperatura, humedad relativa y características de la matriz alimentaria que alberga el alimento.

En el caso de *B. animalis* microencapsulado mediante secado por aspersión e incorporado en harina de plátano, se presentó una reducción de 4 unidades logarítmicas después de tres semanas. Estos resultados contrastan con un estudio previo según el cual, *B. animalis* subsp. *lactis* no se afectan con largos periodos de almacenamiento (Rodrigues et al., 2011). De acuerdo a las condiciones anteriormente mencionadas, *B. animalis* tuvo esta drástica disminución debido a la confluencia de diferentes factores, principalmente la influencia del método de encapsulación utilizado, la temperatura y humedad relativa del almacenamiento el tipo de material encapsulante empleado y la matriz alimentaria en la cual fue incorporada.

Respecto del método utilizado, los cambios en la presión osmótica durante la microencapsulación, producto de la rápida evaporación del agua, podrían ser considerados como un factor de deterioro inicial en contra de la sobrevivencia de *B. animalis* durante el almacenamiento. Si bien, se ha establecido que durante el almacenamiento del probiótico microencapsulado no se presentan diferencias en la actividad de agua, respecto del microorganismo sin encapsular, existe un efecto lesivo atribuible al proceso de encapsulación (Heidebach et al., 2010), que probablemente influencia la sobrevivencia durante el tiempo de almacenamiento. Así mismo, se reportan eficiencias de sobrevivencia mayores al 90%, después del secado por aspersión y enfriamiento tras atomización de los microorganismos *S. boulardii*, *L. acidophilus* y *B. bifidum*, respecto de las células sin encapsular (Arslan-Tontul & Erbas, 2017). Es pertinente aclarar que en comparación con las células libres, el

microambiente de la capsula brinda mayor protección al microorganismo frente al choque osmótico al momento de la encapsulación, así como en el almacenamiento, condición que justifica el uso de estos tratamientos.

Teniendo en cuenta el tiempo de almacenamiento, se han obtenido diferentes resultados, los cuales han sido influenciados por condiciones de encapsulación como el método, material encapsulante y la temperatura de almacenamiento empleada. En el caso de *L. salivarious* microencapsulado usando secado por congelación con microgeles de alginato y alginato-gelatina, hubo una disminución en la viabilidad celular de 2,4 log y 1,7 log respectivamente, después de 5 semanas en estado húmedo, similar al de un producto comercial de base acuosa (Yao et al., 2017). Igualmente, a 25 ºC/60% RH durante un periodo de almacenamiento de 42 días, la reducción del microencapsulado de *L. rhamnosus* basada en alginato, lecitina y almidón estuvo entre 1,23 y 2,66 log en diferentes formulaciones probadas (Tanzina et al., 2017). Al utilizar 37 ºC, se apreció una notable disminución del recuento de *Lactobacillus plantarum* después de 3 días de almacenamiento y no hubieron células viables después de 14 días (Albadran et al., 2015).Las microencapsulación mediante secado por aspersión de *L. plantarum* y *L. casei* basadas en soya y sometidas a 25 ºC/60% RH también mostraron una alta tasa de pérdida de viabilidad después de 2 meses, la cual fue mejorada usando inulina y/o oligosacáridos como material de pared(González-Ferrero et al., 2018). Estos resultados denotan además la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre la reducción de los probióticos en el almacenamiento.

Hilado a lo anterior, se ha establecido que la refrigeración puede mejorar la sobrevivencia en el almacenamiento. El estudio del efecto de la temperatura de almacenamiento de *Bifidobacterium* Bb12 en microcápsulas basadas en caseína, mostró una mayor tasa de inactivación a 25 ºC, en comparación con 4 ºC, donde se obtuvo una disminución cercana a 1 ciclo logarítmico (Heidebach et al., 2010). Así mismo, el almacenamiento de *L. plantarum* en refrigeración durante 21 días, microencapsulado en una matriz de alginato de sodio mostró sobrevivencias cercanas a 9 Log, frente a 1 Log de recuperación obtenido de células no encapsuladas (Coghetto et al., 2016). El efecto denotado podría estar relacionado con la disminución del detrimento celular por reacciones metabólicas como la oxidación de ácidos grasos, que producen desnaturalización de proteínas y degradación de 63 fosfolípidos (Tanzina et al., 2017). En particular, la destrucción bacteriana en el almacenamiento se evidencia por un incremento en la relación entre los ácidos grasos saturados e insaturados, producto de la oxidación de lípidos, lo que a su vez desencadena la formación de radicales libres que dañan el ADN y las células de la membrana (Albadran et al., 2015).

Considerando la influencia de la matriz alimentaria, en el presente estudio se utilizó harina de plátano, cuya baja actividad de agua implica el impedimento para *B. animalis*, de obtener las cantidades residuales que le permitan el desarrollo de algunas de sus funciones

metabólicas básicas. Sumado a ello, la captación residual acuosa, producto de la humedad relativa utilizada en el almacenamiento (80%), que normalmente influencia el contenido de agua de las microcápsulas, pudo haber sido principalmente contenida en la matriz alimentaria dada su naturaleza higroscópica, con la consecuente afectación de la viabilidad de *B. animalis*. Al mismo tiempo, una contracción de la cápsula por aglomeración de la estructura polimérica sería la causante de la disminución en su área, como factor adicional limitante de la captación residual acuosa durante el almacenamiento.

8.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE PREPARACIÓN SOBRE EL RECUENTO DE *B. animalis* EN HARINA DE PLÁTANO INSTANTÁNEA FORTIFICADA

Considerando los recuentos obtenidos, la aplicación de una temperatura de 80 ºC afecta drásticamente la sobrevivencia de *B. animalis* y consecuentemente, la posibilidad de que pueda ejercer acción probiótica. Por otra parte, a 50 ºC también se presenta una reducción del recuento de este probiótico; sin embargo, esta no fue tan dramáticas como para sugerir que sea improbable el efecto benéfico en el organismo humano. De todos modos, se considera que el producto en estas temperaturas tendrá reducciones mínimas del 60,1%, por lo tanto, no sería apropiado su calentamiento en las condiciones evaluadas. Además, puesto que la matriz alimentaria es de preparación instantánea, el suministro térmico no constituye una condición sine qua non, para la preparación del producto. Los resultados obtenidos son comparables con el estudio efectuado por Arslan-Tontul & Erbas (2017) donde la exposición por 30 minutos de *S. boulardii*, *L. acidophilus* y *B. bifidum* a 80 ºC produjo tasas de sobrevivencia cercanas al 50%; mientras que a 50 ºC, alrededor del 90% de estos microorganismos sobrevivieron. Las pequeñas diferencias en la sobrevivencia de *B. animalis*, con respecto al referente esbozado, son atribuibles a las características de la estructura capsular utilizada y en menor orden de relevancia, al grado de resistencia a la temperatura, propia de cada microorganismo.

Se ha establecido que la encapsulación deriva en el mejoramiento de la estabilidad térmica del probiótico. Es evidente que la protección conferida por la encapsulación frente a la exposición térmica subsecuente depende de la temperatura y tiempo suministrados; no obstante, la estructura composicional capsular constituye un factor diferencial para la protección del probiótico. Como precedente de ello, el tratamiento térmico de *Lactobacillus salivarious* a 63 ºC durante 15 y 30 minutos mostró reducciones significativamente menores en lo tratamientos de mayor prolongación temporal, con una sobrevivencia superior en el microorganismo microencapsulado con microgeles de alginato-gelatina (Yao et al., 2017). Además, un estudio realizado con *L. Acidophilus* mostró que las células microencapsuladas

por extrusión en esferas de alginato con doble abrigo de quitosán y sometidas a 70 ºC por 60 minutos tuvieron mayor tasa de sobrevivencia que las células con abrigo sencillo (Jantarathin et al., 2017). Así mismo, *L. plantarum* y *L. casei* microencapsulados mediante secado por congelación con abrigo de doble capa de alginato, tuvieron una disminución cercana a 1,0 y 3,0 log, después de exposición a 75 ºC durante 1 y 10 minutos, respectivamente (Rather et al., 2017). Estos precedentes demuestran que la composición y disposición de la estructura capsular favorece la protección de estos microorganismos.

