



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**“FORMULACIÓN DE RECUBRIMIENTO COMESTIBLE
SUPLEMENTADO CON MUCÍLAGO DE NOPAL (*Opuntia
ficus indica*), COMO SOPORTE PARA INMOVILIZACIÓN
DE BACTERIAS PROBIÓTICAS”**

Tesis para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ANDREA ZARAGOZA RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO LANDETA CORTÉS

CO-DIRECTOR: DR. NEMESIO VILLA RUANO

NOVIEMBRE, 2023.



RESUMEN

En la actualidad el interés por los probióticos como *Limosilactobacillus reuteri* ha aumentado debido a sus propiedades benéficas. Estas bacterias cuentan con actividad antimicrobiana la cual ayuda a la recomposición del microbiota intestinal, asimismo, permite inhibir la colonización de microorganismos patógenos. Sin embargo, factores gastrointestinales, procesos y el tipo de almacenamiento pueden afectar la viabilidad de estas bacterias. En este proyecto se trabajó la formulación de una película comestible con mucílago de nopal con la finalidad de inmovilizar a *L. reuteri*. Esta película se conformó por una variedad de soportes orgánicos como el glicerol, alginato de sodio y almidón. Por otra parte, se decidió utilizar mucílago de nopal ya que México es el primer productor a nivel mundial de esta planta. Asimismo, el nopal cuenta con propiedades antioxidantes y terapéuticas las cuales podrían resultar útiles en la película formulada.

El objetivo de este trabajo fue formular una película para inmovilizar a *L. reuteri* y de esta forma incrementar su viabilidad. Se realizó la caracterización física de las películas mediante microscopía óptica y de barrido. Se llevaron a cabo pruebas de humedad para conocer la pérdida de agua en el proceso de secado. De igual forma se realizaron pruebas de almacenamiento por seis y nueve meses para identificar si sufrían algún tipo de cambio o contaminación notoria. Finalmente, se realizaron pruebas de viabilidad para así determinar si las películas aumentaban, mantenían o disminuían la viabilidad de las bacterias.

Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran que la película es útil para la inmovilización de bacterias y las mantiene viables. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios para aumentar la viabilidad en las películas.

Palabras claves: *L. reuteri*, películas comestibles, mucílago de nopal, viabilidad, probióticos.

ABSTRACT

Currently, interest in probiotics such as *Limosilactobacillus reuteri* has increased due to its beneficial properties. These bacteria have antimicrobial activity which helps to recompose the intestinal microbiota and also inhibits the colonization of pathogenic microorganisms. However, gastrointestinal factors, processes and the type of storage can affect the viability of these bacteria. In this project, we worked on the formulation of an edible coating with cactus mucilage with the purpose of immobilizing *L. reuteri*. This film was made up of a variety of organic supports such as glycerol, sodium alginate and starch. On the other hand, it was decided to use cactus mucilage since Mexico is the world's leading producer of this plant. Likewise, the cactus has antioxidant and therapeutic properties which could be useful in the formulated film.

The objective of this work was to formulate a film to immobilize *L. reuteri* and thus increase its viability. The physical characterization of the films was carried out using optical and scanning microscopy. Humidity tests were carried out to determine the water loss in the drying process. Likewise, storage tests were carried out for six and nine months to identify if they suffered any type of change or noticeable contamination. Finally, viability tests were carried out to determine if the films increased, maintained or decreased the viability of the bacteria.

The results obtained in this project demonstrate that the film is useful for immobilizing bacteria and keeping them viable. However, studies need to be carried out to increase viability in films.

Keywords: *L. reuteri*, edible coating, nopal mucilage, viability, probiotics.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Bacterias Ácido-Lácticas	12
2.1.1 Probióticos	13
2.1.2 Lactobacillus	14
2.2 Crecimiento bacteriano	16
2.2.1 Curva de crecimiento de <i>L. reuteri</i>	17
2.2.2 Medidas directas e indirectas	18
2.2.3 Modelo de Gompertz.....	20
2.3 Inmovilización celular.....	22
2.3.1 Métodos de inmovilización celular	23
2.3.2 Soportes orgánicos para la inmovilización	25
2.4 Mucílago de nopal.....	26
2.4.1 Aplicaciones.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS.....	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos específicos	31
6. METODOLOGÍA	32
6.1 Equipo y materiales	32
6.1.1 Equipo	32
6.1.2 Materiales y medios	32
6.2 Formulación base de película comestible	33
6.3 Extracción de mucílago de nopal	35
6.4 Preparación de película comestible con mucílago de nopal	35
6.5 Microorganismos	36

6.5.1 Cepa Y-12.....	36
6.5.2 Tinción de Gram.....	37
6.6 Construcción de la curva de crecimiento	37
6.7 Obtención de pellet celular	38
6.8 Preparación de película comestible con <i>Limosilactobacillus reuteri</i>.....	38
6.9 Evaluación de películas comestibles	39
6.9.1 Caracterización de las películas comestibles	39
6.9.2 Pruebas de almacenamiento	40
6.9.3 Determinación de la humedad	40
6.9.4 Pruebas de viabilidad de BAL en la película comestible.....	41
6.9.5 Pruebas de viabilidad en el tracto digestivo ante sales biliares	42
6.9.6 Pruebas de viabilidad en el tracto digestivo ante acidez.....	42
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1 Formulación base de película comestible	44
7.2 Extracción de mucílago de nopal	45
7.3 Películas comestibles con mucílago de nopal	46
7.4 Microorganismo	47
7.4.1. Tinción de Gram.....	47
7.5 Cinética microbiana	48
7.6 Pellet celular	51
7.7 Películas comestibles de nopal con <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	52
7.8 Evaluación de películas comestibles	54
7.8.1 Caracterización de películas comestibles	54
7.8.2 Pruebas de almacenamiento	57
7.8.3 Determinación de humedad.....	58
7.8.4 Viabilidad de probióticos en la película comestible.....	59
7.8.5 Viabilidad de probióticos en tracto digestivo ante sales biliares.....	60
7.8.6 Viabilidad de probióticos en tracto digestivo ante acidez.....	63
8. CONCLUSIONES	65

9. PERSPECTIVAS.....	66
10. BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Curva de crecimiento bacteriano
Figura 2	Fases del modelo de Gompertz
Figura 3	Películas iniciales antes de reformulaciones
Figura 4	Películas comestibles base con formulación final
Figura 5	Mucílago de nopal
Figura 6	Películas comestibles con mucílago de nopal
Figura 7	Tinción de gram de <i>Limosilactobacillus reuteri</i> 40X*2X*25X
Figura 8	Crecimiento de <i>L. reuteri</i> . Gráfica de la recopilación de datos de densidad óptica contra UFC/ml
Figura 9	Crecimiento de <i>L. reuteri</i> ajustado con modelo de Gompertz.
Figura 10	Pellet celular
Figura 11	Películas comestibles de nopal con <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
Figura 12	Películas comestibles en microscopio óptico a 100x
Figura 13	Observación de relieve de <i>L. reuteri</i> en la película comestible en el microscopio SEM.
Figura 14	Observación de <i>L. reuteri</i> en la película comestible en el microscopio SEM.
Figura 15	Pruebas de almacenamiento en películas con mucílago de nopal
Figura 16	Pruebas de almacenamiento en películas con mucílago de nopal y probióticos

- Figura 17 Pruebas de viabilidad en películas con mucílago de nopal
- Figura 18 Resultados de pruebas de viabilidad en películas con mucílago de nopal en dilución a la 1×10^{-1} por duplicado
- Figura 19 Pruebas de viabilidad de probióticos en tracto digestivo ante sales biliares
- Figura 19 (B) Comparación de tamaño de colonias
- Figura 20 Resultados de viabilidad de probióticos en tracto digestivo ante acidez

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición química del mucílago <i>Opuntia ficus indica</i>
Tabla 2	Composición de películas comestibles base
Tabla 3	Composición final de películas comestibles base
Tabla 4	Composición de película comestible con mucílago de nopal
Tabla 5	Composición de película comestible con mucílago de nopal y <i>Limosilactobacillus reuteri</i> .
Tabla 6	Medios de cultivo para prueba de sales biliares
Tabla 7	Absorbancia contra UFC para <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
Tabla 8	Tabla comparativa de formulaciones de películas comestibles

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el interés por los probióticos ha aumentado de forma importante, esto se debe a los grandes beneficios que estos confieren cuando se consumen de forma adecuada. Estos microorganismos son bacterias ácido-lácticas sumamente importantes, debido a que poseen propiedades bioterapéuticas, facilitan la digestión, protegen contra distintas enfermedades, equilibran el sistema inmunológico y el microbiota intestinal, etcétera (Salazar & Montoya, 2003).

Las bacterias del género *Lactobacillus* destacan entre los probióticos y son considerados como el taxón con mayor potencial comercial (Rodríguez-López *et al.*, 2021). De forma más específica, la especie *Lactobacillus reuteri* posee actividad antimicrobiana que permite inhibir la colonización de microorganismos patógenos como: *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Campylobacter jejuni*, entre otros (Montiel *et al.*, 2014). Asimismo, ayuda a la recomposición del microbiota intestinal (Mu *et al.*, 2018). Sin embargo, uno de los principales retos a los que se enfrentan estos microorganismos en la industria alimentaria son los tratamientos tecnológicos y/o las condiciones de almacenamiento, por otra parte, una vez que son ingeridos los factores gastrointestinales como el oxígeno, el calor, la temperatura de almacenamiento, la acidez y las sales biliares también pueden afectar en la estabilidad de las bacterias. Todos estos factores representan una barrera en el consumo de los probióticos que limitan su viabilidad. Por esta razón, en los últimos años se han realizado esfuerzos para desarrollar tecnologías que ayuden a aumentar la vida útil de estos microorganismos (Perez-Leonard *et al.*, 2013).

Actualmente la inmovilización celular representa una excelente alternativa para el confinamiento de células, manteniendo sus propiedades biológicas. Esta técnica es sumamente atractiva debido a que cuenta con una variedad de ventajas en las que se encuentra la facilidad de manejo y precios accesibles (Maneau-Hernández, 2021). La unión a soportes orgánicos como el glicerol, alginato de sodio y almidón son ideales para la formulación de películas comestibles.

Finalmente, el mucílago de nopal es una excelente alternativa para el desarrollo de una película comestible y más en un país como México, el cual cuenta con aproximadamente tres millones de hectáreas de nopal silvestre, generando una producción anual superior a 812 mil toneladas de esta verdura (Morales, 2019), siendo el cultivo predominante la variedad Milpa Alta, cultivado en el centro de la república (Espino-Díaz *et al.*, 2010). Asimismo, el mucílago de nopal cuenta con propiedades antioxidantes y terapéuticas las cuales lo convierten en un excelente candidato para esta formulación. Por otra parte, este mucílago es comúnmente utilizado en la industria alimentaria como retenedor de agua, espesante y agente encapsulante (Barrón *et al.*, 2022).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Bacterias Ácido-Lácticas

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son de tipo Gram positivas, fermentadoras, aerotolerantes, no patógenas; presentan forma de cocos, bacilos o cocobacilos, son comúnmente utilizadas en la industria como cultivos iniciadores, carecen de citocromos y no generan esporas (Contreras, 2021). Las BAL se encuentran distribuidas en distintos hábitats y han sido aisladas de distintos nichos como plantas, alimentos, bebidas, tracto digestivo, entre otros. Los principales géneros que constituyen a este grupo de bacterias son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, sin embargo, en los últimos años se han realizado revisiones taxonómicas las cuales proponen la inclusión de otros géneros, como *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* y *Weissella*, entre otros (Raquena, 2018). Este grupo de bacterias son ácido-tolerantes, pueden crecer en valores tan ácidos como 3.2, o valores tan básicos como 9.6, sin embargo, crecen comúnmente en rangos de pH entre 4 y 4.5 (Ramírez, 2011).

Las BAL pueden ser clasificadas en dos principales grupos: homo y heterofermentativas, esto en función de los productos de su metabolismo. Las homofermentativas son aquellas que fermentan carbohidratos produciendo únicamente ácido láctico. Este tipo de bacterias poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, sin embargo, carecen de la fosfocetolasa lo cual les impide formar otro tipo de productos. Entre las principales bacterias homofermentadoras se encuentran: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus*. Las heterofermentativas además de producir ácido láctico también tienen la capacidad de producir dióxido de carbono y etanol, que, a diferencia de las homofermentativas poseen la enzima fosfocetolasa. Entre las bacterias heterofermentativas se encuentran los géneros *Leuconostoc*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* y algunos *Lactobacillus* (Sánchez y Tromps, 2014).

Estas bacterias han desempeñado un papel esencial en la industria alimentaria, por su contribución significativa a la textura mediante la coagulación de caseínas, al aroma y

sabor mediante la producción de metabolitos, mejorando las características sensoriales, propiedades terapéuticas y ayudando a la adición de nutrientes. Asimismo, la producción de ácido láctico genera una disminución del pH lo cual ayuda a la preservación de alimentos de las esporas. Además, la mayoría de los probióticos son bacterias ácido-lácticas; dichos probióticos son microorganismos que, cuando son consumidos en cantidades adecuadas, ayudan a mejorar la salud del huésped (Huertas, 2010).

2.1.1 Probióticos

La palabra probiótico deriva del griego “pro-vida”, lo que quiere decir “a favor de la vida”. Se trata de microorganismos que se encuentran vivos, no patógenos, que otorgan beneficios en la salud; participan en la prevención y tratamiento de distintas enfermedades digestivas, intestinales, hepáticas, entre otras. Actúan mediante el mejoramiento de la función inmune del huésped, así como en la homeostasis intestinal, y pueden contribuir en la regulación del microbiota intestinal (Castañeda, 2018).

Idealmente los probióticos deben ser seguros y libres de vectores que puedan transferir resistencia a los antibióticos y de factores de toxicidad o patogenicidad. Algo esencial en los probióticos es su capacidad de supervivencia, ya que estos organismos deben poder resistir condiciones intestinales como: pH ácido, enzimas, sales biliares, temperatura, entre otros. De igual forma un probiótico debe tener capacidad antagónica contra patógenos y ser capaces de estimular el sistema inmunológico. Asimismo, debe tener efectos beneficiosos demostrables en la salud del huésped. Finalmente, será vital que se demuestre la viabilidad, eficacia de crecimiento y la actividad constante del probiótico (Plaza-Díaz *et al.*, 2019).

El estudio de Carnicé (2006), menciona que los principales mecanismos de acción de los probióticos implican la disminución del pH, inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, disminución de la permeabilidad intestinal, producción de ácido láctico, aumento en la actividad de la lactasa, reducción en el tiempo de eliminación de rotavirus, incremento en la producción de los linfocitos T *helper*, y aumento de la inmunoglobulina A secretora.

Los probióticos también se encargan de estimular, modular y regular la respuesta inmunitaria del huésped mediante la activación de genes específicos de células huésped localizadas. De la misma forma, estos microorganismos ayudan a modular el sistema gastrointestinal por medio de la liberación de hormonas y regulación del comportamiento del cerebro mediante la señalización neuronal bidireccional (Kerry *et al.*, 2018).

Generalmente los probióticos se pueden encontrar en distintos alimentos ricos en bacterias, los cuales normalmente son alimentos fermentados como: yogurt, queso, chucrut, kéfir, pepinos agridulces, kombucha, miso, tempeh, entre otros. Además, es posible adicionar probióticos y prebióticos a algunos alimentos, los cuales se denominan suplementos alimenticios (Zeratsky, 2020).

2.1.2 Lactobacillus

El género *Lactobacillus* se encuentra conformado por bacterias ácido-lácticas, no patógenas y anaerobias facultativas. El género se clasifica en el filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*, conteniendo las cepas *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y *Pediococcus* (Zheng *et al.*, 2020). Fue descrito por primera vez en el año 1901 por Martinus Beijerinck, microbiólogo holandés. Actualmente este género abarca la mayoría de las bacterias ácido-lácticas conteniendo más de 350 especies Gram positivas; estas bacterias tienen una morfología de bastón y no forman esporas (Capurso, 2019).

Tienen un papel esencial en la salud de los seres humanos ya que forman parte del microbiota en varios sitios del cuerpo y son sumamente conocidas por sus propiedades beneficiosas, ya que tienen potencial antagonista contra microorganismos patógenos (Todar, 2019).

Estas bacterias se encuentran principalmente en el intestino delgado y colon, sin embargo, también es posible encontrarlas en otras partes del cuerpo como estómago, vagina y boca. Los *lactobacillus* cumplen diferentes tareas, entre las principales se encuentra contribuir con la salud del sistema inmunitario y del tracto gastrointestinal; asimismo, se encargan de inhibir el desarrollo de bacterias nocivas. Evitando que estas bacterias invadan nuestro cuerpo a través de la entrada por el intestino (GMFH, 2020).

Sus mecanismos de acción se pueden dividir en dos principales: por exclusión competitiva y de barrera epitelial. En el caso de la exclusión competitiva el mecanismo consiste en la disminución del crecimiento de bacterias patógenas mediante la producción de factores biocidas, producción de mucinas y disminución del pH del medio. También se sabe que el mecanismo de barrera epitelial trabaja impidiendo la translocación de antígenos y evitando la traslocación bacteriana (Blanco, 2012).

2.1.2.1 *Limosilactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri recientemente renombrada *Limosilactobacillus reuteri* (*L. reuteri*), pertenece al género *Lactobacillus*, es una bacteria heterofermentativa Gram positiva, tolerante al oxígeno (Mu *et al.*, 2018). Esta es una bacteria probiótica que tiene la capacidad de colonizar distintas partes del cuerpo humano, incluyendo el tracto gastrointestinal, vías urinarias, piel y leche materna. Anteriormente se ha demostrado que la correcta administración de este probiótico puede ser beneficiosa para la salud del huésped (Britton, 2017).

