



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGÍA

**“FORMULACIÓN DE RECUBRIMIENTO COMESTIBLE
SUPLEMENTADO CON MUCILAGO DE CHÍA (*Salvia hispanica*),
COMO SOPORTE PARA INMOVILIZACIÓN DE BACTERIAS
PROBIÓTICAS”**

**"FORMULATION OF AN EDIBLE COATING SUPPLEMENTED WITH
CHIA MUCILAGE (*Salvia hispanica*) AS A SUPPORT FOR THE
IMMOBILIZATION OF PROBIOTIC BACTERIA"**

Tesis para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

EDGAR ILLESCAS APARICIO

DIRECTOR: DR. GERARDO LANDETA CORTÉS

CODIRECTOR: DR. OMAR ROMERO ARENAS

16 DE NOVIEMBRE DE 2023



PUEBLA, MÉXICO



DEDICATORIA

A mis papás, **Edgar Illescas Chávez** y **Alejandra Aparicio**
por brindarme todo el apoyo para lograr todo lo que me propongo

Al **pequeño Edgar**, por sembrar esa chispa para
adentrarme al mundo de la ciencia

A **Dios, a la Vida y el Universo** por siempre guiarme

A **Leia** y **Yoda** por siempre acompañarme en cada desvelo

A toda la **Querida Biobanda**, nunca dejen de soñar

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a **mi familia (mis papás y mi hermano)** por brindarme todas las herramientas para incursionar en el mundo de la ciencia. Así como a mi **tía Rosalía y compañía** por todo el apoyo y cariño brindado.

A mi Alma Mater, **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP)**, por proporcionarme las facilidades de estudiar biotecnología.

A la **Dirección de Innovación y Transferencia del Conocimiento (DITCo)**, por acogerme en los laboratorios de investigación.

Al **Dr. Gerardo Landeta**, por guiarme en el mundo de la biotecnología en alimentos y recibirme para realizar la tesis.

Al **Dr. Jesús Muñoz** por su amistad creada a lo largo de la carrera y acceder a ser revisor del trabajo presentado.

A la **Dra. Norma Elena Rojas**, por abrirme las puertas del laboratorio de microbiología y brindarme sugerencias para mejorar el proyecto presentado.

A **Andrea Zaragoza**, porque siempre logramos sacar adelante el proyecto de las películas comestibles.

A mis amigos porque sin su apoyo y los grandes momentos vividos, nada sería posible. Especialmente a **Agus, Adriana, Araxie, Mena, Frausto, Lupita, Rocko, Jenny, Less, Dul, Alex, Adrián, Jossvic, Amaro, Andy, América, Lucelly, Ara, Fer, Lau, Ramón, Diana y Sofía**.

A los miembros del laboratorio de DITCo (**Wendy, Alejandro, Mónica, Mariana, Daniel, Karla, Montserrat y Dr. Nemesio**), por ayudarme en el laboratorio y hacer más ameno la investigación.

A la **comunidad de Biotecnología – BUAP**, especialmente a la planta docente por compartirme su conocimiento, mención especial al **Dr. Carlos**, la **Dr. Dolores** y la **Dra. Eliza**. A la **Dra. Abi** por siempre andar pendiente en toda la estancia de la carrera como tutora y coordinadora, además de abrirme las puertas de su laboratorio.

Y a todos los que estuvieron presentes en este caminar para cumplir un paso más del gran sueño de ser científicos.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- MARCO TEÓRICO	4
2.1 Películas y recubrimientos comestibles	4
2.1.1 Generalidades de los recubrimientos y películas comestibles	4
2.1.2 Inmovilización celular	5
2.1.3 Aplicaciones potenciales de películas y recubrimientos	6
2.2 Componentes de los recubrimientos comestibles	8
2.2.1 Alginato de sodio	9
2.2.2 Almidón	11
2.2.3 Glicerol	12
2.2.4 Mucílago de Chía.....	12
2.3 Generalidades de la semilla de chía	13
2.4 Proceso digestivo.....	15
2.5 Probióticos	16
2.5.1 <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	17
2.6 Crecimiento bacteriano	19
2.6.1 Modelo de Gompertz	21
3.- JUSTIFICACIÓN.....	24
4.- HIPOTESIS.....	25
5.- OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivos generales	25
5.2 Objetivos específicos	25
6.- METODOLOGÍA	26
6.1 Equipos, materiales y reactivos.....	26
6.1.1 Equipos	26
6.1.2 Materiales y reactivos	27
6.2 Microorganismo de estudio	28
6.2.1 <i>Limosilactobacillus reuteri</i> CUV Y12	28

6.2.2 Condiciones generales de crecimiento y mantenimiento.....	28
6.2.3 Tinción de Gram	28
6.3 Determinación de la cinética microbiana	28
6.4 Formulación base de la película comestible.....	29
6.5 Extracción del mucilago de chía.....	32
6.6 Formulación de la película comestible suplementada con mucílago de chía	32
6.7 Obtención del Pellet Celular.....	33
6.8 Preparación de la Película comestible incorporada con probióticos	34
6.9 Evaluación de las películas comestibles	35
6.9.1 Caracterización física de las películas comestibles.....	35
6.9.2 Pruebas de almacenamiento	36
6.9.3 Determinación de la humedad	36
6.9.4 Pruebas de viabilidad de los probióticos incorporados en la película comestible	37
6.10 Evaluación del potencial probiótico	37
6.10.1 Evaluación de viabilidad condiciones similares a la acidez estomacal	37
6.10.2 Evaluación de viabilidad ante la presencia de sales biliares	38
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
7.1 Microorganismo de estudio	39
7.1.1 Tinción de Gram	39
7.2 Cinética microbiana	40
7.3 Formulación base de la película comestible.....	42
7.4 Extracción de mucilago de chía	44
7.5 Película comestible suplementada con mucílago de chía	45
7.6 Pellet Celular	46
7.7 Película comestible incorporada con probióticos.....	47
7.8 Evaluación de las películas comestibles	48
7.8.1 Caracterización física de las películas comestibles.....	48
7.8.2 Pruebas de almacenamiento	50
7.8.3 Determinación de la humedad	51

7.8.4 Pruebas de viabilidad de los probióticos incorporados en la película comestible	53
7.9 Evaluación del potencial probiótico	55
7.9.1 Evaluación de viabilidad condiciones similares a la acidez estomacal ..	55
7.9.2 Evaluación de viabilidad ante la presencia de sales biliares	56
8.- CONCLUSIONES	59
9.- PERSPECTIVAS	60
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	62
11.- ANEXOS.....	73
1. Script de R Studio para la determinación del crecimiento microbiano	73
2. Memorias	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Principio de la inmovilización celular
Figura 2	Película comestible aplicada en embutidos
Figura 3	Representación de la planta <i>Salvia hispanica</i>
Figura 4	Representación del sistema digestivo
Figura 5	<i>L. reuteri</i> en la bibliografía
Figura 6	Fases de crecimiento bacteriano
Figura 7	Fases del modelo de Gompertz
Figura 8	Resumen gráfico de la metodología
Figura 9	Tinción de Gram de <i>L. reuteri</i>
Figura 10	Crecimiento de <i>L. reuteri</i>
Figura 11	Curva de crecimiento de <i>L. reuteri</i>
Figura 12	Formulaciones de referencia
Figura 13	Formulación base de películas
Figura 14	Mucilago Chía obtenido
Figura 15	Películas suplementadas con mucílago
Figura 16	Pellet celular
Figura 17	Película incorporada con probióticos
Figura 18	Elasticidad en películas comestibles

Figura 19	Composición física
Figura 20	Observación en Microscopio SEM
Figura 21	Pruebas de almacenamiento en función del tiempo.
Figura 22	Tinción de Gram sobre las películas comestibles
Figura 23	Prueba de viabilidad en películas con mucílago de chía
Figura 24	Viabilidad de <i>L. reuteri</i> en condiciones similares a la acidez estomacal
Figura 25	Viabilidad de <i>L. reuteri</i> en presencia de sales biliares
Figura 26	Adaptación de <i>L. reuteri</i> en presencia de sales biliares

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Modificación de los parámetros para la obtención de la película comestible
Tabla 2	Composición de la formulación base de películas comestibles
Tabla 3	Composición de las películas suplementadas con mucílago de chía
Tabla 4	Composición de la película suplementada con mucílago e incorporada con probióticos
Tabla 5	Absorbancia contra UFC/ml para <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
Tabla 6	Determinación de pérdida de humedad

RESUMEN

Las películas comestibles son una cubierta conformada por biopolímeros que brindan una protección a los alimentos al mismo tiempo que ofrecen una alternativa a los recubrimientos tradicionales. La incorporación de probióticos a las películas comestibles ayudaría a la conservación de alimentos y otorgaría un beneficio a la salud del consumidor. El objetivo central de la investigación presentada fue la formulación de una película comestible suplementada con mucílago de chía (*Salvia hispanica*), que permita la inmovilización de probióticos (*Limosilactobacillus reuteri*). Se utilizó una matriz base de alginato de sodio, almidón y glicerol, donde se probaron diferentes concentraciones para favorecer la suplementación del mucílago de chía. Dentro de las principales pruebas realizadas se determinó el crecimiento de *L. reuteri*, se realizaron diferentes formulaciones hasta lograr el objetivo deseado y las películas comestibles se evaluaron con ayuda del microscopio SEM. Además, se evaluó la pérdida de humedad y la viabilidad de los probióticos inmovilizados en la película formulada. En las cualidades físicas las películas presentaron elasticidad, cierta opacidad por la suplementación del mucílago de chía y presentó un 89.33% de pérdida de humedad. La concentración incorporada de *L. reuteri* fue de 1.45×10^8 UFC por gramo y se tiene una reducción de viabilidad de 2 logaritmos con un valor final de 3.76×10^6 . La investigación planteada, demostró la viabilidad de la película formulada, sugiriendo que la matriz compuesta por alginato, almidón y glicerol suplementada con mucílago de chía, ofrecen las condiciones óptimas para la inmovilización de probióticos. Además de tener potencial como una barrera con gran potencial de conservación de alimentos como una alternativa al uso de recubrimientos tradicionales.

Palabras claves: Inmovilización celular, *L. reuteri*, Mucílago de chía, Película comestible, Probióticos, Recubrimiento comestible.

ABSTRACT

Edible films are a coating made up of biopolymers that provide protection to food while offering an alternative to traditional coatings. The incorporation of probiotics into edible films would help in the preservation of food and provide a benefit to the health of the consumer. The main objective of the research presented was the formulation of an edible film supplemented with chia mucilage (*Salvia hispanica*), which allows the immobilization of probiotics (*Limosilactobacillus reuteri*). A base matrix of sodium alginate, starch and glycerol was used, where different concentrations were evaluated to favor the supplementation of chia mucilage. Among the main tests conducted, the growth of *L. reuteri* was determined, different formulations were made until the desired objective was achieved, and the edible films were evaluated with the help of the SEM microscope. In addition, the moisture loss and viability of the immobilized probiotics in the formulated film were evaluated. In physical qualities, the films presented elasticity, a certain opacity due to the supplementation of chia mucilage and presented an 89.33% loss of moisture. The incorporated concentration of *L. reuteri* was 1.45×10^8 CFU per gram and there was a viability reduction of two logarithms with a final value of 3.76×10^6 . The proposed research demonstrated the viability of the formulated film, suggesting that the matrix composed of alginate, starch and glycerol supplemented with chia mucilage, offer the optimal conditions for the immobilization of probiotics. In addition to having potential as a barrier with great food preservation potential as an alternative to the use of traditional coatings.

Keywords: Cell immobilization, Chia mucilage, Edible coating, Edible film, *L. reuteri*, Probiotics.

“FORMULACIÓN DE RECUBRIMIENTO COMESTIBLE SUPLEMENTADO CON MUCILAGO DE CHÍA (*Salvia hispanica*), COMO SOPORTE PARA INMOVILIZACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS”

Illescas – Aparicio, Edgar

Dr. Landeta – Cortés, Gerardo; Dr. Romero – Arenas, Omar

1.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el desarrollo de nuevas tecnologías alimentarias ha ido en auge para satisfacer las necesidades básicas de salud y alimentación que brinden bienestar al ser humano.

Está ampliamente documentado que el uso de probióticos brinda los beneficios a la salud que se requieren al proteger el microbiota intestinal de posibles ataques por parte de patógenos, así como estimular el sistema inmunológico (Hou *et al.*, 2015).

Se puede desarrollar una cubierta que brinde protección a los alimentos y al consumidor, combinando los conocimientos de los probióticos, para lo cual se requiere la inmovilización de los microorganismos en una matriz que otorgue su preservación.

Dentro de las bacterias ácido lácticas que tienen función probiótica se encuentra *Lactobacillus reuteri*, la cual se encuentra en el microbiota del tracto gastrointestinal del ser humano. Además poseen un buen potencial de colonización e inhiben los principales microorganismos como *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium* y *Campylobacter* que son causantes de enfermedades (Casas & Dobrogosz, 2000).

La inmovilización les confiere una protección adicional a las bacterias, dentro de los soportes orgánicos más utilizados, se encuentran los polisacáridos como el almidón y el alginato de sodio (Yong Lee & Mooney, 2012). Los alginatos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria debido a sus propiedades gelificantes.

2.- MARCO TEÓRICO

2.1 Películas y recubrimientos comestibles

2.1.1 Generalidades de los recubrimientos y películas comestibles

Las películas y recubrimientos comestibles son una tecnología emergente con gran potencial en la industria alimenticia debido a su impacto ambiental al ser biodegradables, su bajo costo de producción y cualidades para mejorar la calidad y vida útil de los alimentos. Estas películas suelen ser preparadas a partir de biopolímeros como proteínas, polisacáridos y lípidos. Los cuales actúan como barreras para controlar la transferencia de humedad, oxígeno y sabores, previniendo el deterioro de la calidad de los alimentos (Shojaee-Aliabadi *et al.*, 2013). Sin embargo, las características finales de estas películas, pueden afectar su aceptación por parte del consumidor (Sánchez-González *et al.*, 2009).

Las películas y recubrimientos comestibles, basados en polisacáridos, son una alternativa prometedora para el empaquetado de alimentos debido a que tienen un bajo impacto ambiental en comparación con las películas plásticas (Rafieian *et al.*, 2014). Sin embargo, su naturaleza higroscópica y su composición son factores importantes en su aplicación en la industria alimentaria. Además, la hidrosolubilidad de las películas es un factor importante a tener en cuenta, especialmente en casos donde el recubrimiento se consumirá junto con el alimento o en envases comestibles y biodegradables que requieren alta solubilidad de las películas (González Sandoval *et al.*, 2019).

La combinación de diferentes tipos de compuestos en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles ha abierto la posibilidad de aprovechar las cualidades individuales de cada polímero y obtener un producto con las cualidades deseadas (Rivero *et al.*, 2009). Además, se pueden complementar con aditivos que brinden un beneficio como son los antioxidantes o antimicrobianos para prolongar la vida útil de los alimentos, mejorar las propiedades de los compuestos y evitando el deterioro de los alimentos (Beikzadeh *et al.*, 2020; Mellinas *et al.*, 2016).

Además de su capacidad para mejorar la calidad de los alimentos, las películas y recubrimientos comestibles también se utilizan ampliamente para prevenir daños físicos y mecánicos, deterioro microbiano y contaminación con patógenos transmitidos por los alimentos (Mousavi *et al.*, 2021).

2.1.2 Inmovilización celular

La inmovilización celular consiste en confinar células y enzimas en una superficie o región espacial, permitiendo entrar en una fase de latencia a sus propiedades y actividades, por lo cual es ampliamente utilizado por la biotecnología (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011). Dependiendo del tipo de inmovilización, estas células y enzimas pueden quedar retenidas de forma permanente o temporal (Figura 1), lo que les permite ser utilizadas repetidamente en diversos procesos. La inmovilización celular ofrece numerosas ventajas, como la mejora de la estabilidad, la facilidad de recuperación y reutilización, así como la posibilidad de realizar continuar ciertos procesos.

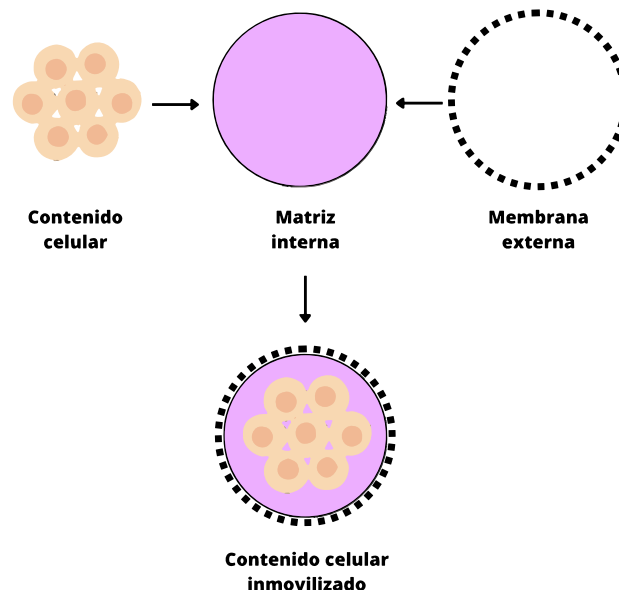


Figura 1. Principio de la inmovilización celular.

Fuente: Elaboración propia.

Una de las formas más comunes de inmovilización celular es el atrapamiento físico, donde las células o enzimas se retienen dentro de una matriz polimérica o un gel. Este enfoque permite la retención de las células o enzimas en una red tridimensional, lo que les proporciona protección y estabilidad.

Por otro lado, la inmovilización celular también puede lograrse mediante encapsulación, que implica el recubrimiento de las células con una capa protectora. Esta capa puede ser una membrana polimérica u otra matriz que retiene las células o compuestos bioactivos en su interior. La encapsulación ofrece una mayor protección a las células o enzimas debido a que la barrera física proporcionada por la capa externa, permite mejorar su estabilidad y protegerlas de condiciones adversas (Yan *et al.*, 2022).

Dentro de las áreas de oportunidad para la aplicación de la inmovilización celular, se encuentra la producción de productos químicos y farmacéuticos, el área alimentaria, en técnicas para la remediación ambiental, la producción de biocombustibles, entre otros. La capacidad de retener y reutilizar las células, enzimas y diversos compuestos bioactivos inmovilizados puede brindar una ventaja significativa en términos de eficiencia y economía dentro de las industrias.

Por ello, la inmovilización celular se suele utilizar en la industria alimentaria para la retención de ingredientes activos como son enzimas, compuestos bioactivos y los probióticos, manteniendo su viabilidad y biodisponibilidad durante la producción, almacenamiento y la liberación durante los procesos digestivos al ingerirlo en sistemas biológicos (Yan *et al.*, 2022).

2.1.3 Aplicaciones potenciales de películas y recubrimientos

La inmovilización celular mediante encapsulación se ha convertido en una tecnología clave para mantener la viabilidad celular durante la producción, el almacenamiento y el consumo de alimentos, por lo que tanto el sector industrial como los consumidores muestran un creciente interés en alimentos que contengan

ingredientes bioactivos con valor agregado y que promuevan la salud, así como mejorar el sabor, la apariencia y la vida útil del alimento, así como otros beneficios (Yan *et al.*, 2022).

En los últimos años, la industria alimentaria ha adoptado el uso de recubrimientos y películas comestibles debido a su potencial para aumentar la vida útil de los productos alimenticios (Figura 2), evitando el deterioro del alimento y manteniendo su calidad (Norajit *et al.*, 2010).



Figura 2. Película comestible aplicada en embutidos.

Fuente: Gastronomía&Cía, 2014.)

Además, el desarrollo de tecnologías emergentes, como la generación de barreras en alimentos frescos y de humedad intermedia, el uso de apósitos biodegradables en el tratamiento de algunas patologías, y la encapsulación en films de diversas sustancias, como fitocompuesto y fármacos, ha llevado a nuevas oportunidades en este campo (Rafieian *et al.*, 2014).

El uso de recubrimientos comestibles en productos altamente perecederos representa un enfoque prometedor en la exploración de nuevas tecnologías de conservación amigables con el ambiente, al reducir el consumo de materiales sintéticos persistentes en el ambiente y facilitar su disposición, lo cual puede

incrementar el tiempo de vida y conservación de los atributos de calidad de los alimentos (Méndez Reyes *et al.*, 2014). En este contexto, las películas comestibles a base de polímeros naturales han surgido como una alternativa prometedora a los plásticos, ya que pueden ayudar a abordar el problema de la contaminación ambiental que se ha incrementado en los últimos años (Muñoz-Tebar *et al.*, 2021).

Y en la actualidad, las películas probióticas se consideran una innovación prometedora al brindar probióticos de cuarta generación, aunque la investigación sobre sus funciones apenas está comenzando. Se ha demostrado que las películas probióticas tienen efectos beneficiosos en la salud, lo cual sienta las bases para su aplicación como promotores de la salud (Hu *et al.*, 2022). Además, se ha observado que los probióticos en forma de biopelícula muestran una mayor eficiencia para evitar la presencia de bacterias patógenas (Motta *et al.*, 2021).

2.2 Componentes de los recubrimientos comestibles

Las películas y recubrimientos comestibles están compuestos por diversos biopolímeros, incluyendo carbohidratos en forma de polisacáridos como el almidón, la pectina, la celulosa, el alginato y el carragenano, proteínas como la gnetina, la caseína y el gluten, así como lípidos como el ácido esteárico, ceras y grasas, los cuales pueden ser utilizados de forma individual o en combinación (Chiumarelli & Hubinger, 2014).

La inmovilización de bacterias en la industria alimentaria se logra mediante el uso de materiales polisacáridos como el almidón y el alginato de sodio, debido a sus propiedades gelificantes, viscosantes y atóxicas (Yong Lee & Mooney, 2012). Esto ha permitido la utilización de ingredientes activos como aceites, sabores, colores, antioxidantes, nutrientes, probióticos y enzimas en los alimentos (Muhammad *et al.*, 2018).

Las películas comestibles a base de carbohidratos, en particular aquellas basadas en polisacáridos son altamente atractivas debido a su capacidad de formación de películas y sus propiedades coloidales. Estas películas suelen ser transparentes, resistentes y flexibles debido a su estructura polimérica (Norajit *et al.*, 2010).

Los polisacáridos comúnmente utilizados en la preparación de películas comestibles son celulosa, alginatos, gomas, quitosano y mucílagos, ya que pueden ser metabolizados por el cuerpo humano junto con los alimentos, convirtiéndolos en los compuestos ideales para la elaboración de películas comestibles (Valdés *et al.*, 2015).

En investigaciones recientes, se ha utilizado mucílagos obtenidos de diversas semillas de plantas como la balangu, albahaca, chía, berro y membrillo, que se han logrado aislar e incorporar en el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles (Muñoz-Tébar *et al.*, 2022). Siendo considerados el uso de mucílagos obtenidos de semillas, como uno de los materiales más prometedores debido a sus propiedades (Soukoulis *et al.*, 2018).

2.2.1 Alginato de sodio

El alginato de sodio es un polisacárido constituido por los monosacáridos D-manurónico y L-gulurónico, ampliamente utilizado en la industria alimentaria debido a sus propiedades gelificantes, siendo una de las aplicaciones más importantes por su capacidad para formar geles, lo cual es de gran utilidad para la inmovilización celular, además resalta por sus propiedades emulsificantes, estabilizantes, la facilidad para formar films y ser un buen ligante de moléculas de agua (González Cuello *et al.*, 2014; Su Cha *et al.*, 2002; Yong Lee & Mooney, 2012).

El alginato de sodio es un polisacárido biodegradable natural y no tóxico, que forma rápidamente un gel firme mediante la reticulación con Ca^{2+} , lo que lo hace adecuado para encapsular probióticos, ya que protege a las bacterias en el ambiente ácido del estómago y se descompone en el intestino liberando los probióticos encapsulados (Yao *et al.*, 2017).

El alginato de sodio se extrae de algas pardas y consta de ácido poliurónico enlazado linealmente, que contiene tres formas estructurales que permiten la agrupación de los ácidos poliurónicos (Norajit *et al.*, 2010).

Para la elaboración de materiales utilizando alginato de sodio, como es el caso de las películas y recubrimientos, se recomienda incorporar alrededor del 0.5 - 2% peso/volumen y se puede combinar con glicerol para mejorar la disolución de la mezcla y optimizar las propiedades (Norajit *et al.*, 2010). La temperatura también es importante en la formación de geles con alginato de sodio. Se ha observado que la viscosidad del alginato de sodio se incrementa a temperaturas entre 25°C y 40°C, lo que favorece la disolución de la mezcla (Méndez Reyes *et al.*, 2014).

Debido a las cualidades gelificantes del alginato de sodio, las películas elaboradas con dicho compuesto, son generalmente hidrófilas, lo que significa que tiene gran absorción de agua y suelen hincharse (Su Cha *et al.*, 2002). Las propiedades funcionales del alginato de sodio, como su capacidad para gelificar, espesar, estabilizar, emulsionar y formar películas, lo hacen adecuado para retener la humedad en productos perecederos, producir cambios en la atmósfera de los productos recubiertos y disminuir el oscurecimiento enzimático en alimentos mínimamente procesados (Méndez Reyes *et al.*, 2014).

2.2.2 Almidón

El almidón es polímero de unidades de D – glucosa compuesto por una mezcla de polisacáridos en un 80% amilopectina y 20% amilosa, dos polisacáridos similares en su estructura (Dias Alves *et al.*, 2007).

La amilosa es una cadena lineal formada por la condensación de D-glucopiranosas a través de enlaces glucosídicos (1, 4), lo que resulta en largas cadenas. La unidad repetitiva de la amilosa es la α -maltosa, que adopta fácilmente una conformación tridimensional helicoidal. Cada vuelta de la hélice contiene seis moléculas de glucosa, lo que le confiere una estructura característica. Por otro lado, la amilopectina es una molécula ramificada, con enlaces α -D-(1,6) que conectan las ramificaciones con las unidades lineales de glucosa (Dias Alves *et al.*, 2007).

Estas características estructurales del almidón, como la presencia de amilosa y amilopectina en su composición, influyen en sus propiedades funcionales en la industria alimentaria. El almidón es conocido por su capacidad de formar geles cuando se somete a un tratamiento térmico de calentamiento y enfriamiento. La amilosa, debido a su conformación helicoidal, tiende a formar geles más firmes y resistentes al calor, mientras que la amilopectina, con sus ramificaciones, forma geles más suaves y menos resistentes al calor.

Además de su capacidad de formar geles, el almidón también se utiliza como espesante y estabilizante en la industria alimentaria. La presencia de amilosa en el almidón confiere propiedades espesantes, ya que la amilosa tiene una mayor capacidad para absorber agua y formar estructuras viscosas (Vázquez-Luna *et al.*, 2019). Esto lo hace útil en la preparación de salsas, sopas, cremas y otros alimentos que requieren una mayor viscosidad. Por otro lado, la amilopectina con sus ramificaciones contribuye a la estabilidad de las emulsiones y la textura en productos como helados, cremas y productos lácteos. Por dichas propiedades espesantes y estabilizantes, la concentración de almidón se puede ajustar para obtener las características deseadas de consistencia (Vázquez-Luna *et al.*, 2019).

2.2.3 Glicerol

El glicerol es un compuesto ampliamente utilizado como agente plastificante en las películas comestibles, y su incorporación en la mezcla a una concentración del 6 - 12% P/V tiene un impacto significativo en las propiedades de la película (Vázquez-Luna *et al.*, 2019).

La concentración de glicerol en la película afecta la permeabilidad de vapor de agua y de otros gases. A medida que se aumenta la concentración de glicerol, se observa un aumento en la adsorción de la película, lo que la hace más higroscópica debido a la naturaleza del glicerol y la porosidad al combinarlo con almidón en la elaboración de películas (Vázquez-Luna *et al.*, 2019).

Los aditivos plastificantes, como el glicerol o el sorbitol, son esenciales para lograr la flexibilidad necesaria en la película, lo que reduce su fragilidad y mejora sus propiedades mecánicas. Esto se debe a la naturaleza hidrofílica de estos compuestos, lo que les permite mejorar las propiedades de los hidrocoloides utilizados en la fabricación de la película (Chiralt *et al.*, 2015).

Con un mayor contenido de plastificante, también se incrementa la solubilidad en agua (Méndez Reyes *et al.*, 2014). A medida que se incluye una mayor cantidad de una sustancia plastificante en una matriz polimérica, la elongación y la deformación se incrementan (Dias Alves *et al.*, 2007).

2.2.4 Mucílago de Chía

El mucílago de chía es un gel mucilaginoso extraído de las semillas de chía (*Salvia hispanica*) que ha demostrado tener propiedades interesantes en la formación de películas comestibles. Este gel actúa como una barrera física que brinda protección digestiva, facilitando la conversión de carbohidratos en azúcares y aumentando la sensación de saciedad (Muñoz, Aguilera, *et al.*, 2012; Muñoz, Cobos, *et al.*, 2012).

La estructura del mucílago de chía está compuesta principalmente por un tetrasacárido con ramificaciones de ácido glucurónico junto con xilosa y glucosa (Garcia e Silva *et al.*, 2022). Estas características estructurales, brindan las propiedades viscoelásticas presentes en el mucílago, favoreciendo la formación de una red de gel. Esta red presenta un aumento en su módulo de elasticidad a concentraciones más altas de mucílago y una disminución a medida que la temperatura aumenta. Además, la dispersión de mucílago de chía muestra resistencia al calor en un rango de temperaturas de 40°C a 80°C (Goh *et al.*, 2016).

El proceso de optimización de mucílago de chía se ve influenciado por la temperatura y el pH. Se ha observado que, a temperaturas más altas, la viscosidad aumenta debido a la formación de nuevos enlaces de hidrógeno entre las moléculas de mucílago, lo que resulta en la formación de un gel. Además, el aumento de la densidad de carga del polisacárido con el pH alcalino conduce a una mayor viscosidad debido a la expansión molecular y la repulsión electrostática entre los grupos funcionales (Hussain *et al.*, 2020).

Así mismo, el mucílago de chía ha sido descrito como una nueva fuente potencial de goma de polisacárido debido a sus propiedades mucilaginosas a bajas concentraciones en soluciones acuosas, haciendo que el mucílago de chía sea un material prometedor en la formación de películas comestibles (Dick *et al.*, 2015).

2.3 Generalidades de la semilla de chía

La semilla de chía (*Salvia hispanica*) es una planta perteneciente a la familia *Lamiaceae* (Figura 3), y ha ganado visibilidad en la actualidad debido a sus posibles propiedades tecnofuncionales y aspectos relevantes para la salud. Numerosos estudios han confirmado las propiedades nutricionales de las semillas de chía, que contienen un 5-6% de mucílago compuesto principalmente por xilosa, glucosa y ácido glucurónico, lo que provoca la formación de polisacáridos ramificados de alto peso molecular (Dehghani *et al.*, 2020; Garcia e Silva *et al.*, 2022).



Figura 3. Representación de la planta *Salvia hispanica*.

Fuente: Diseño obtenido de Canva.

El mucílago de chía se compone principalmente de carbohidratos, representando aproximadamente el 75 - 78% de su contenido, seguido de proteínas con un 9.7 – 10.6%, ceniza con un 8.79%, y lípidos con un 2% (Muñoz, Cobos, *et al.*, 2012).

Las propiedades emulsionantes del mucílago de chía están asociadas con el contenido de proteínas, que forman parte integral del polisacárido y su actividad superficial. La proteína de chía puede ser extraída de la harina de semilla desgrasada en un medio acuoso alcalino con un pH de 8-12, y precipitarse en el punto isoeléctrico de la proteína, que se encuentra en un rango de pH de 3.0 – 5.0, obteniendo un aislado de proteína de chía con cerca de 800 g/kg de proteína (López *et al.*, 2018).

El contenido de sacarosa en el mucílago de chía contribuye a aumentar su viscosidad, ya que promueve la formación de puentes de hidrógeno entre el polímero y los grupos azúcar-OH, lo cual puede crear zonas de unión y estabilizar la estructura del mucílago (Capitani *et al.*, 2015). Además, las semillas de chía son una fuente rica de fibra dietética, con más de 300 g/kg de su peso total compuesto por fibra, y aproximadamente 400 g/kg de aceite, del cual 600 g/kg es ácido

linolénico (omega 3). También son una fuente natural de vitaminas, minerales y antioxidantes como la miricetina, el ácido clorogénico, el ácido cafeico, la quercetina y el kaempferol (Muñoz-Tébar *et al.*, 2022).

2.4 Proceso digestivo

Una etapa clave al hablar de alimentación, implica el proceso digestivo, ya que es un complejo mecanismo que involucra una serie de etapas para descomponer los alimentos consumidos y absorber los nutrientes necesarios para el funcionamiento del organismo (Motta *et al.*, 2021). Se lleva a cabo en el sistema digestivo (Figura 4), pero especialmente dentro del tracto digestivo podemos encontrar la presencia de enzimas y biopelículas microbianas. Estas biopelículas son colonias de microorganismos que se adhieren en el epitelio, y se ha observado que los microorganismos que colonizan el tracto digestivo tienen una función importante para la asimilación de nutrientes (Motta *et al.*, 2021).

Otro factor relevante en la digestión es la presencia de fibras solubles que tienen un impacto positivo en el tiempo de tránsito gastrointestinal y, por lo tanto, en la digestión. Se ha demostrado que estas fibras solubles prolongan el tiempo de tránsito gastrointestinal, lo cual mejora la digestión y provoca un aumento gradual de los niveles de glucosa en sangre, así como una disminución de la resistencia a la insulina a lo largo del tiempo (Garcia e Silva *et al.*, 2022).

Es interesante destacar que algunos probióticos, como *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*, forman parte de la microbiota presente en el revestimiento del intestino y suelen formar biopelículas en su estado natural, formando una capa protectora alrededor de las células individuales (Macfarlane *et al.*, 2011).

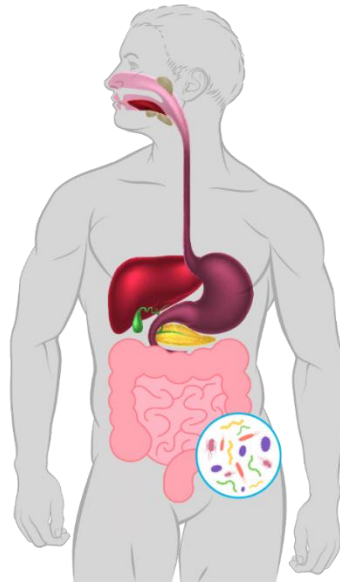


Figura 4. Representación del sistema digestivo. Se resalta la presencia de microbiota en el intestino.

Fuente: Elaboración propia.

2.5 Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que confieren beneficios para la salud del huésped, según la definición de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (Food and Agriculture Organization, 2006). Estos microorganismos presentan características como capacidad de ser tolerados por el sistema inmune del huésped, resistencia a los ácidos gástricos y sales biliares, capacidad de adherirse a la mucosa intestinal y colonizarla, sinergia con la microbiota endógena normal y capacidad de potenciar las defensas inmunitarias del huésped, así como ser seguros para el consumidor (De Araújo U. *et al.*, 2015).

Los probióticos se utilizan como suplementos nutricionales para restaurar la salud intestinal y mejorar los síntomas gastrointestinales, como el dolor abdominal, la diarrea y el estreñimiento (Kechagia *et al.*, 2013). Los organismos probióticos

confieren sus beneficios para la salud a través de la inhibición del crecimiento de patógenos, el mantenimiento de la microflora intestinal que promueve la salud y la estimulación de la respuesta inmunitaria del huésped. En el caso de recubrimientos comestibles, es importante que las células probióticas conserven su viabilidad durante las diferentes etapas de procesamiento, almacenamiento y consumo, para garantizar su presencia en el intestino (Sin Cheow & Hadinoto, 2013).

Los probióticos han sido probados para conferir beneficios nutricionales y terapéuticos (Harel & Tang, 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que mejoran los síntomas de intolerancia a la lactosa, modulan la respuesta inmune, aumentan la resistencia a las enfermedades infecciosas intestinales, disminuyen la duración de la diarrea, mejoran o previenen el estreñimiento, disminuyen la presión arterial y los niveles de colesterol sérico, y modulan los lípidos en sangre, además que promueven la producción *in situ* de vitaminas (Salazar A & Montoya C, 2003). Por otro lado, los probióticos apoyan en la prevención del cáncer de colon y brindar una protección en el intestino. En algunos casos se ha identificado que protegen contra infecciones respiratorias, del tracto urogenital y previenen infecciones en heridas quirúrgicas (Malik *et al.*, 2022).

2.5.1 *Limosilactobacillus reuteri*

Limosilactobacillus reuteri, anteriormente conocida como *Lactobacillus reuteri*, es una bacteria Grampositiva heterofermentativa que se encuentra de forma natural en el intestino de mamíferos y aves (Figura 5). Esta bacteria ha sido identificada como un probiótico con múltiples beneficios para su huésped, especialmente en la lucha contra infecciones dañinas y en la mediación del sistema inmunológico (Hou *et al.*, 2015).

Una de las características importantes de *L. reuteri* es su capacidad de adhesión al epitelio intestinal, produciendo proteínas que se unen a la mucosidad, brindándole protección del ataque de microorganismos patógenos y esto contribuye a mantener un equilibrio saludable en la microbiota intestinal (Hou *et al.*, 2015).

Limosilactobacillus reuteri posee propiedades probióticas, lo cual significa que es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal humano y tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos causantes de enfermedades, siendo un probiótico versátil, ya que puede colonizar diferentes sitios del cuerpo humano, como el tracto urinario, la piel y la leche materna (Casas & Dobrogosz, 2000; Saviano *et al.*, 2021).

El uso de *L. reuteri* como probiótico ha demostrado ser beneficioso en la modulación del microbiota intestinal, la eliminación de infecciones y la atenuación de los síntomas gastrointestinales en condiciones como colitis entérica, diarrea asociada a antibióticos, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal y estreñimiento crónico (Dore *et al.*, 2019). Se ha observado que *L. reuteri* produce moléculas antimicrobianas como la reuterina y promueve el desarrollo y la funcionalidad de las células T reguladoras, fortaleciendo la barrera intestinal y disminuyendo la translocación microbiana, lo cual tiene efectos antiinflamatorios (Saviano *et al.*, 2021).

Limosilactobacillus reuteri es una bacteria probiótica que ofrece múltiples beneficios para su huésped. Sus propiedades de adhesión al epitelio intestinal, producción de moléculas antimicrobianas, modulación de la microbiota intestinal y fortalecimiento de la barrera intestinal lo convierten en un probiótico prometedor en la prevención y tratamiento de infecciones y enfermedades gastrointestinales (Cleusix *et al.*, 2008; Hsiao *et al.*, 2021).

Además, *L. reuteri* ha demostrado tener efectos inhibidores sobre el crecimiento de microorganismos patógenos como *rotavirus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium* y *Campylobacter*, tanto *in vitro* como *in vivo* (Schaefer *et al.*, 2010). Esto resalta su potencial como agente para la prevención y tratamiento de infecciones intestinales.

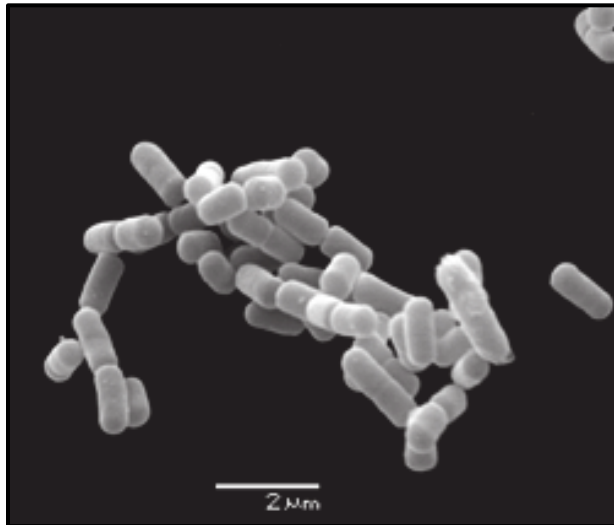


Figura 5. *L. reuteri* en la bibliografía. Observación en SEM.

Fuente: Dishisha, 2013.)

2.6 Crecimiento bacteriano

El conocimiento de las condiciones nutrimentales y metabólicas que afectan el crecimiento bacteriano, como la disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH y presencia de oxígeno, es fundamental para medir el crecimiento de los microorganismos en cultivo. Usualmente, este crecimiento se mide en función de una variable dependiente como el tiempo, en comparación con un parámetro independiente, como las unidades formadoras de colonias (UFC), que indican el número de células microbianas presentes en una población (González *et al.*, 2022).

Dentro del estudio del crecimiento bacteriano, se reconocen cuatro fases que proporcionan información sobre el estado del microorganismo (ver Figura 6). La primera fase es la de latencia, que corresponde al período de adaptación a las condiciones de crecimiento. Le sigue la fase exponencial, caracterizada por un crecimiento acelerado con una tasa constante y una velocidad máxima. A continuación, posteriormente inicia la fase estacionaria, en la cual el crecimiento alcanza su valor máximo y comienza a disminuir debido a la escasez de nutrientes

a la acumulación de productos de desecho. Por último, se produce la fase de muerte, en la cual los microorganismos comienzan a decaer debido a la falta de nutrientes y la acumulación excesiva de desechos (Castro Crespo, 2020).

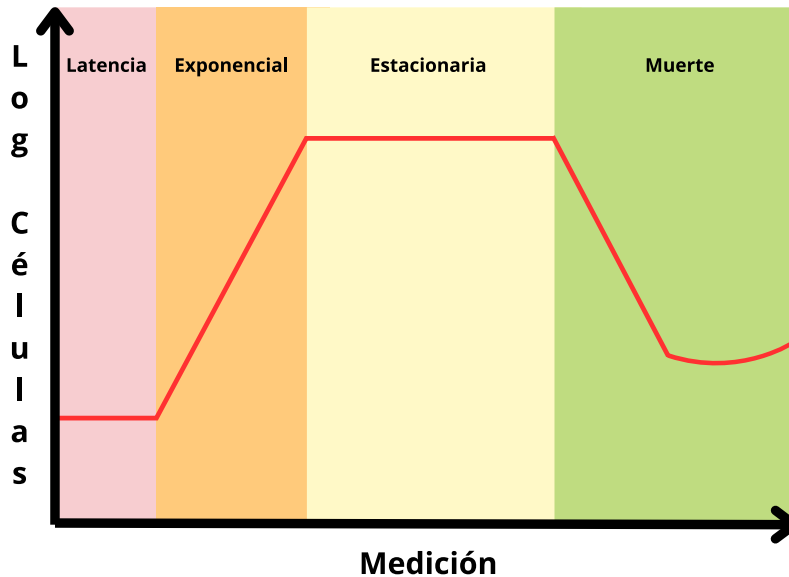


Figura 6: Fases de crecimiento bacteriano.

Fuente: Elaboración propia.

Existen diversos métodos para cuantificar el crecimiento bacteriano, los cuales nos permiten identificar en qué fase y concentración se encuentran las bacterias. Estos métodos pueden ser directos, proporcionando un valor exacto, o indirectos, brindando un parámetro aproximado sobre las condiciones de crecimiento de los microorganismos (Caycedo Lozano *et al.*, 2021).

Entre los métodos directos más utilizados se encuentra el recuento de colonias viables mediante siembra en placas, el cual identifica el número de colonias capaces de crecer en esa condición. Además, se utiliza el recuento directo por observación al microscopio en cámara de Neubauer, que ofrece otra forma de estimación (Caycedo Lozano *et al.*, 2021).

Por otro lado, existen métodos indirectos que son más rápidos y, con el adecuado modelado de los datos, igualmente efectivos. Estos incluyen la medición del consumo de nutrientes por unidad de tiempo, así como los métodos turbidimétricos, que emplean espectrofotómetros para medir la densidad óptica o absorbancia presente en la muestra, donde la presencia de la masa del cultivo dispersa es proporcional al crecimiento (Caycedo Lozano *et al.*, 2021).

2.6.1 Modelo de Gompertz

El modelo de Gompertz es una función matemática ampliamente utilizada en diversos campos de estudio para describir el crecimiento y la decadencia. Se basa en una relación exponencial entre la velocidad de crecimiento específico y la densidad de la población de interés. La ecuación 1 utilizada para ajustar los datos es la siguiente:

$$P(t) = k \cdot e^{-\ln\left(\frac{k}{P_0}\right) \cdot e^{-rt}} \text{ [Ecuación 1]}$$

En donde:

P(t): Tamaño de población en función del tiempo

k: Valor de capacidad del sistema de crecimiento

P₀: Población inicial existente

r: Tasa de crecimiento poblacional

t: Tiempo

El modelo de Gompertz se divide en tres fases principales que reflejan el proceso de crecimiento y decadencia en una población (Figura 7). La primera fase es de crecimiento exponencial, donde la población sigue un patrón exponencial debido a las condiciones ideales de crecimiento. Luego, se produce la fase de interacción con el entorno, en la cual la población comienza a interactuar y se ve afectada por diversos factores limitantes, lo que resulta en una desaceleración del crecimiento microbiano. Finalmente, se alcanza la fase de equilibrio, donde la interacción con el medio ambiente se vuelve más intensa y limitante, lo que conduce a una desaceleración aún mayor del crecimiento. En esta fase, la población se acerca a un equilibrio en el que el crecimiento neto es mínimo o nulo, y la tasa de crecimiento se acerca asintóticamente a cero (Rodríguez Carrillo & Ulloa Ibarra, 2017).

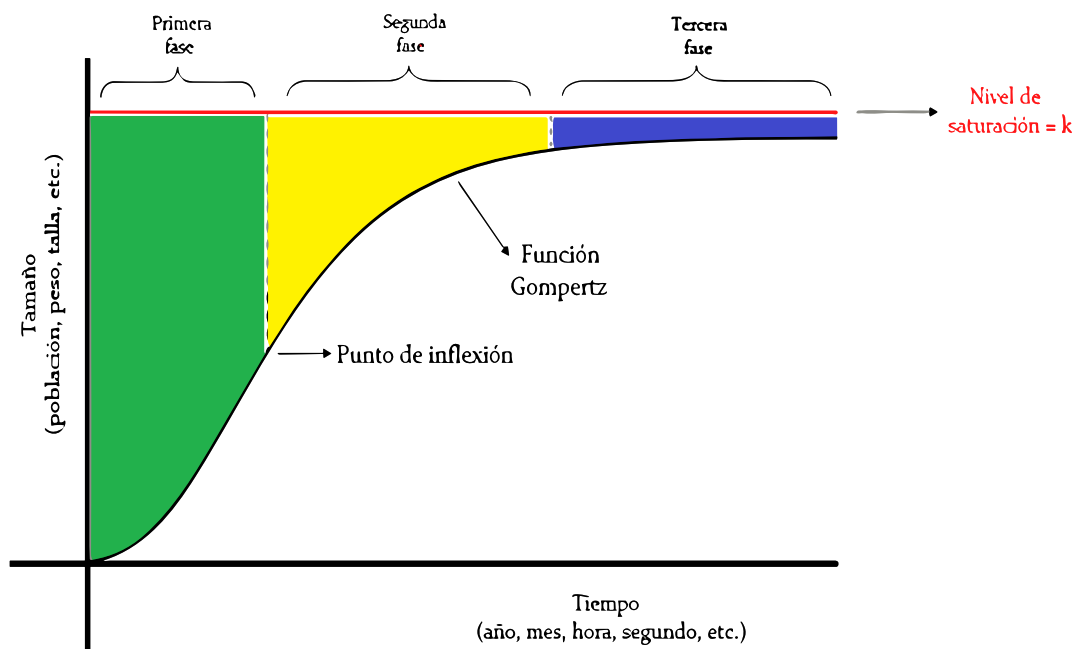


Figura 7. Fases del modelo de Gompertz.

Fuente: ENIP, s/f.

El modelo de Gompertz se distingue de otros modelos de cinética microbiana, como el modelo exponencial y el modelo logístico. A diferencia del modelo exponencial, que asume un crecimiento ilimitado, el modelo de Gompertz considera un límite de crecimiento o capacidad de carga. En comparación con el modelo logístico, el modelo de Gompertz presenta una fase exponencial más pronunciada seguida de una desaceleración gradual hacia el límite (Rodríguez Carrillo & Ulloa Ibarra, 2017).

En el software R Studio, se pueden utilizar herramientas específicas para estimar los parámetros del modelo de Gompertz a partir de datos observados. Al aprovechar bibliotecas y funciones especializadas, es posible ajustar el modelo a los datos y obtener los valores de K , P_0 y r . Esto permite realizar predicciones del crecimiento futuro y analizar el ajuste del modelo a los datos observados (Szabelska *et al.*, 2010).

3.- JUSTIFICACIÓN

La elaboración de una película comestible innovadora que combina los beneficios de la chía (*S. hispanica*) y los probióticos como es el caso de *Limosilactobacillus reuteri* (*L. reuteri*). Esta película permitirá brindar una protección a los alimentos al mismo tiempo que mejorará la salud del consumidor, ayudando a contribuir a la promoción de alimentos más saludables y sostenibles en el futuro.

El uso de alginato y almidón, otorgan un soporte a la película, mientras que la presencia de glicerol brinda propiedades plastificantes.

El mucilago de chía es un componente natural que se obtiene de las semillas de la planta *Salvia hispanica*. Este componente es rico en antioxidantes, fibra y ácidos grasos esenciales, lo que lo convierte en un ingrediente ideal para la elaboración de alimentos saludables. Además, el mucilago de chía ayuda a mejorar la retención de agua y la consistencia de la película, lo que aumenta su eficacia como protección de alimentos.

Por otro lado, los probióticos son microorganismos vivos que tienen un impacto positivo en la salud humana. En este caso, estamos utilizando la especie *L. reuteri*, una cepa probiótica conocida por sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladores y antimicrobianas. La incorporación de probióticos en la formulación de la película comestible permitirá a los consumidores obtener una serie de beneficios a la salud adicionales, al mismo tiempo que protege la calidad del alimento.

4.- HIPOTESIS

La película comestible formulada a partir de mucílago de chía (*Salvia hispanica*) permitirá inmovilizar a la bacteria *L. reuteri* manteniéndolas viables.

5.- OBJETIVOS

5.1 Objetivos generales

- Formular una película comestible suplementada con mucílago de chía (*Salvia hispanica*), que permita la inmovilización de probióticos (*Limosilactobacillus reuteri*).

5.2 Objetivos específicos

- Formular una película comestible con mucílago de chía (*S. hispanica*), para incorporar posteriormente las células bacterianas (*L. reuteri*).
- Determinar el crecimiento de *L. reuteri* en las condiciones experimentales
- Incorporar *Limosilactobacillus reuteri* en la mezcla formulada para la obtención de películas comestibles
- Evaluar la viabilidad de *L. reuteri* en las películas obtenidas

6.- METODOLOGÍA



Figura 8. Resumen gráfico de la metodología.

Fuente: Elaboración propia.

6.1 Equipos, materiales y reactivos

6.1.1 Equipos

- Balanza Granataria (Expoler PRO OHAUS)
- Baño maría H₂O (BALT Series)
- Campana de Flujo Laminar (CFL 103)
- Celdas para espectrofotómetro
- Centrifuga (SOL – BAT J – 600)
- Contador de Colonias (SOL – BAT Q – 20)
- Espátula de laboratorio de acero inoxidable
- Espectrofotómetro UV-vis (Velab VE)
- Horno de microondas (Panasonic Sensor 1200W)
- Incubadora (Barnstead 35550A)
- Kit de Tinción de Gram

- Manta de cielo
- Matraz de Erlenmeyer de 125 y 250 ml
- Micropipetas
- Microscopio electrónico de barrido (JSM – 6610LV)
- Microscopio óptico (Marca Uscamel)
- Parrilla de agitación (Marca Barnstead Thermolyne)
- Pipeta de 10 ml
- Pipeta Pasteur
- Potenciómetro (Marca Conductronic pH140)
- Refrigerador
- Termómetro
- Tubos de ensayo para centrifuga
- Ultra congelador de - 80°C
- Vasos de precipitado
- Vortex (Thermo Scientific)

6.1.2 Materiales y reactivos

- Ácido clorhídrico (HCl al 10%)
- Agar bacteriológico (Marca BD Bioxon)
- Agua de peptona (Marca Merck)
- Agua destilada
- Alginato de sodio (Marca Química Mercurio)
- Almidón (Marca FABPSA)
- Caldo MRS (Marca Merck)
- Citrato de sodio
- Glicerol al 99%
- Hidróxido de sodio (NaOH 1M)
- Bilis de buey (Marca Meyer)
- Semillas de chía (*Salvia hispánica*)

6.2 Microorganismo de estudio

6.2.1 *Limosilactobacillus reuteri* CUV Y12

El microorganismo de estudio con el que se trabajó en la investigación es *Limosilactobacillus reuteri* CUV Y12, aislada de yogurt en los laboratorios de la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento (DITCo), perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) dentro del estado de Puebla, México.

6.2.2 Condiciones generales de crecimiento y mantenimiento

La cepa de estudio de *L. reuteri* Y12, se almacena en criotubos con caldo MRS suplementado con una concentración final de 25% de glicerol en el ultracongelador de -80°C, los cuales son renovados continuamente para favorecer su viabilidad.

El crecimiento de *L. reuteri* Y12 se realiza con la toma de una muestra del inóculo, el cual es estriado en placas de medio MRS, que se incuban a 37°C en un lapso de 24 a 72 horas.

6.2.3 Tinción de Gram

Aunque la CUV Y12 de *L. reuteri*, está identificada por secuenciación y se cuenta con respaldo en el almacenamiento del ultracongelador, se realiza una tinción de Gram para garantizar la presencia de *L. reuteri*, observando los resultados en un microscopio óptico.

6.3 Determinación de la cinética microbiana

Se toma una colonia de la placa que contiene la cepa CUV Y12 en un tubo de 9 ml de caldo MRS, para ser incubado durante 24 horas a 37°C. Para posteriormente tomar una muestra de 30 µl que se vierte en un Matraz de Erlenmeyer de 250 ml

con 100 ml de caldo MRS para obtener el cultivo madre que se mantiene en incubación a 37°C.

Las mediciones se realizan a partir del tiempo 0 y posteriormente en intervalos de tiempo constante, tomando 1 ml de caldo MRS sin inocular como blanco y 1 ml del cultivo madre, los cuales se depositaban en celdas para realizar las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm.

Cada vez que se realizaba la lectura de densidad óptica, se realiza el recuento bacteriano con el método de diluciones seriadas y vertido en placa con agar MRS y se esperan que gelifiquen las placas, las cuales fueron incubadas a 37°C durante un lapso de 24 a 48 horas.

Los datos obtenidos tanto de densidad óptica como el conteo de placas se utilizaron para la construcción de la curva de crecimiento de *L. reuteri*, colocando la medición de la absorbancia medida en el espectrofotómetro a 600 nm (eje X) contra el número de unidades formadoras colonias (UFC) (eje Y).

Para la obtención del modelo de Gompertz, se utilizó el programa R Studio [Anexo 1].

6.4 Formulación base de la película comestible

La preparación de las películas comestibles basada en alginato y almidón, fue inspirada en la metodología propuesta por Concha-Meyer (2008), sin embargo se fueron modificando los porcentajes presentes en peso/volumen (Tabla 1) hasta obtener una consistencia manejable, en función de los intervalos para alginato y almidón, más utilizados para la elaboración de películas y recubrimientos comestibles (Méndez Reyes *et al.*, 2014; Norajit *et al.*, 2010; Su Cha *et al.*, 2002; Vázquez-Luna *et al.*, 2019).

Tabla 1. Modificación de los parámetros para la obtención de la película comestible.

Reactivo	Formulación de referencia	Modificación 1	Modificación 2	Modificación 3
Alginato	4 g (4 %)	2 %	8 %	4 %
Almidón	16 g (16 %)	4 %	8 %	4 %
Glicerol	20 g (20 %)	20 %	20%	20 %
Agua destilada	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

Nota: Los porcentajes se presentan en la concentración peso/volumen.

Y una vez obtenida una película que tenía características más deseables como era la modificación 3, se procedió a modificar los valores de glicerol para modificar la textura de secado (Norajit *et al.*, 2010; Vázquez-Luna *et al.*, 2019), dando como resultado la composición de la película base que se utiliza en las posteriores fases de experimentación (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de la formulación base de películas comestibles.

Reactivo	Cantidades	Concentración	Porcentaje absoluto
(Peso/Volumen)			
Alginato	2 g	2 %	1.82 %
Almidón	2 g	2 %	1.82 %
Glicerol	6 g	6 %	5.47 %
Agua destilada	100 ml	100 ml	90.88%

Nota: para la obtención del porcentaje absoluto, se utilizó el valor de densidad del agua como 0.997 g/ml.

El porcentaje absoluto establece el valor de cada reactivo en función del peso, resultado de la división del peso de un reactivo dado de la formulación, entre la sumatoria del peso de todos los componentes. Dando como suma de porcentajes el 100% (Ramírez Zermeño & Pérez Bejarano, 2022). La ecuación 2 representa la relación matemática del concepto:

$$\text{Porcentaje absoluto reactivo } x \% = \frac{(\text{Peso del reactivo } X)}{(\text{Suma del peso de todos los reactivos})} \times 100$$

[Ecuación 2]

Para la elaboración de las películas comestibles y posteriormente de pesar tanto el alginato como el almidón, se calienta el agua destilada en un rango de temperatura de 20 a 40 °C. Primero se debe disolver el almidón de forma gradual en el agua destilada para evitar la formación de grumos en la mezcla, una vez que se observa uniforme la mezcla, se procede a incorporar el alginato de sodio hasta que se contempla un cambio de viscosidad homogéneo.

En todo proceso de la elaboración de películas, se debe conservar una temperatura constante de 35 °C para favorecer la incorporación de los compuestos. Finalmente se agrega el glicerol y se homogeniza constantemente por 5 minutos.

Una vez que se obtiene la consistencia homogénea de la mezcla, se puede verter en un contenedor para su almacenamiento y la muestra se deja secar durante 3 días a temperatura ambiente.

6.5 Extracción del mucílago de chía

La extracción del mucílago de la semilla de chía se lleva a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Muñoz y colaboradores (2012).

Se colocan 20g de chía en 400 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 500 ml. El pH se ajusta a 8 ± 0.02 empleando solución de 0.1 M de NaOH, para posteriormente mantener en agitación constante a una temperatura de 80 °C durante 2 horas.

Una vez hidratada la semilla de chía, se procede a la separación del mucílago, empleando como filtro un trozo de tela (manta de cielo) y apoyado de un colador, los cuales previamente fueron esterilizadas por irradiación con la lámpara de luz UV durante 15 minutos para tener condiciones asépticas.

El mucílago resultante se centrifuga a 3500 rpm durante 8 minutos para eliminar las impurezas que pudieron producirse en el proceso de filtración. El líquido resultante corresponde al mucílago extraído, el cual se puede almacenar en condiciones de refrigeración para extender su vida útil.

6.6 Formulación de la película comestible suplementada con mucílago de chía

Una vez obtenida la formulación base para la elaboración de películas comestibles que se describe en el apartado anterior, se adicionó el mucílago de chía.

Debido al contenido de agua del mucílago extraído a partir de la semilla de chía, se determinó hacer una modificación al parámetro de volumen (100 ml de agua), para lo cual se distribuyeron 50 % de mucílago líquido (50 ml) y 50 % de agua (50 ml).

La metodología se desarrolló de la misma manera que la formulación base de películas comestibles, con la modificación que, al momento de medir el volumen, el mucílago se disolvió con el agua destilada.

Con la finalidad de estandarizar la formulación para la obtención de películas comestibles suplementada con mucílago de chía, se hicieron los ajustes de datos para reportar los valores en porcentaje absoluto (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de las películas suplementadas con mucílago de chía.

Reactivo	Cantidades	Porcentaje absoluto
Alginato	2 g	1.82 %
Almidón	2 g	1.82 %
Glicerol	6 g	5.47 %
<i>Agua destilada</i>	50 ml	45.42 %
<i>Mucílago de chía</i>	50 ml	45.47 %

Nota: Para la obtención del porcentaje absoluto de mucílago de chía, se considera un valor de densidad de 0.998 g/ml.

6.7 Obtención del Pellet Celular

Se siguió la metodología propuesta por Concha - Meyer (2008) con ciertas modificaciones ajustadas al microorganismo de interés.

L. reuteri se incubó 24 horas previas en caldo MRS, a partir de esta suspensión bacteriana se procedió a tomar una alícuota de 50 µl que se vertió en un Matraz de Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de caldo MRS para obtener el cultivo madre con la concentración bacteriana de interés, determinando las UFC/ml estimadas en función de la densidad óptica.

Del cultivo madre incubado, se transfieren 11 ml de inóculo en tubos para centrifugación, realizando una primera etapa a 3600 rpm por 15 minutos. Una vez finalizada la primera centrifugación se realizan lavados con agua de peptona,

eliminando el sobrenadante de caldo MRS y agregando 5 ml de agua de peptona por tubo.

Se realiza una segunda centrifugación a 3600 rpm por 15 minutos y se vuelve a eliminar el sobrenadante de agua de peptona, resuspendido el pellet celular en 1 ml de agua de peptona para realizar la última etapa de centrifugación a 3600 rpm por 8 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo, se procede a homogenizar el pellet celular, para poderlo incorporar en las películas comestibles.

6.8 Preparación de la Película comestible incorporada con probióticos

Una vez que se logró estandarizar la formulación de las películas comestibles suplementadas con mucílago de chía, se procedió a la incorporación de los probióticos (*L. reuteri*).

De acuerdo con la metodología planteada se incorporó 1 ml de pellet celular concentrado, al mismo tiempo que se incorpora el glicerol, para favorecer la homogenización.

Para favorecer la presencia de los probióticos en las películas, se redujo la cantidad de mezcla preparada a 50 ml de volumen (Tabla 4).

Tabla 4 Composición de la película suplementada con mucílago e incorporada con probióticos.

Reactivo	Cantidades	Porcentaje absoluto
Alginato	1 g	1.79 %
Almidón	1 g	1.79 %
Glicerol	3 g	5.37 %
Agua destilada	25 ml	44.61 %
Mucílago de chíá	25 ml	44.65 %
Pellet celular	1 ml	1.79%

6.9 Evaluación de las películas comestibles

6.9.1 Caracterización física de las películas comestibles

Las películas elaboradas fueron sometidas a diversas pruebas para su evaluación, siendo la parte física uno de los primeros criterios cruciales. Empezando de forma empírica con la evaluación sensorial de la textura y elasticidad desde las primeras mezclas, hasta el uso de microscopios para la observación de la composición física.

En primera instancia se utilizó un microscopio óptico, tomando 1 cm² del material para determinar el posible acomodo de los compuestos y posteriormente se hidrató una película para aplicarse la técnica de tinción de Gram para evaluar la presencia de los probióticos.

Empleando Microscopía electrónica de Barrido (SEM) se identificó la presencia de los probióticos junto con la interacción conformacional, para lo cual se utilizó 1 cm² de película con un tratamiento previo de baño de partículas de oro. Cabe recalcar que, para el uso del SEM, se requirió el apoyo de un experto en el tema.

6.9.2 Pruebas de almacenamiento

Las películas comestibles que se elaboraron en diferentes etapas se sometieron a diferentes condiciones de almacenamiento en diversos periodos de tiempo, para posteriormente evaluar si existe alguna diferencia significativa.

Dentro de los criterios a evaluar, se sometieron a almacenamiento a temperatura ambiente dentro de la ciudad de Puebla con un intervalo promedio de 10 a 27 °C, tanto en condiciones donde pueden percibir luz solar y aisladas de total oscuridad. Así como la preservación en cadena de refrigeración a 4 °C.

El experimento fue monitoreado durante un periodo de 7 meses posterior a su elaboración.

6.9.3 Determinación de la humedad

Para la determinación de humedad presente en las películas comestibles, se prepararon muestras de 1 gramo de mezcla fresca, las cuales se pesan con una balanza analítica junto con el recipiente. Posteriormente, las películas se secaron y las muestras se volvieron a pesar para su análisis.

Los cálculos se obtienen a partir de la ecuación 3 para la determinación del porcentaje de humedad.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(P3-P1)}{(P2-P1)} \times 100 \quad [\text{Ecuación 3}]$$

Donde:

P1 = Peso del recipiente (g)

P2 = Peso del recipiente con muestra fresca (g)

P3 = Peso del recipiente con muestra seca (g)

6.9.4 Pruebas de viabilidad de los probióticos incorporados en la película comestible

Para determinar la viabilidad de los probióticos inmovilizados en la película comestible diseñada, se basó en la técnica propuesta por Champagne *et al.* (1992).

En primer lugar, se preparan 50 ml de solución de citrato de sodio al 1% P/V, para proceder a incorporar la película comestible seca, previamente se había determinado el peso fresco de la muestra para las pruebas. Para disolver la película, se coloca la solución en agitación constante hasta que se obtiene una mezcla homogénea sin presencia de grumos.

Posteriormente, se distribuyó el volumen en tubos de ensayo para realizar una centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos. Una vez observado la presencia del pellet celular, se elimina el sobrenadante y se realiza un lavado con 1 ml de agua de peptona, para obtener el pellet celular en un solo tubo de ensayo. Este tubo se centrifuga a 3600 rpm durante 10 minutos, y en caso de ser requerido, se realiza un último lavado con 1 ml de agua de peptona.

Finalmente, la suspensión conteniendo el pellet celular resuspendido en 1 ml de agua de peptona, se usa para realizar las diluciones seriadas y el vertido en placas con agar MRS.

6.10 Evaluación del potencial probiótico

6.10.1 Evaluación de viabilidad condiciones similares a la acidez estomacal

Siguiendo la metodología propuesta por Gutiérrez Ramírez y colaboradores (2007) con ciertas modificaciones en el análisis de datos, se realizó la evaluación de la capacidad de *L. reuteri* de sobrevivir en condiciones ácidas; simulando la presencia de acidez estomacal. Se realizó el ajuste de pH al caldo de cultivo MRS a un intervalo de 2.5 con ayuda de HCl al 10%, para someter la cepa de estudio a la acidez durante un intervalo de 2 horas, el cual es el tiempo promedio de digestión dentro del estómago.

Se realizaron mediciones al tiempo 0, 60 y 120 minutos, para medir el impacto de la acidez. Utilizando el espectrofotómetro se realizaron mediciones de absorbancia para estimar el valor de UFC presentes y a la par, se realizó vertido en placa para cuantificar las UFC/ml. Observando los resultados de 24 a 72 horas posterior al crecimiento.

Cabe recalcar que se utilizó caldo MRS sin modificaciones, como blanco para hacer la comparativa y que, al verter en placa, fue con Agar MRS sin modificaciones.

6.10.2 Evaluación de viabilidad ante la presencia de sales biliares

Para evaluar la resistencia a las sales biliares, se retomó la metodología de Saavedra *et al.* (2003) con ciertas modificaciones, inoculando la cepa CUV Y12 en caldo MRS fresco suplementado con 0.3 % p/v de sales biliares y en caldo MRS sin modificaciones para el grupo control.

Se realizaron mediciones en el espectrofotómetro a 600 nm en las horas 0, 1, 2, 3 y 4, que es el tiempo estimado de digestión en presencia de sales biliares, simultáneamente se realizó el vertido en placa del inculó y estriando 50 µl en placas de agar MRS suplementadas con sales biliares, con el fin de tener un parámetro comparativo de forma cualitativa.

En el caso del blanco, se realizó la medición en espectrofotómetro y vertido de placa en Agar MRS sin modificaciones, incubando en todos los casos las placas por un intervalo de 24 a 72 horas para su observación.

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Microorganismo de estudio

7.1.1 Tinción de Gram

Con la finalidad de confirmar que la cepa CUV Y12 que pertenece a las bacterias aisladas a partir de una muestra de yogurt artesanal y al realizar un análisis de secuencia fue identificada como *Limosilactobacillus reuteri* (Landeta-Cortés comunicación personal), se realizó una tinción de gran para hacer una evaluación microscópica, obteniendo como el control (Figura 9).

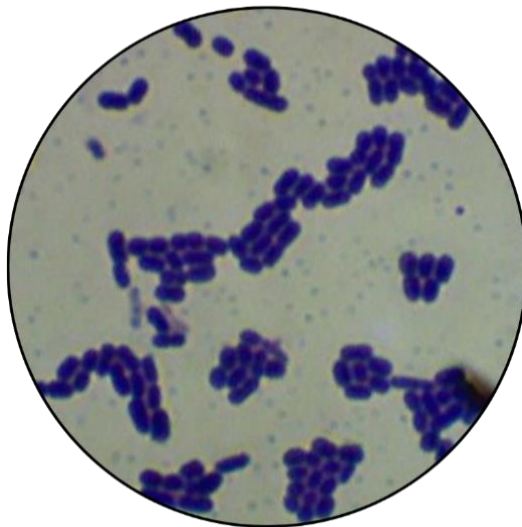


Figura 9. Tinción de gran de *L. reuteri*. Observación en microscopio óptico 100x con aceite de inmersión.

Al observar la morfología, se puede identificar la presencia de bacilos de forma ovalados y alargados, con tonalidad morada, indicando que pertenece al grupo de bacterias Gram positivas y cumpliendo con las cualidades deseadas para ratificar que se trabaja con *L. reuteri*.

7. 2 Cinética microbiana

La recopilación de los datos obtenidos durante la construcción de la cinética microbiana para *L. reuteri* se reportan en la tabla 5, donde se muestran los datos finales de las mediciones de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en relación con el conteo de UFC/ml al realizar el vertido en placa.

Tabla 5. Absorbancia contra UFC/ml para *Limosilactobacillus reuteri*.

Densidad óptica (600 nm)	UFC/ml
0.007	3.35x10 ⁵
0.008	3.50x10 ⁵
0.011	1.17x10 ⁶
0.019	1.85x10 ⁶
0.022	1.50x10 ⁶
0.027	5.50x10 ⁶
0.031	3.96x10 ⁶
0.056	8.90x10 ⁶
0.07	1.84x10 ⁷
0.076	2.40x10 ⁷
0.092	2.48x10 ⁷
0.113	2.17x10 ⁷
0.147	1.65x10 ⁷
0.693	4.75x10 ⁷
1.058	1.02x10 ⁸
1.465	4.35x10 ⁸
1.779	8.15x10 ⁸
2.164	1.99x10 ⁹
2.314	2.09x10 ¹⁰
2.396	2.84x10 ⁹

En el caso de los datos recopilados, aunque se reportan en función de la densidad óptica, en el tiempo 0 de inoculación se reporta un valor de OD 0.007 con una concentración de $3.35E+05$ UFC/ml, mientras que el punto máximo detectado con las técnicas propuestas corresponde a 2.314, logrando la escala de $2.09E+10$ UFC/ml en aproximadamente 24 horas desde la inoculación del cultivo madre con MRS. Para favorecer la visualización de los datos, se graficó la densidad óptica en el eje X comparado con el valor de UFC/ml en el eje Y, como se puede observar en la figura 10.

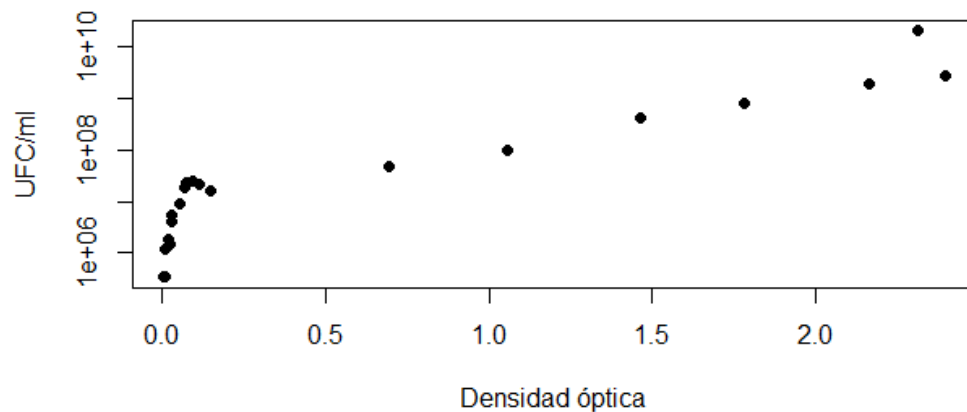


Figura 10. Crecimiento de *L. reuteri*. Grafica de la recopilación de datos de densidad óptica contra UFC/ml.

Mientras que en la figura 11, podemos observar la curva de crecimiento en color azul, con los datos ajustados de acuerdo con el modelo de Gompertz, el cual permite estimar el valor de UFC/ml al medir la densidad óptica, permitiendo trabajar con concentraciones mayores de *L. reuteri*.

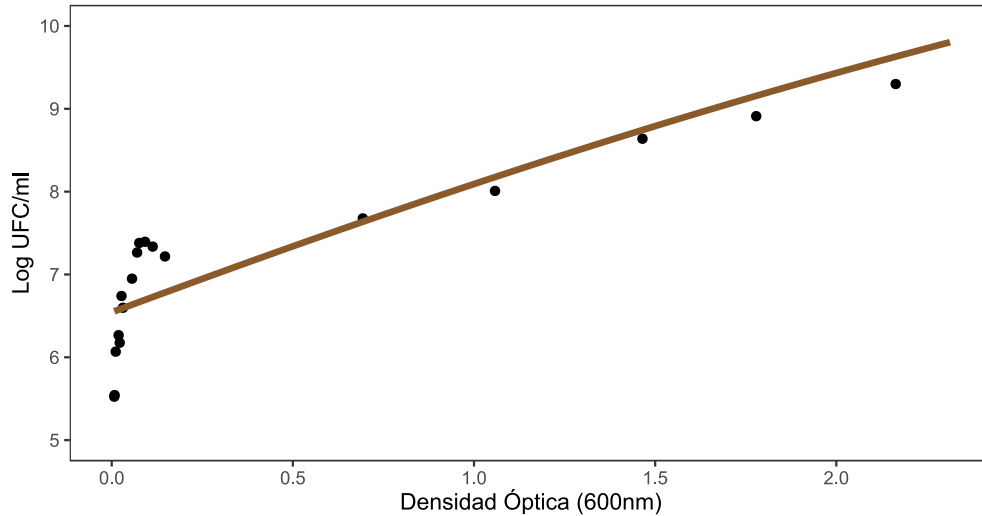


Figura 11. Curva de crecimiento de *L. reuteri*. La línea café indica los datos ajustados al modelo de Gompertz.

7.3 Formulación base de la película comestible

La formulación inicial de las películas comestibles, se inspiró en el trabajo propuesto por Concha-Meyer (2008), sin embargo no se observaron los resultados deseados, ya que se obtuvieron películas con mayor contenido de humedad, una textura más gruesa y como se observa en la figura 12 A, con presencia de grumos que dificultaban la incorporación de los reactivos, al mismo tiempo que eran más susceptibles a contaminación por parte de hongos (Figura 12 B), además de tener un peso promedio de 48.51 gramos al verter.

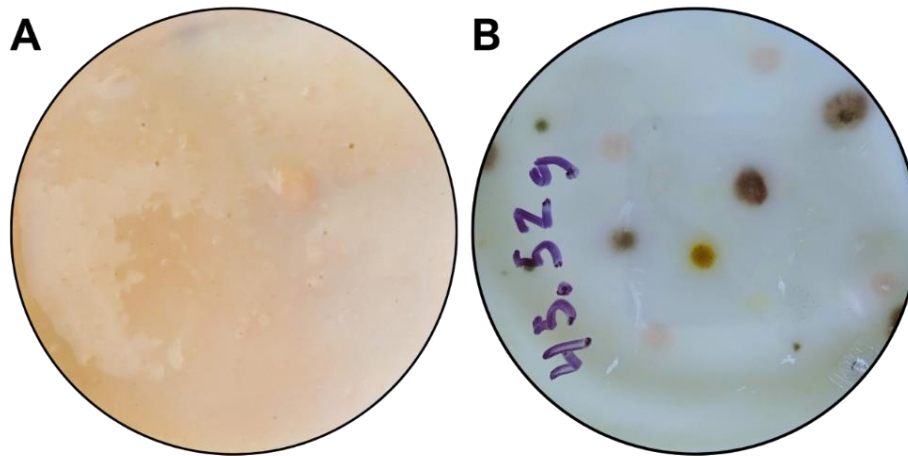


Figura 12. Formulaciones de referencia. A.- Primera mezcla. B.- 3ra Mezcla.

Al realizar cambios en la formulación de las películas, ajustando los parámetros sugeridos de alginato, almidón y glicerol, se obtuvieron mejores resultados. Al presentar películas con mejor apariencia, sin ningún tipo de contaminación, con un color blanco opaco con cierta transparencia y al ser más delgadas como se observa en la figura 13.

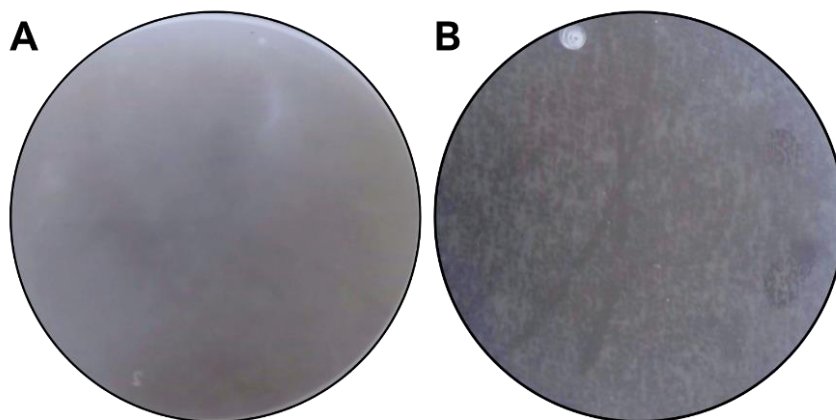


Figura 13. Formulación base de películas. A.- Mezcla fresca. B.- Película seca.

En la figura 13 que presenta las películas comestibles elaboradas con la formulación base mencionada en la metodología, se puede observar en la figura 14 A, la mezcla en fresco, la cual presenta mayor homogenización y apariencia viscosa, mientras que en la figura 13 B, se muestra la película seca, la cual presenta mejores características.

7.4 Extracción de mucilago de chía

La extracción del mucílago de la semilla de chía se realizó con la metodología descrita por Muñoz y colaboradores (2012), obteniendo 165 ml de mucílago por cada 20 gramos de semilla de chía utilizada dando un rendimiento de 82.5%.

El producto final muestra las cualidades de un gel transparente, de apariencia acuosa y tonalidad ámbar como se muestra en la figura 14, además de presentar una densidad de 0.9976 g/ml, pero para los cálculos de la composición, se hizo el ajuste a 0.998 g/ml.

El mucílago obtenido se almacena bajo refrigeración a 4 °C y se renovó cada 2 meses.



Figura 14. Mucilago Chía obtenido.

7.5 Película comestible suplementada con mucílago de chía

Para la elaboración de las películas comestibles suplementadas con mucílago de chía, se utilizó de referencia la formulación base desarrollada en la etapa anterior, con la modificación inicial de modificar la parte líquida, agregando 50 ml de agua y 50 ml de mucílago. Una vez caracterizado el mucílago de chía, se ajustó al porcentaje absoluto de 45.42% de agua destilada y 45.47% de mucílago de chía.

La mezcla se vertió en placas Petri de 60 mm de diámetro, para reducir los tiempos de secado y poder trabajar con muestras de 1 gramo de mezcla fresca.

Las características de composición de las películas suplementadas con mucílago se muestran en la figura 15, obteniendo características físicas a la formulación original, pero con la principal modificación de una mayor opacidad dada por la incorporación del mucílago. Lo cual se puede deber a la presencia de pigmentos presentes en la semilla de chía, que se lograron colar al momento de extraer el mucílago de chía, tal y como lo menciona Garcia y colaboradores (2022).

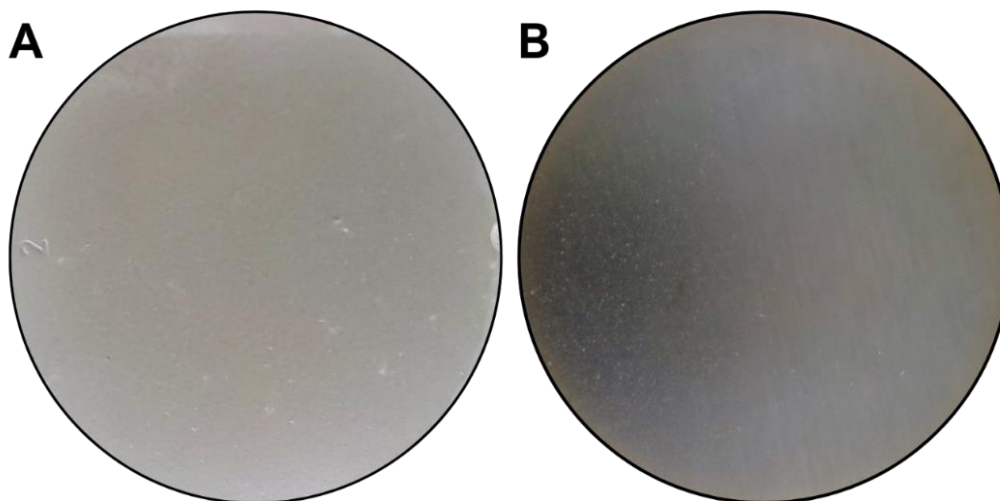


Figura 15. Películas suplementadas con mucílago. A.- Fresca. B.- Seca.

Las películas fueron sometidas a distintas pruebas como la parte de almacenamiento durante 9 meses y la evaluación con diferentes parámetros.

7.6 Pellet Celular

El proceso de extracción de pellet celular es uno de los puntos clave de la investigación, pues aquí se determina la concentración de UFC presentes de *L. reuteri* por gramo de película, llevando a cabo la metodología indicada anteriormente con ligeras modificaciones a lo largo de la experimentación.



Figura 16. Pellet celular.

En la figura 16, se puede observar la extracción del pellet celular, en color blanco observamos una alta concentración de *L. reuteri*, mientras que de color amarillo translucido en el agua de peptona utilizado durante el proceso.

El valor de concentración de *L. reuteri*, presente en el pellet celular extraído, varía por diferentes factores, como las condiciones de crecimiento y nutricionales, que en este caso se mantuvieron constantes (González *et al.*, 2022) y el principal factor variable fue el tiempo, pero en todos los experimentos rondaron en una densidad promedio de 2.379 (Valor del último experimento), que de acuerdo al modelo de Gompertz determinado para la cepa trabajada, estima un valor de 4.51×10^9 UFC/ml.

El pellet celular concentrado en 1 ml se obtuvo a partir de 88 ml del caldo MRS centrifugados, lo que significa que el valor final corresponde a 3.97×10^{11} UFC presentes en el 1 ml de pellet celular.

7.7 Película comestible incorporada con probióticos

Uno de los objetivos principales de la investigación es la inmovilización de probióticos en las películas comestibles compuestas principalmente por la matriz de mucílago de chía, por lo que se incorporó el pellet celular con una concentración de 3.97×10^{11} Unidades formadoras de colonias de *L. reuteri* presentes en el 1ml de pellet.

Para favorecer la presencia de *L. reuteri* y pueda ser considerado como probiótico, se recomienda incorporarlo con una concentración mínima de 1×10^6 UFC/g (Sin Cheow & Hadinoto, 2013), por lo que se preparó 54.88 gramos de mezcla al cual se le incorporó el pellet celular, dando una concentración de 1.45×10^8 UFC/g de película en fresco, que se puede observar en la figura 17 A.

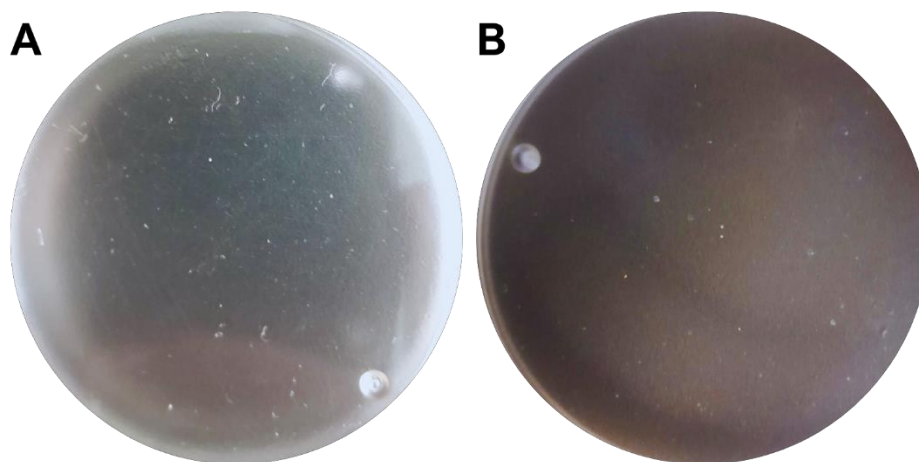


Figura 17. Película incorporada con probióticos. A Mezcla Fresca. B.- Seca.

La incorporación de los probióticos en las películas comestibles suplementadas con mucílago de chía mejoró las características del producto en seco (Figura 17 B), al disminuir la tonalidad ámbar adquirida al añadir el mucílago, dado que el pellet tiene una tonalidad blanquecina que contrarresta la opacidad.

7.8 Evaluación de las películas comestibles

7.8.1 Caracterización física de las películas comestibles

Una vez formulada las películas comestibles con la suplementación de mucílago de chía en la matriz de polímeros y la incorporación de probióticos, se realizaron diversas pruebas para evaluar el potencial de los productos finales.

El primer factor, son parámetros cualitativos relacionados a la parte física, observando que las películas elaboradas muestran elasticidad (Figura 18) que favorecería el manejo como barrera protectora y que de acuerdo con Goh y colaboradores (2016), es aportado en gran medida por la presencia del mucílago de chía.

Así mismo se observa cierta opacidad, que tendrá un gran rol en la protección de los alimentos recubiertos cuando se expongan a la presencia de luz visible y ultravioleta (Ocak, 2020).



Figura 18. Elasticidad en películas comestibles.

El análisis físico se realizó empleando microscopía, para la observación de la conformación de gránulos que podrían corresponder al almidón y alginato, así como gotas que pueden corresponder al glicerol y la presencia de pigmentos correspondientes al mucílago (Figura 19 A). Mientras que en la figura 19 B, se observa un fragmento de película que muestra la posible encapsulación de los probióticos.

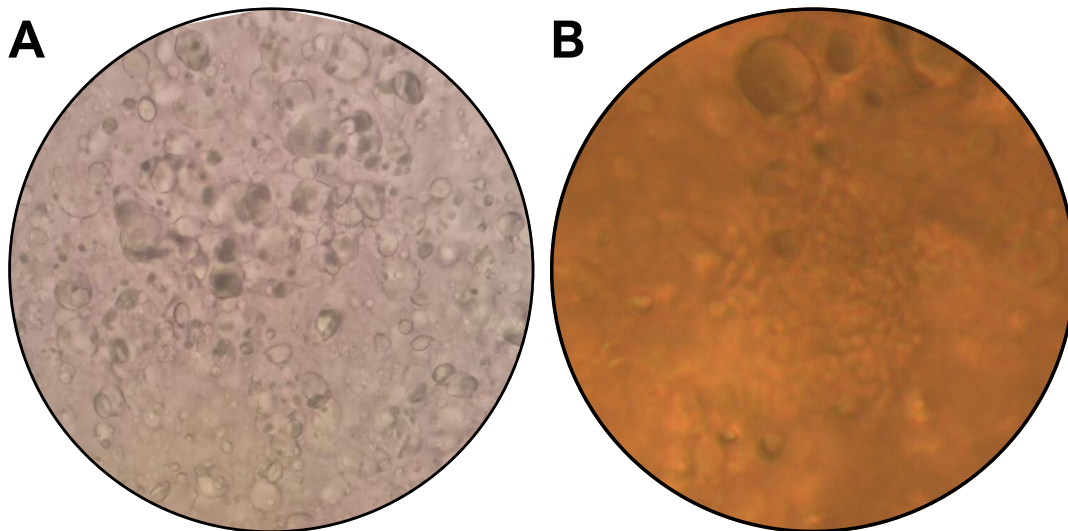


Figura 19 Composición física. A. Observación de conformación de la película. B. Encapsulación de probióticos.

Para reafirmar la composición física, se realizaron observaciones en el microscopio electrónico de barrido (Figura 20) con un acercamiento de 5000x, el cual reafirma la presencia física de *L. reuteri* inmovilizada en las películas comestibles

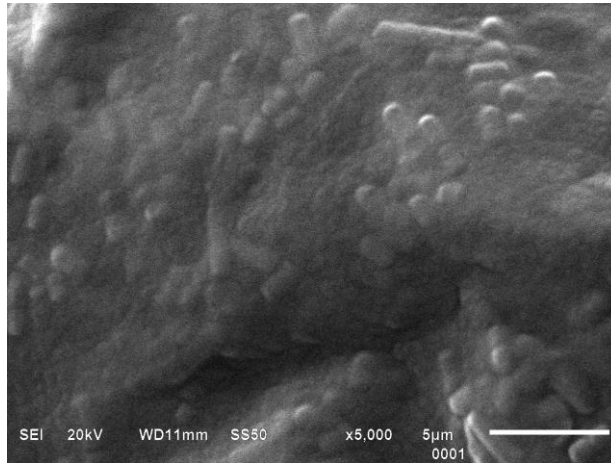


Figura 20. Observación en Microscopio SEM. Observación a 5000x.

7.8.2 Pruebas de almacenamiento

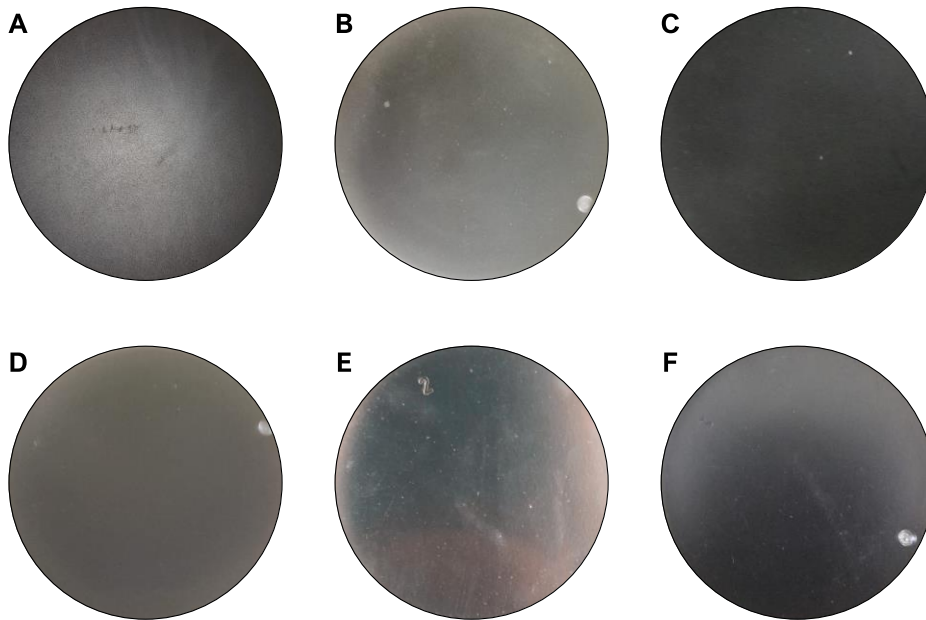


Figura 21. Pruebas de almacenamiento en función del tiempo. A. Almacenamiento en condiciones ambientales (Día 1). B. Almacenamiento en refrigeración (Día 1). C. Almacenamiento en oscuridad (Día 1). D. Almacenamiento en condiciones ambientales (Día 210). E. Almacenamiento en refrigeración (Día 210). F. Almacenamiento en oscuridad (Día 210).

Las películas comestibles suplementadas con mucílago de chía e incorporación de probióticos, se sometieron a diversas condiciones de almacenamiento para evaluar su reacción a diferentes factores ambientales (Figura 21).

Dentro de los criterios a evaluar, se sometieron a almacenamiento a temperatura ambiente dentro de la ciudad de Puebla con un intervalo promedio de 10 a 27 °C, tanto en condiciones donde pueden percibir luz solar (Figura 21 A), aisladas de total oscuridad (Figura 21 B), así como la preservación en cadena de refrigeración a 4 °C (Figura 21 C).

Pasando un lapso de 7 meses, que corresponde a cerca de 210 días, se realizaron las evaluaciones finales, observando que la película que no sufrió cambios físicos significantes fueron las películas almacenadas en total oscuridad (Figura 21 F) y en refrigeración (Figura 21 E); mientras que en las películas guardadas en condiciones ambientales que podían percibir luz solar (Figura 21 D) se observó un oscurecimiento probablemente por la oxidación de compuestos en presencia de luz.

7.8.3 Determinación de la humedad

Una de las finalidades de las películas y recubrimientos comestibles como tecnologías emergentes es que actúen como barreras en alimentos, por lo que se requiere disminuir la presencia de humedad en los productos finales, pero que al mismo tiempo sea un secado gradual para evitar un daño drástico a las células incorporadas como lo indica Yan y colaboradores (2022).

Para analizar dichos parámetros, se seleccionaron 30 muestras aleatorias de películas que fueron pesadas en fresco al momento de su elaboración y posteriormente en un intervalo de 3 a 5 días de secado, los datos recopilados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Determinación de pérdida de humedad.

# Muestras	Peso - Película fresca (gramos)	Peso - Película seca (gramos)	Pérdida de humedad
1	1.03	0.14	86.41%
2	1.02	0.13	87.25%
3	1.03	0.13	87.38%
4	1.05	0.12	88.57%
5	1.10	0.12	89.09%
6	1.00	0.11	89.00%
7	0.98	0.11	88.78%
8	1.00	0.10	90.00%
9	1.00	0.11	89.00%
10	1.00	0.10	90.00%
11	1.00	0.10	90.00%
12	1.01	0.11	89.11%
13	1.00	0.10	90.00%
14	0.98	0.11	88.78%
15	0.99	0.11	88.89%
16	1.04	0.12	88.46%
17	1.00	0.10	90.00%
18	1.02	0.09	91.18%
19	1.01	0.08	92.08%
20	1.01	0.08	92.08%
21	0.99	0.10	89.90%
22	1.00	0.10	90.00%
23	1.10	0.12	89.09%
24	1.07	0.13	87.85%
25	1.06	0.10	90.57%
26	1.16	0.14	87.93%

27	0.99	0.09	90.91%
28	1.00	0.11	89.00%
29	1.57	0.15	90.45%
30	1.09	0.13	88.07%
Promedio			89.33%

Considerando que, en el momento de elaboración, el agua incorporada junto al mucílago acuoso corresponde en conjunto hasta al 90.89% de la composición líquida, el lograr una pérdida promedio de 89.33% se puede considerar un buen valor que permitiría la viabilidad de los probióticos al favorecer su encapsulación en la matriz de polímeros y al mismo tiempo seguir brindando la barrera de protección de ciertos alimentos.

Esta pérdida de agua, modifica las propiedades físicas y estructurales de las películas comestibles, las cuales se pueden observar en el espesor y textura final, tal y como lo sugiere Vázquez-Luna y colaboradores (2019).

7.8.4 Pruebas de viabilidad de los probióticos incorporados en la película comestible

Una prueba crucial para poder clasificar a las películas comestibles como un producto con potencial probiótico es la determinación de *L. reuteri* de forma viable, pues así se garantiza que pueda colonizar el intestino y demostrar la efectividad de la formulación realizada.

Dado que previamente se logró la observación física de *L. reuteri* en los diferentes microscopios, se realizó una observación más para verificar la conformación, pero con la variante de realizar el fundamento de tinción de Gram (Figura 22), rectificado la presencia de los probióticos en las películas en cuestión cualitativa.

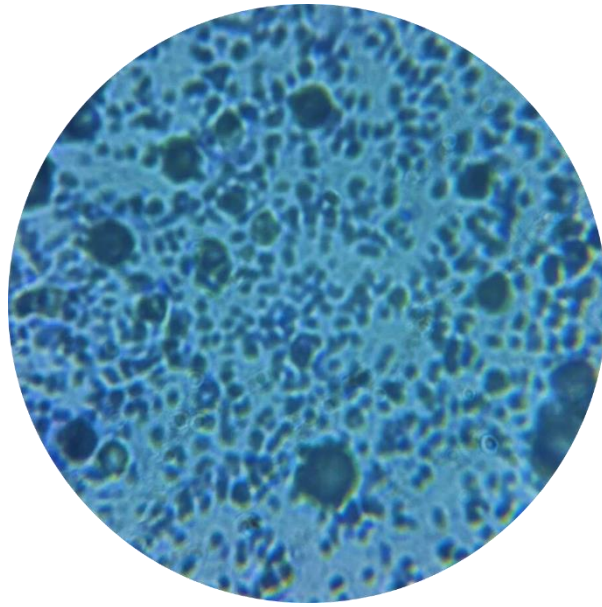


Figura 22. Tinción de Gram sobre las películas comestibles. Observación realizada en microscopio óptico a 40X*2X*25X con filtro polarizado.

Para la cuantificación de células viables que se lograron inmovilizar en la película comestible y posteriormente liberarlos, se basó en la técnica propuesta por Champagne *et al.* (1992), realizando pruebas por duplicado con diluciones seriadas de 1 a 8, esperando un valor de 1.45×10^8 UFC/g en relación a la concentración incorporada en las películas, sin embargo el valor resultante fue de 3.76×10^6 , indicando la pérdida de viabilidad de 2 logaritmos.

Las colonias resultantes de la prueba se pueden observar en la figura 23, observando en la parte experimental que el crecimiento contable llevaba de 72 a 120 horas como se observar en la figura 23 A. Además, la mayoría de las colonias se encontraban agrupadas en la mayoría de las observaciones como se muestra en la figura 23 B, lo cual puede deberse a la formación de congregados al momento de inmovilizar los probióticos en las películas.

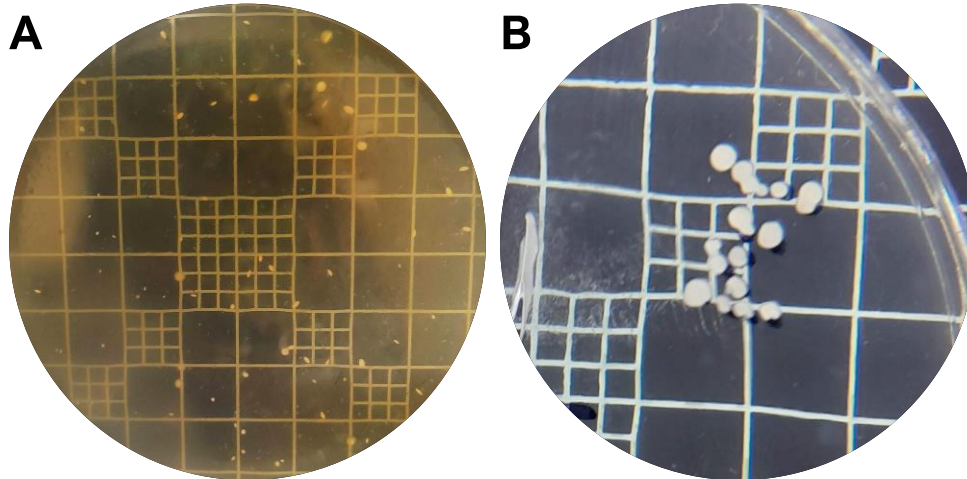


Figura 23. Prueba de viabilidad en películas con mucílago de chía. A. Placa contable con colonias viables. B. Crecimiento de colonias viables.

7.9 Evaluación del potencial probiótico

7.9.1 Evaluación de viabilidad condiciones similares a la acidez estomacal

Si bien diversos autores colocan a *L. reuteri* como un microorganismo con potencial probiótico y se han estudiado los efectos benéficos que produce, se buscó confirmar que la cepa CUV Y12 de *L. reuteri* a partir de una muestra de yogurt tenga dicho potencial probiótico, sobreviviendo a las condiciones de digestión.

Para ello, se sometieron las colonias en una simulación de acidez digestiva a un pH cercano a 2.5 y a la par se comparó la respuesta de crecimiento normal de la misma cepa. Como se puede visualizar en la figura 24, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de *L. reuteri*. Esto coincide con lo reportado en diversas cepas de probióticos, especialmente de *L. reuteri* que muestran resistencia a entornos ácidos (Mu *et al.*, 2018).

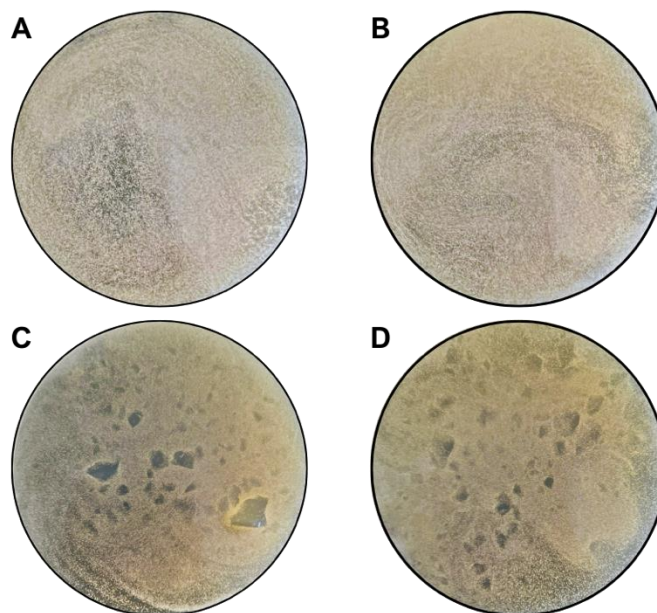


Figura 24. Viabilidad de *L. reuteri* en condiciones similares a la acidez estomacal. A.- Placa control (Hora 0). B. Colonias sometidas a acidez (Hora 0). C.- Placa control (2 horas). B. Colonias sometidas a acidez (2 Horas).

7.9.2 Evaluación de viabilidad ante la presencia de sales biliares

El determinar si la cepa CUV Y12 de *L. reuteri* muestra viabilidad en la simulación del trato digestivo en presencia de sales biliares, es crucial porque los probióticos que pueden sobrevivir en presencia de la bilis, tienen más probabilidades de alcanzar el intestino grueso, donde pueden ejercer sus efectos beneficiosos, como el apoyo a la digestión, la modulación del sistema inmunológico y el equilibrio de la microbiota intestinal (Sivamaruthi *et al.*, 2020).

La prueba se realizó de forma cualitativa en 2 con respecto al grupo control, los resultados se pueden observar en la figura 25, comparando los valores iniciales en relación con las 4 horas estimadas de digestión en presencia de sales biliares.

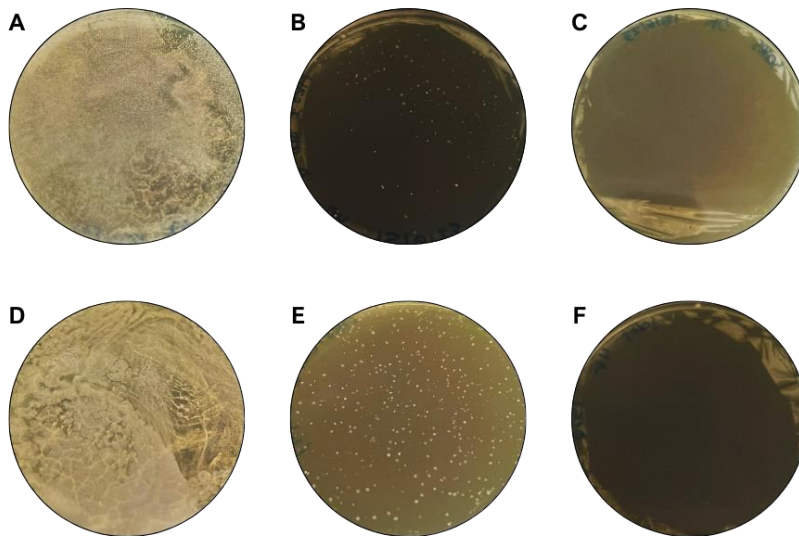


Figura 25. Viabilidad de *L. reuteri* en presencia de sales biliares. A. Placa control (Hora 0). B. Siembra por estriado sobre sales(Hora 0). C. Vertido en medio modificado con sales (Hora 0). D . Placa control (4 horas). E. Siembra por estriado sobre sales (4 horas). F. Vertido en medio modificado con sales (4 horas).

En la figura 25 F que corresponde a la técnica de vertido en placa con el medio MRS modificado con sales biliares a las 4 horas, podemos observar en relación con la figura 25 C, que disminuye el crecimiento microbiano, pero que la cepa CUV Y12 de *L. reuteri* si muestra cierta tolerancia a la bilis, siendo una característica importante de las bacterias ácido lácticas (Saavedra *et al.*, 2003).

Así mismo, podemos observar en la figura 26, la adaptación de *L. reuteri* en presencia de sales biliares, visualizando en la figura 26 A el crecimiento esperado de las bacterias en condiciones óptimas a las 3 horas, en comparación de la figura 26 B que muestra el crecimiento celular, pero con afectaciones en su morfología y viabilidad, tal y como lo reporta Mu y colaboradores (2018) en otros tipos de probióticos sometidos a las mismas pruebas.

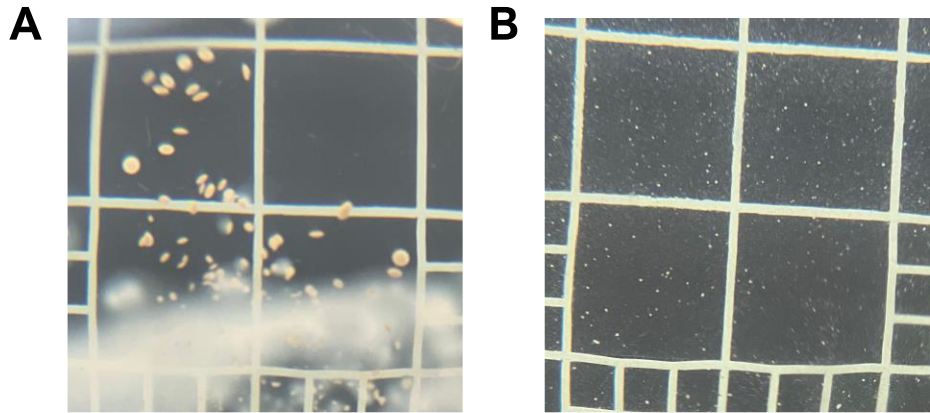


Figura 26. Adaptación de *L. reuteri* en presencia de sales biliares. A. Crecimiento normal a las 3 horas. B. Crecimiento en presencia de sales biliares a las 3 horas.

Estos resultados, reafirman que la cepa CUV Y12 de *L. reuteri*, tiene potencial probiótico, pero que se requiere la implementación de técnicas de encapsulación o inmovilización celular para favorecer el efecto probiótico al ingerirlos. Por ello, la película comestible es una gran alternativa para reforzar la viabilidad.

8.- CONCLUSIONES

En la investigación desarrollada, se abordó el desafío de formular una película comestible suplementada con mucílago de chía (*Salvia hispanica*) con el propósito de inmovilizar probióticos, utilizando como bacterias de estudio a *Limosilactobacillus reuteri*. Los resultados obtenidos brindan un horizonte al tema de viabilidad celular y la aplicación de las películas y recubrimientos comestibles en el ámbito de alimentos funcionales y favorecer el microbiota intestinal.

La formulación de la película brinda resultados satisfactorios, al demostrar que las condiciones planeadas en la investigación son adecuadas tanto en la creación de materiales como en la inmovilización de probióticos, al obtener resultados positivos en la viabilidad. Estos resultados sugieren que la matriz de alginato, almidón, mucílago de chía y glicerol, ofrecen un ambiente propicio para el mantenimiento de las células y beneficiar la colonización en el tracto gastrointestinal al mismo tiempo que permita la conservación de ciertos alimentos.

9.- PERSPECTIVAS

El tema de películas y recubrimientos comestibles son una buena línea de investigación por el gran potencial de este tipo de tecnologías emergentes dentro de la industria alimentaria, se recomienda acompañar el desarrollo con la vigilancia tecnológica para identificar las innovaciones y tendencias en el rumbo de alimentos que puedan ser compatibles con las películas formuladas. Además de replicar ciertos experimentos en diversas condiciones y complementar la formulación con aceites esenciales para potenciar los efectos benéficos. Así como evaluar la solicitud de patente de la formulación de películas y recubrimientos comestibles suplementadas con mucílago de chía que favorecen la inmovilización de probióticos.

10.- BIBLIOGRAFÍA

- Beikzadeh, S., Khezerlou, A., Mahdi, S., Pilevar, Z., & Mohammad, A. (2020). Seed mucilages as the functional ingredients for biodegradable films and edible coatings in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 280, 102164. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102164>
- Capitani, M. I., Corzo-Rios, L. J., Chel-Guerrero, L. A., Betancur-Ancona, D. A., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Rheological properties of aqueous dispersions of chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage. *Journal of Food Engineering*, 149, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.043>
- Casas, I. A., & Dobrogosz, W. J. (2000). Validation of the Probiotic Concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(4), 247–285. <https://doi.org/10.1080/08910600050216246-1>
- Castro Crespo, A. (2020). Cultivo de *Lactobacillus reuteri* en solitario y en cocultivo con *Escherichia coli* [Universidad de Valladolid]. En *Repositorio de la Universidad de Valladolid*. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/42163>
- Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. En *Nova* (Vol. 19, Número 36). <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Champagne, C. P., Gaudy, C., Poncelet, D., & Neufeld, R. J. (1992). *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1429–1434. <https://doi.org/10.1128/aem.58.5.1429-1434.1992>
- Chiralt, A., Talens, P., Monedero, F. M., & Fabra, M. J. (2015). Effect of different components of edible/biodegradable composite films on water relationships in the polymer matrix. En *Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems* (pp. 101–113). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2578-0_8

- Chiumarelli, M., & Hubinger, M. D. (2014). Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. *Food Hydrocolloids*, 38(November), 20–27.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.013>
- Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., & Le Blay, G. (2008). Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an *in vitro* model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(1), 56–64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00412.x>
- Concha-Meyer, A. A. (2008). Evaluación de una biopelícula con bacterias ácido lácticas y nisina para la inhibición de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado [Universidad Austral de Chile].
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fac744e/doc/fac744e.pdf>
- De Araújo U., N., Gutiérrez Ramírez, L. A., Ruíz Villadiego, O. S., & Montoya Campuzano, O. I. (2015). Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: una revisión. *Alimentos hoy*, 23(36), 112–126.
- Dehghani, S., Noshad, M., Rastegarzadeh, S., Hojjati, M., & Fazlara, A. (2020). Electrospun chia seed mucilage/PVA encapsulated with *green cardamomum* essential oils: Antioxidant and antibacterial property. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.023>
- Dias Alves, V., Mali, S., Beléia, A., & Grossmann, M. V. E. (2007). Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 941–946.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.007>

Dick, M., Costa, T. M. H., Gomaa, A., Subirade, M., Rios, A. D. O., & Flôres, S. H. (2015). Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties.

Carbohydrate Polymers, 130, 198–205.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.040>

Dishisha, T. (2013). Microbial Production of Bio-Based Chemicals: *A Biorefinery Perspective*.

Dore, M. P., Bibbò, S., Loria, M., Salis, R., Manca, A., Pes, G. M., & Graham, D. Y. (2019). Twice-a-day PPI, tetracycline, metronidazole quadruple therapy with Pylera or *Lactobacillus reuteri* for treatment naive or for retreatment of *Helicobacter pylori*. Two randomized pilot studies. *Helicobacter*, 24(6), 1–6.

<https://doi.org/10.1111/hel.12659>

ENIP. (s/f). Función de Gompertz. ENIP. https://www.enip.com.mx/ap7_8.pdf

Fajardo-Ochoa, R., Osuna-Castro, J. A., Villavelazquez - Mendoza, C., Escalante-Minakata, P., & Ibarra-Junquera, V. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(6), 42–56.

Food and Agriculture Organization. (2006). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. En *FAO FOOD AND NUTRITION PAPER*.

Garcia e Silva, L. L., da Silva, C. A. S., & Santana, R. de C. (2022). Rheology of dispersions and emulsions composed of chia mucilage and the application of chia in food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(13), 5585–5592. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11921>

Gastronomía&Cía. (2014). Películas comestibles con antimicrobianos para la carne. Gastronomía&Cía.

<https://gastronomiaycia.republica.com/2014/05/01/peliculas-comestibles-con-antimicrobianos-para-la-carne/>

Goh, K. K. T., Matia-Merino, L., Chiang, J. H., Quek, R., Soh, S. J. B., & Lentle, R. G. (2016). The physico-chemical properties of chia seed polysaccharide and its microgel dispersion rheology. *Carbohydrate Polymers*, 149, 297–307.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.126>

González Cuello, R. E., Pérez Mendoza, J., & Urbina Suarez, N. A. (2014). Efecto de la microencapsulación sobre las propiedades reológicas y fisicoquímicas del yogurt blando. *Informacion Tecnologica*, 25(6), 45–56.

<https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000600007>

González, R. E., Tarón Dunoyer, A., & Pérez Mendoza, J. (2022). Modelo de crecimiento microbiano para predecir el comportamiento de *Salmonella spp.* en queso costeño colombiano. *Información tecnológica*, 33(1), 225–234.

<https://doi.org/10.4067/s0718-07642022000100225>

González Sandoval, D. C., Luna Sosa, B., Martínez-Ávila, G. C., Rodríguez Fuentes, H., Avendaño Abarca, V. H., & Rojas, R. (2019). Formulation and Characterization of Edible Films Based on Organic Mucilage from Mexican *Opuntia ficus-indica*. *Coatings*, 9(506).

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/coatings9080506>

Gutiérrez Ramírez, L. A., Gómez Ospina, A. J., Arias Jaramillo, L. M., & Tangarife Patiño, B. (2007). Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. *Bioteología Alimentaria*., 4(2), 37–42.

Harel, M., & Tang, Q. (2014). Protection and Delivery of Probiotics for Use in Foods. *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 469–484). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404568-2.00036-4>

Hou, C., Zeng, X., Yang, F., Liu, H., & Qiao, S. (2015). Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0014-3>

- Hsiao, Y. P., Chen, H. L., Tsai, J. N., Lin, M. Y., Liao, J. W., Wei, M. S., Ko, J. L., & Ou, C. C. (2021). Administration of *Lactobacillus reuteri* combined with *Clostridium butyricum* attenuates cisplatin-induced renal damage by gut microbiota reconstitution, increasing butyric acid production, and suppressing renal inflammation. *Nutrients*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/nu13082792>
- Hu, M.-X., He, F., Guo, Y.-X., Mo, L.-Z., & Zhu, X. (2022). *Lactobacillus reuteri* Biofilms Inhibit Pathogens and Regulate Microbiota in *In Vitro* Fecal Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(38), 11935–11943. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02372>
- Hussain, N., Ishak, I., Sulaiman, R., Fauzi, N. ., & Coorey, R. (2020). Influence of processing conditions on rheological properties of aqueous extract. *Food Research*, 4(1), 227–236.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefit of probiotic: A review. *Hindawi Publishing Corporation*, 2013, 1–7.
- López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Bonino, J., Delgado, J. F., Wagner, J., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Structural characterization of protein isolates obtained from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 396–402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.060>
- Macfarlane, S., Bahrami, B., & Macfarlane, G. T. (2011). Mucosal biofilm communities in the human intestinal tract. En *Advances in Applied Microbiology* (1a ed., Vol. 75, pp. 111–143). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387046-9.00005-0>
- Malik, J. A., Ahmed, S., Yaseen, Z., Alanazi, M., Alharby, T. N., Alshammari, H. A., & Anwar, S. (2022). Association of SARS-CoV-2 and Polypharmacy with Gut-Lung Axis: From Pathogenesis to Treatment. *ACS Omega*, 7(38), 33651–33665. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02524>

- Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., & Garrigós, M. del C. (2016). Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2), 42631. <https://doi.org/10.1002/app.42971>
- Méndez Reyes, D. A., Quintero Cerón, J. P., Váquiro Herrera, H. A., & Solanilla Duque, J. F. (2014). Alginato de sodio en el desarrollo de películas comestibles. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5(2), 89–113. <https://oaji.net/articles/2017/4924-1495547761.pdf>
- Motta, J. P., Wallace, J. L., Buret, A. G., Deraison, C., & Vergnolle, N. (2021). Gastrointestinal biofilms in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(5), 314–334. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00397-y>
- Mousavi, S. R., Rahmati-Joneidabad, M., & Noshad, M. (2021). Effect of chia seed mucilage/bacterial cellulose edible coating on bioactive compounds and antioxidant activity of strawberries during cold storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 190(June), 618–623. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.213>
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>
- Muhammad, A. I., Xiang, Q., Liao, X., Liu, D., & Ding, T. (2018). Understanding the Impact of Nonthermal Plasma on Food Constituents and Microstructure—A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 11(3), 463–486. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2042-9>
- Muñoz-Tebar, N., Molina, A., Carmona, M., & Berruga, M. I. (2021). Use of chia by-products obtained from the extraction of seeds oil for the development of new biodegradable films for the agri-food industry. *Foods*, 10(3), 620. <https://doi.org/10.3390/foods10030620>

- Muñoz-Tébar, N., Carmona, M., de Elguea-Culebras, G. O., Molina, A., & Berruga, M. I. (2022). Chia Seed Mucilage Edible Films with *Origanum vulgare* and *Satureja montana* Essential Oils: Characterization and Antifungal Properties. *Membranes*, 12(2), 213. <https://doi.org/10.3390/membranes12020213>
- Muñoz, L. A., Aguilera, J. M., Rodríguez-Turiénzo, L., Cobos, A., & Díaz, O. (2012). Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 111(3), 511–518. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.031>
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Díaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037>
- Norajit, K., Myong Kim, K., & Hyung Ryu, G. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.015>
- Ocak, B. (2020). Properties and characterization of thyme essential oil incorporated collagen hydrolysate films extracted from hide fleshing wastes for active packaging. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 29019–29030. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09259-1>
- Rafieian, F., Shahedi, M., Keramat, J., & Simonsen, J. (2014). Thermomechanical and morphological properties of nanocomposite films from wheat gluten matrix and cellulose nanofibrils. *Journal of Food Science*, 79(1), 100–107. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12231>
- Ramírez Zermeño, R. M., & Pérez Bejarano, J. A. (2022). *Alimentos Funcionales: Principios y nuevos productos* (4a ed.). Trillas.
- Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.021>

- Rodríguez Carrillo, J. A., & Ulloa Ibarra, J. T. (2017). Alternativa Didáctica Para El Estudio Del Modelo Gompertz. *Investigación e Innovación en Matemática Educativa*, *II(34)*, 98–114.
- Saavedra, L., Taranto, M. P., Sesma, F., & De Valdez, G. F. (2003). Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, *88(2–3)*, 241–245.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00186-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00186-7)
- Salazar A, B. C., & Montoya C, O. I. (2003). Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. *Vitae*, *10(2)*, 20–26.
<https://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v39n1/art10.pdf>
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and *tea tree* essential oil. *Food Hydrocolloids*, *23(8)*, 2102–2109. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.05.006>
- Saviano, A., Brigida, M., Migneco, A., Gunawardena, G., Zanza, C., Candelli, M., Franceschi, F., & Ojetti, V. (2021). *Lactobacillus Reuteri* DSM 17938 (*Limosilactobacillus reuteri*) in Diarrhea and Constipation: Two Sides of the Same Coin? *Medicina*, *57(7)*, 643.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/medicina57070643>
- Schaefer, L., Auchtung, T. A., Hermans, K. E., Whitehead, D., Borhan, B., & Britton, R. A. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*, *156(6)*, 1589–1599.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.035642-0>

- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Amin Mohammadifar, M., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Mahdi Ojagh, S., Marzieh Hosseini, S., & Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-antimicrobial κ-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52(1), 116–124.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.026>
- Sin Cheow, W., & Hadinoto, K. (2013). Biofilm-like *Lactobacillus rhamnosus* probiotics encapsulated in alginate and carrageenan microcapsules exhibiting enhanced thermotolerance and freeze-drying resistance. *Biomacromolecules*, 14(9), 3214–3222. <https://doi.org/10.1021/bm400853d>
- Sivamaruthi, B. S., Fern, L. A., Rashidah Pg Hj Ismail, D. S. N., & Chaiyasut, C. (2020). The influence of probiotics on bile acids in diseases and aging. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128(January), 110310.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110310>
- Soukoulis, C., Gaiani, C., & Hoffmann, L. (2018). Plant seed mucilage as emerging biopolymer in food industry applications. *Current Opinion in Food Science*, 22, 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.004>
- Su Cha, D., Hyuk Choi, J., Chinnan, M. S., & Jin Park, H. (2002). Antimicrobial films based on Na-alginate and κ-carrageenan. *LWT*, 35(8), 715–719.
<https://doi.org/10.1006/fstl.2002.0928>
- Szabelska, A., Siatkowski, M., Goszczurna, T., & Zyprych, J. (2010). Comparison of growth models in package R. *Nauja Przyroda Technologie*, 4(4), 1–9.
<http://www.npt.up-poznan.net>
- Valdés, A., Burgos, N., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2015). Natural pectin polysaccharides as edible coatings. *Coatings*, 5(4), 865–886.
<https://doi.org/10.3390/coatings5040865>

- Vázquez-Luna, A., Santiago, M., Rivadeneyra-Domínguez, E., & Díaz-Sobac, R. (2019). Películas comestibles a base de almidón nanoestructurado como material de barrera a la humedad. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*, 13(2), 152–164. <https://doi.org/doi.org/10.29059/cienciauat.v13i2.1105>
- Yan, C., Kim, S. R., Ruiz, D. R., & Farmer, J. R. (2022). Microencapsulation for Food Applications: A Review. *ACS Applied Bio Materials*. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00673>
- Yao, M., Wu, J., Li, B., Xiao, H., McClements, D. J., & Li, L. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus salivarius* Li01 for enhanced storage viability and targeted delivery to gut microbiota. *Food Hydrocolloids*, 72, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.033>
- Yong Lee, K., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

11.- ANEXOS

1. Script de R Studio para la determinación del crecimiento microbiano

```
# Datos
densidad_optica <- c(0.007, 0.008, 0.011, 0.019, 0.022, 0.027, 0.031, 0.056,
0.070, 0.076, 0.092, 0.113, 0.147, 0.693, 1.058, 1.465, 1.779, 2.164, 2.314)
ufc_ml <- c(3.35E+05, 3.50E+05, 1.17E+06, 1.85E+06, 1.50E+06, 5.50E+06,
3.96E+06, 8.90E+06, 1.84E+07, 2.40E+07, 2.48E+07, 2.17E+07, 1.65E+07,
4.75E+07, 1.02E+08, 4.35E+08, 8.15E+08, 1.99E+09, 2.09E+10)

# Cargar las librerías
library(ggplot2)
library(minpack.lm)

# Ajuste del modelo de Gompertz
gompertz <- function(x, A, B, C) A * exp(-B * exp(-C * x))
gompertz_fit <- nlsLM(log10(ufc_ml) ~ gompertz(densidad_optica, A, B, C), start =
list(A = 10^3, B = 1, C = 1), trace = TRUE)
summary(gompertz_fit)

# Crear un marco de datos para la predicción
densidad_optica_grid <- seq(from = min(densidad_optica), to =
max(densidad_optica), by = 0.001)
ufc_ml_pred <- 10^predict(gompertz_fit, newdata = data.frame(densidad_optica =
densidad_optica_grid))

# Crear el gráfico con ggplot2
gg <- ggplot(data.frame(densidad_optica = densidad_optica, ufc_ml = ufc_ml),
aes(x = densidad_optica, y = log10(ufc_ml))) +
geom_point(shape = 16, cex=2,)
```

```
geom_line(data = data.frame(densidad_optica_grid, ufc_ml_pred), aes(x =
densidad_optica_grid, y = log10(ufc_ml_pred)), color = "#8B5A2B", lwd=1.5,) +
ylim(5, 10) +
xlim(0, max(densidad_optica) * 1) +
labs(x = "Densidad Óptica (600nm)", y = "Log UFC/ml") +
theme_test()
```

```
# Imprimir el gráfico
```

```
print(gg)
```

```
# Predicción para una densidad óptica de X número
```

```
densidad_optica_new <- 2.314
```

```
ufc_ml_pred_new <- 10^predict(gompertz_fit, newdata =
```

```
data.frame(densidad_optica = densidad_optica_new))
```

```
print(paste("La predicción de UFC/ml para una densidad óptica de",
```

```
densidad_optica_new, "es:", format(ufc_ml_pred_new, scientific = TRUE)))
```

2. Memorias



FORMULACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES SUPLEMENTADOS CON MUCÍLAGOS, COMO SOPORTE PARA INMOVILIZACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS

Zaragoza - Rodríguez, Andrea 1*; Illescas - Aparicio, Edgar 1; Landeta - Cortés, Gerardo 2; Villa - Ruano, Nemesio 2; Romero - Arenas, Omar 3. ✉ ed.illescas00@gmail.com

1. Biotecnología - BUAP. 2. DITCo - BUAP. 3. Instituto de Ciencias - BUAP.



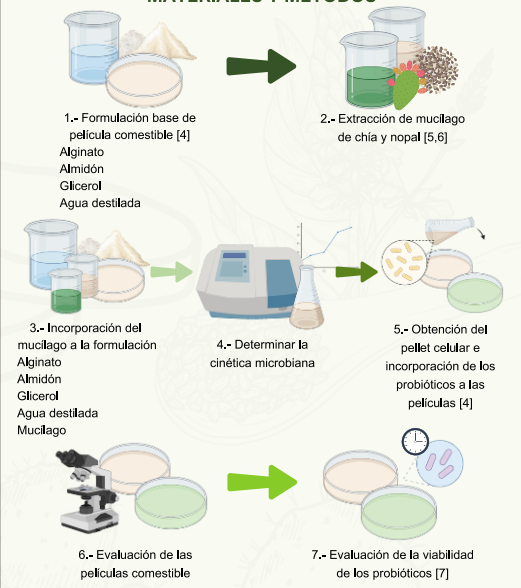
INTRODUCCIÓN

Las películas y recubrimientos comestibles actúan como barreras para controlar la transferencia de humedad, oxígeno y sabores, previniendo el deterioro de la calidad de los alimentos [1]. La incorporación de probióticos (*L. reuteri*) en el desarrollo de una cubierta que brinde protección a los alimentos y al consumidor, puede mejorar con la inmovilización de los probióticos en una matriz para mejorar su viabilidad, siendo los soportes orgánicos los más utilizados [2]. La incorporación de los mucílagos de chia y nopal en la formulación de películas comestibles es idóneo por la similitud que presentan con distintas gomas comerciales [3].

OBJETIVO GENERAL

Formular una película comestible suplementada con mucílago de chia (*Salvia hispanica*) y mucílago de nopal (*Opuntia ficus-indica*) que permita la inmovilización de probióticos para conservar la viabilidad de *Limosilactobacillus reuteri*.

MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS



Figura 1. Películas comestibles suplementadas con mucílago e inmovilización de *L. reuteri*. A. Con mucílago de Chia. B. Con mucílago de nopal.

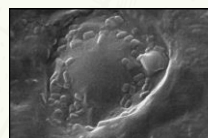


Figura 2. Observación en Microscopio electrónico de Barrido (5000x). Inmovilización de los probióticos sobre los recubrimientos suplementados con mucílago de Chia.



Figura 3. Observación en microscopio óptico de la conformación física de las películas. A. Con mucílago de chia. B. Con mucílago de Nopal.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento (DITCo) por brindarnos la oportunidad de realizar los proyectos de investigación dentro de sus laboratorios.

CONCLUSIONES

Se formularon películas comestible a partir de mucílago de chia y nopal las cuales contribuyen a mantener a las bacterias viables. Las pruebas de viabilidad realizadas en los dos tipos de películas revelan una óptima tasa de supervivencia, obteniendo al momento mayor viabilidad con el mucílago de chia. Las caracterizaciones iniciales de las películas comestibles fueron satisfactorias. Los resultados obtenidos brindan un horizonte al tema de viabilidad celular y la aplicación de las películas y recubrimientos comestibles en el ámbito de alimentos funcionales y favorecer el microbiota intestinal.

REFERENCIAS

- [1] Shojaei-Alabadi, S., Hosseini, H., Amin Mohammadfar, M., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Mahdi Ojagh, S., Marzieh Hosseini, S., & Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-antimicrobial kappa-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52(1), 116–124. [2] Yong Lee, K., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126. [3] Lira-Vargas, A., & Trejo Márquez, M. A., & Salinas Salazar, V. M. (2015). Propiedades físicas, mecánicas y de barrera de películas comestibles a base de mucílago de Nopal como alternativa para la aplicación en frutos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(2), 183–188. ISSN: 1695-0204. [4] Concha-Meyer, A. A. (2008). Evaluación de una biopelícula con bacterias ácido lácticas y niáma para la inhibición de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado [Universidad Austral de Chile]. [5] Muñoz, L. A., Cobos, A., Díaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 216–224. [6] Vargas, L., Gamino, Z., Fuentes, R., y Contreras, D. (2018). Mucílago de nopal y su aplicación en la obtención de biopolímeros. *Naturaleza y Tecnología*, 5(1), 24–38. ISSN:2007-672X [7] Champagne, C. P., Gaudy, C., Foncelet, D., & Neufeld, R. J. (1992). *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1429–1434.

2do Lugar dentro del concurso de carteles científicos por el 10mo Aniversario de la Licenciatura en Biotecnología – BUAP Octubre 2023.



Observación de las películas comestibles con el Microscopio Electrónico de Barrido.



Miembros del laboratorio de Biotecnología de Alimentos – DITCo coordinados por el Dr. Gerardo Landeta



Día de trabajo en el laboratorio para la determinación del crecimiento de *L. reuteri*.