Independiente de la probada salvaguardia que significa la microencapsulación y, teniendo en cuenta que el secado por aspersión se fundamenta en la exposición de la suspensión biológica a un flujo de aire caliente, es pertinente dilucidar si el estado del probiótico tras la microencapsulación por este método es un factor condicionante de su posterior respuesta frente a la exposición térmica. De manera que es pertinente considerar en futuras exploraciones investigativas, que técnica de microencapsulación resulta más apropiada para obtener una mayor sobrevivencia del microorganismo, después de la exposición térmica. Igualmente, se podría indagar el desencadenamiento de estrategias de sobrevivencia del probiótico durante la encapsulación, evidenciables por la formación de metabolitos en la membrana celular, como los esteroles (Gutarowska et al., 2015) y su influencia sobre la resistencia del microorganismo, frente a diferentes temperaturas.

8.3. EFECTO DEL pH SOBRE EL RECUENTO DE *B. animalis* EN HARINA DE PLÁTANO INSTANTÁNEA FORTIFICADA

Superar la acidez intestinal representa uno de los principales desafíos que afrontan los microorganismos probióticos antes de instaurarse en el epitelio intestinal (Coghetto et al., 2016). Se ha indicado que, comparado con el estrés por sales biliares, el pH ácido provoca una mayor destrucción microbiana (Gómez-Mascara que et al., 2016). La exposición de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano, a pH equivalentes al comúnmente existente en el estómago mostró que el microorganismo es significativamente afectado a pH 2,5 con una reducción mayor al 80% desde los 60 minutos de contacto, mientras a pH 3,5 se requirió tiempos mayores para alcanzar un nivel de reducción superior al 50%. Esto implica una eficiencia limitada en la estructura capsular compuesta por Maltodextrina para proteger al microorganismo, al impedir la difusión de las moléculas ácidas como disruptores físicos y de los procesos biológicos en la célula bacteriana.

Otro aspecto sujeto de interpretación biológica es que a pH 6,2 el recuento de *B. animalis es*tuvo una reducción directamente proporcional al tiempo de contacto. Esto permite inferir la existencia concomitante de un grado de deterioro de *B. animalis* en el momento temporal del experimento (cuarta semana), así como una pérdida de integridad en la cápsula de

Maltodextrina; factores que facilitaron la subsecuente afectación del microorganismo por estrés osmótico durante el experimento, conforme transcurrió el tiempo. La pérdida progresiva en la integridad de *B. animalis* es apoyada por los descensos drástico-evidenciados en el análisis del tiempo de falla de este microorganismo. Tal condición explicaría no solo la mayor disminución de *B. animalis* al incrementar los minutos de contacto a pH 6,2, sino que también sería un factor aditivo al efecto provocado por los pH 2,5 y 3,5 en los tiempos de mayor prolongación. Específicamente, a pH 3,5 la reducción del recuento de *B. animalis* fue más notoria en los tiempos de 120 y 180 minutos, tanto por la pérdida de integridad de la cápsula como por la susceptibilidad osmótica del microorganismo en la cuarta semana.

Comparados con los resultados obtenidos, otros estudios muestran reducciones de entre 1 y 3 logaritmos por sometimiento de cepas microencapsuladas a fluidos gástricos simulados durante diferentes tiempos de exposición. En el caso de *L. plantarum* sometido a los métodos de ionización por electroespray y secado por congelación, se demostró que las pérdidas por estrés gástrico pueden ser de alrededor de 2 $\log_{10}$ (Gomez-Mascaraque et al., 2016). Igualmente, hubo una reducción de 1,9 $\log_{10}$de *L. salivarious* microencapsulado con microgeles de alginato-gelatina, después de 40 minutos en condiciones gástricas simuladas (Yao et al., 2017). Así mismo, *Lactobacillus plantarum* encapsulado mediante secado por aspersión en alginato de sodio tuvo un decrecimiento de 2,9 Log cuando fue expuesto durante 120 minutos a condiciones simuladas de ácidos gástricos (Coghetto et al., 2016). Además, *L. rhamnosus* encapsulado en microperlas basadas en alginato–nanocristales de celulosa – lecitina fue sometido al contacto con condiciones gástricas simuladas (pH= 1,5), obteniéndose una reducción entre 1 y 2 log en un tiempo de 2 horas (Tanzina et al., 2017). También, se ha probado el uso de micropartículas a base de soya para mejorar la tolerancia de *L. plantarum* y *L. casei* a fluidos gastrointestinales simulados, con resultados satisfactorios (González-Ferrero et al., 2018). De manera opuesta, otros estudios muestran reducciones superiores, que implicarían la incapacidad de estos microorganismos para generar beneficios en la salud de los consumidores (Arslan-Tontul&Erbas, 2017; Rather et al., 2017).

La destrucción de los microorganismos probióticos en el estómago se ha relacionado no solo con el nivel de acidez, sino también con la destrucción de las proteínas de la membrana por acción de enzimas (Tanzina et al., 2017) como la pepsina y pancreatina, las cuales causan lisis de la pared bacteriana (Coghetto et al., 2016).Por tanto, sería pertinente en un estudio posterior la inclusión de este factor para establecer su efecto, concomitante con el pH ácido, sobre la viabilidad de *B. animalis*.

8.4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SALES BILIARES SOBRE EL RECUENTO DE *B. animalis* EN HARINA DE PLÁTANO INSTANTÁNEA FORTIFICADA

El paso de *B. animalis* a través del tracto intestinal implica, entre otros aspectos, la necesidad de sobrevivencia frente a concentraciones de sales biliares cercanas al 1% durante cerca de 60 minutos. Bajo estas condiciones, *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano fue capaz de sobrevivir con recuentos similares a los que tuvo sin exposición a concentración alguna de sales biliares. Esto indica que la microencapsulación de *B. animalis* con maltodextrina permitirían al microorganismo incorporado en harina de plátano la resistencia a sales biliares a nivel intestinal. Un aspecto por considerar en que cuando las microcápsulas se generan sin excesivo calor, los procesos de microencapsulación pueden derivar en una mayor sobrevivencia en los procesos subsecuentes de exposición a estrés gastrointestinal (Coghetto et al., 2016). En este caso, el proceso de secado por aspersión se llevó a cabo a 80 ºC, existiendo precedentes con resultados satisfactorios al usar la misma temperatura, aunque otro tipo de material encapsulante (Arslan-Tontul & Erbas, 2017; González-Ferrero et al., 2018).

Los estudios previos han mostrado reducciones razonables, que denotan la potencialidad de los diferentes métodos de microencapsulación para mantener la integridad de los probióticos. *Lactobacillus salivarious* encapsulado con microgeles de alginato-gelatina bajo condiciones intestinales simuladas durante 40 minutos tuvo una disminución de alrededor de 2 log (Yao et al., 2017). Igualmente, hubo una disminución cercana a 2 log cuando los microorganismos microencapsulados *L. plantarum* y *L. casei* fueron expuestos a condiciones intestinales simuladas durante 120 minutos (Rather et al., 2017). Además, las pérdidas del *L. plantarum* sometido a ionización por electroespray y secado por congelación fueron cercanas a 1 log, después de exposición a estrés intestinal (Gómez-Mascaraque et al., 2016). Un resultado satisfactorio fue promovido por la integración de goma arábiga y β-ciclodextrina como materiales de pared para encapsular *L. acidophilus*, el cual, después de 180 minutos bajo condiciones similares a las intestinales, tuvo una sobrevivencia del 98,9% (Arslan-Tontul&Erbas, 2017). Los estudios expuestos tienen en común el uso de microorganismos del género *Lactobacillus*, mientras que utilizan una gama diversa de componentes capsulares, los cuales serían responsables principales del grado de sobrevivencia microbiana obtenido en cada caso.