El mecanismo de acción de *L. reuteri* consiste en producir moléculas antimicrobianas como ácidos orgánicos, etanol y reuterina, la cual se produce durante el crecimiento anaeróbico y en presencia de glicerol. La reuterina es sumamente importante ya que actúa como inhibidora contra distintos patógenos como: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 (EHEC), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis ssp. Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila ssp. hydrophila* y *Campylobacter jejuni* (Montiel *et al.*, 2014).

Debido a su actividad antimicrobiana, estas bacterias son capaces de inhibir la colonización de microbios patógenos contribuyendo a la remodelación de la composición del microbiota comensal en el huésped. Por otra parte, *L. reuteri* puede beneficiar la salud del huésped, ya que ayuda a disminuir la producción de citocinas proinflamatorias, mientras promueve el desarrollo y funcionalidad de las células T reguladoras. Además *L. reuteri* contribuye a fortalecer la barrera intestinal, asimismo, disminuye la translocación microbiana del lumen intestinal al tejido (Saviano, 2021).

Se ha demostrado que cuenta con acción inmunomoduladora. Es utilizada comúnmente en caso de diarrea, infecciones gastrointestinales, después del uso prolongado de antibióticos, para la salud bucal, entre otros. Su modo de acción se basa en la producción de reuterina, ácido láctico y ácido acético, los cuales disminuyen el pH en el tracto digestivo, contrarrestando el crecimiento de patógenos (Ozolife, 2021).

2.2 Crecimiento bacteriano

El crecimiento en un sistema biológico puede ser definido como el incremento ordenado de las estructuras celulares de un organismo. Es importante mencionar que el crecimiento de células individuales puede ser considerado como crecimiento, sin embargo, también es posible considerar como crecimiento al incremento de la población, o sea el incremento de número de células. El crecimiento de células individuales hace referencia al aumento del tamaño y peso de las estructuras celulares que precede a la división celular. Como consecuencia, esta división conlleva un aumento en el número de células, lo cual impacta de manera directa a la población (Benitande *et al.*, 2002).

El estudio del crecimiento bacteriano es fundamental para el adecuado diseño de métodos de control para el crecimiento bacteriano. Los estudios de crecimiento bacteriano se pueden realizar en laboratorios usando cultivos puros de un microorganismo o *in situ* (Pedrique *et al.*, 2008).

En el caso de estudios realizados en laboratorio, generalmente se llevan a cabo con la finalidad de caracterizar cepas específicas de bacterias, esto resulta de gran ayuda para optimizar la producción comercial de distintos productos microbianos. Por otra parte, el crecimiento en el ambiente puede resultar ser complejo, sin embargo, es esencial para el entendimiento de tasas de nutrientes, respuesta e interacción microbiana, supervivencia y crecimiento de patógenos. El crecimiento, ya sea en laboratorio o en el ambiente se analiza en el contexto de la cinética de crecimiento, incluyendo la fase de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte. Finalmente, el crecimiento se discute dentro del contexto del balance de masa del crecimiento en condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas (Maier *et al.*, 2015).

2.2.1 Curva de crecimiento de *L. reuteri*

La curva de crecimiento muestra una representación gráfica del número de células viables a lo largo del tiempo. Esta grafica se lleva a cabo mediante la determinación de células viables en un mililitro de líquido previamente inoculado. Las curvas de crecimiento bacteriano constan de cuatro principales etapas bien definidas: latencia, exponencial, estacionaria y muerte. Es importante mencionar que la duración de cada etapa dependerá del microorganismo (Jiménez, 2015).

La fase de latencia o “*lag*”, representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de haber permanecido en un periodo de ayuno nutrimental. Esta fase representa un periodo de transición, en la cual se producen las enzimas necesarias para que los microorganismos puedan adaptarse y empezar a crecer en un nuevo ambiente. En la etapa de latencia no existe un incremento en la población celular, sin embargo, sí hay gran actividad metabólica e incrementar del tamaño individual de las células (Pedrique *et al.*, 2008).

La fase exponencial o de crecimiento balanceado es la etapa en la que existen suficientes nutrientes en el medio, por lo tanto, las bacterias reanudan su ciclo celular y aumentan su número de forma exponencial. En esta etapa en cada tiempo de generación la población se multiplica. En la fase exponencial serán sumamente importante las condiciones ambientales a las que se encuentren las células ya que repercutirá de manera directa en la velocidad de crecimiento exponencial.

Existen limitaciones de crecimiento las cuales no permitirán que el incremento se mantenga indefinidamente en forma exponencial. Las limitaciones pueden ser el agotamiento de nutrientes, la acumulación de productos tóxicos, el volumen disponible o una combinación de las causas anteriores. Este periodo es conocido como fase estacionaria, en el cual deja de existir el crecimiento, sin embargo, las células tampoco mueren, por lo cual en esta etapa el número de células en el cultivo no varía. Asimismo, en esta fase las bacterias presentan un metabolismo diferente, en el cual, se genera la acumulación y liberación de metabolitos secundarios (Caycedo *et al.*, 2021).

Finalmente, después de haber permanecido en fase estacionaria, el número de células viables empieza a disminuir de manera drástica, esto indicará que la población ha entrado en fase de muerte (López, 2016).

La evolución en su conjunto se muestra en la figura 1.

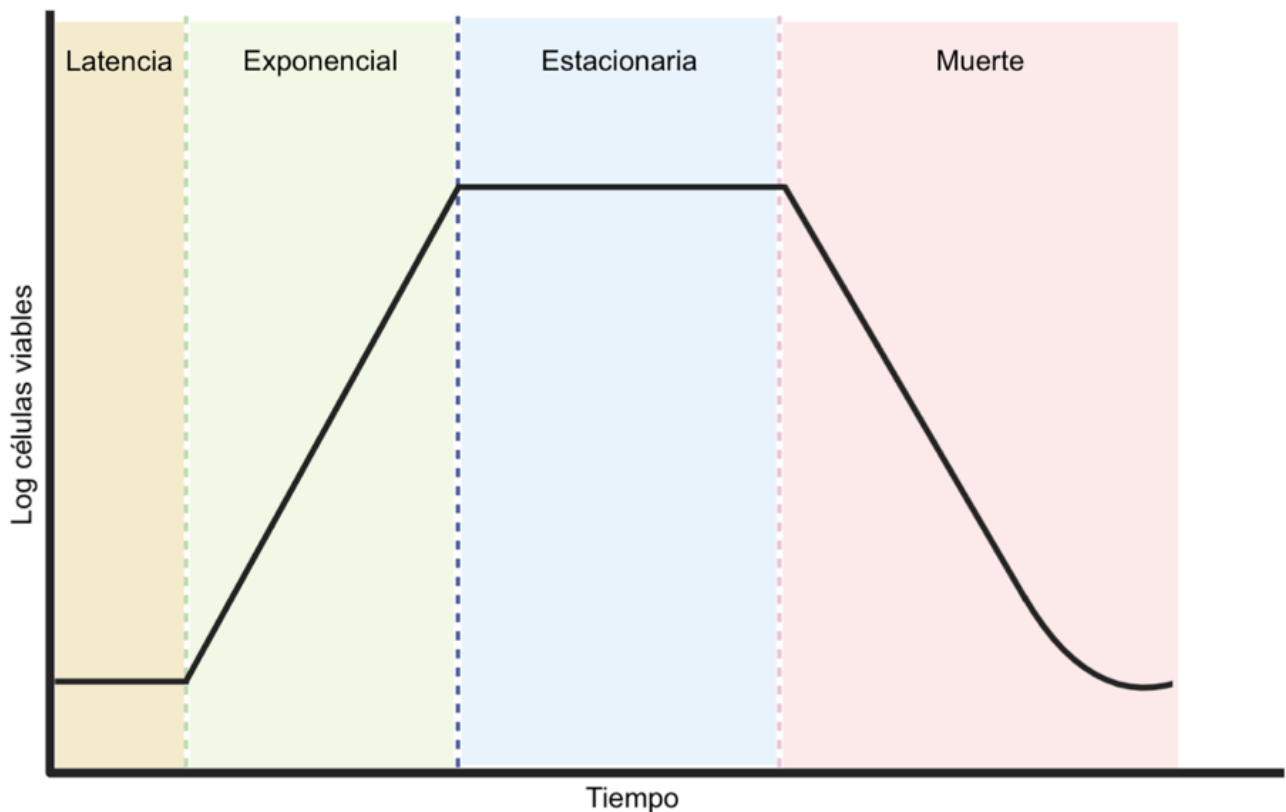


Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano

Fuente: Jiménez, 2015. Elaboración propia.

2.2.2 Medidas directas e indirectas

Los métodos de conteo microbiano pueden ser divididos principalmente en dos, directos o indirectos. Es esencial mencionar que cada uno de estos métodos cuenta tanto con ventajas como desventajas. En el caso de los métodos directos será fundamental que las preparaciones se encuentren limpias, sin partículas contaminantes, ya que esto podría afectar de manera importante los resultados. Las medidas directas del crecimiento

bacteriano se basan en el recuento de las células, ya sean viables o totales. El crecimiento bacteriano se puede medir mediante la estimación de los cambios en el número de células, determinando la cantidad de algún componente, o pesando en seco a las células. Existen diferentes métodos de conteo, la selección del método a utilizar dependerá de la situación y la muestra (Pedrique *et al.*, 2008).

El recuento de células viables también se puede llevar a cabo por medio de métodos directos. Este recuento también es conocido como recuento en placa o recuento de colonias. En este caso se lleva a cabo un conteo de colonias con el microscópico, en el cual podremos encontrar tanto células vivas como muertas, en este caso solo se cuentan las vivas. Una célula viable puede ser definida como aquella que tiene la capacidad de dividirse y dar lugar a una descendencia. Este conteo se puede llevar a cabo mediante dos principales métodos, el de extensión en placa y el de vertido de placa (Orozco, 2011).

Estas técnicas se basan en contar las unidades formadoras de colonias (UFC) existentes, ya sea en un gramo o un mililitro de la muestra. Cuando la concentración de la muestra es baja es posible filtrarla mediante una membrana, la cual se pasará al medio de cultivo en una placa Petri. Los microorganismos que se hayan retenido en la membrana se irán desarrollando hasta formar colonias que posteriormente pueden ser contadas. Por el otro lado, cuando la muestra presenta altas concentraciones se procede a la preparación de diluciones en proporción 1:10. Posteriormente se toman alícuotas de cada una de las muestras y se siembran en medios de cultivo en placa para posteriormente observar su crecimiento. Al utilizar esta técnica la selección de la placa contable será fundamental, debido a que si las concentraciones son muy altas se observará un crecimiento masivo, pero si son bajas, apenas se distinguirá el crecimiento; estas dos situaciones podrían impedir el conteo de UFC. Las placas contables serán aquellas que contengan entre 25 y 250 colonias (Ramírez, *et al.*, 2017). Esta técnica es sumamente utilizada debido a que permite obtener resultados satisfactorios para la estimación de colonias bacterianas. Entre sus ventajas se encuentra la fácil realización y adaptación a la medición de poblaciones de cualquier densidad (Pedrique *et al.*, 2008).

Las medidas indirectas del crecimiento bacteriano se basan en la medida de algún parámetro del cultivo en específico, el cual permita deducir información sobre el

crecimiento de número de células del cultivo. La principal medida indirecta es la turbidez., su fundamento se basa en que ésta se crea debido a que las células dispersan la luz que atraviesa una suspensión; por lo tanto, entre mayor número de células exista en el medio, mayor será la luz dispersada y habrá una mayor turbidez. La turbidez puede ser medida mediante un fotómetro o espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda: 540 nm, 600 nm y 660 nm. Una de las principales ventajas de esta técnica es su rapidez y utilidad para la obtención de correctas estimaciones de número de células (Orozco, 2011).

El funcionamiento del espectrofotómetro recae en la lámpara especial que este tiene, el aparato guía la luz por medio de un conector el cual seleccionará y separará la luz de la longitud de onda, para posteriormente pasar a través de una muestra. La intensidad de la luz que sale a través de la muestra es captada y se compara con la intensidad de luz que incidió con la muestra. Teniendo estos datos es posible calcular la transmitancia, valor que dependerá directamente de la concentración de la sustancia de interés (Iañez, 2005).

2.2.3 Modelo de Gompertz

La curva de Gompertz es un modelo matemático descrito por primera vez por el matemático y actuario británico Benjamin Gompertz en 1825. En sus principios fue descrito en la ciencia actuarial con la finalidad de ajustar datos de mortalidad humana. Esta función se basa en una relación de tipo exponencial entre la velocidad de crecimiento específico y la densidad de la población de interés. Actualmente, se considera una de las ecuaciones primarias utilizadas para describir el crecimiento bacteriano bajo condiciones ambientales controladas y definidas (Castro *et al.*, 2008).

Casas *et al.* (2010), indican que el modelo de Gompertz asume que la tasa de crecimiento postnatal aumenta de forma monótona hasta cuando alcanza un punto máximo y posteriormente disminuye monotónicamente en forma asíntota. La curva de crecimiento obtenida es una sigmoideal y cuenta con un punto de inflexión, el cual corresponde a la máxima tasa de crecimiento con la edad y una asíntota, como se muestra en la figura 2.

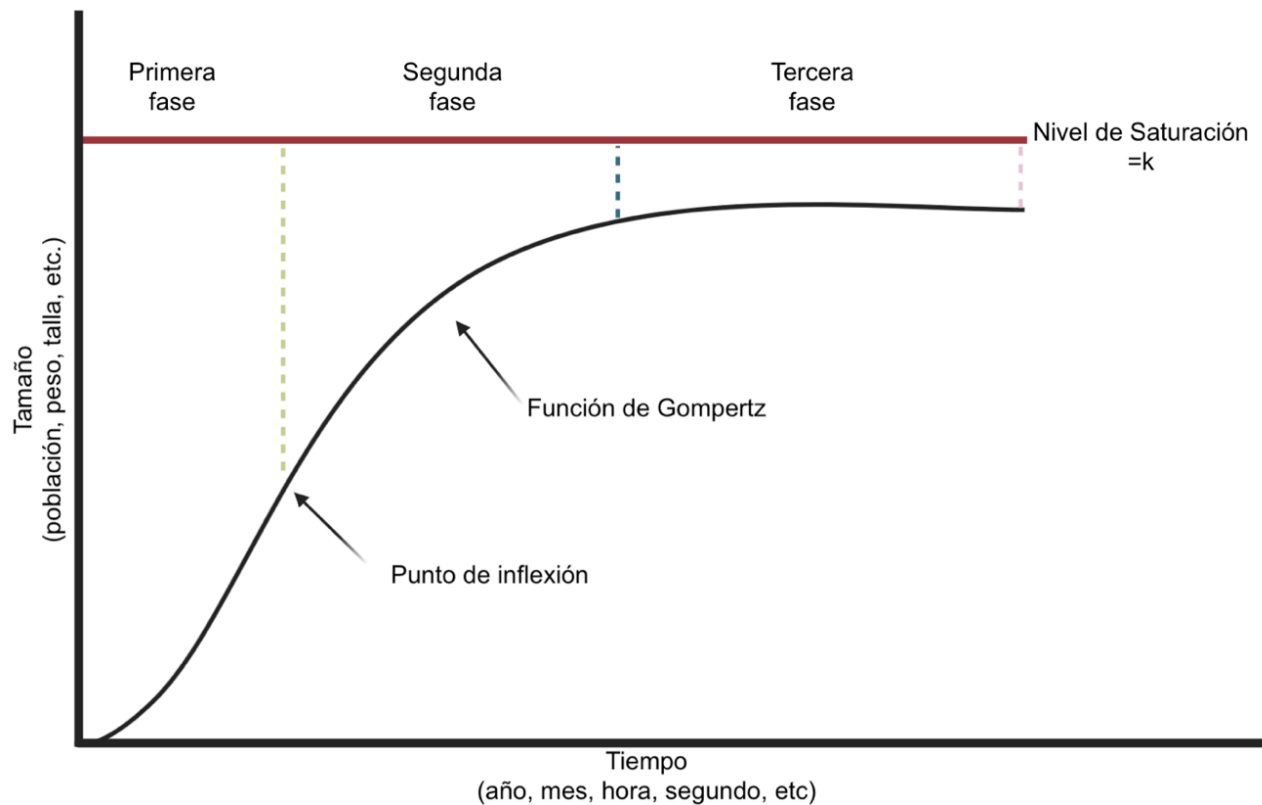


Figura 2. Fases del modelo de Gompertz

Fuente: Rodríguez, 2017. Elaboración propia.

En la gráfica de Gompertz es posible identificar tres fases principales: crecimiento exponencial (primera), la interacción con el medio (segunda) y el equilibrio (tercera). La primera fase se comporta de forma exponencial. En esta etapa el crecimiento no ha sido afectado por ningún factor del medio, se encuentra en las características idóneas para crecer. En la segunda fase, el crecimiento se empieza a ver afectado por algunos factores del medio, lo cual impide su crecimiento, por lo cual, éste se deja de observar en forma exponencial. Finalmente, en la última fase también llamada de equilibrio sigue existiendo esta interacción con el medio, sin embargo, ahora es más fuerte, por lo cual afecta aún más al crecimiento hasta llegar un punto donde lo detiene. En esta etapa se observa una desaceleración con mayor fuerza hasta que se alcanza un equilibrio (Rodríguez *et al.*, 2017). La ecuación que refleja el modelo de Gompertz se muestra a continuación:

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

Donde:

P(t): Indica el tamaño de la población en un tiempo establecido

K: Valor que indica la capacidad de carga o límite con el que cuenta un sistema donde se está llevando a cabo un crecimiento

P₀: Población inicial

2.3 Inmovilización celular

El término inmovilización en la ciencia de la biotecnología hace referencia al confinamiento de células, enzimas u otros organismos, de forma que, se encuentren concentradas en una región específica. En la inmovilización se mantienen las propiedades biológicas, esto resulta sumamente útil para que estas células sean utilizadas, ya sea para la degradación o la obtención de un producto determinado. Esta metodología ha llamado la atención de los científicos en los últimos años debido a su bajo precio comparado a procesos tradicionales similares. Asimismo, cuenta con ventajas técnicas como: facilidad para el manejo de altas densidades celulares, mejor control de sistemas continuos y la posible recuperación de la biomasa para su utilización en procesos posteriores. Las células pueden ser inmovilizadas ya sea de forma permanente o temporal, esto es sumamente importante ya que permite su reutilización (Maneau-Hernandez, 2021).