Se ha considerado que la sobrevivencia de las células bacterianas en condiciones gastrointestinales se relaciona con la impermeabilidad y estabilidad de las microcápsulas frente a componentes deletéreos (Coghetto et al., 2016). Además, se ha demostrado que el material hidrofílico es más fácilmente degradado en presencia de sales de bilis (Arslan-Tontul & Erbas, 2017). En el caso de la maltodextrina, por ser un componente polimérico

anfipático, el tiempo de contacto prolongado implica una mayor posibilidad de pérdida de la integridad capsular. Esto explica por qué la exposición del microencapsulado a una suspensión de sales biliares, independiente de la concentración suministrada, tuvo un efecto deletéreo gradual sobre la cápsula, provocando disminuciones drásticas de *B. animalis* cuando se utilizó un tiempo de 180 minutos. La exploración futura de combinaciones estructurales en la cápsula podría derivar en una mayor sobrevivencia de *B. animalis* en el producto.

Conclusiones

EVALUACIÓN *B. animalis* MICROENCAPSULADO E INCORPORADO EN HARINA DE PLÁTANO DOMINICO HARTÓN

9. CONCLSIONES

- El porcentaje de falla de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano decreció significativamente entre la tercera y cuarta semana, pasando del 93 al 27%. Consecuentemente, a partir de la tercera semana el producto no podría ser considerado como probiótico.

- El área media de las cápsulas tuvo una disminución, pasando de 172 μm^2 en el día 1 a 39 μm^2 en el día 49, presentándose variaciones morfológicas apreciables.

- Las temperaturas utilizadas tuvieron un efecto estadísticamente diferente sobre el recuento de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano, con una reducción del 60,1 y 90,2% a 50 y a 80 ºC respectivamente, respecto del recuento promedio del control.

- El suministro de pH menores a 3,5 en los tiempos superiores a 60 minutos afectó drásticamente la sobrevivencia de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano. Tanto el deterioro de este microorganismo, como el de su cubierta capsular en el momento temporal del análisis (quinta semana), influenciaron su sobrevivencia en los tratamientos en cuestión.

- Las concentraciones de 3 y 5 g/L de sales biliares en los tiempos de contacto iguales o superiores a 120 minutos disminuyeron los recuentos de *B. animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano, en un grado sustancial que podría afectar su capacidad de ejercer la acción probiótica en el organismo humano.

10. RECOMENDACIONES

- Se debería explorar el uso de otros tipos de encapsulantes basados en microgeles y microperlas, combinación de materiales poliméricos de diferente naturaleza y encapsulación con doble abrigo, como mecanismos de protección durante el almacenamiento del probiótico y frente al estrés térmico y bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

- Considerando que la microencapsulación puede afectar la viabilidad durante el almacenamiento del microorganismo microencapsulado por avería subletal, sería apropiado promover la resistencia de *B. animalis* a partir del efecto de condiciones de estrés controlado de carácter oxidativo, térmico y metabólico.

- Teniendo en cuenta la complejidad de las condiciones a las cuales se ve expuesto *B. animalis* al pasar por el tracto gastrointestinal, se podría diseñar un sistema continúo simulado donde se evalúe de manera secuencial y con mayor precisión el efecto de las condiciones gástricas e intestinales sobre la viabilidad del probiótico.

11. REFERENTES BIBLIOGRÁFICOS

Aceti, A., Gori, D., Barone, G., Callegari, M. L., Di Mauro, A., Fantini, M. P., … Italian Society of Neonatology. (2015). Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: systematic review and meta-analysis. *Italian Journal of Pediatrics*, *41*(1). https://doi.org/10.1186/s13052-015-0199-2

Acuerdo Final para la Terminación del Conflicto de Paz en Colombia. *La Construcción de una Paz Estable y Duradera. (2016).* Retrieved from http://www.altocomisionadoparalapaz.gov.co/herramientas/Documents/Acuerdo-Final-AF-web.pdf

Adhikari, K., Mustapha, A., Grü, I. U., & Fernando, L. (1299). Viability of Microencapsulated Bifidobacteria in Set Yogurt During Refrigerated Storage1. *Journal of Dairy Science*, *83*(12999), 1946–1951. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75070-3

Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U., & Fernando, L. (2000). Viability of Microencapsulated Bifidobacteria in Set Yogurt During Refrigerated Storage. *Journal of Dairy Science*, *83*(9), 1946–1951. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75070-3

Aguayo, E., Tarazona-Díaz, M. P., Martínez-Sánchez, A., & García-González, A. (2017). Influence of moderate high-pressure homogenization on quality of bioactive compounds of functional food supplements. *Journal of Food Quality*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/2856125

Alves, N. N., Messaoud, G. Ben, Desobry, S., Costa, J. M. C., & Rodrigues, S. (2016). Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. *Journal of Food Engineering*, *189*, 45–54. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.023

Amakiri, A. C., & Thantsha, M. S. (2016). Survival of Bifidobacterium longum LMG 13197 microencapsulated in Vegetal or Vegetal-inulin matrix in simulated gastrointestinal fluids and yoghurt. *SpringerPlus*, *5*(1). https://doi.org/10.1186/s40064-016-3010-y

Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, *18*(5), 240–251. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004

Anandharamakrishnan, C., Rielly, C. D., & Stapley, A. G. F. (2007). Effects of Process Variables on the Denaturation of Whey Proteins during Spray Drying. *Drying Technology*, *25*(5), 799–807. https://doi.org/10.1080/07373930701370175

Araya-Quesada, Yorleny (1), Morales-Torres, Alejandra (1), Vargas-Aguilar, Pedro (1), Wexler, L. (2014). Potencial tecnológico de harina de plátano verde con cáscara (Musa AAB) como sustituto de grasa para geles cárnicos Technological use of green banana flour with shell (Musa AAB) as a fat susbtitute for meat models. *REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY*, *9*(2011), 50–60.

Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic Saccharomyces cerevisiae var: Boulardii with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1), 685–690. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034

Avellone, G., Salvo, A., Costa, R., Saija, E., Bongiorno, D., Di Stefano, V., … Dugo, G. (2018). Investigation on the influence of spray-drying technology on the quality of Sicilian Nero d'Avola wines. *Food Chemistry*, *240*(April 2017), 222–230. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.116

Azcárate-peril, M. A., Sikes, M., & Bruno-bárcena, J. M. (2011). The intestinal microbiota , gastrointestinal environment and colorectal cancer : a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer ? *J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *301*, 401–424. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00110.2011.

Bampi, G. B., Backes, G. T., Cansian, R. L., de Matos, F. E., Ansolin, I. M. A., Poleto, B. C., … Favaro-Trindade, C. S. (2016). Spray Chilling Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis subsp. lactis and Its Use in the Preparation of Savory Probiotic Cereal Bars. *Food and Bioprocess Technology*, *9*(8), 1422–1428. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1724-z

Bedoya, P. B., & Quino Ávila, A. C. (2014). Efectos de la desnutrición infantil sobre el desarrollo psicomotor. *Revista Criterios*, *21 (1)*(1), 225–244.