La inmovilización de microorganismos mediante soportes, ya sean naturales o sintéticos, es una herramienta para proporcionar estabilidad a las funciones celulares. Asimismo, esta técnica puede resultar sumamente útil para alcanzar altas concentraciones en volúmenes reducidos, así como la reutilización del biocatalizador y la implementación de sistemas continuos de producción (Durán-Páramo *et al.*, 2019). Los materiales utilizados en la inmovilización celular deben cumplir ciertos requisitos como: tener grado alimenticio, ser de bajo costo, disponibilidad, no degradables y aptos para condiciones bajas de temperatura y pH (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011).

2.3.1 Métodos de inmovilización celular

Los métodos de inmovilización celular pueden ser divididos de forma general en dos principales: por retención física y mediante unión química; los primeros son la inmovilización e inclusión en membranas, y en el caso de la inmovilización celular mediante unión química se encuentran la unión a soportes, adsorción y unión covalente. Esta clasificación fue hecha por Arroyo (1998) y se describe a continuación:

Inmovilización

Esta técnica consiste en la retención física de la célula de interés mediante una matriz sólida porosa; generalmente esta matriz se encuentra constituida por polímeros de diferentes tipos como: poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. Este proceso se lleva a cabo mediante la suspensión de la célula en la solución con el polímero de interés; posteriormente, se realiza la polimerización mediante un cambio de temperatura o la adición de una sustancia química. Esta inmovilización puede ser en geles o fibras. Entre sus principales ventajas se encuentra su sencillez, que requiere poca cantidad de reactivo y que las células no sufren alteraciones.

Inclusión de membranas

Esta se divide en dos tipos, microencapsulación y reactores de membrana; la primera se basa en rodear a la célula con membranas semipermeables, las cuales permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de las células, esta inmovilización puede ser de tipo permanente o temporal. Las microcápsulas obtenidas son esféricas con un tamaño diminuto (entre 1 y 100 μm). Por otra parte, la inmovilización mediante la utilización de los reactores de membrana se basa en el empleo de membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y más importante, impermeables a la célula, esto es posible debido a una bomba la cual establece un flujo líquido que pasa a través del reactor.

Unión a soportes

Es el método más empleado en la industria. Al utilizar este método es esencial que la inmovilización celular apoye el incremento a la afinidad por el sustrato, reduzca la

inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y disminuya las posibles contaminaciones microbianas. Es muy importante que el soporte tenga resistencia mecánica adecuada a las condiciones del medio y sea fácilmente separable del medio líquido para permitir su reutilización. Existe una gran variedad de materiales utilizados como soportes los cuales difieren de tamaño, porosidad, conformación, densidad y características. Los soportes pueden ser divididos en orgánicos e inorgánicos; los primeros pueden ser soportes naturales y materiales manufacturados, mientras que en el caso de los soportes orgánicos pueden ser divididos en:

Polímeros naturales

- Polisacáridos: Celulosa, almidón dextranos, agaragar, agarosa, alginato, quitina, quitosano, entre otros.
- Proteínas fibrosas: Colágeno, queratina, etc.

Polímeros sintéticos

- Poliolefinas
- Polímeros acrílicos
- Otros tipos

Adsorción

En este procedimiento la célula se une a un soporte mediante interacciones iónicas. Existen diferentes factores que afectarán la adsorción como: el pH del medio, la fuerza iónica, el diámetro del poro y la presencia de iones. Esta técnica presenta varias ventajas como sencilla preparación y costos bajos, entre otros. Sin embargo, de igual forma cuenta con ciertas limitaciones, como la debilidad de unión al soporte y baja estabilidad.

Unión covalente

Esta metodología resulta sumamente interesante debido a sus ventajas desde el punto de vista industrial; se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Entre sus ventajas se encuentran: manipulación sencilla, reutilización de los derivados y mayor estabilidad de su estructura terciaria, etc.

2.3.2 Soportes orgánicos para la inmovilización

2.3.2.1 Alginato de sodio

El alginato hace referencia a un grupo de polisacáridos procedentes de algas marrones, utilizado como agente espesante, gelificante, emulsionante, estabilizador, mejorador de textura en fideos, entre otros, mejorando la calidad de los alimentos. Los alginatos son los polisacáridos más abundantes presentes en algas marinas; éstos son de tipo lineales, contienen ácido β -D-manurónico (M: 1,4- enlace ácido β -D-manopiranosilurónico 4C1) y ácido α -L-gulurónico (G: 1,4-enlace ácido α -L-gulopiranosilurónico 1C4). Se ha demostrado que el alginato es un compuesto completamente seguro, reconocido como un componente inocuo, lo que ha permitido su uso en la industria alimentaria como aditivo. Estos componentes cuentan con la habilidad de actuar como espesantes al ser disueltos en agua, aumentando la viscosidad de la solución. Asimismo, tienen la capacidad de retener el agua y formar un gel a partir de reacciones químicas de intercambio iónico. Finalmente, el alginato cuenta con la propiedad de formar películas (Avendaño-Romero *et al.*, 2013).

2.3.2.2 Almidón

El almidón es un poliscárido presente en forma de reserva vegetal, se conforma por dos tipos de moléculas: amilosa (30%) molécula lineal que se encuentra enrollada en forma de hélice, y amilopectina (70%) molécula ramificada. Este polisacárido proviene de la polimerización de glucosa que sintetizan los vegetales en procesos de fotosíntesis. La amilosa es considerada como el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos (1,4) que conforman largas cadenas lineales de hasta 5000 residuos con pesos moleculares hasta de 1 millón, es decir, que la amilosa es una α -D-(1,4)-glucano, cuya unidad repetitiva es la α -maltosa, la cual adquiere fácilmente una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice tiene seis moléculas de glucosa. Por su parte la amilopectina contiene ramificaciones unidas por enlaces α -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa y su peso molecular es muy alto ya que las fracciones pueden alcanzar hasta 107 daltons (Calvo, s.f.).

El mecanismo de acción del almidón se basa en la hidratación de este material. En este proceso los gránulos de almidón absorben agua y se hinchan, lo que provoca el rompimiento de la estructura, liberando cadenas poliméricas y cristales, teniendo como consecuencia el incremento en la viscosidad de la solución (Castillo *et al.*, 2022).

2.3.2.3 Glicerol

El glicerol (C₃H₈O₃) es un polialcohol el cual posee tres grupos hidróxilos (-OH), de forma comercial esta sustancia es conocida como glicerina. La presencia de los grupos hidróxilos le confiere características como ser higroscópico, fácilmente soluble tanto en agua como alcoholes, y ligeramente soluble en disolventes orgánicos como éteres y dioxanos, e insoluble en hidrocarburos. A lo largo de los años se ha utilizado como materia prima o aditivo. Este compuesto es higroscópico por lo cual ha sido empleado como humectante, permitiendo la elaboración de preparaciones que tengan que mantenerse húmedas. Cuenta con un sabor ligeramente dulce y tiene la propiedad de no elevar los niveles de azúcar en sangre, esto ha permitido que sea utilizado como aditivo alimentario, codificado como E422 (Dias *et al.*, 2007).

El glicerol es un plastificante soluble en agua; es un agente sumamente efectivo utilizado como suavizante para los almidones y mejora la flexibilidad de las películas resultantes. Cuanto más se incluye una sustancia plastificante en una matriz polimérica, la elongación y la deformación se incrementan (Otey *et al.*, 1979).

2.4 Mucílago de nopal

Opuntia ficus indica, comúnmente conocido como nopal, es una planta angiosperma dicotiledónea. Pertenece a la familia de las cactáceas, una de sus principales características es su gran adaptación a climas áridos. Es una fruta rica en ácidos grasos, polifenoles, vitaminas y aminoácidos, asimismo, se ha demostrado que cuenta con propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras, hipoglucemiantes, antioxidantes y antimicrobianas (El-Mostafa *et al.*, 2014).

Una de las razones por las cuales el mucílago de nopal se considera como un excelente ingrediente para la formulación de película comestible, es la similitud que presenta con

distintas gomas comerciales como las pectinas. Este mucílago es de tipo hidocoloide y cuenta con la capacidad de formar una red estructural, lo cual es esencial para formar una película (Lira-Vargas, 2015).

De acuerdo con Paredes-Martínez (2011), el mucílago tiene una amplia aplicación en diferentes productos alimenticios como yogurts, mayonesas, cremas y bebidas, debido a que modifica sus propiedades funcionales como la retención de agua, elasticidad, viscosidad, espesor, entre otros.

En un estudio realizado por Espino-Díaz *et al.* (2010), se realizó la caracterización de películas comestibles basadas en mucílago de nopal; los resultados obtenidos por esos autores se muestran en la tabla 1. Los componentes de mayor interés en este caso son los carbohidratos y la humedad debido a que estos componentes le darán la textura y consistencia deseada a la película formulada.

Tabla 1. Composición química del mucílago *Opuntia ficus indica*

Composición química	
Humedad	12.43
Proteína	1.04 ^a
Ceniza	20.08 ^a
Calcio	3.10 ^a
Grasa	2.3 ^a
Carbohidratos	64.15 ^a
Galactosa	5.71 ^a
Arabinosa	5.32 ^a
Xilosa	3.27 ^a
Ácido galacturónico	0.85 ^a
Glucosa	32.29 ^a

^a Porcentaje sobre base seca.

Fuente: Espino-Díaz *et al.* (2010).

2.4.1 Aplicaciones

En la actualidad el nopal ha ganado interés debido a sus múltiples usos, identificando entre los principales los siguientes: como fruta, hortaliza, planta forrajera para alimentación de ganado, sustrato para la producción de grana cochinilla, planta medicinal, en la industria cosmética como materia prima, en la producción de bebidas alcohólicas, como cerco vivo, utilización para conservación de suelo, clarificación de agua, producción de alimentos y repelente de insectos, entre otros. Por consiguiente, se han realizado esfuerzos para formular películas comestibles con mucílago de nopal. Además de las múltiples aplicaciones mencionadas anteriormente, la alta presencia de pectinas en este mucílago lo convierte en ideal para la formulación de estas películas (Abraján, 2008).

Diferentes autores han estudiado el desarrollo de películas comestibles compuestas a base de mucílago de nopal; entre los textos encontrados en la literatura se encuentra el trabajo realizado por Del-Valle *et al.* (2008), el cual realizó el recubrimiento de fresas por medio de inmersión. Asimismo, Ruiz *et al.* (2009), llevaron a cabo la formulación de películas comestibles para el recubrimiento de fresas. Ese estudio reportó que se logró retardar la proliferación tanto de hongos como levaduras, se aumentó la fuerza de rompimiento, se mantuvieron los atributos sensoriales y la película comestible no presentó un sabor u olor desagradables para el consumidor. Asimismo, Salinas *et al.* (2015), presenta a las películas comestibles de mucílago de nopal como una buena alternativa para el recubrimiento de frutas frescas.

En trabajos más recientes, como el de Punina *et al.* (2022), se desarrolló una película comestible a base de mucílago de nopal y aceite esencial de orégano para prolongar el tiempo postcosecha de la fresa. De la misma forma Bernedo *et al.* (2019), trabajó en la formulación de una película comestible comestible a base de mucílago de nopal la cual permitió alargar la maduración y vida útil del mango. Mientras que Molina *et al.* (2019), refieren que en su trabajo se utilizaron recubrimientos de mucílago de nopal, pectina y aceite esencial de romero para la conservación de naranjas. En la investigación realizada por Apaza (2020), se menciona que “los recubrimientos formulados a base de mucílago de nopal son aceptables sensorialmente, así mismo ayudan a extender el tiempo de vida

útil de la palta o aguacate, variedad Hass, disminuyendo las pérdidas de peso, manteniendo la firmeza y retrasando los parámetros de color del fruto”.

Recientemente Barrón *et al.* (2022), presentaron la evaluación del mucílago de nopal con alginato para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum*. En ese trabajo se realizó la microencapsulación de la cepa mediante la técnica de extrusión. Los resultados obtenidos fueron positivos, ya que demostraron que la mezcla de estos dos componentes es útil para la encapsulación de estas bacterias.

3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias del género *Lactobacillus* han resaltado en la última década debido a los beneficios que confieren, como sus propiedades bioterapéuticas, equilibrar el sistema inmunológico y producir moléculas antimicrobianas, entre otros. De forma específica, se ha demostrado que la especie *Limosilactobacillus reuteri* posee actividad antimicrobiana, lo cual ayuda a impedir la colonización de microorganismos patógenos y apoya a la recomposición del microbiota intestinal. La viabilidad de estas bacterias ha sido un desafío, ya que las condiciones del tracto gastrointestinal no son las ideales para *L. reuteri*.

Por esta razón, la presente investigación se enfocó en el desarrollo de una película comestible, la cual mantuviera viable a la bacteria *L. reuteri* en el tracto gastrointestinal. Se espera que la adición de estos probióticos a la película comestible permita a los consumidores adquirir beneficios para la salud, al mismo tiempo que el recubrimiento cuida la calidad del alimento. Esta película se conformó por glicerol, alginato y almidón, los cuales funcionaron como soportes orgánicos. Asimismo, se adicionó mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*) con la finalidad de ayudar a la retención de agua de la película comestible.

Por otra parte, el nopal es una fruta sumamente rica en aminoácidos, ácidos grasos, polifenoles y vitaminas, igualmente, que ha demostrado propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras, hipoglucemiantes, antioxidantes y antimicrobianas (El-Mostafa *et al.*, 2014).

4. HIPÓTESIS

La película comestible formulada a partir de mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*) permitirá inmovilizar a la bacteria *Limosilactobacillus reuteri* en condiciones viables.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Formular una película comestible suplementada con mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*) que permita la inmovilización de *Limosilactobacillus reuteri*.

5.2 Objetivos específicos

- Formular una película comestible con mucílago de nopal, para incorporar posteriormente las células bacterianas de *L. reuteri*.
- Determinar la cinética de crecimiento de *L. reuteri* en las condiciones experimentales.
- Incorporar *L. reuteri* en la mezcla para obtener una película comestible.
- Evaluar la viabilidad de *L. reuteri* en las películas obtenidas
- Evaluar la viabilidad de de *L. reuteri* en una simulación del tracto gastrodigestivo.

6. METODOLOGÍA

6.1 Equipo y materiales

6.1.1 Equipo

- Microscopio óptico USCAMEL
- Microscopio electrónico de barrido JSM-6610LV (Jeol)
- Incubadora Barnstead 35550A
- Baño maría H2O Balt Serires
- Espectrofotómetro UV-Vis Velab VE
- Licuadora Oster
- Campana de Flujo Laminar CFL 103
- Horno microondas Panasonic Sensor 1200W
- Vortex Thermo Scientific
- Centrifuga SOL-BAT J-600
- Refrigerador
- Balanza Granataria Expoler PRO OHAUS
- Contador de Colonias SOL-BAT Q-20
- Parrilla de agitación CIMAREC

6.1.2 Materiales y medios

Medios de cultivo:

- Caldo MRS Merck KGaA
- Agar bacteriológico BD Bioxon
- Agua de peptona Merck KGaA

Materiales y reactivos:

- Nopal
- Agua destilada
- Etanol al 65%

- Glicerol al 99%
- Alginato de sodio Química Mercurio
- Almidón FABPSA
- Agua tridestilada HERCO-TEC
- Ácido clorhídrico (HCl al 10%)
- Citrato de sodio
- Bilis de buey Meyer
- Vasos precipitados
- Tubos para centrifugar
- Espátulas de acero inoxidable
- Matraces estériles
- Celdas para espectrofotómetro
- Cuchillo
- Tabla para picar
- Pipeta de 10 ml
- Pipeta Pasteur
- Micropipetas
- Termómetro
- Kit tinción de Gram
- Tela tipo Manto de cielo
- Colador doméstico.

6.2 Formulación base de película comestible

Esta formulación inicial se basa en la metodología propuesta por Concha-Meyer (2008), realizando algunas modificaciones de componentes considerando lo establecido en otros trabajos (Méndez Reyes *et al.*, 2014; Norajit *et al.*, 2010; Su Cha *et al.*, 2002; Vázquez-Luna *et al.*, 2019). En la tabla 2, se observan los componentes y las proporciones en porcentaje peso/volumen utilizadas para la realización de estas películas comestibles. Es importante mencionar que se realizaron diferentes reformulaciones con la finalidad de obtener la mejor apariencia posible.

Tabla 2. Composición de películas comestibles base

Componente	Formulación inicial de referencia	Reformulación 1	Reformulación 2	Reformulación 3
Alginato de sodio	4%	2%	8%	4%
Almidón	16%	4%	8%	4%
Glicerol	20%	20%	20%	20%
Agua destilada	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

La composición final de estas películas se encuentra en la tabla 3. Esta fue la formulación que se utilizó como base para la realización de este proyecto.

Tabla 3. Composición final de películas comestibles base

Componente	Cantidad (g)
Almidón	2 g
Alginato de sodio	2 g
Glicerol	6 g
Agua destilada	100 ml

Como primer paso se pesa cada uno de los reactivos. Después se calienta el agua hasta que se encuentra en una temperatura entre 20-40 °C. Una vez que el agua alcanza la temperatura deseada se adiciona el alginato de sodio de forma gradual evitando la

formación de grumos; posteriormente se procede a agregar de la misma forma el alginato. Una vez disueltos estos componentes se agrega el glicerol para homogenizar la mezcla. Como paso final se vierte la mezcla en placas Petri para mantenerlas en un proceso de secado por 72 h a temperatura ambiente.