Bosnea, L. A., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2014). Complex Coacervation as a Novel Microencapsulation Technique to Improve Viability of Probiotics Under Different Stresses. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(10), 2767–2781. https://doi.org/10.1007/s11947-014-1317-7

Bustillo, Mariliana Videa, Vilalareyna Ruiz, Freyden Belén., Roda Zeledón, Hassell Janireth., López Rugama, F. Y. (2018). Harina de plátano (musa paradisiaca l.) en combinación con harina de maíz, para la elaboración de tortillas. plantain flour (musa paradisiaca l.) in combination with maize flour for the preparation of tortillas. *El Higo Universidad Nacional de Ingeniería Sede Regional Norte*, *8*, 10–21.

Brinques, G. B., & Ayub, M. A. Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of Lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, *103*(2), 123–128. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.006

Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Henkens, T., Kiekens, S., van den Broek, M. F. L., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2017). Research Paper: Enhancing the viability of Lactobacillus rhamnosus GG after spray drying and during storage. *International Journal of Pharmaceutics*, *534*(October), 35–41. Retrieved from http://10.0.3.248/j.ijpharm.2017.09.075%0Ahttps://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselp&AN=S037851731730950X&site=eds-live

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, *104*(4), 467–483. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031

Bustamante, M., Oomah, B. D., Rubilar, M., & Shene, C. (2017). Effective Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium infantis encapsulation with chia seed (Salvia hispanica L.) and flaxseed (Linum usitatissimum L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food Chemistry*, *216*, 97–105. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.019

Cabañas, S. D. (2015). *Alimentación y OGM: Los Alimentos Transgénicos*. *Universidad de Valladolid*.

Campaniello, D., Speranza, B., Petruzzi, L., Bevilacqua, A., & Corbo, M. R. (2018). How to routinely assess transition, adhesion and survival of probiotics into the gut: a case study on propionibacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, *53*(2), 484–490. https://doi.org/10.1111/ijfs.13607

Carlos, L., & Ballesteros, F. (2017). Mortalidad por desnutrición en menores de cinco años, aproximación estadística de los determinantes, Colombia 2009 - 2012.

Castellanos, F. J., & Lucas, J.C. (2011). Caracterización física del fruto en variedades de plátano cultivadas en la zona cafetera de Colombia. *Acta Agronómica*, 60 (2), 176-182. SSN electrónico 2323-0118. ISSN impreso 0120-2812.

Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*(2), 184–190. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001

Champagne, C. P., Raymond, Y., Guertin, N., & Bélanger, G. (2015). Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of

probiotic bacteria in ice cream. *International Dairy Journal*, *47*, 109–117. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.03.003

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004a). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, *56*(1), 27–35. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.002

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004b). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, *56*(1), 27–35. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.002

Chen, H. Y., Li, X. Y., Liu, B. J., & Meng, X. H. (2017). Microencapsulation of Lactobacillus bulgaricus and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, *29*, 248–255. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.015

Chen, M., Tang, H., & Chiang, M. (2017). Effects of heat , cold , acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of ke fi r-isolated probiotic Lactobacillus ke fi ranofaciens M1. *Food Microbiology*, *66*, 20–27. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.020

Cho, Y. A., & Kim, J. (2015). Effect of Probiotics on Blood Lipid Concentrations. *Medicine*, *94*(43), e1714. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001714

Colciencias, MADR, & Corpoica. (2017). Plan Estratégico de Ciencias, Tecnología e Innovación del sector agropecuario Colombiano (2017 - 2027). *Pectia*, 161.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, *162*(1), 56–67. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003

Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, *96*(5), 1024–1039. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02219.x

Corcoran, B., Stanton, C., Fitzgerald, G., & Ross, R. (2008). Life Under Stress: The Probiotic Stress Response and How it may be Manipulated. *Current Pharmaceutical Design*, *14*(14), 1382–1399. https://doi.org/10.2174/138161208784480225

Corrêa, R. C. G., Peralta, R. M., Bracht, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). The emerging use of mycosterols in food industry along with the current trend of extended use of bioactive phytosterols. *Trends in Food Science and Technology*, *67*, 19–35. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.012

Cortés, Misael; Chiralt, Amparo; Puente, L. (2005). Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. *Vitae*, 7–8. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/L_Diaz3/publication/260511523_ALIMENTOS_FUNCIONALES_UNA_HISTORIA_CON_MUCHO_PRESENTE_Y_FUTURO/links/0a85e53174e0e2bd95000000.pdf

Cuello, R. E. G., Mendoza, J. P., & Alcázar, L. B. M. (2015). Efecto de la microencapsulación sobre la viabilidad de lactobacillus delbrueckii sometido a jugos gástricos simulados. *Informacion Tecnologica*, *26*(5), 11–16. https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000500003

Clemente, E. (2008). Harina de plátano verde, una rica alternativa para celíacos. Directo al paladar. Retrieved from https://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/harina-de-platano-verde-una-rica-alternativa-para-celiacos

DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadísitcas. (2014). *El cultivo del plátano (Musa paradisiaca), un importante alimento para el mundo*. Retrieved from https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_abr_2014.pdf.

Dekker, J., Collett, M., Prasad, J., & Gopal, P. (2007). Functionality of probiotics - Potential for product development. *Forum of Nutrition*, *60*, 196–208. https://doi.org/10.1159/0000107196

Delgado Fernández, N. S. (2017). *" EVALUACIÓN DEL USO DE LA HARINA RACIÓN CRECIMIENTO-ENGORDE COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO EN CUYES MACHOS RAZA PERÚ (Cavia porcellus).* [tesis].*Facultad de Medicina Veterinaria. Limbayeque-Perú.*

Dianawati, D., Lim, S. F., Ooi, Y. B. H., & Shah, N. P. (2017). Effect of Type of Protein-Based Microcapsules and Storage at Various Ambient Temperatures on the Survival and Heat Tolerance of Spray Dried Lactobacillus acidophilus. *Journal of Food Science*, *82*(9), 2134–2141. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13820

Dianawati, D., & Shah, N. P. (2011). Survival, Acid and Bile Tolerance, and Surface Hydrophobicity of Microencapsulated *B. animalis* ssp. lactis Bb12 during Storage at Room Temperature. *Journal of Food Science*, *76*(9). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02422.x

Didari, T., Mozaffari, S., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2015). Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(10), 3072–3084. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i10.3072

Ding, W. K., & Shah, N. P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, *72*(9), 446–450. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00565.x

Ding, W. K., & Shah, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*, *15*(2), 219–232.

Divya, J. B., & Nampoothiri, K. M. (2015). Encapsulated Lactococcus lactis with enhanced gastrointestinal survival for the development of folate enriched functional foods. *Bioresource Technology*, *188*, 226230. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.073

Dominic, M. (2002). *Shelf Life*. (Blackwell Science Ltd, Ed.) (1st ed.). Australia: Principal Lecture in Food Sciences at the School of Applied Science South Bank University, London.

Doyon, M., & Labrecque, J. (2008). Functional foods: a conceptual definition. *British Food Journal*, *110*(11), 1133–1149. https://doi.org/10.1108/00070700810918036

Duque, Alba Lucia., Bohorquez, Y. (2001). *pérdida postcosecha del plátano.* Universidad del Quindío. 153-158.

Escorcia, T. A. (2008). El análisis bibliométrico como herramienta para el seguimiento de publicaciones científicas, tesis y trabajos de grado [tesis]. Pontificia Universidad Javeriana. *Tesis Pontificia Universidad Javeriana*, 1–61.

Espitia-Pérez, Pedro Juan., Pardo-Plaza, Yuri Janio., Montalvo-Puente, A. P. (2013). Características del análisis proximal de harinas obtenidas de frutos de plátanos variedades Papocho y Pelipita (Musa ABB Simmonds). *Acta Agronómica*, *62 (3)*, 189–195.