Para evitar cualquier tipo de contaminación es sumamente importante mantener todas las condiciones de asepsia posibles.

6.3 Extracción de mucílago de nopal

Para hacer la extracción de mucílago de nopal, se sigue la metodología de Vargas et al. (2018), con algunas modificaciones.

Se consigue el nopal fresco en cualquier establecimiento local en Puebla, Puebla. Estos se lavan con agua abundante. Posteriormente, se elimina la epidermis del nopal, recuperando la mayor cantidad de parénquima. Después se realiza un segundo lavado y se cortan en pequeños cubos. Se licuan lotes de 200 gr de nopal con 75 ml de agua destilada hasta obtener una mezcla homogénea. Esta mezcla se somete a baño María a 80 °C por 20 minutos y posteriormente se lleva a cabo la filtración con un colador doméstico. Se realiza un segundo filtrado con tela tipo manto de cielo previamente esterilizada mediante luz UV por 15 minutos de cada lado. El sedimento obtenido se desecha y se recolecta el sobrenadante el cual se precipita con etanol al 65% v/v. Se deja reposar esta mezcla por 20 horas a 10 °C en un refrigerador convencional. El mucílago precipitado se recolecta y se elimina el sobrenadante existente con una pipeta Pasteur.

6.4 Preparación de película comestible con mucílago de nopal

Para la formulación de las películas comestibles con mucílago de nopal se toma como referencia la formulación base referida anteriormente. Sin embargo, para esta formulación se tomó en cuenta la densidad del mucílago de nopal obtenido la cual fue de 0.96 g/ml. Debido a la similitud de densidades con el agua destilada se opta por agregar 50 ml de agua en lugar de 100 ml. Esto con la finalidad de complementar los líquidos con 50 ml de mucílago.

Los componentes utilizados para las películas comestibles se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Composición de película comestible con mucílago de nopal

Componente	Cantidad	Porcentaje Peso/Volumen	Porcentaje Peso/Peso
Alginato	2 g	2%	1.85%
Almidón	2 g	2%	1.85%
Glicerol	6 g	6%	5.55%
Agua destilada	50 ml	50 ml	46.25%
Mucílago de nopal	50 ml	50 ml	44.50%

Para elaborar las películas se pesa el alginato y almidón en contenedores separados. Posteriormente, en un vaso precipitado se adicionan 50 ml de agua destilada y 50 ml de mucílago de nopal. La mezcla se debe trabajar a una temperatura de 20-40 °C para lograr una mejor incorporación de los componentes. Se agrega gradualmente el almidón a la mezcla, cuidando que no se generen grumos ni burbujas. Una vez disueltos se procede a agregar alginato, este componente se debe incorporar de forma gradual para lograr la homogenización de la mezcla y después se adiciona el glicerol. Se deja enfriar la mezcla para posteriormente verterla en placas Petri para su almacenamiento y secado. El secado se lleva a cabo en un contenedor limpio y con entrada de aire por 3 días a temperatura ambiente.

6.5 Microorganismos

6.5.1 Cepa Y-12

Limosilactobacillus reuteri. Cepa Y12

En este proyecto de investigación se trabajó con la bacteria *Limosilactobacillus reuteri* CUVY-12, la cual fue aislada de yogurt artesanal en el Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

6.5.2 Tinción de Gram

Se utiliza la cepa Y-12, la cual previamente fue identificada por medio de secuenciación y se almacenó en glicerol en un ultra congelador a -80 °C. Se realizó una tinción de Gram con la finalidad de observar de forma detallada la morfología celular de éstas bacterias.

6.6 Construcción de la curva de crecimiento

En agar MRS se inocula una colonia de *L. reuteri* de un cultivo en glicerol, esto se realiza mediante la técnica de estría cruzada, posteriormente el inóculo se incuba por 24 horas a 37°C. Después de transcurrir las 24 horas se procede a tomar una colonia del cultivo e inocula un tubo de caldo MRS de 10 ml. Posteriormente se procede a tomar alícuotas de 15 µL del cultivo e inocular en un matraz con caldo MRS.

Se toman las primeras muestras de 1 ml para depositarlas en una celda y realizar lecturas en el espectrofotómetro a 600 nm. Se utiliza el caldo MRS sin inocular como blanco para no afectar los valores de absorbancia de la muestra. Este procedimiento se realiza cada 2 horas con la finalidad de obtener diferentes valores de absorbancia.

Cada vez que se obtiene una nueva lectura en el espectrofotómetro se lleva a cabo el método de vertido en placa con 1ml de la muestra. Al mismo tiempo, se realizan diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-8} en tubos de ensayo con 9 ml de medio. Posteriormente, se procede a inocular cada placa Petri estéril con 1 ml de muestra. A continuación se adiciona agar MRS estéril a una temperatura soportable al tacto. Una vez que se agrega el agar se realizan movimientos delicados para fusionar el medio con las bacterias. Las placas resultantes se incuban a 37 °C por 24 horas. Después de transcurrir las 24 horas se cuentan las colonias presentes en las placas. Es importante mencionar que solamente las placas que se presenten de 30 a 300 colonias podrán contarse (Madigan *et al.*, 2004).

La curva de crecimiento de *L. reuteri* se construye en Microsoft Excel 16.67, en esta gráfica se compara la absorbancia medida en el espectrofotómetro a 600nm en el eje X con las UFC presentes en la placa Petri en el eje y. Para realizar esta curva se utiliza la ecuación de Gompertz que se muestra a continuación:

$$f(t) = ae^{-be^{-ct}}$$

Donde:

a= Asíntota

b= Establece el desplazamiento a lo largo del eje X

c= Tasa de crecimiento

e= n° de Euler (2.7182).

6.7 Obtención de pellet celular

Se realiza un inóculo de *Limosilactobacillus reuteri* cepa Y12 en caldo MRS, con una concentración estimada de 10^7 UFC/ml con una OD de 0.140 midiendo a 600 nm. Posteriormente, se procede a transferir el inóculo a tubos especiales para centrifugar a 3600 rpm por 15 minutos. Se elimina el sobrenadante y se adicionan 5 ml de agua de peptona a cada tubo. Se realiza una segunda centrifugación a 3600 rpm por 15 minutos, para después eliminar el sobrenadante. Finalmente, se recolecta todo el precipitado en un solo tubo y se resuspende en 1 ml de agua de peptona. Este pellet celular se centrifuga una última vez a 3600 rpm por 8 minutos.

6.8 Preparación de película comestible con *Limosilactobacillus reuteri*

Se siguió la metodología mencionada anteriormente, agregando el pellet celular como paso final, esto es, una vez que la mezcla no presenta grumos y se observa homogénea, entonces se procede a agregar el pellet celular revolviendo delicadamente.

Por otra parte, se realizó un cambio en las proporciones de bacterias agregadas, esto con la finalidad de saturar la película con probióticos. Se optó por preparar 50 ml de

mezcla en lugar de 100 ml como se había realizado anteriormente, utilizando las mismas proporciones de los componentes y agregando el 1 ml de pellet celular final. La composición de las películas comestibles se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Composición de película comestible con mucílago de nopal y *Limosilactobacillus reuteri*.

Componente	Cantidades en formulación inicial	Cantidades en formulación final
Alginato	2 g	1 g
Almidón	2 g	1 g
Glicerol	6 g	3 g
Agua destilada	50 ml	25 ml
Mucílago de nopal	50 ml	25 ml
Pellet celular	1 ml	1 ml

6.9 Evaluación de películas comestibles

6.9.1 Caracterización de las películas comestibles

La caracterización de las películas comestibles se realiza en un microscopio óptico y en un microscopio electrónico de barrido JSM-6610LV (Jeol).

Para la caracterización en microscopio óptico se observan las películas tanto en la vista frontal como la trasera, utilizando un cuadrado de 1 cm aproximadamente, en este caso no se realiza ningún tipo de pretratamiento a la muestra. Posteriormente se realiza una tinción de Gram de las películas realizadas, esto con la finalidad de verificar si están presentes los probióticos adicionados. Las muestras se observan con un aumento de 40 y 100x.

Para la observación en el microscopio electrónico de barrido, se recortan pequeños cuadrados de 0.25 cm² de área de las películas realizadas. Después, se preparan las muestras con un recubrimiento de oro al bajo vacío, este paso se realiza con la finalidad de proporcionarle propiedades conductoras a la película y así poder obtener imágenes de alta resolución en el microscopio. Las muestras son observadas con la ayuda de un experto.

6.9.2 Pruebas de almacenamiento

Las películas comestibles realizadas, se someten a diferentes pruebas de almacenamiento en las cuales se evalúa cómo las condiciones de almacenamiento afectaban la apariencia de las películas. Estas pruebas se llevaron a cabo durante 9 y 7 meses, correspondiendo a películas con mucílago de nopal y, películas con mucílago de nopal y *L. reuteri*, respectivamente.

En estas pruebas de almacenamiento se toma en cuenta la temperatura y luz a la que las películas se encuentran sometidas. Se dividen las películas en tres grupos principales: 1) El primer grupo se encuentra en condiciones de almacenamiento “normal” a una temperatura ambiente y fueron expuestas indirectamente a la luz. 2) El segundo grupo de igual forma se almacena a temperatura ambiente, sin embargo, estas películas no se encuentran expuestas a la luz. 3) El tercer y final grupo se almacena a una temperatura de 4 °C en refrigeración y con luz limitada. La apariencia de las películas fue monitoreada diariamente.

6.9.3 Determinación de la humedad

Para la determinación de humedad se preparan películas que cubran la superficie de la placa Petri. Antes de verter la mezcla en las placas se pesa cada una de ellas y se numeran, esto con la finalidad de tener un control del peso de cada una. Las películas se dejan secar por 72h y posteriormente se lleva a cabo un segundo pesaje con la finalidad de conocer la cantidad de agua perdida. Para determinar la humedad se utiliza la siguiente ecuación.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(P_3 - P_1)}{(P_2 - P_1)} \times 100$$

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 BAL en la película comestible

La metodología para la elaboración de las películas comestibles se modificó con la finalidad de hacer el procedimiento más rápido y escalable, cambiando la agitación manual por una agitación mecánica.

Se preparan 50 ml de citrato de sodio al 1%, esta solución se coloca en la parrilla de agitación hasta que los componentes se disuelven de manera uniforme. Posteriormente, se agrega una película comestible de nopal de 1 g y se mantiene en agitación por 20 minutos. Una vez que la película se disuelve, se procede a distribuir el volumen en 7 tubos de 6.5 ml cada uno para después centrifugarlos a 4000 rpm por 15 minutos. El pellet celular obtenido se resuspende en los tubos en 1 ml de agua de peptona; para esto, se realiza el lavado de los tubos hasta obtener el pellet celular en un solo tubo de ensayo. Posteriormente se lleva a cabo una segunda centrifugación a 3600 rpm por 10 minutos. Finalmente, se realiza un último cambio de agua de peptona y se procede a resuspender el pellet celular obtenido en 1 ml de agua de peptona, para después utilizar este mililitro para inocular 9 ml de agua de peptona y realizar las diluciones necesarias, para después llevar a cabo el vertido en placa y así obtener las UFC presentes en la película. La metodología mencionada anteriormente se basó en la técnica propuesta por Champagne *et al.* (1992).

6.9.5 Pruebas de viabilidad en el tracto digestivo ante sales biliares

Para llevar a cabo estos estudios de viabilidad se tomaron como referencia las técnicas propuestas por Saavedra *et al.*, (2003), y Gutiérrez *et al.*, (2007). Para esta prueba se preparan y esterilizan los medios el mismo día; los medios de cultivo utilizados se muestran a continuación en la tabla 6.

Tabla 6. Medios de cultivo para prueba de sales biliares

Medios de cultivo	Cantidad
Caldo MRS	100 ml
Caldo MRS con sales biliares al 0.3% p/v	100 ml
Agar MRS	200 ml
Agar MRS con sales biliares al 0.3% p/v	400 ml

Inicialmente se vierten 5 placas de agar MRS con sales biliares y se dejan secar. Los caldos de MRS se preparan en matraces de 250 ml, una vez que estos se enfrían se inoculan con 50 microlitros de bacterias. Se realiza la primera medición en el espectrofotómetro a 600 nm a la hora cero tanto del medio estándar (MRS) como del medio MRS adicionado con sales biliares. Después de medir, se agrega 1 ml de medio MRS y se vierte su respectivo agar. De igual forma, se lleva a cabo un estriado con 50 microlitros de caldo MRS con sales en las placas de MRS con sales anteriormente preparadas. Se repite este procedimiento a las 1, 2, 3 y 4 horas. Las placas se incuban por 24 horas para después analizar los resultados obtenidos.

6.9.6 Pruebas de viabilidad en el tracto digestivo ante acidez

En el caso de las pruebas de viabilidad ante acidez, se utilizó como referencia la metodología propuesta por Gutiérrez *et al.* (2007).

El paso inicial es preparar un pre-inóculo con probióticos 24 h antes en un caldo MRS. Después se ajustan 100 ml de caldo MRS a un pH de 2.5 con HCl. Este medio acidificado se inocula con 10 microlitros de probióticos. En el caso de esta prueba, se llevan a cabo tres mediciones en el espectrofotómetro a 600 nm a las cero (0), 1 y 2 horas, seleccionando estos tiempos con la finalidad de simular la digestión en el tracto gastrointestinal humano. Cada que se realiza una medición en el espectrofotómetro se lleva a cabo el vertido en placa con 1 ml de inóculo para un análisis cualitativo. Las placas se mantienen en incubación para monitorearlas a las 24 y 72 horas de crecimiento.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Formulación base de película comestible

La formulación inicial de la película comestible se basó en el trabajo realizado por Concha-Meyer (2008), sin embargo, se realizaron cambios en las proporciones de los materiales con la finalidad de obtener una película con mejores características sensoriales. Las películas obtenidas con las primeras formulaciones tenían una alta cantidad de grumos los cuales eran difíciles de disolver, esto se debía a que se incorporaban los ingredientes rápidamente en la mezcla, lo cual no permitía que se disolvieran por completo. La mayoría de estas películas se contaminaron en el proceso de secado debido a la alta actividad de agua presente en las películas. Las películas pesaron en promedio 48.51 g, lo cual se considera elevado, por lo que el periodo de secado fue más prolongado y como consecuencia se encontraban expuestas al exterior por más tiempo. Las películas obtenidas en esta fase inicial se muestran a continuación en la figura 3, en estas películas se aprecia la presencia de grumos, asimismo, una matriz más gruesa y húmeda.

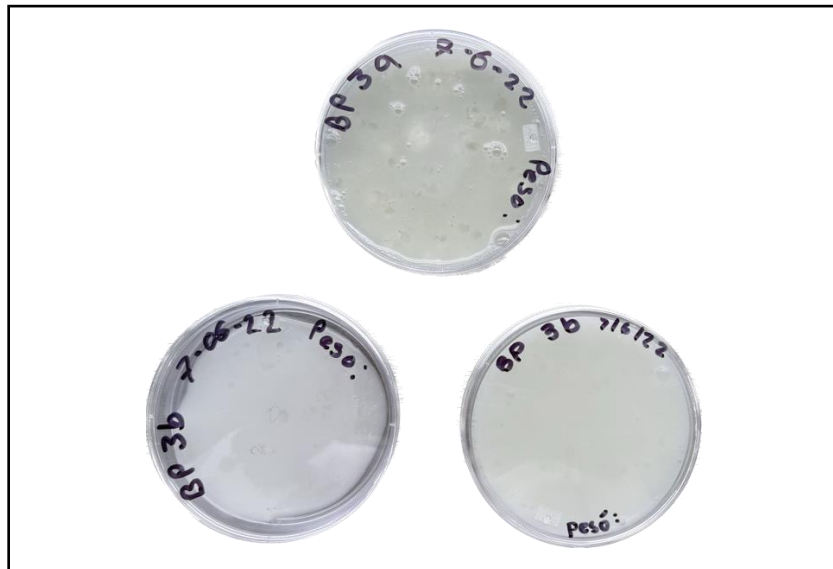


Figura 3. Películas iniciales antes de reformulaciones

Debido a lo anteriormente expuesto se realizaron cambios en la formulación de las películas reduciendo la cantidad de glicerol, almidón y alginato. Después de estas modificaciones, se obtuvo la formulación final base. Las películas resultantes tuvieron mejor apariencia y no presentaron ningún tipo de contaminación. Por otra parte, se optó por hacer películas más delgadas con la finalidad de reducir los riesgos de contaminación. Las películas obtenidas fueron de color blanco opaco y se mantuvieron en almacenamiento durante 12 meses, en los cuales no presentaron ningún signo notorio de contaminación o deterioro. En la figura 4 se exhibe una película comestible con esta formulación. En esta figura es posible apreciar los cambios notorios en la homogenización de la mezcla, con relación a lo que muestra la figura 5.



Figura 4. Películas comestibles base con formulación final

7.2 Extracción de mucílago de nopal

Para el proceso de extracción de mucílago se emplearon 944.23 g iniciales de nopales frescos y limpios, los cuales fueron previamente cortados. Para la extracción del mucílago se siguió la metodología propuesta por Vargas *et al.*, (2018), con algunas modificaciones, obteniendo así 404.43 g finales de mucílago, dando como resultado un rendimiento de 42.83%, el cual se considera óptimo debido a que en estudios realizados anteriormente se habían reportado rendimientos de 0.68% con base en peso fresco

(Espino-Díaz *et al.*, 2010) y de 2.56% de acuerdo con Vargas *et al.* (2016). Por otra parte, la densidad del mucílago obtenido fue de 0.96 g/ml.

La coloración final del mucílago fue verde y opaca, tal como lo muestra la figura 7. La coloración final es una consecuencia de los altos niveles de pigmentos naturales como la clorofila (Domínguez *et al.*, 2023). Por otra parte, el cambio en la coloración del nopal de verde brillante a verde oliva en el mucílago se debe al tratamiento térmico al cual fue sometido durante su elaboración. Este cambio se origina por la formación de feofitina provocada por el remplazo del ión Mg^{+2} del anillo tetrapirólico de la clorofila por dos iones de hidrógeno (Orozco, 2017). Su olor fue neutro y suave, esta es una característica esencial ya que no alteraría las características sensoriales de las películas. Este mucílago se mantuvo en almacenamiento en refrigeración a una temperatura de 4 °C por diez meses sin mostrar ningún signo visible de contaminación o deterioro.

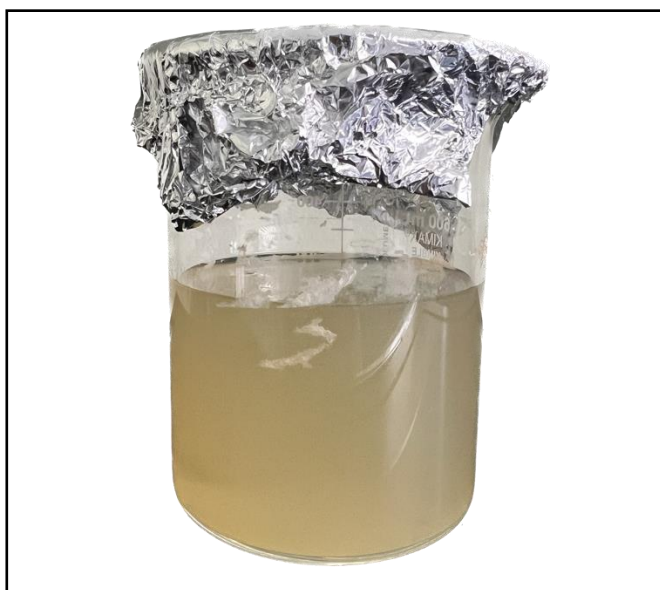


Figura 5. Mucílago de nopal

7.3 Películas comestibles con mucílago de nopal

Para esta formulación se utilizó como referencia la formulación base desarrollada al inicio de este trabajo, realizando un cambio en la proporción del agua ya que en este caso se agregaron 50 ml de agua y 50 ml de mucílago de nopal. Estas películas se vertieron en placas Petri de menor diámetro para así reducir los tiempos de secado. En esta fase se

obtuvieron películas altamente similares a las de la formulación base con un color blanco opaco, tal como lo muestra la figura 6. El principal problema en lotes iniciales de estas películas fue la formación de burbujas en las mismas. Esto se debió a un vertido inapropiado, sin embargo, una vez que se empezó a verter de forma adecuada estas burbujas ya no se presentaban en las películas.

De la misma forma, estas películas fueron sometidas a pruebas de almacenamiento durante 9 meses con la finalidad de observar posibles cambios en sus propiedades organolépticas.



Figura 6. Películas comestibles con mucílago de nopal

7.4 Microorganismo

7.4.1. Tinción de Gram

Con la finalidad de verificar el estado de las bacterias aisladas de yogurt artesanal se le realizó una tinción de Gram, en el Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se esperaba observar bacterias con morfología de bastón y Gram positivas. Como resultado se obtuvo la imagen que se muestra en la figura 7.

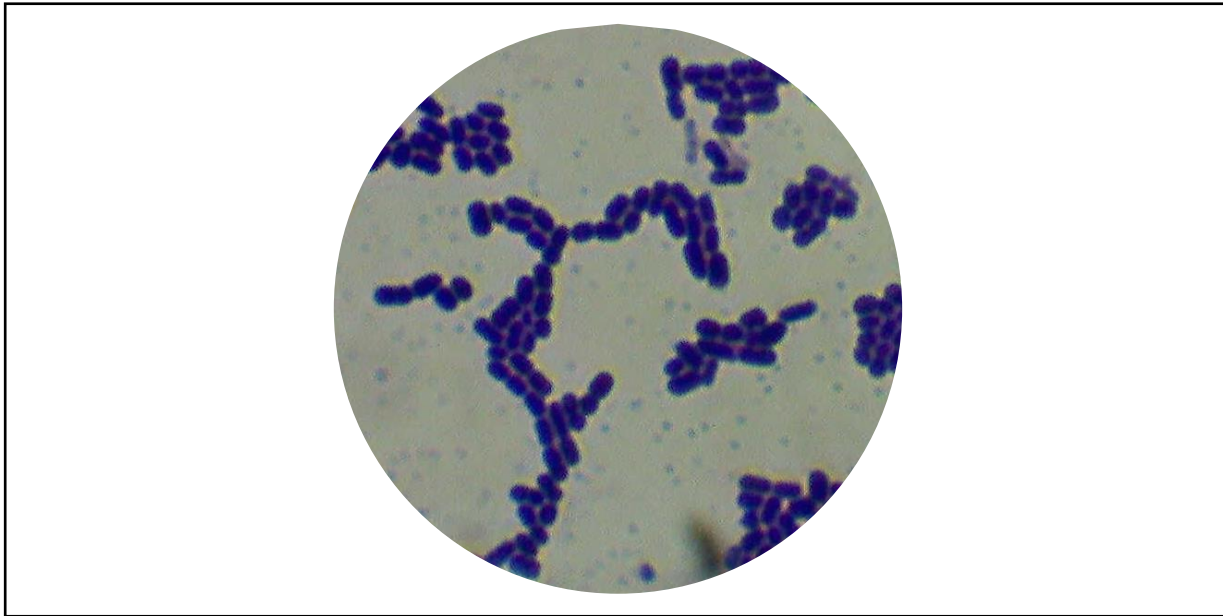


Figura 7. Tinción de gram de *Limosilactobacillus reuteri* 40X*2X*25X

En la figura 7, es posible identificar la morfología característica de estos probióticos. Asimismo, en la imagen es posible observar la forma de estos bacilos, ovalada y larga. *L. reuteri* es una bacteria de tipo Gram positivo, la imagen referida muestra bacterias con pigmentación morada, característica de una Gram positiva; la pigmentación que se aprecia es resultado de la distribución del peptidoglicano en la pared celular. Debido a la composición de la pared celular, retienen el primer colorante de la tinción de Gram (Antonio *et al.*, 2012).

7.5 Cinética microbiana

Los datos obtenidos en la construcción de la cinética de crecimiento de *L. reuteri* se muestran en la tabla 7. Los datos presentan las mediciones de densidad ópticas obtenidas a una longitud de onda de 600 nm y de manera adicional se realizó el conteo de UFC/ml por vertido en placa. En la tabla mencionada anteriormente se reportó una densidad óptica de 0.007 con $3.35E+05$ UFC/ml, correspondiente al tiempo 0 de inoculación. Esta cinética de crecimiento se llevó a cabo durante 28 horas, y el punto con mayor concentración de bacterias se presentó a las 24 horas con una densidad óptica

de 2.314 y 2.09E+10 UFC/ml. Los datos presentados en la tabla 7 se graficaron y se muestran a continuación en la figura 8.

Tabla 7. Absorbancia contra UFC para *Limosilactobacillus reuteri*

Densidad óptica (600 nm)	UFC/ml
0.007	3.35E+05
0.008	3.50E+05
0.011	1.17E+06
0.018	6.70E+05
0.019	1.85E+06
0.022	1.50E+06
0.027	5.50E+06
0.031	3.96E+06
0.056	8.90E+06
0.070	1.84E+07
0.076	2.40E+07
0.092	2.48E+07
0.113	2.17E+07
0.147	1.65E+07
0.693	4.75E+07
1.058	1.02E+08
1.465	4.35E+08

1.779	8.15E+08
2.164	1.99E+09
2.314	2.09E+10
2.396	2.84E+09
2.404	2.23E+09

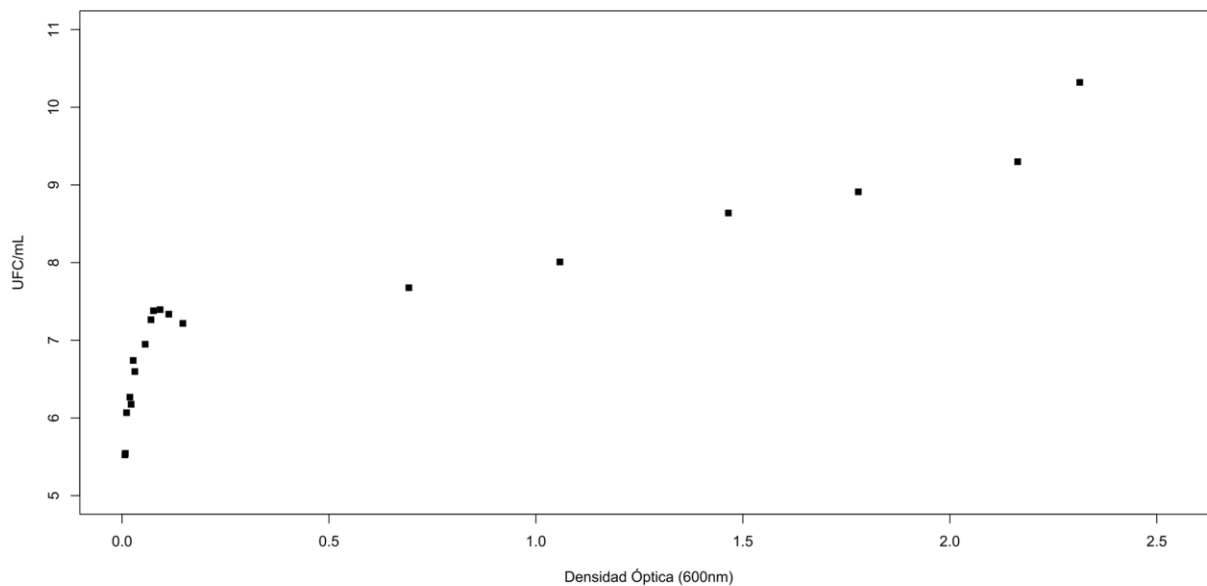


Figura 8. Crecimiento de *L. reuteri*. Gráfica de la recopilación de datos de densidad óptica contra UFC/ml

En la figura 9 es posible observar la curva de crecimiento en color naranja. Los datos presentados a continuación fueron ajustados con el modelo de Gompertz. Este modelo permitió estimar el valor de UFC/ml al medir la densidad óptica, lo cual fue de utilidad para realizar las películas adicionadas con bacterias.

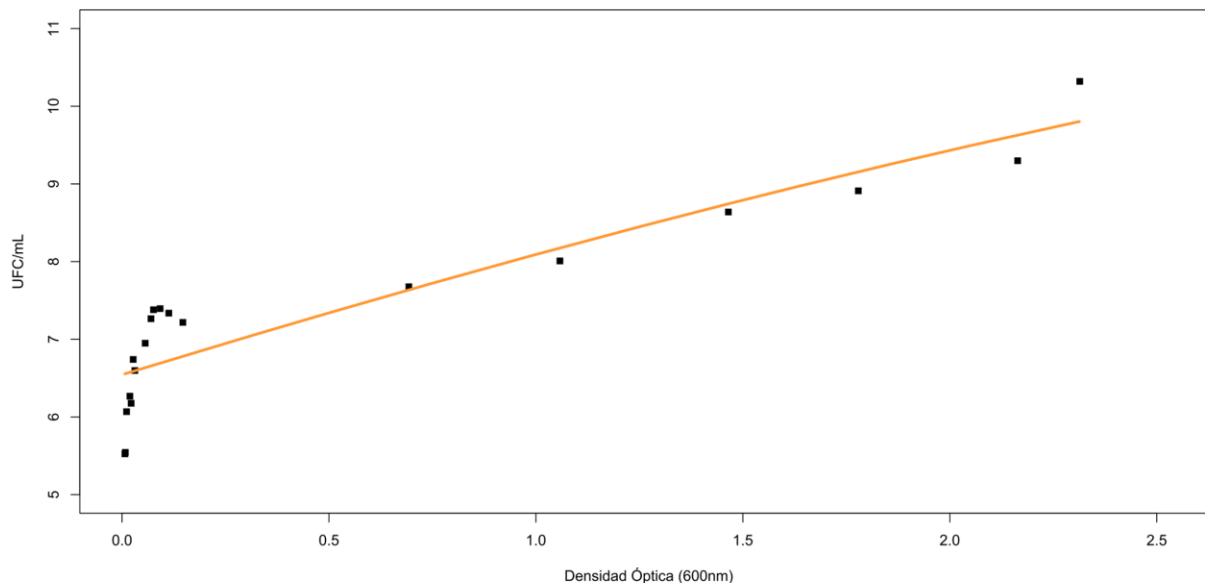


Figura 9. Crecimiento de *L. reuteri* ajustado con modelo de Gompertz.

7.6 Pellet celular

La extracción del pellet celular se llevó a cabo siguiendo la metodología indicada anteriormente. En este procedimiento se realizaron modificaciones a los tiempos de centrifugado con la finalidad de disminuir su duración y hacer este proceso más escalable. La densidad óptica del inóculo utilizado fue de 2.346 a 600 nm. Como resultado de la última centrifugación se obtuvo un tubo con pellet de bacterias, el cual fue nuevamente resuspendido con 1 ml de agua de peptona para así tener 1 ml final, el cual se utilizó posteriormente para inocular las películas comestibles.

En la figura 9 se muestran los pellets obtenidos a lo largo de este proceso. Es posible observar como en la primera centrifugación el pellet obtenido se encuentra precipitado, sin embargo, el volumen es menor, a diferencia de la segunda centrifugación en la cual se aprecia que el pellet aumentó. Finalmente, en el tercer lavado es notorio el aumento de volumen del pellet celular, esto se debe a que todos los precipitados obtenidos de la segunda centrifugación fueron resuspendidos en 1 ml de agua de peptona. El pellet celular se encontraba precipitado en el fondo del tubo en cada una de las centrifugaciones realizadas debido a la diferencia de densidades. En la sección (D) de la

figura 9 se muestra el resultado obtenido al resuspender por última vez el agua de peptona con el concentrado de bacterias, dando como resultado un pellet de color crema clara con una alta concentración de bacterias.

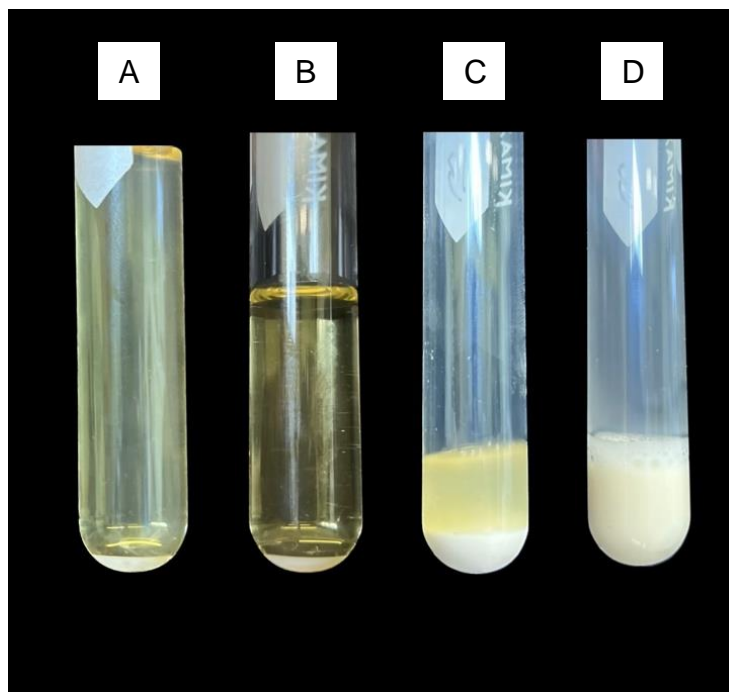


Figura 10. Pellet celular. (A) Primera centrifugación, (B) Segunda centrifugación, (C) Tercera centrifugación y (D) Re-suspensión de pellet celular final

7.7 Películas comestibles de nopal con *Limosilactobacillus reuteri*

A lo largo de este proyecto se hicieron cambios en las concentraciones de bacterias presentes en las películas; las primeras películas se hicieron en una mezcla con volumen de 100 ml adicionando 1 ml de pellet celular. Esta concentración inicial de bacterias obtuvo resultados bajos en las pruebas de viabilidad, por lo cual se optó por aumentar la concentración de bacterias al doble, agregando 1 ml de pellet a 50 ml de mezcla. Asimismo, se optó por disminuir las concentraciones de los componentes de la película con la finalidad de reducir la presencia de grumos en la mezcla y mejorar su apariencia final. A continuación, en la tabla 8 se muestra la recopilación de formulaciones indicada en porcentaje peso volumen.

Tabla 8. Tabla comparativa de formulaciones de películas comestibles

Componente	Formulación inicial de referencia	Formulación base final	Formulación con mucílago	Formulación final
Alginato de sodio	4%	2%	2%	1.96%
Almidón	16%	2%	2%	1.96%
Glicerol	20%	6%	6%	5.88%
Agua destilada	100 ml	100 ml	50 ml	25 ml
Mucílago de nopal	N/A	N/A	50 ml	25 ml
Pellet celular	N/A	N/A	N/A	1 ml

Se midió la densidad óptica del inóculo para calcular las UFC presentes. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 600 nm dando como resultado 2.346. De acuerdo con los datos obtenidos en la cinética de crecimiento a esta OD, se estima que hay 4.51×10^9 UFC/ml. Tomando en cuenta que se utilizaron 88 ml de caldo MRS inoculado para la extracción del pellet, la concentración aproximada total del pellet fue de 3.97×10^{11} UFC. Finalmente, teniendo en cuenta las proporciones de esta nueva formulación, es posible decir que al momento de realizar la película se añadieron 7.93×10^9 UFC, y que en cada gramo de esta mezcla había una concentración de bacterias de 1.59×10^8 UFC.

Las películas obtenidas tuvieron apariencia opaca, asimismo, mantuvieron una coloración ligeramente amarilla. Se sometieron a pruebas de almacenamiento durante siete meses con la finalidad de observar algún cambio organoléptico. Se llevaron a cabo dos tipos de películas: a) comestibles de 1 g de mezcla fresca y b) películas que

recubrieran toda la superficie de la placa Petri sin importar el peso. Las películas de 1 g se elaboraron con la finalidad de utilizar en pruebas posteriores. Las películas más grandes se utilizaron para llevar a cabo las pruebas de almacenamiento. A continuación, en la figura 11, se muestran las películas obtenidas. La coloración amarilla de las películas se debe a los ácidos presentes en el tejido vegetal del nopal, ya que estos pueden actuar como catalizadores de la degradación de los pigmentos clorofilados, dando como resultado la pigmentación final obtenida en la película (Orozco, s/f) .

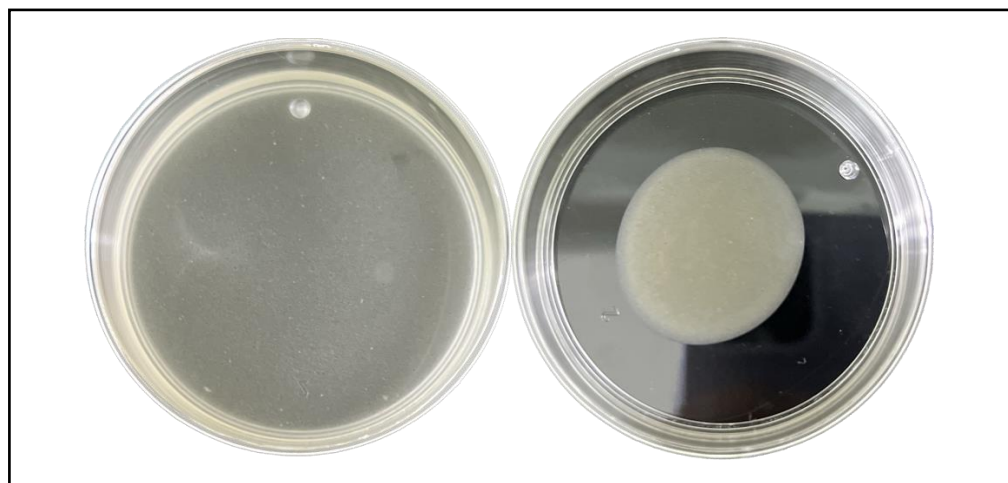


Figura 11. Películas comestibles de nopal con *Limosilactobacillus reuteri*

7.8 Evaluación de películas comestibles

7.8.1 Caracterización de películas comestibles

La caracterización de las películas comestibles se realizó empleando un microscopio óptico y microscopía electrónica barrido. En el caso del microscopio óptico se analizó la película sin ningún tipo de tratamiento obteniendo la imagen que se muestra en la figura 12(A). En esta foto es notoria la característica pigmentación verde del nopal. En esta figura también se observó la encapsulación de materiales en pequeñas aglomeraciones. Por otra parte, se realizó una tinción de Gram con la finalidad de verificar que las bacterias adicionadas estuvieran presentes. Las imágenes obtenidas se muestran en la figura 12(B).

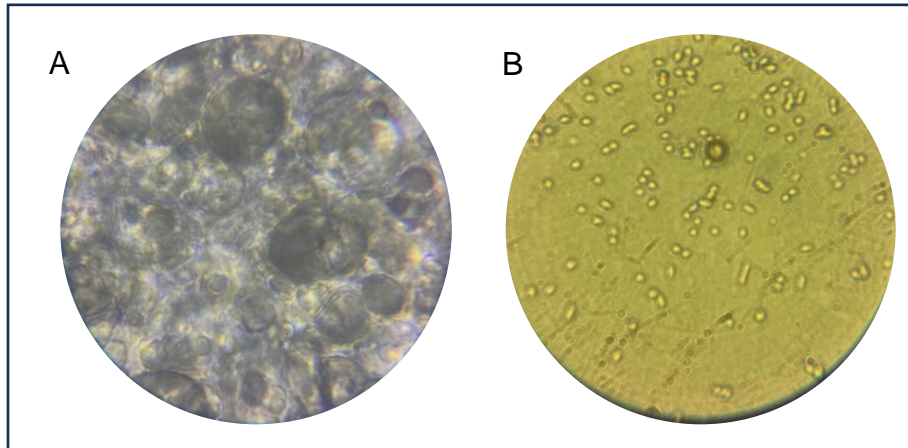


Figura 12. Películas comestibles en microscopio óptico a 100x. (A) Sin tratamiento (B) Con tinción de Gram

Al realizar la tinción de Gram la presencia de *L. reuteri* fue evidente. En la figura 12(B) es posible observar bacterias con una morfología de bacilo altamente parecida a la de la bacteria de interés. De igual forma, las bacterias que se muestran a continuación demostraron ser Gram positivas, otra característica específica de *L. reuteri*. Con la finalidad de obtener fotografías con alta resolución se optó por usar un filtro de luz el cual venía incorporado con el microscopio.

El análisis mediante el microscopio electrónico de barrido fue realizado con la ayuda de un profesional. Las imágenes obtenidas se muestran a continuación en la figura 13 y 14, las cuales fueron tomadas con un aumento de 5000x. En estas figuras es posible observar la morfología característica de *L. reuteri*, esto nos permite afirmar que las películas comestibles formuladas sí logran inmovilizar a las bacterias de interés.

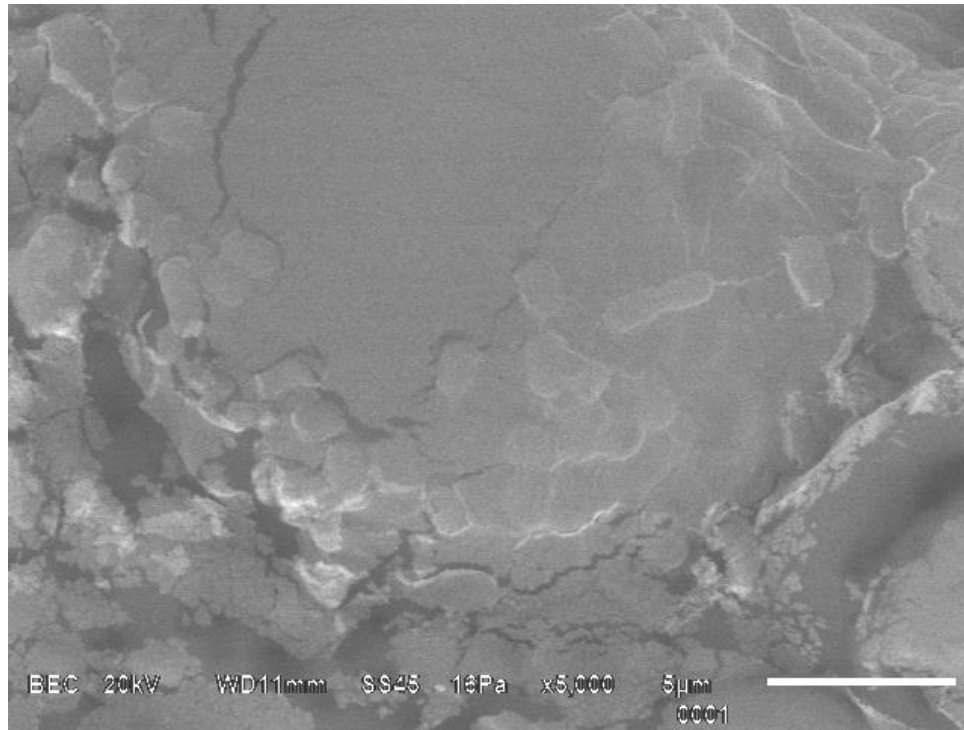


Figura 13. Observación de *L. reuteri* en la película comestible en el microscopio SEM.

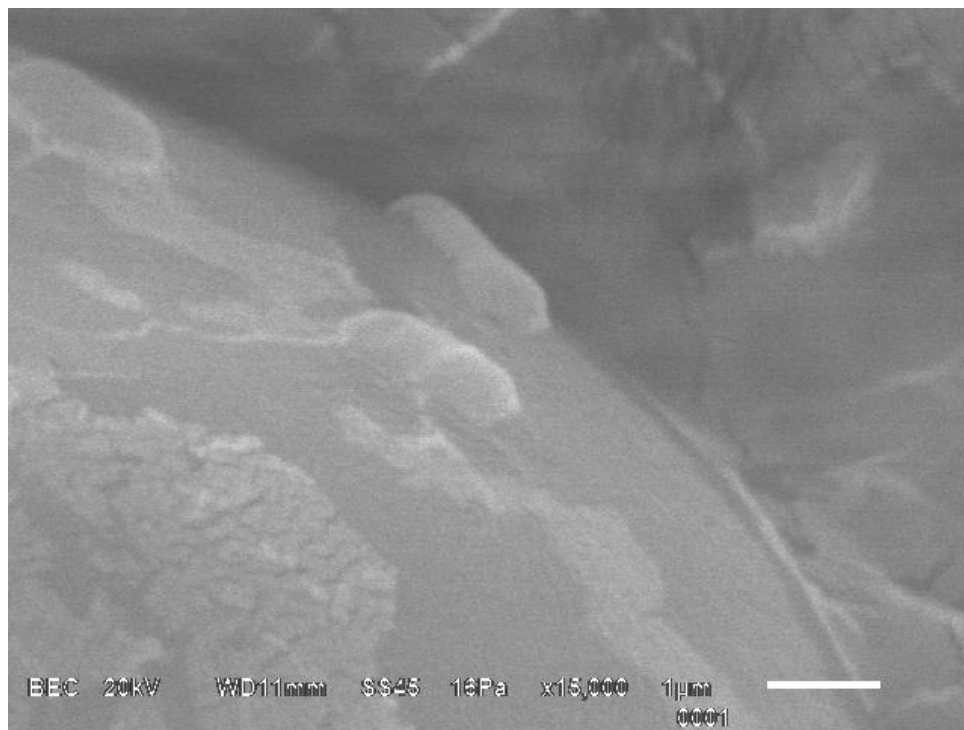


Figura 14. Observación de relieve de *L. reuteri* en la película comestible en el microscopio SEM.

7.8.2 Pruebas de almacenamiento

Se realizaron las primeras pruebas de almacenamiento a las películas con mucílago de nopal sin la adición de probióticos. Esta prueba se llevó a cabo durante nueve meses en los cuales se monitoreó que no se contaminaran o cambiaran de aspecto físico. Se utilizaron dos variables, iluminación y temperatura. Los resultados obtenidos demuestran que pueden estar en cualquier tipo de almacenamiento, ya sea con o sin luz, y a temperaturas bajas o altas sin presentar ningún cambio notorio en la apariencia (Figura 15).

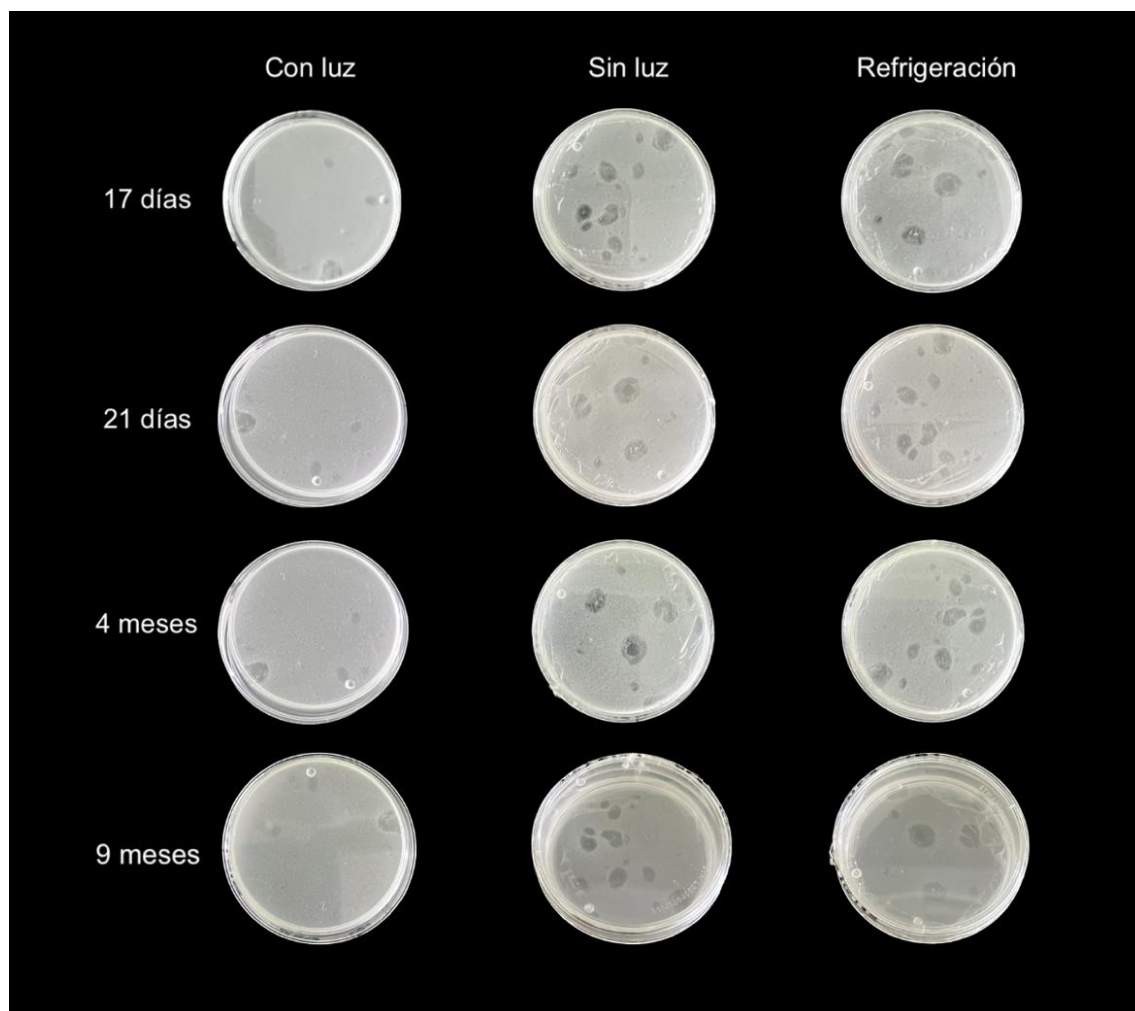


Figura 15. Pruebas de almacenamiento en películas con mucílago de nopal

Las segundas pruebas de viabilidad se llevaron a cabo con las películas comestibles adicionadas con probióticos. Estas pruebas se realizaron por un periodo de siete meses,

se siguió el mismo protocolo que en la prueba anterior, teniendo como única variable la adición de bacterias en las películas. En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos en esta prueba, en esta imagen es posible apreciar que no existió ningún cambio notorio después de estas pruebas de almacenamiento. Esto nos permite inferir que el tipo de almacenamiento al que estén expuestas las películas no influirá de forma importante en una contaminación o deterioro notorio.

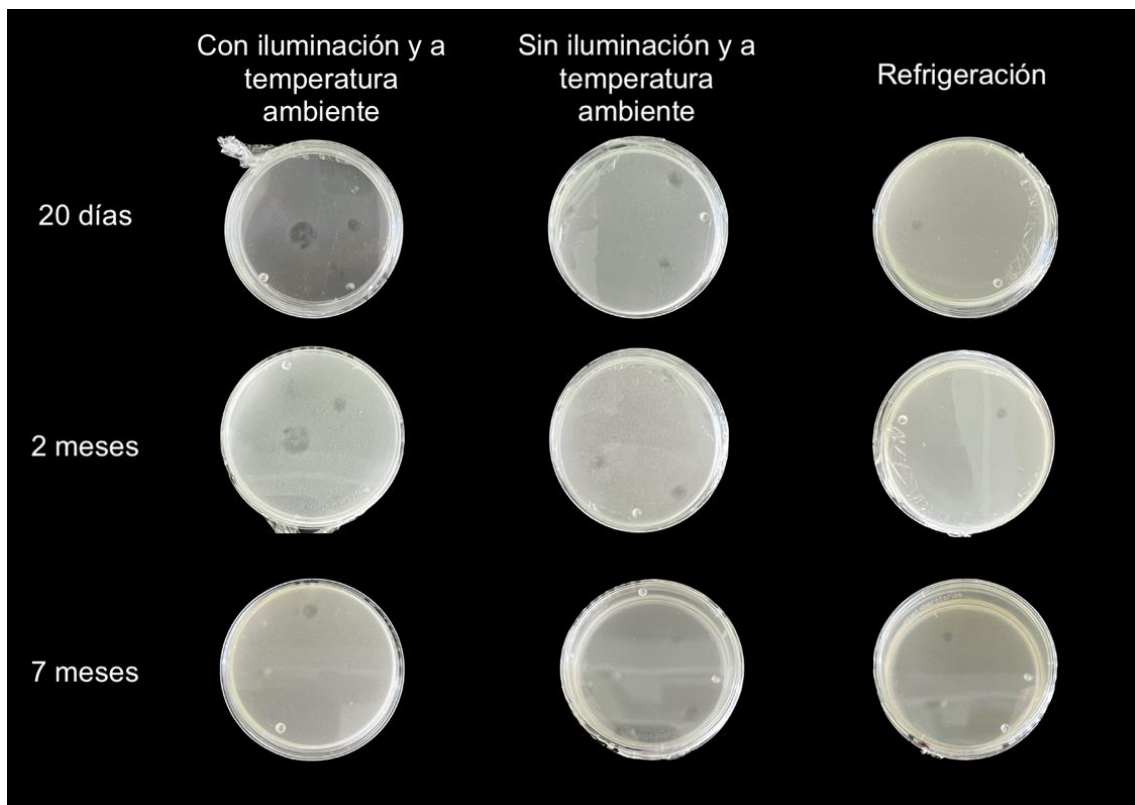


Figura 16. Pruebas de almacenamiento en películas con mucílago de nopal y probióticos

7.8.3 Determinación de humedad

En esta prueba se utilizaron las películas que cubrieran toda la superficie de la placa Petri. Se tomaron en cuenta 9 placas obteniendo como resultado final un porcentaje de pérdida de agua promedio de 81.47; los pesajes se llevaron a cabo antes y después del secado. De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible inferir que en el proceso de secado se pierde la mayor cantidad de masa de la mezcla, debido a que en esta etapa

se evapora la mayoría de agua presente en la mezcla, dando como resultado a la película comestible.

7.8.4 Viabilidad de probióticos en la película comestible

Se realizaron pruebas de viabilidad de las bacterias presentes en la película, esto fue de suma importancia para el monitoreo de las poblaciones inoculadas. Para la realización de estas películas se inoculo la mezcla con 1 ml de pellet celular con una concentración aproximada de 3.97×10^{11} UFC/ml. La imagen que se exhibe en la figura 17, muestra crecimiento de bacterias en la placa a la dilución 1×10^{-3} e incubada por 72 horas. De acuerdo con el conteo de colonias, se determinó que hay 6.5×10^4 UFC/ml.

Los resultados obtenidos indican que la película sí mantiene las bacterias viables, sin embargo, es importante mencionar que el número de UFC disminuyó de forma importante. Esto puede ser consecuencia del tiempo en el que se realizaron los estudios de viabilidad, ya que se llevaron a cabo después de estar durante dos meses en almacenamiento. Asimismo, las pruebas se realizaron en películas que fueron almacenadas a temperatura ambiente y expuestas indirectamente a la luz, lo cual pudo haber inferido en los resultados obtenidos. En estudios posteriores será fundamental realizar más pruebas de viabilidad con películas almacenadas en refrigeración y/o a temperatura ambiente sin exposición directa a la luz y en caso de ser necesario, modificar la formulación de las películas o metodología.

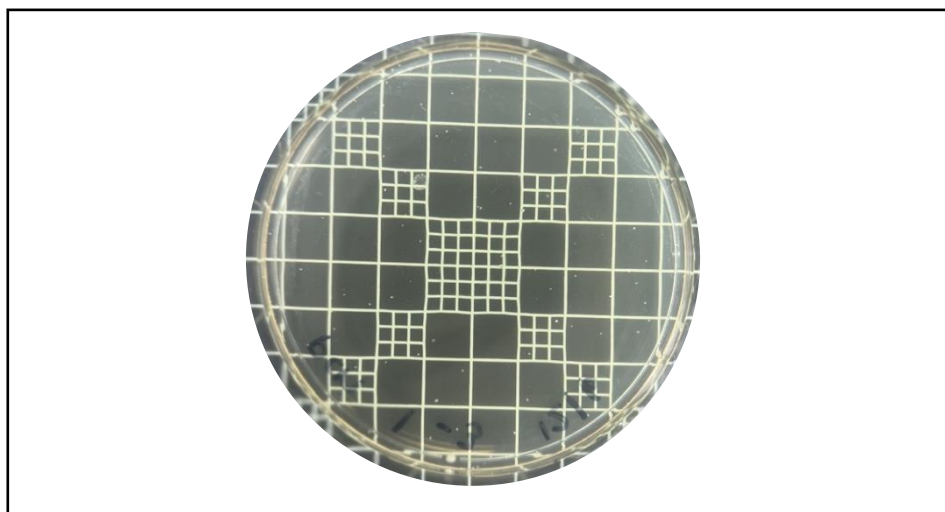


Figura 17. Pruebas de viabilidad en películas con mucílago de nopal

De forma complementaria, a continuación se muestran otros resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad. En la figura 18 se muestran placas a la dilución de 1×10^1 independientes. En la figura 18(A) se observa una placa con alta concentración de bacterias y un crecimiento notorio. Por lo contrario, en la figura 18(B) el crecimiento no es tan notorio como en la placa 18(A), sin embargo, sí cuenta con una alta concentración de colonias presentes. Es importante mencionar que éstas no pueden ser tomadas en cuenta como placas contables debido a la alta saturación de bacterias. No obstante, estos resultados permiten afirmar que sí hay bacterias viables en las películas.

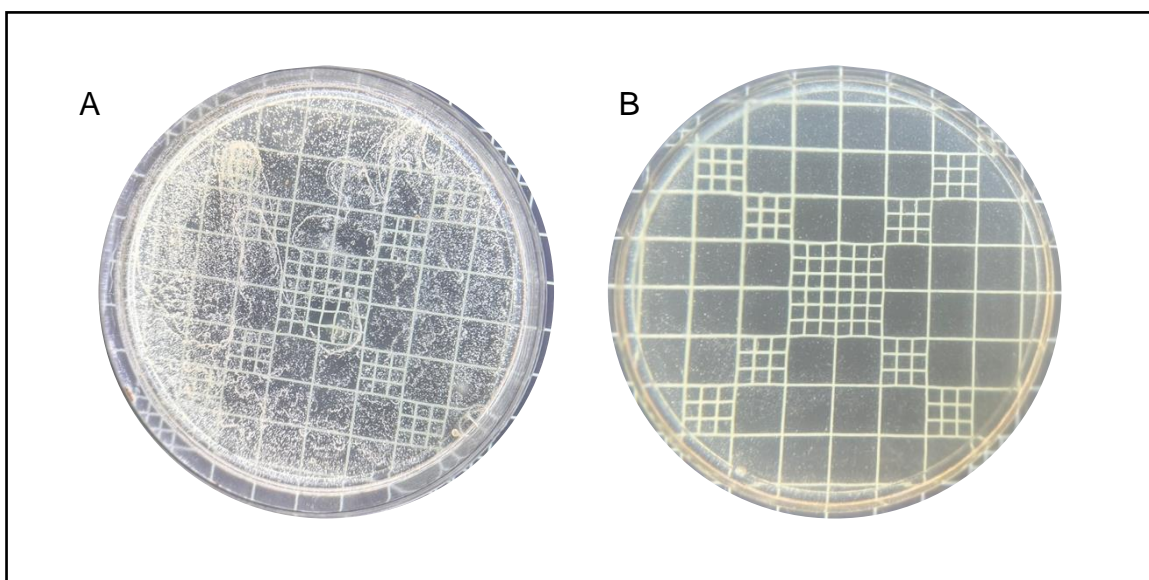


Figura 18. Resultados de pruebas de viabilidad en películas con mucílago de nopal en dilución a la 1×10^{-1} por duplicado.

7.8.5 Viabilidad de probióticos en tracto digestivo ante sales biliares

Las bacterias aisladas de yogurt artesanal en el Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, fueron sometidas a pruebas de viabilidad de sales biliares con la finalidad de conocer su comportamiento en el tracto gastrointestinal. En la figura 19 se observan los resultados obtenidos ante esta prueba, donde se trabajó con dos tipos de medios, uno selectivo (medio MRS adicionado con sales) y otro no selectivo (medio MRS).

Se identificó que el crecimiento fue más tardado en las placas con agar MRS adicionado con sales en comparación de las placas con medio MRS. Al comparar los dos tipos de inoculación en el medio selectivo, se identificó que las placas que habían sido inoculadas mediante estriado simple tenían colonias más grandes a diferencia de las que habían sido inoculadas mediante el vertido en placa. En la figura 19(B) es posible apreciar la diferencia en tamaño de colonias en medio MRS con sales biliares contra las colonias que crecieron en ese medio a la hora 3 de la simulación. Esto se debe a que el medio MRS tiene un pH (6.4 ± 0.2) cercano al ideal para el crecimiento de las bacterias. Por otra parte, la adición de sales biliares al medio pudo haber afectado el pH mencionado anteriormente, volviéndolo más básico, lo cual repercute de forma directa en el crecimiento de la bacteria (Mu *et al.*, 2018). Estos resultados demuestran que las bacterias sí son resistentes a las sales biliares y justifica por qué son grandes candidatas para su encapsulación, ya que al verse alterado su crecimiento con las sales biliares el recubrimiento comestible sería una excelente alternativa para mejorar su viabilidad.

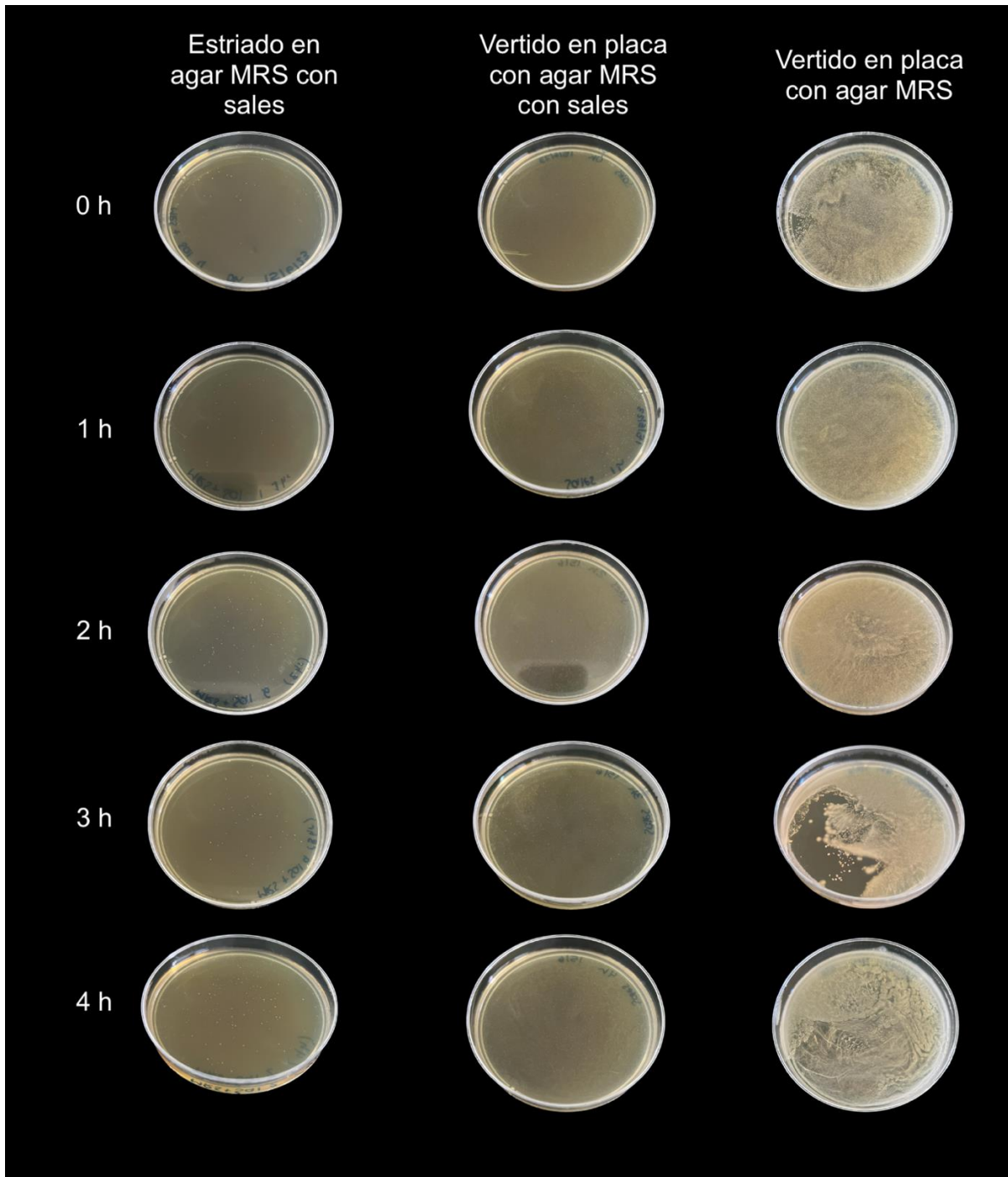


Figura 19. Pruebas de viabilidad de probióticos en tracto digestivo ante sales biliares

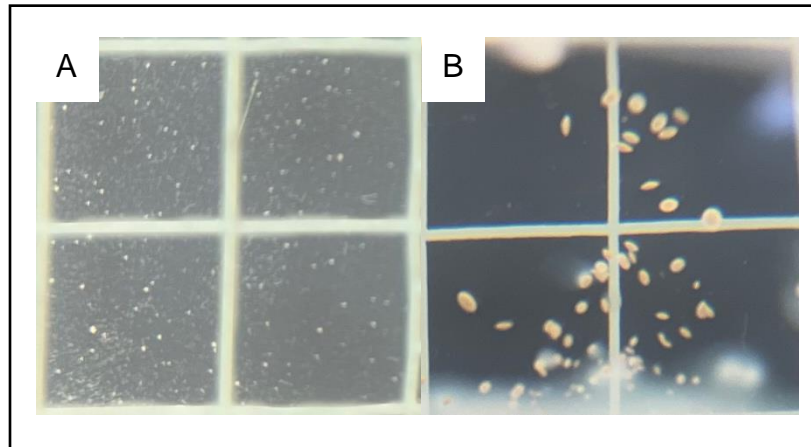


Figura 19(B). Comparación de tamaño de colonias (A) Con medio MRS adicionado con sales y (B) Con medio MRS

7.8.6 Viabilidad de probióticos en tracto digestivo ante acidez

Las bacterias aisladas fueron sometidas a pruebas de acidez. Esta prueba se llevó a cabo con dos medios, uno acidificado y uno estándar sin ningún tipo de modificación.

En la figura 20 se exhiben los resultados obtenidos en estas pruebas, las placas que se muestran a continuación estuvieron en incubación por 72 horas. Se tomaron 3 mediciones, en las cuales se identificó un crecimiento similar tanto en saturación como de tamaño. Los resultados obtenidos fueron los esperados debido a que una de las características más atractivas de esta cepa, es su capacidad de supervivencia a medios ácidos (Mu *et al.*, 2018). La resistencia bacteriana a los ácidos se encuentra estrechamente relacionado con el metabolismo de la arginina y glutamina (Teixeira *et al.*, 2014). En el caso específico de la arginina, la respuesta de tolerancia al ácido se debe a su degradación por la vía de la arginina deiminasa (Rollan *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos indican que la bacteria tiene la capacidad de sobrevivir en el sistema gastrointestinal.

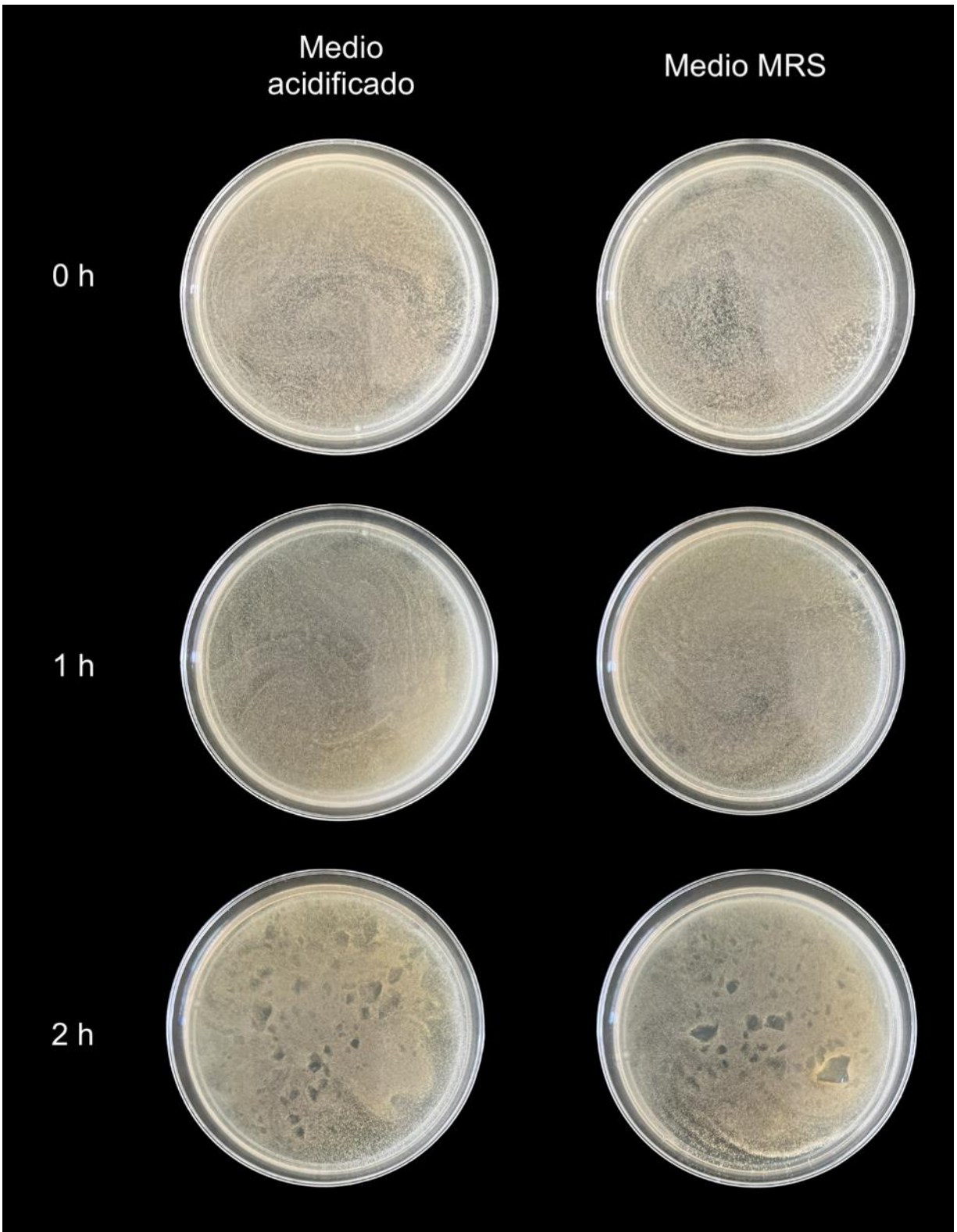


Figura 20. Resultados de viabilidad de probióticos en tracto digestivo ante acidez

8. CONCLUSIONES

- En relación con el primer objetivo específico, se logró la formulación de una película comestible con mucílago de nopal adicionada con *L. reuteri* la cual mostró tener características sensoriales. Se llevó a cabo la extracción de mucílago de nopal obteniendo rendimientos mayores a los reportados en otros estudios, esto permitirá ahorrar tiempo y recursos en trabajos posteriores. Los resultados obtenidos durante las pruebas de almacenamiento demostraron que, la luz y la temperatura no alteran la apariencia física de las películas, ni promueven su contaminación, por lo que no influyen en el tiempo de vida de anaquel de la película comestible formulada.
- Desarrollar la cinética de crecimiento de *L. reuteri* fue útil para la incorporación adecuada de las BAL en la película comestible formulada. Por otra parte, la determinación de la curva de crecimiento fue fundamental para la exitosa extracción del pellet celular.
- Se comprobó la factibilidad positiva de incorporar células bacterianas de *L. reuteri* en la formulación de una película comestible con mucílago de nopal, sin embargo, los resultados obtenidos muestran un bajo porcentaje de supervivencia.
- A partir de los resultados obtenidos en las pruebas simuladoras del tracto gastrointestinal humano, es posible concluir que las bacterias sí sobreviven a estas condiciones, postulándolas como candidatas idóneas para su aprovechamiento como bacterias con potencial probiótico. Asimismo, los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad ante sales biliares demuestran la necesidad formular una película comestible la cual mejore su viabilidad ante condiciones básicas del tracto gastrointestinal.
- En respuesta al objetivo general de esta investigación, el trabajo demostró que la película comestible de mucílago de nopal sí contribuye a mantener las bacterias viables; sin embargo, el porcentaje de supervivencia de las *L. reuteri* fue más bajo de lo esperado. No obstante, esta investigación sirve como precedente para posteriores estudios relacionados, en los cuales será oportuno analizar ajustes a la composición o metodología de la película.

9. PERSPECTIVAS

- Mejorar la formulación y/o combinar otras metodologías para aumentar el porcentaje de viabilidad.
- Ejecutar pruebas de viabilidad de *L. reuteri* en películas almacenadas en diferentes condiciones y comparar resultados obtenidos.
- Realizar vigilancia tecnológica en innovaciones de alimentos que sean compatibles con las películas formuladas.
- Evaluar posibilidad de realizar la solicitud de patente de la formulación de las películas comestibles con mucílago de nopal y *L. reuteri*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abraján, M. A. (2008). Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis doctoral. Universidad Politécnica De Valencia.
- Antonio, G., Tobón, J., & Hoyos, A. V. (2012). Microbiología. En *MEDICINA & LABORATORIO* (Vol. 18). <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2012/myl1211-12d.pdf>
- Apaza (2020). Influencia de la aplicación de recubrimientos biodegradables a base de mucílago de nopal (*Opuntia spp.*) y la temperatura de almacenamiento en la conservación de la palta (*Persea americana* Mill) variedad Hass. Tesis de grado. UNIVERSIDAD Nacional De Moquegua.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. 39(2). 23-39. <https://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>
- Avendaño-Romero G. C., López A. y Palou E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7 - 1 (2013): 87 – 96. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/46178354/ALGINATOS_I-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1659409514&Signature=YVHIYr3DRqUJIFbXX8mYbfBeKR M1KCD05EGbzAR~TFR7f0QKPpWfRzYqDV3LK7LGjJX29o7Q5r0sphUOv TiJV~zltA4xAznTJX5obhX1Mhi2ph755RUnJkICVJP4NrSgn9rMo~hcROdsS leMGNwvDCZ78T-65EJrnW-gtFwR2VN98ymgf6cBULeB4eLQNZgrhp2iFbfUN~FLNju9rX7uxBBWFQcf7 PY4nkM4Hp-BD88rN89mQxc7QRfwWAFGIX7oZkw6VCd6-C2GwcY4SxchO4oaWIZefmSp1ktdA8wdV7hTM2JqTFEOcCg8r9vw~qktBlk wbu9A7dAzX~~mMnvmYw &Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

- Barrón, D., Zavala, L. G., San Juan, P. X., Reyes, M. L. (2022). Evaluación del mucílago de nopal para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* 1449. Revista Jóvenes en la ciencia., 16(1), 1-6. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/7167>
- Benitende, S. y Sanchez, C. (2002) Crecimiento Bacteriano. Universidad de Entre Ríos, Catedra de Microbiología Agrícola. Recuperado de: http://www2.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf
- Bernedo P. y Sierra E. M. (2019) “aplicación de un recubrimiento comestible a base de mucilago de nopal (Opuntia ficus-indica) sobre la calidad del mango (Mangifera indica L.)”. Tesis de grado. Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa.
- Blanco, H., López, R., Rodríguez, T. y Báez M. (2012). Experiencia con el uso de lactobacilos acidófilos y su relación con la frecuencia de enterocolitis necrotizante e infección neonatal. Medical Country. 2(2). 11-13. <https://revistamedicaclcountry.com/app/default/files-module/local/documents/Experiencia%20con%20el%20uso%20de%20lactobacilos%20acidofilos.pdf>
- Britton, R. A. (2017) *Lactobacillus reuteri*. Floch, E. D. (Ed), The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. 89-97.
- Calvo, M. (s.f). Estructura del Almidón. Bioquímica de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/almidon.html>
- Capurso, L. (2019) Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG. A Review. Journal of Clinical Gastroenterology. 53(1). S1-S41. doi: 10.1097/MCG.0000000000001170
- Carnicé, R. T. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. Monografías Anales de Pediatría. 4(1). 30-41. <https://www.analesdepediatria.org/es-pdf-13092364>

- Casasm G. A., Rodríguez D., Téllez, G. (2010) Propiedades matemáticas del modelo de Gompertz y su aplicación al crecimiento de los cerdos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 23 (3) version ISSN 2256-2958
- Castañeda, C. (2018). Probióticos, puesta al día. Revista Cubana de Pediatría. 90(2). 286-298. ISSN 1561-3119
- Castillo, A., Martínez, H., Gómez, O., Posada, C., Londoño, S. M. y Rodríguez, M. E. (2022). El don del almidón: la partícula espesante. Ciencia UNAM. Recuperado de: <https://ciencia.unam.mx/leer/1262/el-don-del-almidon-la-particula-espesante>
- Castro G., Valbuena E., Sánchez E., Briñez W., Vera H. y Leal M. (2008) Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. Revista Científica Maracaibo. 28(5). ISSN 0798-2259. ISSN 2256-2958.
- Caycedo L, Corrales L. C. y Trujillo D. M. (2021) Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. Nova. 19(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>
- 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>
- Contreras-López, M. F. (2021). Elaboración de películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido-lácticas. Tesis de grado. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarde, A. y Galotto, M.J. (2005) Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia Picus-indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life, *Food Chemistry*, 91: 751-756.
- Domínguez, M. V, Flores, M. V, Flores, J., Montenegro, L. P., Morales, E., & Santillán, J. G. (2023). *Principios activos de plantas usadas en la medicina tradicional* (Patent 1.).
- Durán-Páramo E., Brito M. A., Muñoz J. M. y Robles F. (2019). LA INMOVILIZACIÓN CELULAR COMO HERRAMIENTA PARA LA INOCULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO. Instituto Politécnico Nacional. https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_V/CV-43.pdf
- El-Mostafa, K., el Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., el Kebbaj, M., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., & Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules*, 19(9), 14879–14901. <https://doi.org/10.3390/molecules190914879>
- Espino-Díaz, M., de Jesús Ornelas-Paz, J., Martínez-Téllez, M. A., Santillán, C., Barbosa-Cánovas, G. V., Zamudio-Flores, P. B., & Olivas, G. I. (2010). Development and Characterization of Edible Films Based on Mucilage of *Opuntia ficus-indica* (L.). *Journal of Food Science*, 75(6), E347-E352. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01661.x>
- Fajardo-Ochoa R., Osuna-Castro J. A., VillaVelázquez-Mendoza C., Escalante-Minakata P., Ibarra-Junquera V. (2011). INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS Y ENZIMAS. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 3(6). 42-51. https://www.researchgate.net/publication/220007839_Inmovilizacion_de_celulas_y_enzimas

- Fontané, L., Benaiges, D., Goday, A., Llauro, G. y Pedro-Botet, J. (2018) Influence of the microbiota and probiotics in obesity. *Clínica e Investigación en ARTERIOSCLEROSIS*. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2018.03.004>
- GMHF. (2020). *Conoce la familia Lactobacillus*. Gut Microbiota for Health. Recuperado de: <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/es/una-infografia-para-conocer-a-los-lactobacillus/>
- Gutiérrez Ramírez, L. A., Gómez Ospina, A. J., Arias Jaramillo, L. M., & Tangerife, B. (2007). Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. *Revista Lasallista de Investigación.*, 4(2), 37–42.
- Huertas, R. A., (2010). REVIEW. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS: PAPEL FUNCIONAL EN LOS ALIMENTOS. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012&lng=en&tlng=es ISSN 1692-3561
- Iañez, E. (2020) Ciclo celular y crecimiento. [Diapositivas de PowerPoint] Repositorio Microbiología General, Licenciatura de Biología. Universidad de Granada. https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm#_Toc58934319
- Infobae. (2017). Más allá del yogur: 6 alimentos ricos en probióticos para cuidar la salud. Recuperado 12 de julio de 2022, de <https://www.infobae.com/tendencias/nutriglam/2017/10/27/mas-alla-del-yogur-6-alimentos-ricos-en-probioticos-para-cuidar-la-salud/>
- Jiménez, A. (2015). Curva de crecimiento bacteriano. [Diapositivas de PowerPoint] Repositorio de la Universidad Autónoma de Santo Domingo. <https://es.slideshare.net/Altajimenez/curva-de-crecimiento-bacteriano>

- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, J., Shin, H. y Das, G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal Food and Drug Analysis*. 26. 927-939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- Lafuente G. (2017). "Glicerol: Síntesis y Aplicaciones". Trabajo para la obtención de Máster. Universidad Nacional de Educación A Distancia.
- 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),193-198. ISSN: 1665-0204. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81343176007>
- López, L. (2016) *Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes*. [Diapositiva de PowerPoint] Repositorio de Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México. https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Transferencia_de_conocimientos_Liz_Lopez_2015.pdf
- Madigan Michael T., Martinko John M., Parker Jack. (2004) Brock. *Biología de los Microorganismos*. (10a edición) PEARSON, Prentice Hall.
- Maier, R. M. y Pepper, I. L. (2015). Bacterial Growth. Pepper, I. L. (Ed.) *Environmental Microbiology*. 37-56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>
- Maneau-Hernández R. I., Borrego K., Liva M., Fariñas T. (2021) *Revista CENIC Ciencias Biologicas*. 52(1). 059-078. <https://www.redalyc.org/journal/1812/181268228007/html/>
- 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>

- Molina, F. A., Osorio, N. M., Yañez, M. E., Rojas, J. O., García, M. A. (2019). Recubrimientos de mucílago de nopal (*Opuntia ficus-indica*) y pectina con aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) en la conservación de naranjas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 29(2). 53-58.
- Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Langa, S., el Aouad, N., Arqués, J., Reyes, F., & Medina, M. (2014). Antimicrobial activity of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Food Microbiology*, 44, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.006>
- Morales, P. (2019) ¿Por qué el nopal y el amaranto podrían hacer frente a la crisis mundial de los alimentos? *Actualidad RT*. <https://actualidad.rt.com/actualidad/316112-nopal-amaranto-crisis-alimentos-mundial>
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>
- 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>
- Orozco, E. (2007). “*Elaboración y caracterización de películas de mucílago de nopal-pectina: efecto de la concentración del mucílago de nopal en las propiedades fisicoquímicas y mecánicas*”. Tesis de pregrado. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Orozco, J. F. (2011). *Procesos Celulares*. Procesos celulares. Recuperado 1 de agosto de 2022, de <http://procesoscelulares.pbworks.com/w/page/31162428/resumen%20de%2>

[0medidas%20directas%20e%20indirectas%20del%20crecimiento%20microbiano](#)

- Otey, F. and Westhoff, R. (1979) Biodegradable film compositions prepared from starch and copolymers of ethylene and acrylic acid. *Product R & D*, 16(4), 305-308. <https://doi.org/10.1021/i360064a009>
- Ozolife (2021) Lactobacillus reuteri. Propiedades. Ozolife. <https://ozolife.es/lactobacillus-reuteri/>
- Paredes-Martínez (2011). Establecimiento de las condiciones de centrifugación para la obtención de mucílago de nopal deshidratado. Tesis de grado. Universidad Autónoma de México.
- Pedrique, M. y Castro, N. (2008). Reproducción y crecimiento microbiano. [Diapositivas de PowerPoint] Repositorio de Catedra de Microbiología, Facultad de Farmacia. UCV. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_6_crecimiento.pdf
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M. y Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in nutrition*. 10(1). 49-66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
- Punina N. M. y Ulcuango R. B. (2022) “aplicación de una película comestible a base de mucílago de nopal y aceite esencial de orégano en la conservación poscosecha de la fresa (Fragaria x ananassa)”. Tesis de grado. Universidad Técnica De Cotopaxi.
- Ramírez, J. A., Parra, J. A., y Alvarez, A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de microorganismos. [Diapositivas de PowerPoint] Repositorio Institucional Unilibre. Ciencias de Salud. Universidad Libre de Pereira. <https://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/17610>

- Ramírez, J. C., Rosas, P., Velázquez, M. Y., Ulloa, J. A. y Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*. 2(7). 1-16. ISSN: 2007-0713
- Raquena, T. (2018). Bacterias lácticas en la alimentación y en la salud. Digital CSIC. Disponible en: [https://digital.csic.es/handle/10261/194782#:~:text=Las%20bacterias%20l%C3%A1cticas%20\(BAL\)%20constituyen,son%20oxidasa%20y%20catalasa%20negativos.](https://digital.csic.es/handle/10261/194782#:~:text=Las%20bacterias%20l%C3%A1cticas%20(BAL)%20constituyen,son%20oxidasa%20y%20catalasa%20negativos.)
- Rodríguez, J. A. y Ulloa, J. E. (2017). ALTERNATIVA DIDÁCTICA PARA EL ESTUDIO DEL MODELO GOMPERTZ. *Red de Centros de Investigación en Matemática Educativa AC. II*. ISSN: 2594-1046
- Rollan, G., Lorca, G. L., & Font de Valdez, G. (2003). Arginine catabolism and acid tolerance response in *Lactobacillus reuteri* isolated from sourdough. *Food Microbiology*, 20(3), 313–319. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00139-9](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00139-9)
- Ruiz H. F. y Guerrero B. J. A. (2009) Aplicación de películas comestibles a base de quitosano y mucílago de nopal en fresa (*Fragaria ananassa*) almacenada en refrigeración. UDLAP.
- 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., Blanca C., & Montoya C., Olga I. (2003). Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. *Vitae*, 10(2),20-26. ISSN: 0121-4004. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169817981002>
- Salazar, B. C., & Montoya, O. I. (2003). Importancia de los probióticos y prebióticos en importance of the probiotics and prebiotics in the human health. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 10(2), 20–23. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169817981002>

- Salinas V. M., Trejo M.A., Lira A. (2015). Propiedades físicas, mecánicas y de barrera de películas comestibles a base de mucílago de nopal como alternativa para la aplicación en frutos. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha* Vol 16(2):193-198
- Salvucci, E. (2017). Crecimiento Microbiano: Hacia una nueva biología. Wordpress. Recuperado de: <https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/#:~:text=Es%20importante%20conocer%20la%20cin%C3%A9tica,el%20cultivo%20a%20mayores%20escalas.>
- Sánchez, L. y Tromps, J. (2014) *In vitro* characterization of acid lactic bacterias with probiotic potential. *Revista de Salud Animal*, 36(2), 124-129. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2014000200008&lng=es&lng=en ISSN 0253-570X
- 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/10.3390/medicina57070643>
- 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>
- Teixeira, J. S., Seeras, A., Sanchez-Maldonado, A. F., Zhang, C., Su, M. S.-W., & Gänzle, M. G. (2014). Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*, 42, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.015>
- Todar, K. (2019). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Recuperado de http://textbookofbacteriology.net/lactics_4.html
- Vargas, L., Gamiño, Z., Fuentes, R. y Contreras, D. (2018). Mucílago de nopal y su aplicación en la obtención de biopolímeros. *Naturaleza y Tecnología*. 5(1). 24-35. ISSN:2007-672X

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>

Zeratsky, K. (2020) ¿Qué son los probióticos y los prebióticos? MayoClinic. Recuperado de: <https://www.mayoclinic.org/es-es/healthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/expert-answers/probiotics/faq-20058065>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., y Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.

ANEXOS

1. Script de R Studio para determinar el 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)
```

```
# Ajuste del modelo de Gompertz
```

```
library(minpack.lm)
```

```
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)
```

```
# Gráfica del modelo ajustado
```

```
densidad_optica_grid <- seq(from = min(densidad_optica), to =  
max(densidad_optica), by = 0.001)
```

```
ufc_ml_pred <- 10^predict(gompertz_fit, newdata = list(densidad_optica =  
densidad_optica_grid))
```

```

plot(log10(ufc_ml) ~ densidad_optica, data = data.frame(densidad_optica =
densidad_optica, ufc_ml = ufc_ml), pch = 15, ylim = c(5, 11), xlim = c(0,
max(densidad_optica)*1.1), xlab = "Densidad Óptica (600nm)", ylab = "UFC/mL")

lines(log10(ufc_ml_pred) ~ densidad_optica_grid, type="l", lwd=3, col = c("#ff9933"))

#####

# Predicción para una densidad óptica de X numero

densidad_optica_new <- 2.386

ufc_ml_pred_new <- 10^predict(gompertz_fit, newdata = list(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)))

```