FAO/OMS. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudios FAO Alimentación Y Nutrición*, *85*, 52. Retrieved from file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIOTICOS OPS 2006.pdf

FAO.Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2013). *FAO en Huella del Despilfarro de Alimento.s* Retrieved from http://www.fao.org/3/a-ar428s.pdf.

FAO.Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2015). *FAO en Colombia- Colombia en una Mirada*. Retrieved from http://www.fao.org/colombia/fao-en-colombia/colombia-en-una-mirada/es/.

Favarin, L., Laureano-Melo, R., & Luchese, R. H. (2015). Survival of free and microencapsulated Bifidobacterium: Effect of honey addition. *Journal of*

Microencapsulation, *32*(4), 329–335. https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1017620

Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Kalbasi Ashtari, A., & Omid, M. (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, *90*(4), 667–675. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.04.006

Filser, lucas D., Francisco da Silva, F., & de Oliveira, O. J. (2017). State of research and future research tendencies in lean healthcare: a bibliometric analysis. *Scientometrics*, 1–18. https://doi.org/10.1007/s11192-017-2409-8

Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, *16*(3), 284–292. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008

Forssten, S. D., Sindelar, C. W., & Ouwehand, A. C. (2011). Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, *17*(6), 410–413. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.014

Fortin, M. H., Champagne, C. P., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., & Lacroix, M. (2011). Viability of bifidobacterium longum in cheddar cheese curd during manufacture and storage: Effect of microencapsulation and point of inoculation. *Dairy Science and Technology*, *91*(5), 599–614. https://doi.org/10.1007/s13594-011-0034-5

Flores Navarrete, D. S. (2018). *" Obtención de harina de plátano verde tipo HARTÓN (Musa AAB) precocida y fortificada . [Thesis]. Universidad central del ecuador facultad de ciencias químicas. p.17-64.*

Francisco, C. R. L., Heleno, S. A., Fernandes, I. P. M., Barreira, J. C. M., Calhelha, R. C., Barros, L., … Barreiro, M. F. (2018). Functionalization of yogurts with Agaricus bisporus extracts encapsulated in spray-dried maltodextrin crosslinked with citric acid. *Food Chemistry*, *245*(November 2017), 845–853. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.098

Fredua-Agyeman, M., & Gaisford, S. (2015). Comparative survival of commercial probiotic formulations: Tests in biorelevant gastric fluids and real-time measurements using microcalorimetry. *Beneficial Microbes*, *6*(1), 141–151. https://doi.org/10.3920/BM2014.0051

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, *45*(1), 306–312. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.020

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Pinto, S. S., Muñoz, I. B., & Amboni, R. D. M. C.

(2013). Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, *50*(1), 39–44. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.037

Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, *44*(5), 1127–1149. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.053

Gañan, P., Zuluaga, R., Restrepo, A., Labidi, J., & Mondragon, I. (2008). Plantain fibre bundles isolated from Colombian agro-industrial residues. *Bioresource Technology*, *99*(3), 486–491. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.012

García Segura, J. L., Montes Jave, C., Hilario Cárdenas, M. E., Asenjo López, P., & Baltazar Sánchez, G. (2002). *Pobreza y desnutrición infantil*. Retrieved from http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/handle/123456789/2413

Geng, S., Wang, Y., Zuo, J., Zhou, Z., Du, H., & Mao, G. (2017). Building life cycle assessment research: A review by bibliometric analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *76*(October 2015), 176–184. https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.068

Geng, Y., Chen, W., Liu, Z., Chiu, A. S. F., Han, W., Liu, Z., … Cui, X. (2017). A bibliometric review: Energy consumption and greenhouse gas emissions in the residential sector. *Journal of Cleaner Production*, *159*(800), 301–316. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.091

Geoffrey A. Preidis1, 2, Colin Hill3, Richard L. Guerrant4, B.S. Ramakrishna5, Gerald W. Tannock6, and J. V. (2011). Probiotics, Enteric and Diarrheal Diseases, and Global Health. *Gastroenterology*, *140*(1), 8–14. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.010.Probiotics

Gobernación de Caldas (2006). Desarrollo de la fruticultura en Caldas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-MADR Gobernación de Caldas Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola-FNFH Asociación Hortifrutícola de Colombia-Asohofrucol Sociedad de Agricultores y Ganaderos del Valle del Cauca-SAG. p. 9-10,22,24.

Gonçalves, A., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2016). Microencapsulation of vitamin A: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *51*, 76–87. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.001

Grover, S., Rashmi, H. M., Srivastava, A. K., & Batish, V. K. (2012). Probiotics for human health -new innovations and emerging trends. *Gut Pathogens*, *4*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/1757-4749-4-15

Guimaraes, Rangel Renata; Amaral Vendramini, Ana Lúcia do; Dos Santos, Antonio Carlos;

Ferreira Leite, S. G. L. M. (2013). De velopment of pr obiotic beads similar to fish eggs, *5*, 5–10. https://doi.org/10.1016/j.jf

Haddadin, M. S. Y. A. R. R. . (2004). The Production of Yoghurt with Probiotic Bacteria Isolated from Infants in Jordan. *Pakistan Journal of Nutrition*, *3*(5), 290–293. https://doi.org/10.3923/pjn.2004.290.293

Hamad, G. M., Zahran, E., & Hafez, E. E. (2017). The efficacy of bacterial and yeasts strains and their combination to bind aflatoxin B1 and B2 in artificially contaminated infants food. *Journal of Food Safety*, *37*(4), 1–9. https://doi.org/10.1111/jfs.12365

Headey, D. (2016). What Drives Diversification of National Food Supplies ? A Cross-Country Analysis Samira Choudhury, *15*(December), 85–93.

Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(4), 291–311. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499801

Ilha, E. C., da Silva, T., Lorenz, J. G., de Oliveira Rocha, G., & Sant'Anna, E. S. (2015). Lactobacillus paracasei isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *European Food Research and Technology*, *240*(5), 977–984. https://doi.org/10.1007/s00217-014-2402-x

Johnson-Henry, K. C., Abrahamsson, T. R., Wu, R. Y., & Sherman, P. M. (2016). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for the Prevention of Necrotizing Enterocolitis. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, *7*(5), 928–937. https://doi.org/10.3945/an.116.012237

Joseph, N., Kumar, A., Singh, H., Shaheen, M., Das, K., & Shrivastava, A. (2018). Nutritional Supplement and Functional Food Use Among Medical Students in India. *Journal of Dietary Supplements*, *211*, 1–15. https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1407384

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria 39 Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol*, *3*, 39–48.

Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT - Food Science and Technology*, *39*(10), 1221–1227. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.013

Kapsak, W. R., Rahavi, E. B., Childs, N. M., & White, C. (2011). Functional Foods: Consumer Attitudes, Perceptions, and Behaviors in a Growing Market. *Journal of the American Dietetic Association*, *111*(6), 804–810. https://doi.org/10.1016/j.jada.2011.04.003

Khem, S., Woo, M. W., Small, D. M., Chen, X. D., & May, B. K. (2015). Agent selection and protective effects during single droplet drying of bacteria. *Food Chemistry*, *166*, 206–214. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.010

Khosravi Zanjani, M. A., Ehsani, M. R., Tarzi, B. G., & Sharifan, A. (2018). Promoting probiotics survival by microencapsualtion with hylon starch and genipin cross-linked coatings in simulated gastro-intestinal condition and heat treatment. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *17*(2), 753–766.

Klein, M., Sanders, M. E., Duong, T., & Young, H. A. (2010). Probiotics: From Bench to Market. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1212*(SUPPL. 1), 1–14. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05839.x

Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, *57*(2), 761–766. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.037

Lahtinen, S. J. (2012). Probiotic viability – does it matter? *Microbial Ecology in Health & Disease*, *23*(0), 10–14. https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18567

Li, R., Zhang, Y., Polk, D. B., Tomasula, P. M., Yan, F., & Liu, L. S. (2016). Preserving viability of Lactobacillus rhamnosus GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. *Journal of Controlled Release*, *230*, 79–87. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.04.009

Li, X. Y., Chen, X. G., Sun, Z. W., Park, H. J., & Cha, D. S. (2011). Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in Lactobacillus casei ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, *83*(4), 1479–1485. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.053

Lian, W., Hsiao, H., & Chou, C. (2002). Survival of bifidobacteria after spray drying. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(1), 79–86. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501007334

Lira de Medeiros, A. C., Thomazini, M., Urbano, A., Pinto Correia, R. T., & Favaro-Trindade, C. S. (2014ª). Structural characterisation and cell viability of a spray dried probiotic yoghurt produced with goats' milk and Bifidobacterium animalis subsp. lactis (BI-07). *International Dairy Journal*, *39*(1), 71–77. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.05.008

Lira de Medeiros, A. C., Thomazini, M., Urbano, A., Pinto Correia, R. T., & Favaro-Trindade, C. S. (2014b). Structural characterisation and cell viability of a spray dried probiotic yoghurt produced with goats' milk and Bifidobacterium animalis subsp. lactis (BI-

07). *International Dairy Journal*, *39*(1), 71–77. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.05.008

Liserre, A. M., Ré, M. I., & Franco, B. D. G. M. (2007). Microencapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. lactis in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*, *21*(1), 1–16. https://doi.org/10.1080/08905430701191064

Lizarralde, R. D. (2014). *MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, Informe de Rendición Pública de Cuentas*.

Manickavasagan, A., Thangavel, K., Dev, S. R. S., Delfiya, D. S. A., Nambi, E., Orsat, V., & Raghavan, G. S. V. (2015). Physicochemical Characteristics of Date Powder Produced in a Pilot-Scale Spray Dryer. *Drying Technology*, *33*(9), 1114–1123. https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1014045

Mark-Herbert, C. (2004). Innovation of a new product category - Functional foods. *Technovation*, *24*(9), 713–719. https://doi.org/10.1016/S0166-4972(02)00131-1

Markowiak, Paulina., Slizewaska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, *9*(9), 1021. https://doi.org/10.3390/nu9091021

Mazzeo, M., Alzate G, A., & Marín, M. (2008). Obtención de Almidón a Partir de Residuos Poscosecha del Plátano Dominico Hartón (Musa AAB SIMMONDS). *Vector*, *3*, 57–69.

Mazzeo -Menese, M., León Agatón, L., Mejía Gutiérrez, L. F., Guerrero Mendieta, L. E., & Botero López, J. D. (2010). APROVECHAMIENTO INDUSTRIAL DE RESIDUOS. *Revista Educación En Ingeniería*, *9*, 128–139.

Masters, W. A., Hall, A., Martinez, E. M., Shi, P., Singh, G., Webb, P., & Mozaffarian, D. (2016). The nutrition transition and agricultural transformation: a Preston curve approach. *Agricultural Economics (United Kingdom)*, *47*, 97–114. https://doi.org/10.1111/agec.12303

Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future Probiotic foods. *International Dairy Journal*, *12*(2–3), 173–182. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00099-1

Michael de Vrese and Schrezenmeir, J. (2008). 3 - Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, (May), 19–25.e1. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00003-5

MinAgricultura. (2014). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, (571).

Ministerio de la protección Social. (2008). Resolucion numero 288 de 2008, 1–54.

Misselwitz, B., Pohl, D., Frühauf, H., Fried, M., Vavricka, S. R., & Fox, M. (2013). Lactose

malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European Gastroenterology Journal*, *1*(3), 151–159. https://doi.org/10.1177/2050640613484463

Mongeon, P., & Paul-Hus, A. (2016). The journal coverage of Web of Science and Scopus: a comparative analysis. *Scientometrics*, *106*(1), 213–228. https://doi.org/10.1007/s11192-015-1765-5

Moumita, S., Goderska, K., Johnson, E. M., Das, B., Indira, D., Yadav, R., … Jayabalan, R. (2017). Evaluation of the viability of free and encapsulated lactic acid bacteria using in-vitro gastro intestinal model and survivability studies of synbiotic microcapsules in dry food matrix during storage. *LWT - Food Science and Technology*, *77*, 460–467. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.079

Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., & Maneerat, S. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(8), 1337–1345. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0020-8

Noori, N., Khaji, L., & Gandomi, H. (2017). Effects of Camellia sinensis on survival of encapsulated Lactobacillus casei and Bifi dobacterium lactis in ice-cream, *10*(1), 72–77.

Olagnero, G., Abad, a, & Bendersky, S. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, *25*, 14. https://doi.org/0328-1310

Olivares-tenorio, M., Dekker, M., & Boekel, M. A. J. S. Van. (2017). LWT - Food Science and Technology Evaluating the effect of storage conditions on the shelf life of cape gooseberry (Physalis peruviana L .). *LWT - Food Science and Technology*, *80*, 523–530. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.027

Oldenhof, tte, Wolkers, W. F., Fonseca, F., phanie Passot, S., & le Marin, M. (2005). Effect of Sucrose and Maltodextrin on the Physical Properties and Survival of Air - Dried Lactobacillus bulgaricus : An in Situ Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2021

Ouwehand, A. C. (2017). A review of dose-responses of probiotics in human studies. *Beneficial Microbes*, *8*(2), 143–151. https://doi.org/10.3920/BM2016.0140

Ozen, M., & Dinleyici, E. C. (2015). The history of probiotics: The untold story. *Beneficial Microbes*, *6*(2), 159–165. https://doi.org/10.3920/BM2014.0103

Pacifico, L., Osborn, J. F., Bonci, E., Romaggioli, S., Baldini, R., & Chiesa, C. (2014). Probiotics for the treatment of Helicobacter pylori infection in children. *World Journal of*

Gastroenterology, *20*(3), 673–683. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i3.673

Páez, B. R. (2013). *Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para aplicación en alimentos. Estudios microbiológicos y tecnológicos.* Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/38116/Documento_completo__.pdf?sequence=1

Pacheco, E. (2001). Laboratorio de bioquímica de alimentos. Instituto de química y tecnología. Facultad Agronomía. Retrieved from http://acta.ivic.gob.ve/52- 4/articulo6.pdf

Paganelli, R., Ciuffreda, S., Verna, N., Cavallucci, E., Paolini, F., Ramondo, S., & Di Gioacchino, M. (2002). Probiotics and food-allergic diseases. *Allergy*, *57 Suppl 7*(5), 97–99.

Pakdaman, M. N., Udani, J. K., Molina, J. P., & Shahani, M. (2016). The effects of the DDS-1 strain of lactobacillus on symptomatic relief for lactose intolerance - A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. *Nutrition Journal*, *15*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12937-016-0172-y

Panghal, A., Janghu, S., Virkar, K., Gat, Y., Kumar, V., & Chhikara, N. (2018). Food Bioscience Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach, *21*(October 2017), 80–89.

Pedroso, D. L., Dogenski, M., Thomazini, M., & Heinemann, R. J. B. (2013). and Lactobacillus acidophilus in cocoa butter using spray chilling technology, *783*, 777–783. https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300017

Pereira-caro, G., Oliver, C. M., Weerakkody, R., Singh, T., Conlon, M., Borges, G., … Ann, M. (2015). Free Radical Biology and Medicine Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice fl avanones in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, *84*, 206–214. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.010

Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, *14*(6), 505–515. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.008

Pinto, S. S., Fritzen-freire, C. B., Prudêncio, E. S., Muñoz, I. B., & Amboni, R. D. M. C. (2015). Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of Bifidobacterium-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, *50*(1), 39–44. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.037

Principi, A. N., Cozzali, R., Farinelli, E., Brusaferro, A., Esposito, S., & Esposito, S. (2017).

Gut dysbiosis and irritable bowel syndrome: the potential role of probiotics.

Qu, M. C. D. E., Alimentos, M. D. E., Autor, A., Stalin, D., Navarrete, F., & Isabel, M. S. (2018). *" Obtención de harina de plátano verde tipo HARTÓN (Musa AAB) precocida y fortificada ."*

Quiceno, Maria Cristina., Giraldo, Germán Antonio., Villamizar, R. H. (2014). Physical-chemical characterization of plantain (Musa paradisiacal sp . AAB , Simmonds) for industrialization Materiales y métodos. *Universidad La Gran Colombia*, *20*, 48–54.

RAMÓN MOLINA, M. M. (2009). *Desarrollo de leche de soya en polvo con un ingrediente funcional por medio de la microencapsulación de cultivos probióticos (Lactobacillus Casei 01) utilizando el método de secado por aspersión*.

Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., John, K., & Mccormick, J. K. (2003). Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(4), 658–671. https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.658

Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, *27*(1), 1–11. https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.008

Roberfroid, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. Digestive and Liver Disease. *Digestive and Liver Disease*, *34*, 105–10.

Robledo, S., Osorio, G. A., & López, C. (2014). Networking en pequeña empresa: una revisión bibliográfica utilizando la teoria de grafos. *Revista Vínculos*, *11*(2), 6–16.

Robledo, S., & Zuluaga, Jorge. (2013). Diffusion of Products Through Social Networks : *Respuestas*, *18*(2), 28–42.

Rodríguez- barona, Sneyder; Montes, Luz M.; De J. Ramírez, D. (2012). Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión en presencia de prebióticos.

Rodriguez-Barona, S., Paz, D. L., Zuluaga, A., & Giraldo Gómez, G. I. (2016). Efecto del secado combinado en la estabilidad de probióticos microencapsulados incorporados en una matriz alimenticia. *Revista Agronomía Colombiana de La Facultad de Ciencias Agrarias, Sede Bogotá*, *1*, 1244–1247. https://doi.org/10.15446/agron.colomb.sup.2016n1.58750

Rodríguez-Huezo, M. E., Durán-Lugo, R., Prado-Barragán, L. A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramírez, J., & 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 prebiotic. *Food Research International*, *40*(10), 1299–1306. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.09.001

Rodríguez-Restrepo, Y. A., Giraldo, G. I., & Rodríguez-Barona, S. (2017). Solubility as a fundamental variable in the characterization of wall material by spray drying of food components: Application to microencapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. lactis. *Journal of Food Process Engineering*, *40*(6), 1–8. https://doi.org/10.1111/jfpe.12557

Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D. K., & Kapila, S. (2010). Resistance of microencapsulated Lactobacillus acidophilus LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food and Bioprocess Technology*, *3*(4), 586–593. https://doi.org/10.1007/s11947-008-0135-1

Saikia, S., Mahnot, N.K., Mahanta, C.L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.08.016

Salar-behzadi, S., Wu, S., Toegel, S., Hofrichter, M., Altenburger, I., Unger, F. M., … Viernstein, H. (2013). Impact of heat treatment and spray drying on cellular properties and culturability of Bi fi dobacterium bi fi dum BB-12, *54*, 93–101. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.024

Samona, A., & Robinson, R. K. (1994). Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, *47*(2), 58–60. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1994.tb01273.x

Sánchez Maria Teresa, Ruiz María Adolfina, M. M. E. (2013). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharmaceutica*, *54*(2), 29–38.

Sanders, M. E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P. R., & Mm, E. (2015). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease, *62*(5), 787–796. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302504.An

Sazawal, S., Dhingra, U., Hiremath, G., Sarkar, A., Dhingra, P., Dutta, A., … Black, R. E. (2010). Effects of Bifidobacterium lactis HN019 and prebiotic oligosaccharide added to milk on iron status, anemia, and growth among children 1 to 4 years old. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *51*(3), 341–346. https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d98e45

Schrezenmeir, J. M. de V. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition 1–3, *73*(14), 3–6. https://doi.org/10.1007/10_2008_097

Shah, N. P. (2000). Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, *83*(4), 894–907. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74953-8

Shokri, Z., Fazeli, M. R., Ardjmand, M., Mousavi, S. M., & Gilani, K. (2015). Factors affecting viability of Bifidobacterium bifidum during spray drying. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, *23*(1). https://doi.org/10.1186/s40199-014-0088-z

Silva, M. P., Tulini, F. L., Marinho, J. F. U., Mazzocato, M. C., De Martinis, E. C. P., Luccas, V., & Favaro-Trindade, C. S. (2017). Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics Lactobacillus acidophilus LA3 and Bifidobacterium animalis subsp. lactis BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *75*, 640–647. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.025

Silveira Rodríguez, Manuela Belén, Monereo Megías, Susana, Molina Baena, B. (2016). Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿cerca o lejos?, *90*, 1–7.

Simons, L. A., Amansec, S. G., & Conway, P. (2006). Effect of Lactobacillus fermentum on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *16*(8), 531–535. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.10.009

SIPSA. (2014). *EL cultivo de plátano musa paradisiaca, un importante alimento para el mundo*. *Boletin mensual Insumos y Factores Asociados a la Producción Agropecuaria* (Vol. 22).

Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, *51*(3), 456–467. https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060

Smarkusz, J., Ostrowska, L., & Witczak-Sawczuk, K. (2017). Probiotic strains as the element of nutritional profile in physical activity – new trend or better sports results? *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, *68*(3), 229–235. Retrieved from http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselc&AN=edselc.2-52.0-85032702365&lang=es

Soccol, Carlos Ricardo, Vandenberghe, Porto de Souza, Spier Michele Rigon, Medeiros Pedroni, Adriane Bianchi, Yamaguishi, Tiemi, Lindner, Juliano de De, Pandey, A. and T.-S. V. (2013). The Potential of Probiotics : A Review, *48*(4), 413–434.

Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., & Bhandari, B. (2013). The Viability of Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus acidophilus NCFM Following Double Encapsulation in Alginate and Maltodextrin. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(10), 2763–2769. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0938-y

Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014).

Impact of Milk Protein Type on the Viability and Storage Stability of Microencapsulated Lactobacillus acidophilus NCIMB 701748 Using Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(5), 1255–1268. https://doi.org/10.1007/s11947-013-1120-x

Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, *16*(2), 198–203. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.008

Turchiuli, C., Fuchs, M., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., & Dumoulin, E. (2005). Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *6*(1), 29–35. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.11.005

United Nations ONU. (2015). *Una Población en Crecimiento. Retrieved form.* https://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html

Van Der Zanden, L. D. T., Van Kleef, E., De Wijk, R. A., & Van Trijp, H. C. M. (2014). Understanding heterogeneity among elderly consumers: An evaluation of segmentation approaches in the functional food market. *Nutrition Research Reviews*, *27*(1), 159–171. https://doi.org/10.1017/S0954422414000092

Verruck, S., Carvalho, M. W. De, Liz, G. R. De, Amante, E. R., Rosana, C., Vieira, W., … Prudencio, E. S. (2017). Survival of Bi fi dobacterium BB-12 microencapsulated with full-fat goat ' s milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments, *153*(May), 48–56. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.05.008

Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(10), 6112–6124. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1795-2

Wisbaum, W., Colaborado, H., Barbero, B., Allí, D., Arias, M., Benlloch, I., … Lezama Isabel Tamarit, I. (2011). DESNUTRICIÓN INFANTIL: Causas, consecuencias y estrategias para su prevención y tratamiento. *Unicef*, *1*, 21. Retrieved from https://old.unicef.es/sites/www.unicef.es/files/Dossierdesnutricion.pdf

Yang, G., Sau, C., Lai, W., Cichon, J., & Li, W. (2015). Prevention of Necrotizing Enterocolitis Thorugh Manipulation of the Intestinal Microbiota of the Premature Infant, *344*(6188), 1173–1178. https://doi.org/10.1126/science.1249098.Sleep

Yang, Y., Xia, Y., Chen, H., Hong, L., Feng, J., Yang, J., … Ma, Y. (2016). The effect of perioperative probiotics treatment for colorectal cancer: short-term outcomes of a

randomized controlled trial. *Oncotarget*, *7*(7), 8432–8440. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7045

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, *6*(1), 205–214. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.008

Zhang, M. M., Qian, W., Qin, Y. Y., He, J., & Zhou, Y. H. (2015). Probiotics in Helicobacter pylori eradication therapy: A systematic review and meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(14), 4345–4357. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i14.4345.

12. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de asistencia al IV Congreso Internacional del Investigación en innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos- IICTA 2018.

• **Anexo 2.** Premio LARKIN del 3er puesto a la investigación en modalidad poster del trabajo titulado Sobrevivencia de *Bifidobacterium animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano" en el IV Congreso Internacional del Investigación en innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos- IICTA 2018, realizado en la ciudad de Cali del 16 al 18 de mayo de 2018.

•

IICTA 2018

Palmira, 22 de octubre de 2018

Señores
Universidad Nacional de Colombia
Sede Manizales
Manizales - Caldas

Cordial saludo.

Por medio de la presente hago constar que los señores **Eduardo Corpas Iguarán, Jennifer Gaviria Giraldo, Sneyder Rodriguez Barona, Jessica Triviño Valencia, Laura Zuleta Gallego, Kihomara Valencia Bedoya** y **Milena Ramírez Chamorro,** asistieron al IV Congreso Internacional de Investigación e Innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos - IICTA 2018 que se realizó en la ciudad de Cali del 16 al 18 de mayo de 2018. En este evento participaron con el trabajo en modalidad Póster titulado **"Sobrevivencia de *Bifidobacterium animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano"** y fueron ganadores del 3er. puesto del premio LARKIN a la investigación en modalidad poster.

Atentamente,

JOSÉ IGOR HLEAP ZAPATA
Presidente IV IICTA - 2018

Anexo 3. Sumisión del artículo titulado "Free and microencapsulated *Bifidobacterium animalis* subsp, *animalis* through spray-drying process survival under stress conditions and viability during storage" a la revista Journal of Food Science and Tecnology.

Journal of Food Science and Technology

Free and microencapsulated Bifidobacterium animalis subsp. animalisthrough spray-drying process Survival under stress conditions and viability during storage

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JFST-D-18-02604
Full Title:	Free and microencapsulated Bifidobacterium animalis subsp. animalisthrough spray-drying process Survival under stress conditions and viability during storage
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	jessica triviño valencia Universidad Católica de Manizaels COLOMBIA
Order of Authors:	Jessica Triviño Valencia
	Eduardo Javid Corpas Iguarán
	Jennifer Gaviria Giraldo
	Sneyder Rodríguez-Barona
	Mónica Quintero Moreno
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Católica de Manizaels
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Jessica Triviño Valencia
First Author Secondary Information:	
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Abstract The Bifidobacterium animalis subsp. animalis was microencapsulated through spray-drying process by using maltodextrin. In this study, its survival under pHconditions, bile salts and temperature was evaluatedas well as its viability during storage conditions. The viability of the encapsulated agent when storaged at 25°C remained high and constant during the first four weeks. The results for thefree and microencapsulatedB.animalisthermal tolerance behavior, showed animportant difference ($p < 0.05$) among the survivalpercentage of each tested temperature, the microencapsulation showed a protective effect against temperatures similar or lower than55°C. Regarding 2.5 pH exposure during a three-hour incubation, there is a survival of 5.38% in the free microorganism in contrast to 11.87%, whereas in a pH of 3.5 during 3 hours, the encapsulating agent showed a survival of 23%. In the end, the results obtained from the encapsulated cells under 1 g/L of bile salts showed a survival of 19%,while the free cells presented a total loss of feasibility when it was subjected for a 3-hours period at g/.
Suggested Reviewers:	Luz Mary Montes Ramírez lmmontesr@unal.edu.co
	Alexandra Gonzalez Esparza alexandra.gonzales@gmail.com
	Ociel Muñóz ocielmunoz@uach.cl

Anexo 4. Artículo sometido Artículo sometido a revista Dynas (Pubindex): "Efecto del almacenamiento y condiciones de estrés sobre el recuento de *Bifidobacterium animalis* microencapsulado e incorporado en harina de plátano"

Effect of storage and stress conditions on the *Bifidobacterium animalis* count microencapsulated and incorporated in plantain flour

Eduardo Corpas-Iguarán[a], Jennifer Gaviria-Giraldo[a], Sneyder Rodríguez-Barona[b], Jessica Triviño-Valencia[a], Laura Zuleta-Gallego[c], Kihomara Valencia-Bedoya[c], Milena Ramírez-Chamorro[c], Karol de la Vega-Agudelo[c].

[a] *Grupo de Investigación y desarrollo Tecnológico para el Sector Agroindustrial, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica de Manizales, Manizales, Colombia.* ecorpas@ucm.edu.co, jgaviria@ucm.edu.co, jtrivino@ucm.edu.co

[b] *Grupo de Bacterias Acido Lácticas y Sus Aplicaciones Biotecnológicas – Industriales, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia. Manizales, Colombia.* snrodriguezba@unal.edu.co

[c] *Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología, Universidad Católica de Manizales, Manizales, Colombia.* laura.zuleta@ucm.edu.co, kihomara.valencia@ucm.edu.co, milena.ramirez@ucm.edu.co, karol.delavega@ucm.edu.co

Abstract

The incorporation of probiotics into the intestinal microbiota depends on its survival, not only during the food storage but also when passing through the gastrointestinal tract. This study aimed to evaluate the effect of storage and stress conditions such as temperature, pH and bile salts on the viability of *Bifidobacterium animalis* microencapsulated and incorporated in plantain flour. Between days 21 and 28, the failure percentage decreased from 93 to 27%, while the aw and the humidity of the product increased. For the temperature, the counts obtained at 50 and 80 °C decreased by 60.1 and 90.2%, respectively. Likewise, at pH 2.5 had a reduction higher than 90% from 60 min, whilst at pH 3.5 during 60 min the survivals were less than 50%. Finally, the counts achieved using 1 g/l of bile salts were higher than those obtained at 3 and 5 g/l.

Keywords. Functional food; Microencapsulation; Probiotics; Spray dry; Survival analysis.

Anexo 5. Certificado de participación en el curso de Análisis Bibliométrico con una dedicación de 12 horas.

Universidad® Católica de Manizales

Manizales, 05 de marzo de 2018

A QUIEN CORRESPONDA

Por medio de la presente hago constar que Jessica Triviño Valencia identificada con cédula de ciudadanía número 1.053.786.711, participó en el curso de "Análisis Bibliométrico" con una duración de 12 horas; organizado por el Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial, Programa de Bacteriología y la Maestría en Microbiología Agroindustrial de la Facultad de Ciencias de la Salud, los días 01 y 02 del mes de marzo del año 2018, en el Aula Móvil de la Universidad Católica de Manizales de la ciudad de Manizales, Caldas.

Mgr. GLORIA INÉS ESTRADA SALAZAR
Decana Facultad de Ciencias de la Salud

Dr. EDUARDO JAVID CORPAS IGURÁN
Director Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial