

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



CARACTERIZACIÓN DE CÁPSULAS DE MUCÍLAGO DE CHÍA (*Salvia hispánica* L.) PARA ENCAPSULAR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

POR:

GUADALUPE RUEDA ALTUNAR

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2019

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**CARACTERIZACIÓN DE CÁPSULAS DE MUCILAGO DE CHIA (*Salvia hispánica*
L.) PARA ENCAPSULAR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

POR:

GUADALUPE RUEDA ALTUNAR

TESIS

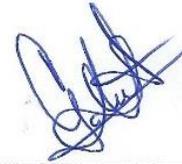
Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprobada por el comité de asesoría:



M.C. Sarahí del Carmen Rangel Ortega
Asesor principal



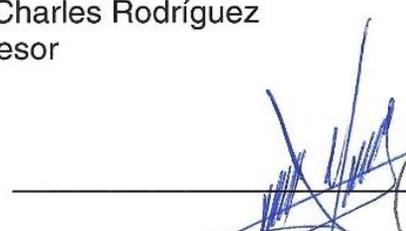
Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez
Coasesor



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Coasesor



Dr. Armando Robledo Olivo
Coasesor



Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal
Saltillo, Coahuila, México, Diciembre 2019



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**CARACTERIZACIÓN DE CÁPSULAS DE MUCILAGO DE CHIA (*Salvia hispánica*
L.) PARA ENCAPSULAR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

POR:

GUADALUPE RUEDA ALTUNAR

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprobada por el comité evaluador:

M.C. Sarahí del Carmen Rangel Ortega (Presidente)



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez (Vocal)



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez (Vocal)



Dr. Armando Robledo Olivo (Vocal suplente)



Saltillo, Coahuila, México, Diciembre 2019

MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADÉMICA

La suscrita **Guadalupe Rueda Altunar** alumna de la carrera Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos con matrícula 41155151 y autora de la siguiente tesis manifiesta que:

- 1.- Reconozco que el plagio académico constituye un delito que está penado en nuestro país.
- 2.- Las ideas, opiniones, datos e información publicadas por los otros autores y utilizadas en la presente tesis han sido debidamente citadas reconociendo la autoría de la fuente original.
- 3.- Toda información consultada ha sido analizada e interpretada por el suscrito y redactada según su criterio y apreciación, de tal manera que no se ha incurrido en el "copiado y pegado" de dicha información.
- 4.- Reconozco la responsabilidad sobre los derechos del autor de los materiales bibliográficos consultados por cualquier vía y manifiesto no haber hecho mal uso de ninguno de ellos.
- 5.- Entiendo que la función y alcance de mi comité de asesoría está circunscrito a la orientación de guía respecto a la metodología de la investigación realizada para la presente tesis, así como del análisis e interpretación de mis resultados obtenidos, y por lo tanto eximo de toda responsabilidad relacionada al plagio académico a mi comité de asesoría y acepto que cualquier responsabilidad respecto es únicamente mía.

Atentamente



GUADALUPE RUEDA ALTUNAR

Tesista

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme esta bendición que es la vida, por darme salud, familia y amigos, por permitirme pertenecer a esta institución que me formo como profesional y poder incorporarme a la vida laboral para aportar mis conocimientos y habilidades ante la sociedad.

A mi Alma Mater, por ser mi segunda casa durante esta etapa, por cada aprendizaje y esfuerzo logrado, por darme las herramientas necesarias para salir adelante y formarme como profesional.

M. C Sarahi del Carmen Rangel ortega, por su apoyo absoluto durante el proyecto, por la paciencia y confianza para poder llevar a cabo esta investigación y poder concluir con éxito esta etapa de mi formación.

Dra. Dolores Gabriela Martínez, por compartir su tiempo, apoyo y conocimientos en el transcurso del proyecto y por su valiosa colaboración.

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez y el **Dr. Armando Robledo Olivo**, por sus conocimientos transmitidos, y formar parte del presente trabajo.

A mi hermana Ing. Ana lidia, por su amistad, apoyo incondicional durante estos años y el periodo de este trabajo, por su tiempo, conocimientos, y ser participe y testigo de este proyecto.

M.C Alma Leticia Martínez Herrera, por su apoyo y tiempo brindado durante el transcurso de esta investigación.

A todos los docentes del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos que siempre me orientaron y brindaron su apoyo.

DEDICATORIAS

A mis padres, Bartolomé Rueda y Eleuteria Altunar, quienes siempre me demostraron su amor, sus ganas de sacar adelante a su familia e inspirarme a ser mejor persona. Un enorme agradecimiento por el apoyo que me brindaron, principalmente en los momentos difíciles, siempre demostraron sacrificios para ver mi sueño cumplido, quienes son mi motor de seguir adelante, esta meta cumplida nunca hubiera sido posible si no hubieran estado ustedes. Gracias.

A mis hermanos, quienes compartimos tantos momentos felices y siempre estuvieron en las buenas y en las malas, que hemos aprendido juntos lo que ser familia y darme esas ganas de seguir adelante brindándome el apoyo en el transcurso de cada año de mi carrera Universitaria.

A José Antonio, por ser mi compañero de vida, por demostrarme cariño y apoyo, con quien compartimos los intereses y metas, a la persona que me da fuerzas día a día y me regala de su tiempo a pesar de las dificultades. Siempre serás mi apoyo y fuerza de seguir adelante.

A mi amiga, Guadalupe Pech, con la cual compartimos momentos increíbles y siempre ha estado ahí para apoyarme, quien ha sido como una madre durante estos últimos años, ha pasado a ser parte de mi familia.

A mi asesora M.C. Sarahi Rangel Ortega, por sus enseñanzas, paciencia y por el respaldo incondicional en esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
I.- INTRODUCCIÓN	3
II.- JUSTIFICACIÓN	5
III.- HIPÓTESIS	6
IV.- OBJETIVOS	6
4.1 General	6
4.2 Específicos	6
V.- REVISIÓN DE LITERATURA	7
5.1 Mucilagos	7
5.1.1 Concepto	7
5.2 La chía (<i>Salvia hispánica</i> L.)	7
5.2.1 Descripción y composición de la semilla de chía	8
5.2.2 Beneficios o propiedades nutricionales	10
5.2.3 Mucilago de chía	10
5.2.4 Usos y aplicaciones	11
5.3 Encapsulados	12
5.3.1 Morfología y técnicas de encapsulación	12
5.3.2 Materiales empleados para encapsulación	18
5.3.3 Usos (principios activos)	21
5.4 Bacterias Acido Lácticas (BAL)	22
5.4.1 Características generales	22
5.4.2 Fuentes de obtención	23
5.5 Importancia de la encapsulación de Bacterias Acido Lácticas (BAL)	24

VI.- MATERIALES Y METODOS	25
6.1 Ubicación	25
6.2 Caracterización de mucilago de chíá	25
6.2.1 Hidratación de la semilla de chíá (<i>Salvia hispánica L.</i>).....	25
6.2.2 Extracción de mucilago de chíá (<i>Salvia hispánica L.</i>).....	26
6.3 Evolución de concentración de mucilago de chíá y alginato de sodio	27
6.3.1 Concentración de alginato de sodio.....	27
6.3.2 concentración en la mezcla de alginato de sodio y mucilago de chíá	27
6.3.3 Pruebas reológicas de la mezcla	28
6.4 Preparación de las capsulas mediante la técnica de gelificación iónica	28
6.4.1 Caracterización e hidratación de las capsulas.....	29
6.5 Acondicionamiento celular de las BAL.....	30
6.5.1 Preparación de medio de cultivo y conteo colonial de las BAL.....	31
6.5.2 Evaluación de la concentración de las BAL para la encapsulación	32
6.6 Encapsulación de las BAL	32
6.6.1 Preparación de las mezclas biopolimericas.....	32
6.6.2 Crecimiento de las BAL	33
6.6.3 Encapsulación de las BAL	34
6.7 Viabilidad de células (BAL) encapsuladas	35
6.8 Determinación de viabilidad	36
VII.- RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
7.1 Determinación de rendimiento de mucilago de chíá	37
7.2 Comportamiento reológico de la mezcla mucilago de chíá y alginato de sodio	38
7.2.1 Viscosidad en función de la velocidad de deformación de la mezcla mucilago-alginato	40

7.2.3 Determinación del índice de consistencia y el índice de comportamiento del flujo.....	41
7.3 Formación de capsulas por gelificación iónica.....	42
7.3.1 Morfología de capsulas deshidratadas	45
7.4 Cinética de hidratación de las cápsulas.....	46
7.5 Determinación de colonias viables de BAL.....	48
7.6 Encapsulación de BAL.....	49
7.7 Viabilidad de las BAL encapsuladas	51
VIII.- CONCLUSIÓN	53
IX.- RECOMENDACIONES	54
X.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas, flores y semillas de chía	8
Figura 2. Semillas de chía oscura y blanca.....	9
Figura 3. Micrografía de semilla de chía a) semillas seca y b) semilla hidratada con formación de “capsula mucilaginosa”.....	11
Figura 4. Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas, a) forma esférica, b) forma multi-pared, c), d), e) y f) estructuras matriciales, g) forma irregular y h) forma multi-núcleo.....	13
Figura 5. Principio del método de recubrimiento.....	16
Figura 6. Hidratación de la semilla de chía.....	25
Figura 7. Extracción en centrifuga y mucilago de chía.....	26
Figura 8. Viscosímetro de cono y plato Physica MCR 501.....	28
Figura 9. Capsulas en solución de CaCl ₂ y capsulas para deshidratación.....	29
Figura 10. Medición en micrómetro mitutoyo.....	30
Figura 11. Medición en software DinoCapture 2.0	30
Figura 12. Reactivación de BAL.....	31
Figura 13. Siembra de vaciado en placa de BAL (QJ y QR).....	31
Figura 14. BAL para la encapsulación.....	33
Figura 15. a) Encapsulación, b), c) deshidratación en campana (Isaac lab), y d) capsula deshidratada.....	34
Figura 16. Hidratación y siembra en agar MRS.....	35
Figura 17. Comportamiento reológico de la mezcla de mucilago de chía- alginato de sodio, siendo el último en concentraciones de: a) 2% de alginato, b) 3% de alginato y c) 5% de alginato de acuerdo a la deformación del fluido mediante la aplicación de esfuerzo cortante.....	39
Figura 18. Variación de viscosidad del fluido al incrementar la velocidad de deformación en diferentes concentraciones de alginato: a) 3% de alginato de sodio, b) 5% de alginato de sodio.....	41
Figura 19. Micrografía de las capsulas en diferentes concentraciones de alginato de sodio a) 2%, b) 3% y c) 5% de la muestra 3 en proporción (%M=50, %A=50).....	45

Figura 20. Micrográficas de capsulas deshidratadas en 3% de alginato (%M=50, %A=50).	46
Figura 21. Micrografía de capsulas en concentración 3% de alginato de sodio y proporción de %M=50, %A=50 (Muestra 3) en diferentes tiempos de hidratación ($\varnothing=1.243\text{mm}$): a) 1h ($\varnothing=1.829\text{mm}$), b) 2h ($\varnothing=1.981\text{mm}$), c) 3h ($\varnothing=2.05\text{mm}$), d) 4h ($\varnothing=2.104\text{mm}$).	48
Figura 22. Conteo colonial de las BAL en etapa de crecimiento exponencial.	49
Figura 23. Formación de capsulas con BAL húmedas y deshidratadas.	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos de encapsulación según el tipo de estructura formada.....	14
Cuadro 2. Condiciones de hidratación y extracción de mucilago de chía.	26
Cuadro 3. Concentración porcentual de la mezcla de mucílago de chía y alginato de sodio.	27
Cuadro 4. Concentración de BAL para su encapsulación.	32
Cuadro 5. Condiciones de esterilidad de los biopolímeros.....	33
Cuadro 6. Muestra de hidratación de las capsulas.....	35
Cuadro 7. Parámetros reológicos de acuerdo a la ley de la potencia de las mezclas mucilago de chía- alginato de sodio.....	42
Cuadro 8. Evolución de las características físicas de las capsulas.....	44
Cuadro 9. Velocidad de hidratación de las capsulas.....	46

RESUMEN

La técnica de encapsulación ha sido de mayor tendencia debido a una mejor estabilidad de los compuestos bioactivos en su proceso y almacenamiento, por lo que, ha habido la necesidad de mezclar biopolímeros para mejorar las características reológicas y gelificantes. La aplicación de la técnica de gelificación iónica es considerada simple, eficiente y de bajo costo que no requiere disolventes o equipos especializados. El mucílago de la semilla de chía se ha utilizado como material de pared en microcápsulas de compuestos activos, favoreciendo sus propiedades de emulsión y gelificación. La incorporación de BAL para la encapsulación en biopolímeros ha reducido la pérdida de viabilidad ante condiciones ambientales y su conservación.

En el presente estudio se realizaron análisis reológicos en diferentes proporciones de la mezcla de mucílago de chía y alginato de sodio en concentración (2, 3 y 5%), con el objetivo de conocer el efecto de la viscosidad y comportamiento del fluido. Posteriormente se formaron cápsulas experimentales mediante la técnica de gelificación iónica, para conocer el tamaño y forma de las capsulas mediante un software DinoCapture 2.0, así mismo la velocidad de hidratación de las mismas, con la finalidad de seleccionar la capsulada adecuada, capaz de proteger las bacterias ácido lácticas a encapsular. Las cepas de bacterias ácido lácticas utilizadas para la encapsulación se identificaron como QJ y QR reactivadas en caldo MRS seguido a un recuento de colonias en agar MRS. Los resultados mostraron que las mezclas presentaron un comportamiento no newtoniano tipo pseudoplástico, ya que el índice de consistencia aumenta conforme a mayor presencia de alginato de sodio, lo cual dificulta su fácil manejo en la formación de las cápsulas. Además, se observó que en la concentración de 50% de mucílago de chía y alginato de sodio al 3% existe la formación de capsulas uniformes, moldeables y esféricas. Así mismo, la cinética de hidratación de las capsulas indicó que la presencia del mucílago de chía en mayor concentración, facilita la velocidad de hidratación y absorbe rápidamente su peso en

agua. Por otro lado, la inoculación de las bacterias ácido lácticas (BAL) QJ y QR para su encapsulación presentaron concentraciones de 8.17 y 8.06 log¹⁰ UFC/ml respectivamente. La viabilidad del encapsulado resulto ser negativa, sin presencia de bacterias al transcurso de su liberación.

Palabra clave: Bacterias ácido lácticas, Salvia hispánica L, Cápsulas, Gelificación iónica.

I.- INTRODUCCIÓN

La chía (*Salvia hispánica L.*) es una planta herbácea que pertenece a la familia Labiatae, originaria de México y Guatemala. La planta produce numerosas semillas pequeñas de color oscuro y blancas, la semilla ofrece una nueva oportunidad para mejorar la nutrición humana, siendo una fuente natural de ácidos grasos omega-3, antioxidantes, proteína, vitaminas, minerales y fibra dietética. Una de las características de la semilla es la liberación del mucílago al entrar en contacto con el agua, se emerge inmediatamente y en un tiempo corto se forma una cápsula mucilaginosa. El mucílago de la semilla de chía es un carbohidrato complejo de alto peso molecular, constituyente de un hidrocoloide con potencial uso como agente espesante y encapsulante en la industria de alimentos y farmacéutica. Se han realizado investigaciones previas sobre el mucílago de chía como una fuente natural de agentes encapsulantes de probióticos en matrices alimentarios que proporcionen protección.

La encapsulación está definida como una tecnología de empaque en miniatura de materiales sólidos o líquidos contenidos en cápsulas que pueden liberar el contenido en condiciones controladas. La aplicación de mucílago de chía para la formación de cápsulas, permitirá incrementar las opciones de sustitución de agentes encapsulantes comúnmente utilizados en la encapsulación de sustancias bioactivas (sabores, aceites esenciales, probióticos, etc.), principalmente probióticos como la bacteria ácido láctica (BAL).

La encapsulación de BAL ha llamado la atención por ser un método que mejora la estabilidad de ellas en productos alimenticios funcionales y que además presenta actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos patógenos. De acuerdo a Ding y Shah (2009) la encapsulación puede mejorar la sobrevivencia de estos microorganismos durante el procesamiento, almacenamiento de alimentos y también durante el paso a través de tracto gastro-intestinal humano. El método por gelificación iónica es una técnica química, fácil y rápida para encapsular células vivas siendo las BAL utilizando hidrocoloides (mucílago y alginato) como materiales encapsulantes.

Este proceso consiste en la suspensión del compuesto a encapsular en una solución acuosa de la mezcla de mucílago de chía y alginato de sodio, mediante goteo sobre una solución de cloruro de calcio, produciendo la gelificación instantánea de las mismas.

Este trabajo de investigación pretende encontrar las condiciones de estabilidad, funcionalidad del mucílago aislado de la chía y la mezcla con alginato de sodio, con la finalidad de delimitar su uso como agente encapsulante para las bacterias ácido lácticas (BAL) provenientes de quesos de cabra, y ser aplicables en productos de elaboración artesanal con función antimicrobiana.

II.- JUSTIFICACIÓN

La encapsulación de aditivos cobró mayor importancia a finales de los años 90 con la encapsulación de sabores que incrementaron el interés por encontrar y mejorar técnicas, por lo que abre nuevas pertinencias de su aplicación a la industria.

Recientemente en la industria alimentaria se ha utilizado la tecnología de encapsulación de diferentes sustancias bioactivas como un método de protección y recubrimiento de materiales con la finalidad de extender la vida de anaquel y ser sometidos en diferentes procesos de liberación controlada brindando beneficios a la salud al consumidor. Por otro lado, la encapsulación de bacterias ácido lácticas (BAL) ha llamado la atención para su supervivencia dentro del producto y ser liberados a condiciones de reproducción. Uno de los enfoques más predominantes es el estudio del mucilago de chía como material encapsulante de bacterias ácido lácticas (BAL) y fuente de viabilidad para su aplicación.

Debido a la importancia de encapsular bacterias ácido lácticas (BAL), el mucílago de chía (*Salvia hispánica* L.) conlleva a la preservación de sustancias añadidas otorgando la supervivencia de estas sin afectar el medioambiente. Esta tecnología ofrece una mejor condición como una barrera al paso de oxígeno con efectos probióticos e intervenir su uso a la sociedad.

Por lo anterior, uno de los posibles usos de BAL encapsulada es en la producción de queso artesanal, ya que en ciertos casos son afectados por microorganismos patógenos que interfieren en su proceso. Es por ello que surge la noción de encapsular bacterias ácido lácticas (BAL) en un matriz de mucílago de chía aplicando la técnica de gelificación iónica, con la finalidad de utilizar las capsulas como una alternativa a la pasteurización de la materia prima (leche) con propiedades antimicrobianas.

III.- HIPÓTESIS

La BAL encapsuladas en un matriz de mucílago de chía y alginato de sodio tendrán la capacidad de resistir y ser viables para su posterior aplicación en diferentes procesos de la industria alimentaria.

IV.- OBJETIVOS

4.1 General

Determinar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas (BAL) encapsuladas en una matriz de mucílago de chía y alginato de sodio mediante la técnica de gelificación iónica.

4.2 Específicos

- Caracterizar el proceso de extracción del mucílago de chía (*Salvia hispánica* L.).
- Probar distintas concentraciones de mucílago-alginato de sodio para seleccionar aquella con la que se obtengan las mejores características en la formación de cápsulas regulares.
- Determinar el número de UFC/ml de BAL antes de su encapsulación.
- Determinar el número de UFC/ml después de la encapsulación.

V.- REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Mucílago

5.1.1 Concepto

Los mucílagos son fibras solubles presentes en los vegetales, productos fisiológicos que se encuentran en células especiales dentro de los tejidos, principalmente en tejido externo de las semillas y órganos como raíces, bulbos, tubérculos, flores y hojas (Serván, 2018). Son utilizados como agente de retención de agua, siendo una sustancia vegetal viscosa y coagulable al alcohol. Es una solución análoga por su composición y sus propiedades a las gomas, por lo que presentan soluciones viscosas en presencia de agua formando un pseudodilución gelatinoso (Bach. Carhuamaca, 2013). Su estructura química general representa a polisacáridos heterogéneos con cadenas de ácido glucurónico y galacturónicos combinados con hexosas y pentosas, donde presentan un alto peso molecular, superior a 200 000 g/mol. Los azúcares y el ácido galacturónico son compuestos que tienen funciones hidroxilos, por lo que esta materia es soluble o hinchable en agua, formando geles o soluciones acuosas (Arapa, 2017). Por lo tanto, son usados como agente espesante en productos alimenticios y farmacéuticos. El mucílago se encuentra principalmente en algunos hongos, en las algas, semillas de lino (linaza), en raíces de malva, membrillo, nopal, y semillas de chía.

5.2 La chía (*Salvia hispánica* L.)

La chía (*Salvia hispánica* L.) es una planta herbácea anual que pertenece a la familia Lamiaceae, nativa del sur de México y el norte de Guatemala. La semilla de chía junto con maíz, frijoles y amaranto, fueron cultivos importantes para las civilizaciones precolombinas en América, incluidas las poblaciones mayas y aztecas. Aunque la planta es cultivo de verano, hoy en día es comercializada en México, Bolivia, Argentina, Ecuador y Guatemala debido a la importancia de sus beneficios a la salud (Ixtaina *et al.*, 2008).

Salvia hispánica L. es comúnmente conocido como la chía siendo esta palabra una adaptación española al vocablo náhuatl que significa “semilla de la que se obtiene aceite”, esta planta y sus semillas fue de uso importante en la época prehispánica, eran apreciados por sus usos medicinales, alimenticios y artísticos, así como ofrendas en ceremonias religiosas (Cahill, 2003)

La planta puede crecer hasta 1 m de altura y tiene hojas dispuestas de forma opuesta de 4 a 8 cm de largo y 3 a 5 de ancho que presenta pequeñas flores hermafroditas blancas o moradas con tamaños que oscilan entre 3 a 4 mm (Figura 1). El fruto de esta planta, es típicamente un esquizocarpo consistente en lóculos que forman 4 mericarpios parciales denominados núculas o semillas, son indehiscentes, ovaladas, lisas y brillantes, que van desde el color negro, gris y negro con manchas irregulares a blanco (Bueno *et al.*, 2010).



Figura 1. Plantas, flores y semillas de chía

Fuente: Orona *et al.*, 2017.

5.2.1 Descripción y composición de la semilla de chía

Las semillas de chía son pequeñas, de aproximadamente de 1 a 1.2 mm de ancho y 2 a 2.2 mm de longitud; tiene una forma ovalada y ligeramente aplanada. El color habitual de la chía es gris con manchas oscuras (Figura 2) y la semilla consta de tres partes

principales: el pelaje, el embrión y el endospermo (Rovati *et al.*, 2008). La testa o capa sirve como una capa protectora de chíá (*Salvia hispánica* L.) para el embrión y contiene el mucílago, una sustancia de polisacárido que se hincha cuando entra en contacto con el agua formando una cápsula pegajosa y gelatinosa alrededor de la semilla y fuertemente adherida a la semilla. La composición de la semilla de chíá en ciertos casos varía dependiendo del lugar donde crece; sin embargo, se ha informado que la de chíá contiene aproximadamente 5.80% de humedad, 16.54% de proteína, 30.74% de lípidos, 34.40% de fibra dietética, siendo una buena fuente de niacina y vitaminas A y C (USDA, 2004).

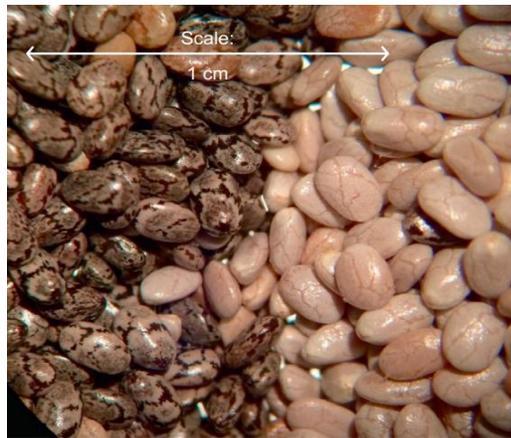


Figura 2. Semillas de chíá oscura y blanca.

Fuente: Valdivia y Tecante, 2015.

La semilla de chíá contiene más proteína y aceite que otros granos (arroz, cebada, avena, trigo, maíz), por lo que sería una fuente de alimento muy atractiva para países en desarrollo, dado que el aceite posee un alto contenido de ácido linolénico omega-3, esencial en la alimentación y efectivo para disminuir las afecciones cardiovasculares. Se pueden encontrar diferentes preparaciones de chíá en el mercado. Estos incluyen semillas crudas, cápsulas de aceite como suplementos, harina de semillas e ingredientes para alimentos (Ayerza y Coates, 2005; Peperkamp, 2014). Y se le atribuyen propiedades nutricionales importantes.

5.2.2 Beneficios o propiedades nutricionales

La chía se promociona como un producto alimenticio saludable y se usa como suplemento e ingrediente en diferentes proporciones. Los aspectos de salud y el valor nutricional son las principales razones por las cuales los consumidores compran semillas de chía. Los principales componentes químicos aislados de la *S. hispánica* están los ácidos grasos esenciales (ácido α -linolénico (Omega 3), ácido linoleico (Omega 6) y compuestos fenólicos (ácido cafeico, kaempferol, miricetina y quercetina) por lo que han sido recomendados debido al contenido de fibra dietética, proteínas, antioxidante y minerales (Peperkamp, 2014; Reyes *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que las proteínas de la semilla de chía contienen un buen equilibrio de aminoácidos esenciales, pero una de las propiedades de cualidades más importantes que debe tener la proteína comestible es una buena digestibilidad (Mohd *et al.*, 2012).

La fibra dietética total (TDF) se ha convertido en un componente importante en la dieta diaria. La ingesta de TDF tiene efectos beneficiosos para la salud. Algunos de ellos incluyen la reducción de la colesterolemia, la modificación de las respuestas glucémica e insulémica, los cambios en la función intestinal y la actividad antioxidante. El TDF también tiene funcionalidades tecnológicas como agente aglutinante de grasa, formador de gel, quelante y texturizante (Esposito *et al.*, 2005).

El consumo dietético de chía molida, aceite y proteínas tiene beneficios para la salud a largo plazo debido a sus propiedades antioxidantes y la protección de las células contra los radicales libres que pueden inducir diferentes enfermedades degenerativas. No hay evidencia de efectos adversos o alergenicidad causados por semillas de chía enteras o molidas, por lo tanto, las semillas de chía y los productos derivados como el mucílago, son fuentes prometedoras de alimentos (Marineli *et al.*, 2015).

5.2.3 Mucílago de chía

El contenido de fibra de la semilla de chía corresponde a un polisacárido con un alto peso molecular. En 1996, la FAO lo describió como una fuente potencial de goma de

polisacárido debido a sus excepcionales propiedades mucilaginosas a baja concentración en soluciones acuosa. El mucílago de chía se aprecia cuando esta entra en contacto con el agua, el mucílago emerge inmediatamente formando una cápsula mucilaginosa transparente que rodea la semilla (Figura 3) (Guiotto, 2014).

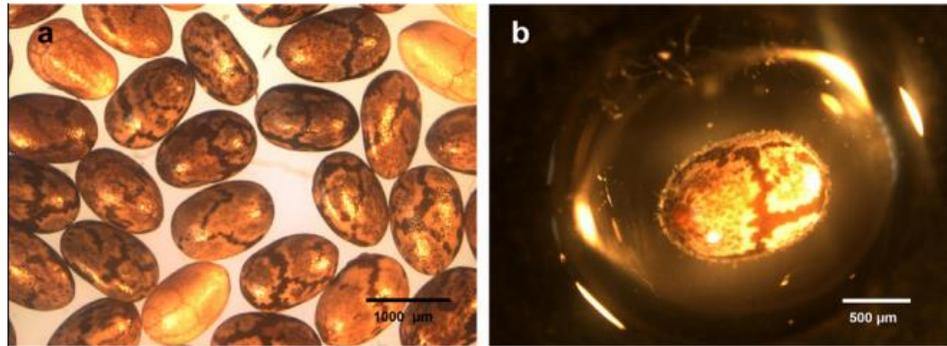


Figura 3. Micrografía de semilla de chía a) semillas seca y b) semilla hidratada con formación de “cápsula mucilaginosa”.

Fuente: Muñoz *et al.*, 2012.

La estructura básica del polisacárido que compone el mucílago es de un tetrasacárido con 4-O-metil- α -D-glucuronopiranosil residuos que se presentan como ramas de β -D-xilopiranosil en la cadena principal. Los monosacáridos β -D-xilosa, α -D-glucosa y 4-O-metil- α -D glucorónico se obtuvieron por hidrólisis ácida en la proporción 2: 1: 1, respectivamente. Debido a que el mucílago de la capa de semillas de chía está compuesto principalmente de polisacáridos, que pueden absorber 27 veces su peso en agua (Muñoz *et al.*, 2012), este gel mucilaginoso se considera un ingrediente valioso en la industria alimentaria, por sus propiedades físicas (Orona *et al.*, 2017).

5.2.4 Usos y aplicaciones

Algunas de las aplicaciones más importantes del mucílago incluyen su uso como agente estabilizador, suspensión, emulsión y aglutinante con capacidad de retener agua, también es usado como encapsulantes, liberación controlada de sabores, producción de películas o recubrimientos comestibles. La aplicación principal de este producto es la producción de cápsulas que proporcionan una sustancia nutricional de

(omega-3, antioxidantes, microorganismos, etc.) mejorando la estabilidad de los compuestos (Williams y Phillips, 2000; Koocheki *et al.*, 2009).

5.3 Encapsulados

La encapsulación es definida como el atrapamiento de compuestos dentro de una sustancia inmiscible, que puede ser sólida o líquida, es una tecnología prometedora para proteger componentes bioactivos y podría ser adecuada para administrar varios compuestos importantes. Los compuestos bioactivos (aceites esenciales, vitaminas, minerales, polifenoles, carotenoides y otros compuestos) son aquellas sustancias obtenidas en fuentes vegetales que tienen buenos efectos sobre la salud a través de actividad celular y fisiológicas (Wei y Huang, 2019). El material encapsulado se suele llamar como fase de núcleo, relleno, activa, interna o de carga útil, mientras que el material utilizado para la encapsulación se denomina membrana de recubrimiento, cubierta, cápsula, material de soporte, fase externa o matriz (Canizales *et al.*, 2018).

La tecnología de encapsulación se ha aplicado extensamente en la industria farmacéutica, nutraceútica y alimentaria como una herramienta importante para mejorar la estabilidad de los compuestos bioactivos durante el procesamiento y almacenamiento, así como para mejorar su biodisponibilidad (McClements, 2015).

5.3.1 Morfología y técnicas de encapsulación

La encapsulación ha recibido diferentes denominaciones en función de su morfología y estructura interna, teniendo como factor común el tamaño. Dependiendo de las características fisicoquímicas del material activo, de la composición del material pared y la técnica de encapsulación utilizada, se podrán obtener diversos tipos de partículas que se observa en la Figura 4 (Reyes, 2010).

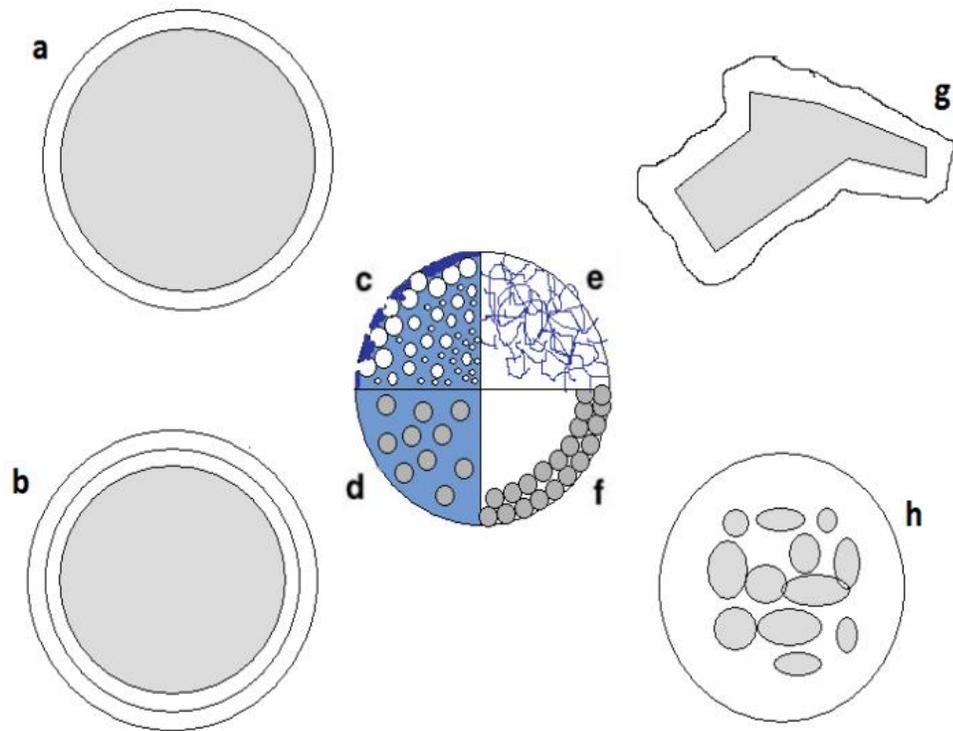


Figura 4. Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas, a) forma esférica, b) forma multi-pared, c), d), e) y f) estructuras matriciales, g) forma irregular y h) forma multi-núcleo.

Fuente: Vehring, 2008.

Los métodos de encapsulación se han clasificado según el tipo de estructura formada: tipo capsular o matricial. En el Cuadro 1 se observan los métodos de encapsulación más utilizados para encapsular sustancias.

Cuadro 1. Métodos de encapsulación según el tipo de estructura formada.

Métodos	Sistema formado
Secado por aspersión	Matricial
Extrusión	Matricial
Gelificación iónica	Matricial o Capsular
Recubrimiento	Capsular
Coacervación	Capsular
Extracción-Evaporación de disolventes	Usualmente matricial
Atrapamiento por liposomas	Capsular
Polimerización interfacial	Capsular
Complejos de inclusión	Matricial

Fuente: Sparks y Jacobs, 1999.

5.3.1.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión es el método más ampliamente usado para microencapsular ingredientes alimenticios y es el más económico. Se fundamenta en la producción de un polvo seco, por medio de la atomización de una emulsión, en una corriente de aire caliente dentro de una cámara de secado a 150-200°C, este proceso también se denomina atomización (Rodríguez, 2005). El disolvente se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la emulsión, quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s) (Alonso, 2011). La distribución del tamaño de la partícula en general es menor a 100 µm, aunque hay que destacar que ello depende de las condiciones del proceso. En comparación con otros métodos, el secado por aspersión proporciona una eficiencia de encapsulación relativamente alta, se ha utilizado en la industria alimentaria para encapsular sabores y aromas (López y Gómez, 2008).

5.3.1.2 Extrusión

La microencapsulación por extrusión consiste en el paso de una emulsión formada por el material activo y el encapsulante a través de un extrusor (elemento que da forma por presión a una masa fluida) a alta presión. Debido al calor al que se somete al material activo, este proceso no es adecuado para encapsular compuestos termolábiles (Gouin, 2004).

Recientes estudios, demuestran que la aplicación de esta técnica mejora notablemente al incorporar dispositivos extrusores como boquillas múltiples y discos aspersores, inyectoros con impulsos vibratorios e incluso con flujo de aire incorporado, todos diseñados bajo el mismo objetivo, la producción masiva de microcápsulas (Lupo *et al.*, 2012).

5.3.1.3 Gelificación iónica

El proceso, denominado gelificación iónica o gelificación ionotrópica, comienza con una solución polimérica acuosa, con iones de baja masa molecular que interactúan con polielectrolitos de cargas opuestas, reaccionando y formando un gel insoluble (Burey *et al.*, 2008). Existen dos técnicas de gelificación:

En la gelificación externa, la sal de calcio soluble es agregada en el seno de una emulsión A/O. El tamaño de partícula no puede ser bien controlado y las partículas tienden a coagular en grandes masas antes de adquirir la consistencia apropiada.

Gelificación interna, se basa en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio. Esto se lleva a cabo por acidificación de un sistema aceite-ácido soluble, con participación en la fase acuosa del alginato (Liu *et al.*, 2007).

Este proceso ha sido muy utilizado por su sencillez para llevarlo a cabo en el laboratorio. Cualquier componente activo puede ser encapsulado tanto si es hidrofílico, hidrofóbico, líquido viscoso o sólido, representa una técnica de encapsulación simple, eficiente y de bajo costo que no requiere equipo especializado, alta temperatura o

disolventes orgánicos, lo que la hace adecuada para diferentes tipos de compuestos (ĐorĐević *et al.*, 2015; Mofidi *et al.*, 2000).

5.3.1.4 Recubrimiento

Este proceso tiene su base en el denominado “pan coating”, en el cual partículas de huésped son suspendidas mediante una corriente vertical de aire y pulverizadas sobre el anfitrión, el cual después de evaporarse el disolvente, forma un sólido alrededor del huésped (Figura 5) (Alonso, 2011).

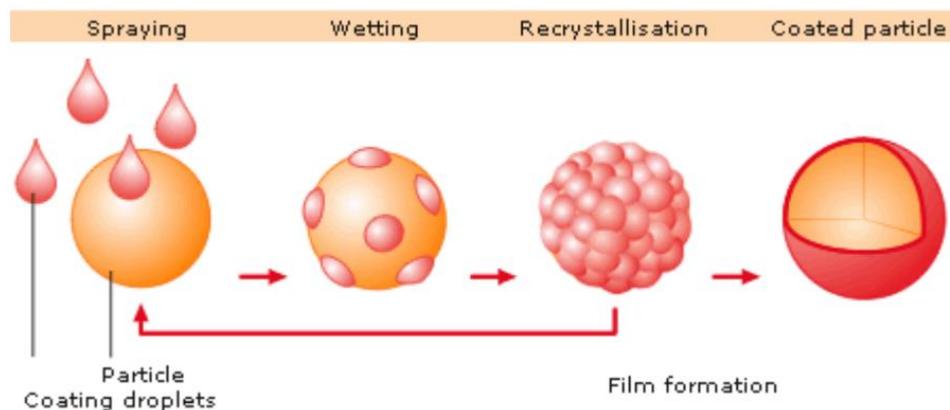


Figura 5. Principio del método de recubrimiento.

Fuente: Alonso, 2011.

El recubrimiento por lecho fluidizado se utiliza para partículas sólidas de tamaño 50-500 μm de diámetro, que son suspendidas en una malla metálica, en aire en corriente ascendente, a alta velocidad dentro de una cámara con temperatura y humedad controlada. El material de recubrimiento se atomiza desde la parte inferior en forma de gotas finísimas. La corriente de aire desplaza a las partículas recubiertas hacia la parte superior, donde se produce la solidificación y finalmente caen en una malla metálica. La cantidad de partículas cubiertas depende de la longitud de la cámara y del tiempo de residencia dentro de ésta (Alonso, 2011).

5.3.1.5 Coacervación

Este método se basa en la separación de fases, consiste en tres pasos; la formación de un sistema de tres fases químicamente inmiscibles (una fase líquida o fase

continua, un material a recubrir y un material de cobertura o de pared). Deposición del material polimérico líquido que formará la cubierta sobre el material a cubrir. Y solidificación de la cubierta.

Con esta técnica, se pueden obtener microcápsulas esféricas muy pequeñas, de hasta de 4 μm y con una carga de material a encapsular de alrededor del 90%. Además, proporcionan una buena protección contra las pérdidas por volatilización y contra la oxidación. Este proceso se utiliza preferentemente para encapsular diferentes tipos de aceites (Korus *et al.*, 2003)

5.3.1.6 Extracción-Evaporación de solventes

Esta denominación ha sido normalmente asignada a un conjunto de procedimientos en los que se da, como circunstancia común, la formación de una emulsión que puede ser del tipo A /a (Aceite/agua) y A/A (Aceite/Aceite). En ambos casos, la fase interna de la emulsión es un disolvente orgánico que presenta una solubilidad limitada en la fase externa de la emulsión que puede ser aceite o agua. Además, es fundamental la incorporación de un agente tensoactivo en la fase externa de la emulsión. Una vez formada la emulsión, se puede extraer el disolvente para conseguir la precipitación gradual del polímero a medida que se va eliminando el disolvente, dando lugar a las microesferas. Los tamaños de partícula obtenidos varían de 0,1-1000 μm (Wang y Schwendeman, 1999).

5.3.1.7 Atrapamiento de liposomas

Los liposomas son micropartículas en las cuales el recubrimiento/membrana exterior consiste en una o más bicapas hidratadas rodeando o encapsulando un material activo, por ejemplo, los fosfolípidos se pueden usar para formar una bicapa esférica alrededor de una sustancia no polar como un esteroide. Las microcápsulas de liposomas poseen unas propiedades más versátiles y son menos frágiles que los encapsulados hechos de grasa. Se han empleado mayoritariamente en el campo farmacéutico y cosmético (Alonso, 2011).

Materiales hidrofóbicos e hidrofílicos pueden ser atrapados en liposomas que también pueden ser utilizados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas del cuerpo; estos materiales consisten de una o más capas de lípidos no tóxicos y aceptables en alimentos (Yáñez *et al.*, 2002)

5.3.1.8 Polimerización interfacial

En este proceso se produce la polimerización de un monómero en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana, que dará lugar a la pared de la microcápsula. La mezcla se dispersa en una fase polar y un catalizador provoca la polimerización del monómero. El polímero es insoluble en la sustancia activa hidrofóbica y se deposita como pared alrededor de la sustancia activa.

La selección del método de encapsulación está en función del: tamaño medio de la partícula requerida, propiedades físicas del agente encapsulante, sustancia a encapsular, aplicaciones del material encapsulado propuesto, mecanismo de liberación deseado y costo (Villena *et al.*, 2009).

5.3.1.9 Complejos de inclusión

Este proceso hace referencia a una nueva asociación supramolecular de un compuesto (ingrediente encapsulado) dentro de un sustrato con una cavidad (material encapsulante). Los materiales encapsulantes más utilizados son las ciclodextrinas, donde involucra la formación de complejos tipo huésped-anfitrión, por inclusión de analitos en su cavidad: se genera un equilibrio dinámico en el cual agua u otro compuesto, son reemplazados en la cavidad de la molécula del material encapsulante. La estabilidad de estos complejos depende de la estructura, hidrofobicidad de la molécula, pH, disolvente orgánico, temperatura y concentración del material (Alonso, 2011).

5.3.2 Materiales empleados para encapsulación

La importancia de la estabilidad de los compuestos bioactivos es la selección de un material apropiado para la encapsulación. Los materiales empleados a las técnicas pueden ser proteínas, polisacáridos, lípidos y surfactantes. La selección de los

biopolímeros utilizados se encuentra ligados a las características fisicoquímicas del compuesto bioactivo a estabilizar, su potencial de aplicación y el costo de los materiales de encapsulación.

5.3.2.1 Proteínas

Las proteínas son utilizadas en la fabricación de partículas de biopolímeros en su estado natural, o pueden ser modificadas (química, física, o enzimática) con el fin de ser empleadas en campos específicos. En general, las proteínas poseen superficie activa (responden al entorno) debido a que contienen una mezcla de aminoácidos hidrófilos e hidrófobos a lo largo de su cadena de polipéptidos (Ozturk y McClements, 2016). Las características específicas de las proteínas de grado alimenticio que se utilizan en la fabricación de partículas de biopolímeros son sus propiedades moleculares (Jones y McClements, 2010).

La caseína es una proteína aislada de la leche que una estructura abierta con segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos. La caseína puede ser utilizada en la liberación de compuestos en sitios específico debido a su digestibilidad, y baja toxicidad. Esta característica convierte a la caseína en una proteína con potencial para ser utilizado en el desarrollo de sistemas de encapsulación (Luo et al., 2015).

5.3.2.2 Polisacáridos

Los polisacáridos se caracterizan por ser económicos y presentar alta disponibilidad, también pueden ser modificados (física, química y enzimática) dependiendo a su aplicación. En general, los polisacáridos son moléculas hidrofílicas y sus mecanismos de estabilización son basados en incrementar la viscosidad de la fase acuosa, inhibiendo el movimiento de las partículas presentes (Ozturk y McClements, 2016).

5.3.2.2.1 Pectina

La pectina es un polisacárido que posee iones con cargas eléctricas negativas (aniónico) (Souza et al., 2013). La carga eléctrica de la pectina es producto de la relación entre el pH y su pKa. De este modo, las pectinas tienden a tener carga negativa a valores de pH altos y carga eléctrica neutra a pH bajos. Las pectinas pueden

ser clasificadas como pectinas de bajo metoxilo (BM) y alto metoxilo (AM). Las pectinas AM forman geles bajo condiciones ácidas, lo cual es atribuido a la reducción de la repulsión electrostática a valores de pH bajos. Las pectinas BM forman geles en la presencia de iones de calcio, lo cual es atribuido a la capacidad de los iones de calcio divalente catiónicos (Ca^{2+}) para formar enlaces electrostáticos entre las regiones aniónicas de la estructura de la pectina (McClements, 2014).

5.3.2.2.2 Gomas

Las gomas son generalmente insípidas, pero pueden tener un efecto pronunciado en el gusto y sabor de alimentos, son solubles, de baja viscosidad, poseen características de emulsificación y es muy versátil para la mayoría de los métodos de encapsulación (Murúa, 2009); una aplicabilidad ha sido en inmovilización de células bacterianas, para lo cual se han utilizado alginatos y carragenina (McMaster *et al.*, 2005).

Los alginatos son uno de los polímeros más utilizados en la microencapsulación. Se extraen principalmente de tres especies de algas marrones (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*) (Pedroza, 2002), posee propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes, razones por las cuales ha sido de gran interés para la industria alimentaria. El alginato es descrito como un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico proveniente de algas marinas conformado por dos monómeros en su estructura, el ácido α -L-gulurónico y el ácido β -D-manurónico. El alginato es un material polimérico adecuado para la microencapsulación por ser biocompatible, no tóxico y degradable (Lupo *et al.* 2012).

5.3.2.2.3 Maltodextrina

La maltodextrina es un polisacárido hidrosoluble de alto peso molecular que se emplea en la estabilización de compuestos a través del método de secado por aspersión. El secado por aspersión, el alto peso molecular de la maltodextrina previene la adherencia del producto en la cámara de secado y reduce la higroscopicidad del polvo, por lo que su uso en secado por aspersión es alto debido a las eficiencias de encapsulación que se obtienen (Silva *et al.*, 2013).

5.3.2.3 Lípidos

Los principales agentes encapsulantes de carácter lipídico están: grasa láctea, lecitinas, ceras, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites hidrogenados; son excelentes formadores de películas capaces de cubrir las partículas individuales, proporcionando una encapsulación uniforme. (Murúa *et al.*, 2009).

5.3.2.4 Surfactantes

Los surfactantes son utilizados en la estabilidad de caseína hidrofílicos y lipofílicos. La fuerza conductora que permite la obtención de sistemas de encapsulación es el autoensamble a través de efectos hidrofóbicos. De este modo, se evita emplear métodos mecánicos (homogenización) en la estabilización de la caseína. Surfactantes hidrosolubles con un balance entre sus grupos hidrofílicos y lipofílico (BHL) entre 8 y 18 se emplean en la formación de emulsiones oleosas en acuosas (A/a), permitiendo que las moléculas oleosas puedan ser incorporadas en productos acuosos. Surfactantes liposolubles con BHL entre 2 y 6 son utilizados en la formación de emulsiones agua en aceite (a/A) (Rojas, 2016).

5.3.3 Usos (principios activos)

La encapsulación se usa intensivamente en los sectores de alimentos como una barrera efectiva para los ingredientes líquidos y sólidos contra varios parámetros ambientales (oxígeno, luz, radicales libres, etc.). Los compuestos bioactivos como vitaminas, antioxidantes, aceites esenciales, enzimas, microorganismos benéficos, etc. pueden ser preservados por distintas técnicas de encapsulación.

Estas tienen como propósito mantener su actividad por aislamiento total o parcial del entorno hasta su liberación en tiempo y lugar adecuados. También la encapsulación es fuente de nuevos ingredientes con propiedades únicas, permite enmascarar o preservar aromas y sabores, reducir problemas de aglomeración y volatilidad de líquidos, mejorando así la dosificación de aditivos y por lo tanto la relación costo-efectividad (Gouin, 2004).

Aunque las tecnologías existentes para la encapsulación a escala de laboratorio son efectivas, aún existen varios desafíos para producir microorganismos microencapsulados de grado alimenticio a gran escala. Microorganismos como las bacterias ácido lácticas (BAL) se han encapsulado en diferentes polímeros para su estudio respecto a la funcionalidad, viabilidad y aplicación.

5.4 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

5.4.1 Características generales

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílico aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidinanegativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Además, las BAL son ácidos tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Yang *et al.*, 2012).

Estas bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos y especies (Azadnia *et al.*, 2011). Para su multiplicación requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL. Por lo tanto, estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, tales como leche acidificada, yogurt, mantequilla, crema, kefir, y quesos; así como también en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales (Vásquez *et al.*, 2009).

Los BAL son un grupo grande de aproximadamente 380 especies bacterianas que

pertenecen a 40 géneros. Los géneros más comunes son *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Tamang *et al.*, 2016); sin embargo, éstas son agrupadas como homofermentadoras o heterofermentadoras basado en el producto final de su fermentación. Las homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis (Embden-Meyerhof). Por su parte, las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentadoras y convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato- fosfoacetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Carr *et al.*, 2002).

5.4.2 Fuentes de obtención

La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL. Sin embargo, otros alimentos son también excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos de bacterias lácticas, entre ellos se encuentra las masas de los cereales, los vegetales y la carne (Vazquez *et al.*, 2009).

Las bacterias lácticas involucrada en fermentación en los alimentos pueden presentarse en las mismas por diferentes vías como; presente en la materia prima en número suficiente que otros microorganismos (vegetales y embutidos) o como cultivos añadidos con mezcla compleja de iniciadores, puesto que con la fermentación con bacterias lácticas son mejorados en cuanto a sus características sensoriales, nutritivas e higiénicas, y en muchos casos incremento en los rendimientos (Pavunc *et al.*, 2012).

Entre ellos, el queso es elaborado con cultivo iniciadores comerciales, los cuales han sido aislados y seleccionados con base a algunas propiedades deseadas tales como la producción de sabores y aromas. Es por ello que la adición de las cepas bacterias

ácido lácticas (BAL) en la producción artesanal de quesos tienen una gran importancia, ya que permite incrementar el conocimiento acerca del potencial y de la aplicación de cepas autóctonas para ser utilizados como cultivos iniciadores (Speranza *et al.*, 2015).

5.5 Importancia de la encapsulación de Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son de gran importancia en la industria alimentaria para la conservación y desarrollo de características sensoriales en los alimentos, dado que es un gran desafío aumentar la capacidad de supervivencia de los probióticos durante el proceso de manipulación para su conservación.

Las aplicaciones y ventajas de las bacterias encapsuladas han sido enfocados en diferentes líneas de investigación como, la producción de cultivos iniciadores, producción de productos alimenticios, viabilidad de las células probióticas en el tracto gastrointestinal, aplicación en fermentadores, aplicación de nuevos métodos en la elaboración de alimentos y mejoramiento de las propiedades sensoriales de productos probióticos (Mortazavian, 2007). Teniendo en cuenta los aspectos anteriores, se ha observado que la encapsulación puede ser usada eficientemente para la preparación de cultivos iniciadores de bacterias con más alta viabilidad y que la vida de anaquel de las células encapsuladas se incrementa y pueden ser directamente ingeridas en los productos y consumidas (Favaro *et al.*, 2008).

VI.- MATERIALES Y METODOS

6.1 Ubicación

En el presente trabajo se realizó en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, en los laboratorios de Fermentaciones y Microbiología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Materiales: Se utilizaron semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) (Marca Plantavit), CaCl_2 (Marca JalmeK) grado reactivo analítico, alginato de sodio grado reactivo (Marca Cape Crystal) y agua destilada.

6.2 Caracterización de mucílago de chía

6.2.1 Hidratación de la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.)

Para llevar a cabo la hidratación, se utilizaron vasos de precipitados de 500 ml agregando las semillas de chía previamente pesada en agua destilada en una proporción 1:10 p/v, se hidrataron en un tiempo de 2 h manteniéndose en una temperatura de 37°C en una parrilla eléctrica (Thermo SCIENTIFIC) en agitación constante con la ayuda de un agitador magnético a una velocidad de 9000 rpm, esto se realizó por triplicado (Figura 6).



Figura 6. Hidratación de la semilla de chía.

En el proceso de hidratación se llevó el control de temperatura, el pH y al final se midió el rendimiento de la obtención del mucílago (Cuadro 2).

Cuadro 2. Condiciones de hidratación y extracción de mucílago de chíá.

T° inicial	pH inicial	T° final	pH final
20	8.9	37	6.5

6.2.2 Extracción de mucílago de chíá (*Salvia hispánica* L.)

Para el proceso de extracción, la muestra hidratada se trituró en una licuadora casera a velocidad media en un tiempo de 3 s aproximadamente. Para su fácil obtención del mucílago, esta se dispuso en una centrifuga (VELAB) por 25 min a 5000 rpm para su separación. Finalmente se filtraron las partículas restantes del sobrenadante utilizando una tela de gasa y un vaso de precipitados de 100 ml. Se midió la densidad del mucílago con un picnómetro previamente pesada (Figura 7). El mucílago de chíá se almacenó en tubos de 15 ml (CORNING CentriStar) en refrigeración a una temperatura de 5°C hasta su posterior uso.



Figura 7. Extracción en centrifuga y mucílago de chíá.

6.3 Evaluación de concentración de mucílago de chíá y alginato de sodio

6.3.1 Concentración de alginato de sodio

En un vaso de precipitado de 200 ml se preparó la muestra de alginato de sodio, el agua destilada se calentó en una parrilla eléctrica a una temperatura de 60°C agregando poco a poco el alginato de sodio en agitación constante con un agitador magnético hasta disolverse por completo sin presencia de grumos.

Se evaluaron 3 diferentes concentraciones de alginato de sodio en 2, 3 y 5 expresados en porcentaje, con la finalidad de definir la concentración adecuada para la formación y cantidad de esta que se requiere para la formación de las cápsulas.

6.3.2 Concentración en la mezcla de alginato de sodio y mucílago de chíá

Se evaluaron diferentes proporciones de la mezcla de mucílago de chíá y alginato de sodio con la finalidad de conocer las características reológicas y morfología de las cápsulas formadas con estas. Se emplearon 5 diferentes concentraciones en la mezcla de mucílago-alginato representada en la Cuadro 3. El concentrado de alginato se empleó en 3 diferentes soluciones: 2, 3 y 5%.

Cuadro 3. Concentración porcentual de la mezcla de mucílago de chíá y alginato de sodio.

Muestra	% Mucilago	% Alginato
1	0	100
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	100	0

Se prepararon 10 ml de muestra con las proporciones descritas del Cuadro 3 en tubos de 15 ml (CORNING CentriStar) para su posterior mezcla se empleó el uso de un

vortex (BIOBASE) y una espátula para obtener una mezcla homogénea. Todas las muestras se realizaron por triplicado, al final se realizó un promedio de los datos obtenidos.

6.3.3 Pruebas reológicas de la mezcla

A las mezclas preparadas se le realizaron pruebas reológicas en un viscosímetro de cono y plato (Physica MCR 501) (Figura 8) en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) en el Departamento de Procesos de Polimerización, esto con la finalidad de analizar el comportamiento de deformación y la viscosidad de la mezcla.



Figura 8. Viscosímetro de cono y plato Physica MCR 501.

6.4 Preparación de las cápsulas mediante la técnica de gelificación iónica

Para la formación de las cápsulas, las mezclas se realizaron en las proporciones del Cuadro 3 por triplicado, con la finalidad de conocer la morfología de las capsulas (forma y tamaño). Primero se prepararon soluciones de CaCl_2 al 0.1M en agua destilada a una temperatura de 60°C en agitación constante por 15 min hasta disolverse, por otro lado, se preparó el alginato de sodio en sus diferentes concentraciones (2, 3 y 5%) calentando el agua destilada en una parrilla eléctrica a 60°C agregando la concentración de alginato correspondiente hasta su homogenización.

La técnica de encapsulación se llevó a cabo mediante la suspensión a través de una jeringa (BD Plastipak) de 5 ml con la mezcla contenida, posteriormente se fue

agregando gota a gota en un vaso de precipitado de 100 ml que contenía la solución de CaCl_2 , se mantuvo en agitación discontinua y se dejó reposar por 10 min en la solución. Por último, las cápsulas formadas se filtraron y se enjuagaron con agua destilada para eliminar el exceso de CaCl_2 en la superficie de las cápsulas, posteriormente estas se colocaron en cajas Petri para su secado en una estufa (RIOSSA E-71) a 31°C por 24 h (Figura 9).



Figura 9. Cápsulas en solución de CaCl_2 y en deshidratación.

Las cápsulas se almacenaron en temperatura ambiente en microtubos de 2 ml hasta su posterior uso para las mediciones.

6.4.1 Caracterización e hidratación de las cápsulas

La morfología o características físicas de las cápsulas deshidratadas de las diferentes concentraciones del mucílago y agregados del alginato de sodio, se observaron mediante un software (AmScope 3.7).

Para conocer el crecimiento óptimo de las cápsulas de acuerdo a la hidratación, se midió el diámetro inicial, posteriormente estas se hidrataron en agua destilada en un tiempo de 4 h. Las mediciones se realizaron en intervalos de 1 h con un micrómetro Mitutoyo (Figura 10) para la determinación de la velocidad de hidratación de las cápsulas.



Figura 10. Medición en micrómetro Mitutoyo.

Durante el proceso de hidratación las cápsulas se observaron en un software DinoCapture 2.0 (Figura 11) en el Departamento de Parasitología, laboratorio de toxicología de la UAAAN.

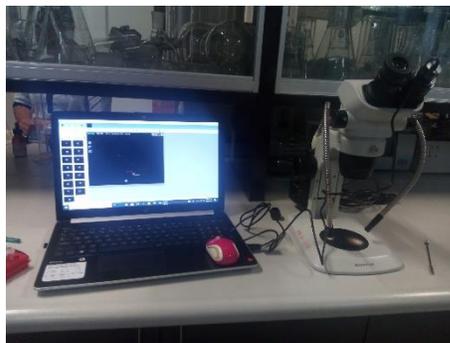


Figura 11. Medición en software DinoCapture 2.0

6.5 Acondicionamiento celular de las BAL

Las cepas de BAL identificadas como QJ y QR se obtuvieron de la colección del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Las BAL se reactivaron en caldo MRS estéril en tubos (pirex) de 5 ml agregando 1% v/v (50 μ l) del inóculo con la ayuda de una micropipeta (Science MED Finlad Technology) (Figura 12), estas fueron incubadas a 31°C durante 24 h en anaerobiosis, cada cepa se reactivó por triplicado.

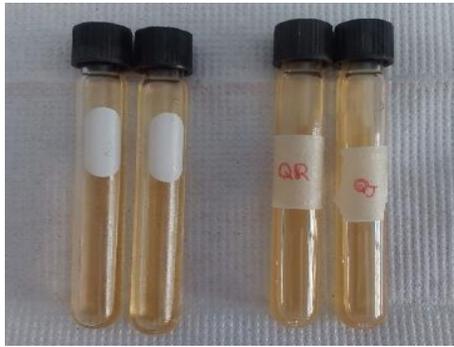


Figura 12. Reactivación de BAL.

6.5.1 Preparación de medio de cultivo y conteo colonial de las BAL

Para determinar las células viables a encapsular se aplicó el método de cuenta en placa, para ello, las BAL se reactivaron en caldo MRS en un tiempo de 6 h según lo descrito por Andrade, (2018) en donde las bacterias se encuentran en la fase de crecimiento exponencial y antes de alcanzar la fase estacionaria. El método consistió en realizar diluciones seriadas al cumplir el tiempo de incubación mencionado anteriormente, fue plaqueado 1 ml de cada dilución en cajas Petri por duplicado en medio sólido de agar MRS (Figura 13), estas fueron incubadas a 31°C hasta observar crecimiento de las colonias para su conteo.



Figura 13. Siembra de vaciado en placa de BAL (QJ y QR).

6.5.2 Evaluación de la concentración de las BAL para la encapsulación

Para conocer el número de UFC/ml de las BAL a encapsular y liberar, se probaron diferentes volúmenes de BAL a agregar en un cierto volumen de la mezcla de los biopolímeros como se muestra en el Cuadro 4, esto con la finalidad de definir el volumen del concentrado respecto a la encapsulación y conseguir una cápsula con características definidas encapsulando la mayor cantidad posible de BAL.

Cuadro 4. Concentración de BAL para su encapsulación.

BAL (ml)	MUCILAGO-ALGINATO (ml)
2	10
4	10
6	10
8	10

6.6 Encapsulación de las BAL

6.6.1 Preparación de las mezclas biopoliméricas

Las mezclas de mucílago-alginato se prepararon de acuerdo a la concentración seleccionada de las pruebas realizadas anteriormente.

Para la esterilización de los carbohidratos (mucílago de chíá y alginato de sodio), se realizaron diferentes pruebas donde se describen a continuación: en tubos (CORNING CentriStar) con 10 ml de muestra homogénea de los biopolímeros, se esterilizó en una autoclave en condiciones de esterilización para carbohidratos (Castillo *et al.*, 2017), es decir, 108°C por 10 min cerradas herméticamente, por otra parte, el alginato de sodio se esterilizó en frascos de vidrio a 108 y 121°C en tiempos de 10 y 15 min respectivamente por separado, es decir, sin ser mezclado con el mucílago, mientras

que el mucílago de chíá se esterilizó con las mismas condiciones a 108°C por 10 min (Cuadro 5). Se dejaron enfriar en temperatura ambiente hasta su posterior uso.

Cuadro 5. Condiciones de esterilidad de los biopolímeros.

MUESTRA	Temperatura °C
Mucílago-alginato	108
Mucílago de chíá	108
Alginato de sodio	108 y 121

6.6.2 Crecimiento de las BAL

En un volumen de 10 ml de caldo MRS estéril, se inoculó el 1% de las bacterias con una micropipeta (Science MED Finland-Technology) y se incubaron 31°C en un tiempo de 6 h en anaerobiosis. Posteriormente se tomó el volumen correspondiente indicado del Cuadro 4, se dispuso a centrifugar las bacterias QJ Y QR en diferentes revoluciones: 4500 y 2000 rpm por 1 y 2 min respectivamente (Figura 14). Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se utilizó para el proceso de encapsulación.



Figura 14. BAL para la encapsulación.

6.6.3 Encapsulación de las BAL

Se preparó solución de CaCl_2 estéril, así como materiales de uso importante: vasos de precipitados, puntillas, agua destilada y espátula para la agitación a 121°C durante 15 min.

El proceso de encapsulación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (Isaac lab). En vasos de precipitados de 100 ml se depositó la muestra de biopolímeros y con la ayuda de una micropipeta (Science MED Finland-Technology) se añaden las BAL para la suspensión en la mezcla. Posteriormente se homogenizó la muestra. La encapsulación por gelificación iónica se realizó conforme se explicó anteriormente. Por último, las cápsulas, se depositaron en cajas Petri para su secado a 24 h, se dejaron secar en la campana de flujo laminar (Isaac lab) para mantener las cápsulas en condiciones de esterilidad (Figura 15).

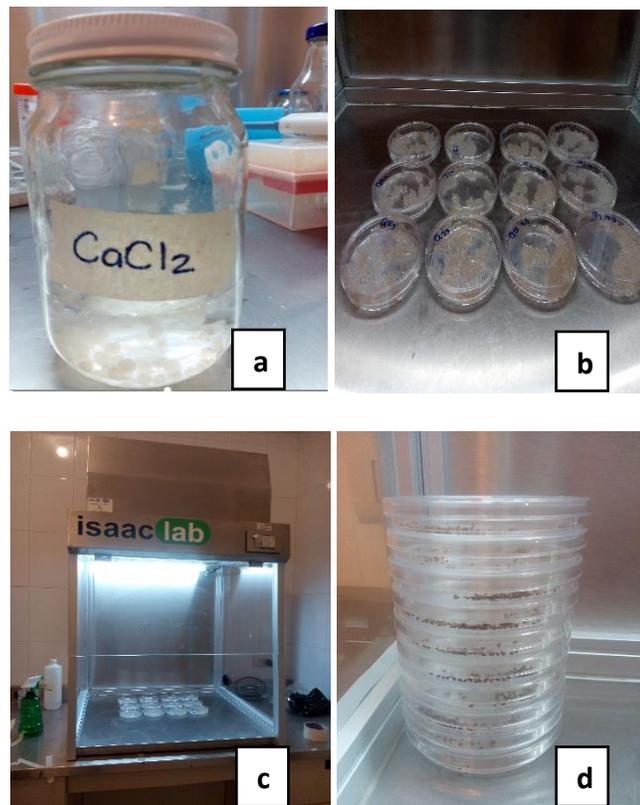


Figura 15. a) Encapsulación, b), c) deshidratación en campana (Isaac lab), y d) cápsula deshidratada.

Las capsulas deshidratadas se almacenaron a temperatura ambiente en microtubos estériles de 2 ml.

6.7 Viabilidad de células (BAL) encapsuladas

Se prepararon los materiales para el recuento de células viables encapsuladas, para ello se esterilizaron a 121°C por 15 min el agar MRS, agua peptonada y puntillas. Las cápsulas preparadas en el paso anterior fueron hidratadas en diferentes matrices como se presenta en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Muestra de hidratación de las capsulas.

Matriz	Volumen (ml)
Agua destilada	10
Agua peptonada	100

Las cápsulas fueron hidratadas durante 4 h en muestras estériles (121°C por 15 min), esto para la liberación de las bacterias encapsuladas. Cumplido el tiempo, se realizaron diluciones seriadas seguido de un sembrado por vaciado en caja con medio sólido de agar MRS (Figura 16), estas fueron incubadas a 31°C hasta el crecimiento de las bacterias y finalmente se realizó el conteo de las colonias



Figura 16. Hidratación y siembra en agar MRS.

6.8 Determinación de viabilidad

Para la determinación de la viabilidad de las bacterias encapsuladas, se expresaron en log₁₀ UFC/ml, aplicando la siguiente ecuación:

$$Viabilidad = (N / No) * 100$$

Donde:

N= Logaritmo de número de células viables encapsuladas

No= Logaritmo de número de células viables inoculadas (Montes 2013).

VII.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Determinación de rendimiento de mucílago de chíá

La metodología de extracción aplicada en el presente trabajo nos dio un rendimiento de extracción de 50% del mucílago en húmedo. Si bien comparamos los resultados con estudios anteriores por otros autores encontraremos que nuestro resultado es superior a lo reportado por Cuapio (2012), quien obtuvo 24% de rendimiento, también es mayor a lo reportado por Vázquez *et al.*, (2010) con un rendimiento de 21.5%, por otro lado, nuestro rendimiento fue menor a lo reportado por Gandarillas (2016) donde obtuvo un 70% de rendimiento óptimo. Cabe mencionar que, en la literatura de Muñoz *et al.*, (2012) señala que, el tiempo y temperatura de hidratación ha tenido efectos significativos en el rendimiento; el mucílago extraído se incrementa a valores de temperatura a 80°C y que, además en un tiempo de 2 h de hidratación alcanza el peso total las semillas completando la absorción de agua.

Aunque la temperatura de hidratación fue la misma de los autores mencionados, es importante destacar que Gandarillas (2016) llevo a cabo la trituración de la semilla por 50 s dejando la separación completa del mucílago de la semilla, sin embargo, tomando en cuenta que el presente trabajo optamos por un tiempo de 3 s de trituración, debido a que, algunas partículas de la semilla después de centrifugar, serian un obstáculo al paso a través de la jeringa durante su aplicación. Es por ello, la importancia del tiempo de molienda de esta, para conocer la cantidad de extracto obtenida en relación a la hidratación original.

En el Cuadro 2, se observa las condiciones que se llevaron a cabo en la hidratación de la semilla de chíá con un tiempo de hidratación y agitación mencionadas anteriormente. Finalmente, el mucílago de chíá dio como resultado 1 g/cm³ respecto a la densidad, característica similar a lo reportada por Muñoz *et al.*, (2012) con un 0.98 g/cm³ de resultado.

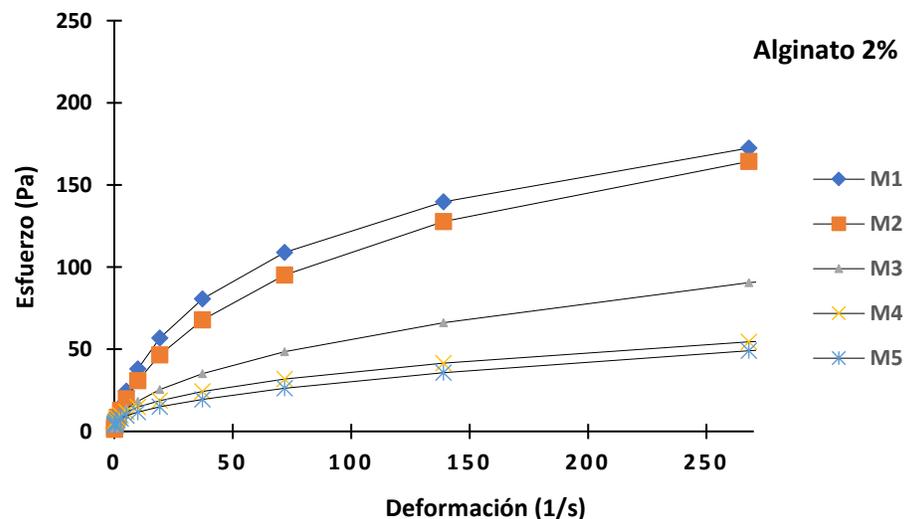
7.2 Comportamiento reológico de la mezcla mucílago de chíá y alginato de sodio

Ramírez Navas (2006) menciona que la viscosidad aparente, “ μ ” se define como el cociente entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación, lo cual es conocida en un término “viscosidad” para fluidos no newtonianos.

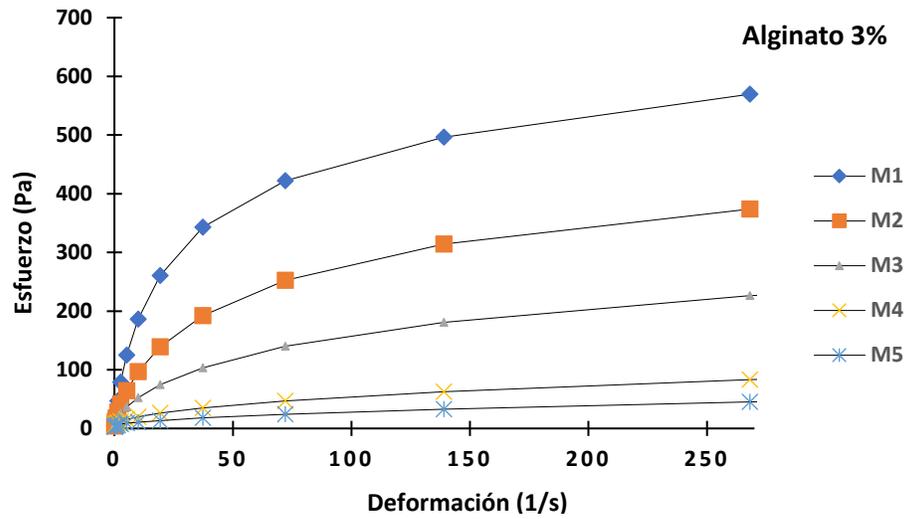
$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

De acuerdo a la definición, las mezclas sometidas al estudio reológico de las proporciones indicadas del Cuadro 3, presentaron en todos los casos un comportamiento de un fluido no newtoniano de tipo pseudoplástico en las diferentes concentraciones de alginato de sodio tal como se muestra en la Figura 17.

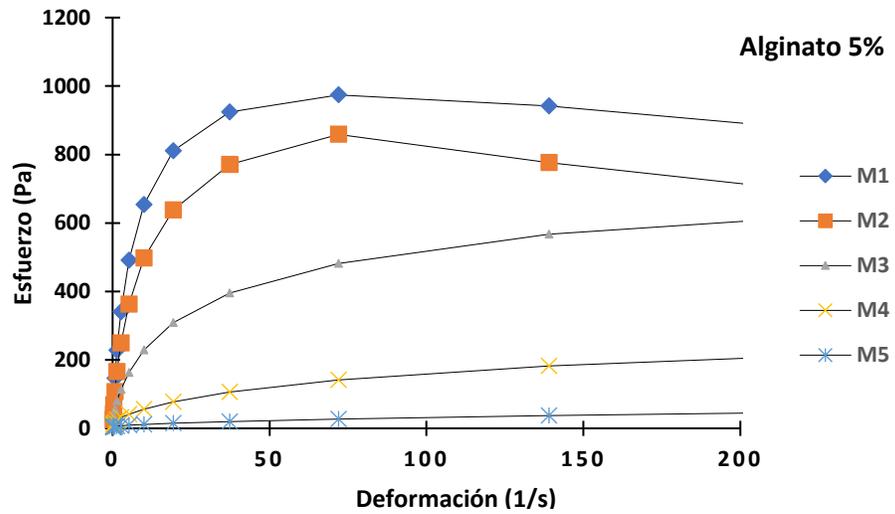
Un comportamiento similar ha sido observado en Capitani (2013) y Minga *et al.* (2017) donde estudiaron diferentes concentraciones de mucílago de chíá, mismos resultados se registraron con León (2018) al mezclar mucílago de chíá con la de membrillo y Maldonado (2015) con goma guar en la elaboración de mayonesa obteniendo los mismos comportamientos.



a)



b)



c)

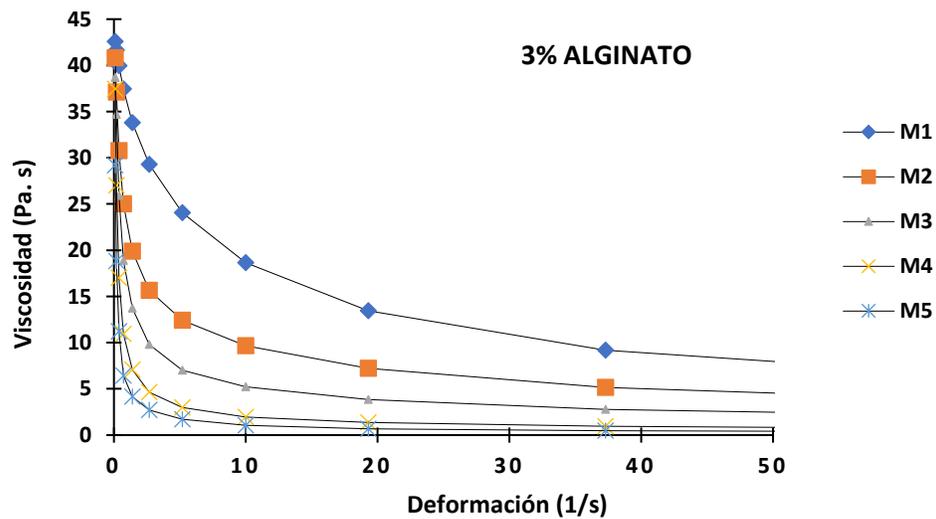
Figura 17. Comportamiento reológico de la mezcla de mucílago de chíá- alginato de sodio, siendo el último en concentraciones de: a) 2% de alginato, b) 3% de alginato y c) 5% de alginato de acuerdo a la deformación del fluido mediante la aplicación de esfuerzo cortante.

7.2.1 Viscosidad en función de la velocidad de deformación de la mezcla mucilago-alginato

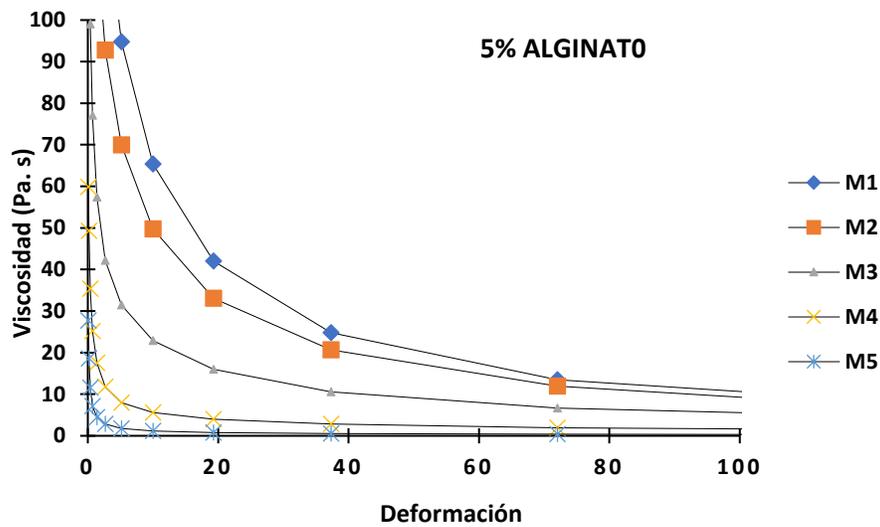
El fluido pseudoplástico es caracterizado por una disminución de su viscosidad con la velocidad de deformación (Ramírez Navas, 2006). Esto nos dice que la viscosidad no permanece constante, sino que, está en función de la velocidad cortante.

Las variaciones en la viscosidad aparente con la velocidad de deformación para las diferentes concentraciones de alginato, disminuyen conforme aumenta la velocidad de deformación, esta tendencia general confirma el comportamiento pseudoplástico de las dispersiones de la mezcla. A medida que aumenta la velocidad de deformación, las cadenas de la molécula de polímeros posicionadas al azar se alinean en la dirección del flujo, generando soluciones con menor viscosidad (Chagas, 2004).

En la siguiente Figura 18 se muestra los valores de viscosidad en cuanto a la concentración diferente de alginato de sodio. Se observa que, en todas las mezclas tienen una alta viscosidad a velocidad de deformación bajas.



a)



b)

Figura 18. Variación de viscosidad del fluido al incrementar la velocidad de deformación en diferentes concentraciones de alginato: a) 3% de alginato de sodio, b) 5% de alginato de sodio.

7.2.3 Determinación del índice de consistencia y el índice de comportamiento del flujo

Para conocer las características de la mezcla mucílago-alginato, se realizaron cálculos mediante la linealización logarítmica de la ecuación de la ley de la potencia, donde se relaciona el esfuerzo (Pa) con deformación (1/s), donde la línea recta de pendiente representa n (índice de comportamiento) y la interpretación representa k (índice de consistencia). En la siguiente ecuación se muestra el modelo de la ley de potencia:

$$\tau = k\gamma^n$$

Linealización logarítmica de la ecuación en ambos miembros de la ecuación anterior:

$$\log \tau = \log k + n \log \gamma$$

A continuación, se muestra el Cuadro 7, donde se presenta los valores obtenidos de estos parámetros de las diferentes mezclas.

Cuadro 7. Parámetros reológicos de acuerdo a la ley de la potencia de las mezclas mucilago de chíá- alginato de sodio.

Soluciones de Alginato						
Mezcla %M-%A	2%		3%		5%	
	<i>n</i>	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>k</i>
0-100	0.56±0.16	6.75±1.11	0.58±0.02	30.91±0.52	0.54±0.02	153.34±17.62
25-75	0.58±0.0	6.79±0.28	0.53±0.0	21.36±0.50	0.55±0.0	118.13±15.63
50-50	0.45±0.03	6.74±0.27	0.48±0.01	15.55±1.55	0.48±0.0	61.42±3.48
75-25	0.35±0.01	7.42±0.34	0.39±0.02	8.86±0.86	0.43±0.0	19.99±2.33
100-0	0.35±0.04	6.29±1.14	0.36±0.03	5.49±0.89	0.38±0.0	5.72±0.21

Se observa que el índice de comportamiento (n) es inferior a uno en todos los casos ($n < 1$), por lo que nos indica que la mezcla se comporta como un fluido pseudoplástico cumpliendo con las condiciones de la ley de la potencia, además n disminuye conforme se incrementa la proporción del mucílago de chíá independiente de la concentración de alginato de sodio. Así mismo, con el incremento de la concentración de alginato de sodio, los valores de k aumentan principalmente en muestras en ausencia del mucílago. Este comportamiento puede atribuirse también al efecto reológico de las moléculas que aumentan con la concentración, lo que a su vez aumenta la interacción a los movimientos intermoleculares producida por la fuerza (Chen y Chen, 2001). Además, el índice de consistencia (k) de la solución de alginato de sodio, disminuye drásticamente al aumentar el contenido de mucílago, esto se observa en soluciones en concentración de 3%.

7.3 Formación de cápsulas por gelificación iónica

Con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas y adecuadas para la elaboración de las cápsulas de alginato de sodio con matriz de mucílago de chíá, se realizaron de acuerdo a las proporciones del Cuadro 3 en diferentes concentraciones de alginato, ya que, según Martínez *et al.*, (2015) el material de la cápsula debe estabilizarse para proteger su contenido, y evitar pérdidas del mismo durante su almacenamiento hasta su aplicación. El tamaño y forma de las cápsulas depende de gran medida de la

viscosidad del agente de encapsulación utilizado por lo cual se prepararon cápsulas experimentales para su estudio.

Doleyres y Lacroix (2005) mencionan que la concentración de CaCl_2 es muy importante para la obtención de la consistencia deseada y durabilidad de las cápsulas. Mientras que, Castillo *et al.*, (2017) obtuvieron mejores resultados en una concentración de 0.1M debido a que las cápsulas presentaron mayor firmeza que en concentración bajas de CaCl_2 , mismas que se emplearon para posteriores ensayos.

Al obtener las cápsulas y ser deshidratadas, es importante mencionar ciertos factores que determinan la morfología de las mismas. El tamaño de la boquilla de la jeringa utilizada fue determinante para la variación de tamaño y forma de las cápsulas obtenidas, así como la distancia de separación de la boquilla a la solución reticulante. Otro de los factores determinantes respecto en la forma, fue la viscosidad de la mezcla o bien el tamaño de partícula y el tiempo de exposición en el cloruro de calcio. A pesar de todos estos factores, la técnica de encapsulación por gelificación iónica ha sido una de las más destacadas al permitir la formación de encapsulados en tamaños uniformes, por lo que es importante la estandarización de este método para eliminar variaciones de estos factores.

Se obtuvieron cápsulas desde tamaños muy pequeños de formas irregulares y elípticas, esféricas regulares con diferentes medidas, sin embargo, a pesar de las variaciones, las cápsulas experimentales obtenidas fueron uniformes. Una vez obtenidas las cápsulas se observaron en un microscopio estereoscópico (OLYMPUS SZ51) aumento 0.80x conectado a un software DinoCapture 2.0.

Los resultados mostraron que, en cuanto aumenta el contenido de alginato, tanto en la concentración en solución como en la proporción, es difícil manipular la matriz y formar las cápsulas debido a la alta viscosidad. Esto depende principalmente del comportamiento de la viscosidad del alginato de sodio en presencia de mucílago de chíá. La formación de las cápsulas de acuerdo al Cuadro 3, en la muestra 5, independientemente de la concentración de alginato, no hubo formación de cápsula, más bien se obtuvo una película delgada debido a la ausencia de Na^+ del alginato

para el intercambio iónico. Las cápsulas en concentración 2% de alginato de sodio, se obtuvieron cápsulas planas en la muestra 3 y 4, mientras que en la 1 y 2 se formaron cápsulas uniformes y elípticas. En la concentración 3% de alginato en las muestras 1 y 2 hubo formación de cápsulas irregulares, mientras que en la muestra 3 se obtuvieron cápsulas uniformes y esféricas, en la muestra 4 fueron cápsulas elípticas. Por último, en la concentración 5% de alginato las muestras 1, 2 y 3, desarrollaron cápsulas irregulares, por lo que en la muestra 4 hubo formación de cápsulas regulares y esféricas. En el Cuadro 8 se muestran las características evaluadas macroscópicamente y microscópicamente en cuanto a la formación en diferentes proporciones y concentrado (mucílago-alginato).

Cuadro 8. Evaluación de las características físicas de las cápsulas.

Características de las cápsulas					
Muestra %M-%A	Esférica	Uniforme	Irregular	Elíptica	Plana
1		●	●●	●	
2		●	●●	●	
3	●	●	●		●
4	●			●	●
5	---	---	---	---	---

- Alginato 2%
- Alginato 3%
- Alginato 5%

Con base a los resultados comparativos del cuadro anterior, se logró identificar la mezcla que forma las cápsulas esféricas y uniformes en base a la viscosidad, siendo

la muestra 3 en proporción 50:50 (v/v) quien logró una cápsula esférica y uniforme como se muestra en la Figura 19.

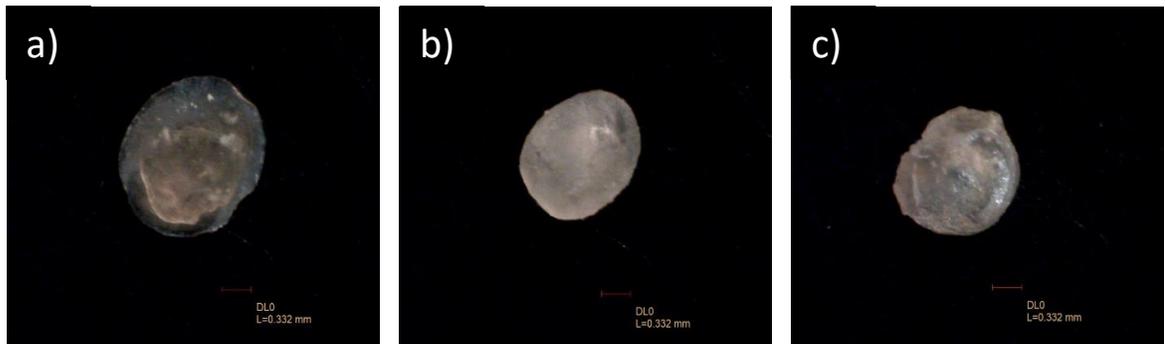


Figura 19. Micrografía de las cápsulas en diferentes concentraciones de alginato de sodio a) 2%, b) 3% y c) 5% de la muestra 3 en proporción (%M=50, %A=50).

El tamaño y la forma de las cápsulas varían en cuanto a los diferentes concentrados de alginato de sodio siendo estas planas, esféricas e irregulares, para las concentraciones 2, 3 y 5% respectivamente, de la proporción de la muestra 3.

7.3.1 Morfología de cápsulas deshidratadas

En la Figura 20 se observa las cápsulas de 3% de alginato proporción (%M=50, %A=50) de una forma esferoide e irregular con formación de grietas. Un estudio con Huerta (2018) en la encapsulación de aceite de ajonjolí con mucílago de nopal y alginato de sodio por gelificación iónica en una proporción 50:50 p/p, mostraron cápsulas irregulares, con capa gruesa y una estructura porosa con presencia de aceite, por otra parte, Us-Medina (2014) presentaron microcápsulas lisas y redondas con poca apariencia de ruptura y poros que permite el paso del oxígeno, en una muestra de 1% de mucílago/alginato (50:50 p/p) con 3 % de cloruro de calcio y 30 minutos de tiempo de entrecruzamiento.

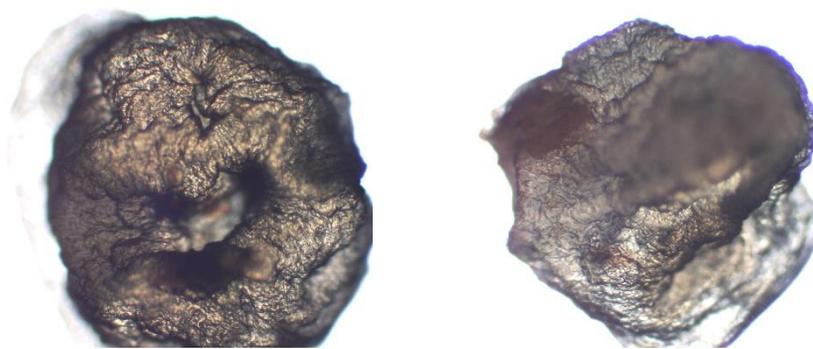


Figura 20. Micrografías de cápsulas deshidratadas en 3% de alginato (%M=50, %A=50).

7.4 Cinética de hidratación de las cápsulas

Se analizaron la velocidad de hidratación de las cápsulas tras un periodo de 4 h en intervalos de 1 h agregándole agua destilada. Se realizó mediante el diámetro promedio (ϕ) de las cápsulas medidas en cuatro direcciones, la cual se graficaron el diámetro respecto al tiempo obteniendo una línea recta, cuya pendiente representa la velocidad de hidratación al cambio del tamaño de las cápsulas. En el Cuadro 9 se presenta la velocidad de hidratación de las cápsulas formadas a partir de las muestras de estudio.

Cuadro 9. Velocidad de hidratación de las cápsulas.

Soluciones de Alginato			
Mezcla	2%	3%	5%
%M-%A	<i>m(mm/h)</i>	<i>m(mm/h)</i>	<i>m(mm/h)</i>
0-100	0.1170	0.1647	0.1867
25-75	0.1817	0.1538	0.1810
50-50	0.1200	0.1943	0.1522
75-25	0.1029	0.1542	0.1926
100-0	---	---	---

En el cuadro anterior se muestra el efecto modular de las cápsulas hidratadas a lo largo de la cinética, se obtuvieron valores cada de 60 min. Se puede apreciar el incremento del diámetro conforme a la concentración del alginato de sodio utilizado en

la mezcla, es decir, la velocidad de hidratación obtiene un mayor valor al agregar el mucílago de chíá sucesivamente. La velocidad máxima de hidratación en cápsulas con presencia de alginato al 2% se obtuvo en la muestra 2 la cual presenta una proporción del 25% de mucílago de chíá (0,1817 mm/h), mientras que en la concentración de 3% de alginato la hidratación más rápida la presentó la cápsula en 50% de mucílago de chíá (0.1943 mm/h), por último, el incremento del diámetro promedio de 0.1926 mm/h se obtuvo en cápsulas con concentración 5% de alginato en un 75% de mucílago de chíá. Cabe mencionar que la incorporación del mucílago de chíá en las muestras es de suma importancia debido a la facilidad de la velocidad de hidratación de las cápsulas, ya que este polisacárido posee una gran capacidad para absorber y retener agua varias veces su peso en agua (Muñoz, 2012). Salgado (2015) menciona la comparación de retención de agua de diferentes semillas, destacó que la semilla de chíá tiene mejor valor respecto a la hidratación y que es atribuida al contenido de fibra soluble presente en el mucílago.

Respecto a los valores de la velocidad de hidratación de las cápsulas, se define que, las cápsulas con mejor velocidad están en concentración 2, 3 y 5% de alginato de la muestra 2, 3 y 4 respectivamente. El tamaño y la forma de las cápsulas requeridas para su uso en la encapsulación están presentes en la muestra 3 (%M=50, %A=50) en concentración 3% de alginato, mientras que en un 5% de alginato está la muestra 4 (%M=75, %A=25). Us-Medina (2017) hace referencia que en proporción 50:50 de mucílago de chíá y alginato de sodio, tienden a formarse cápsulas esféricas, no agregadas y de diámetro uniforme. Por lo tanto, para la encapsulación de las BAL se seleccionaron las cápsulas de la muestra 3 (%M=50, %A=50) del Cuadro 3 antes mencionada, con un 3% de alginato de sodio.

En la siguiente Figura 21 se muestra el proceso de hidratación de 4 h de la cápsula seleccionada para el encapsulamiento de las bacterias ácido lácticas (BAL).

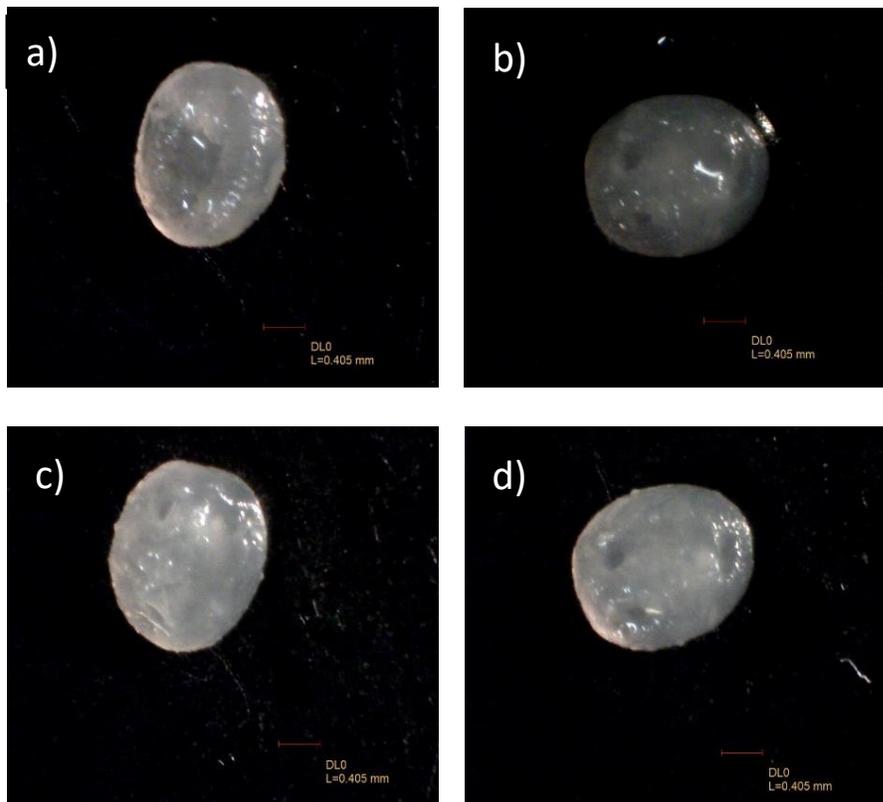


Figura 21. Micrografía de cápsulas en concentración 3% de alginato de sodio y proporción de %M=50, %A=50 (Muestra 3) en diferentes tiempos de hidratación ($\phi=1.243\text{mm}$): a) 1h ($\phi=1.829\text{mm}$), b) 2h ($\phi=1.981\text{mm}$), c) 3h ($\phi=2.05\text{mm}$), d) 4h ($\phi=2.104\text{mm}$).

7.5 Determinación de colonias viables de BAL

Los datos obtenidos de las células viables expresadas en $\text{Log}^{10}\text{UFC/ml}$, nos permite conocer la concentración de BAL para su encapsulación. En consideración del inicio de la fase estacionaria en un tiempo de 6 h (Andrade, 2018) de las BAL identificadas como QJ Y QR se obtuvieron 8.17 y 8.06 $\text{Log}^{10}\text{UFC/ml}$ respectivamente, representada en la Figura 22.

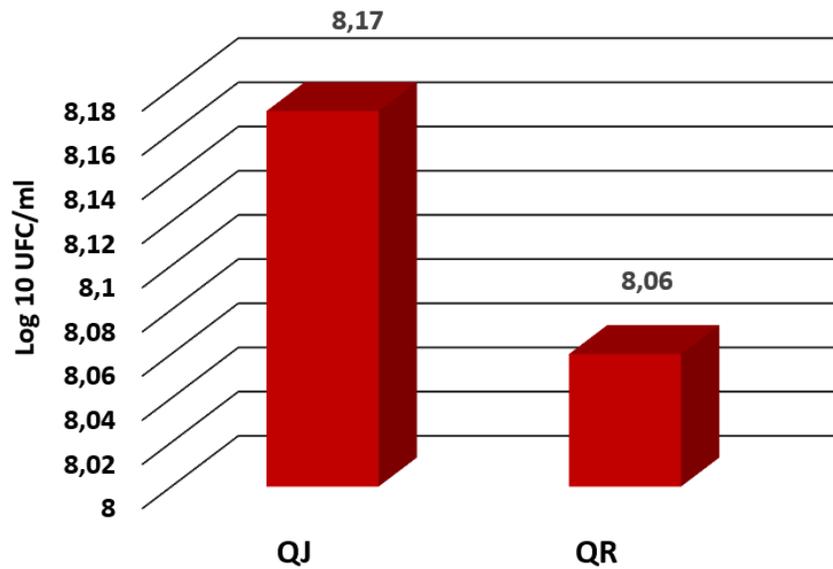


Figura 22. Conteo colonial de las BAL en etapa de crecimiento exponencial.

7.6 Encapsulación de BAL

La incorporación de las BAL en la matriz mucílago-alginato seleccionado anteriormente fue eficaz, ya que no hubo complicaciones al transcurso del proceso de la encapsulación, hubo un fácil manejo en la formación de las cápsulas con la jeringa y por consiguiente las cápsulas se mantuvieron a lo largo del proceso en un ambiente estéril sin complicaciones, posteriormente, fueron almacenadas a temperatura ambiente. En la formación de las cápsulas con las BAL se observaron que éstas presentaban forma esférica y uniforme, así mismo una vez que las cápsulas fueron deshidratadas como se observa en la Figura 23.

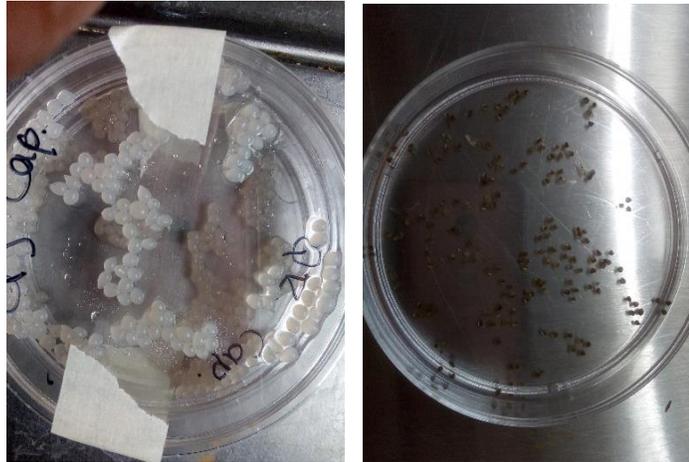


Figura 23. Formación de cápsulas con BAL húmedas y deshidratadas.

La concentración de biopolímeros aumenta la eficacia de la encapsulación, ya que la alta viscosidad y rápida solidificación en la fase dispersa contribuyen a la reducción de porosidad de las micropartículas. Una alta concentración de polímeros tiene la eficiencia de precipitar más rápido en la solución dispersa evitando y retrasando la difusión del compuesto activo dentro de las gotas poliméricas.

La encapsulación por gelificación iónica se ha aplicado extensamente en probióticos para diferentes líneas de investigación en la industria alimentaria, si bien, aspectos muy importantes en su formación, el cual esta técnica no genera daño celular asegurando la viabilidad de probióticos, además, algunos autores argumentan la simplicidad, fácil manejo del equipo, bajo costo y suave manejo de los microorganismos (Montes, 2013).

Debido a que esta técnica se lleva a cabo por goteo, la adición de microorganismos en hidrocoloides para la suspensión a una solución de endurecimiento, va a variar el tamaño de las cápsulas obtenidas de acuerdo al diámetro de salida de la solución, mientras menor es el diámetro de la aguja, menor será el tamaño. El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes, en donde el ion calcio es el más empleado. La gelificación se produce en una zona de unión entre el ácido

glucurónico del alginato enlazado del mismo ácido de otra molécula de alginato a través del ion calcio dando lugar a un gel (Draget, 2000).

7.7 Viabilidad de las BAL encapsuladas

Numerosos estudios han demostrado que la viabilidad del probiótico en un producto alimenticio no solo depende de las condiciones de almacenamiento sino también de la matriz y el procesamiento de los alimentos. Se han encapsulado probióticos como *Bifidobacterium adolescentis* en alginatos con mezclas de biopolímeros *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* en perlas de alginato de calcio con y sin recubrimiento de alginato de sodio, en donde los autores encontraron que las perlas recubiertas de alginato podrían reducir la pérdida de viabilidad de las cepas ante el medioambiente adverso. (Mokarram, 2009).

Llevado a cabo las condiciones adecuadas (pH, temperatura) para el proceso de hidratación en liberación de las BAL en diferentes matrices (agua destilada y agua peptonada), se observó el aumento del tamaño de las cápsulas después de 4 h de hidratación, posteriormente para el conteo de colonias en agar MRS. Los resultados mostraron que no hubo liberación o crecimiento de BAL de ninguna de las dos cepas encapsuladas. Debido a lo anterior, Fuchs *et al.*, (2006) reporta que la eficiencia de liberación controlada, depende principalmente de la composición y estructura de la pared, así como las condiciones de operación durante la producción y uso de las partículas (temperatura, pH, presión, humedad), esta condición está en función del tipo de polímero empleado que pueden ser hidrofílico o lipídico. Por otra parte, Nag, (2011) hace referencia que el material central se libera por difusión a una velocidad que aumenta con el incremento de la temperatura. La estabilidad de la cápsula depende de que su temperatura de transición sea superior a la temperatura de almacenamiento, mencionado esto, las cápsulas se sometieron a temperaturas de crecimiento de las BAL, es decir, 32 °C, ya que una elevada temperatura tiende a morir, lo cual no es factible para bacterias sino para otros componentes.

Draget (2000) menciona que el empleo de tratamientos térmicos y de esterilización también propician el proceso de despolimerización, lo que evidencia la reducción de

viscosidad relativa y la pérdida de resistencia del gel de haber habido la gelificación. Debido a esto, al someter a esterilización las muestras de mucílago y alginato de sodio se presentaba pequeñas burbujas de aire en el alginato de sodio después de la esterilización, siendo esto uno de los factores que afecta en la formación de las cápsulas.

La morfología de la superficie de las cápsulas es importante, ya que en cápsulas irregulares pueden aparecer grietas superficiales y/o profundas que conduce a la formación de poros, las cuales son los responsables de reducir la eficiencia de la encapsulación (Motazavian *et al.*, (2007). De acuerdo al autor, las cápsulas deshidratadas tienen las características de grietas superficiales y presencia de poros como se presenta en la Figura 20, si bien a la imagen, sería una de las causas del no crecimiento de BAL después de la encapsulación. Lupo (2015) reporta sobre las cápsulas elaboradas con alginato de sodio y extracto de cacao mediante gelificación iónica en un estudio por SEM, donde evidencia claramente grandes agujeros para las esferas preparadas en esta técnica.

Estudios realizados con George *et al.*, (2006) y Gouin (2004) indica que la principal desventaja de las cápsulas elaboradas con alginato es que son muy porosas y se pueden producir pérdidas del material activo durante su preparación, la cual conduce a la difusión relativamente rápida de la humedad y otros fluidos a través de las cápsulas, lo que reduce las propiedades de barrera contra factores ambientales desfavorables, además son susceptibles al ambiente ácido y se ha verificado la pérdida de estabilidad mecánica en los ambientes que contienen ácido láctico (Audet *et al.*, 1988).

Según estudios Chandramouli *et al.* (2004) nos dice que el quitosano de bajo peso molecular se difunde más rápidamente en la matriz de alginato en comparación con la matriz de alto peso molecular, lo que resulta en la formación de cápsulas con mayor densidad y resistencia, comparado con lo escrito anteriormente, el mucílago de chíá es un polisacárido de alto peso molecular pudiendo ser uno de los efectos de no liberación de las BAL.

VIII.- CONCLUSIÓN

La obtención de mucílago de la semilla de chía (*Salvia hispánica* L.), nos permite conocer las condiciones de extracción (temperatura y pH) y la densidad, llevando a cabo la hidratación para la liberación del mucílago, seguido a la trituración y centrifugación, así mismo, se obtuvo un rendimiento del 50% mediante la relación 1:10 (p/v).

La selección de la concentración de mucílago-alginato resulta dar la formación de cápsulas esféricas y uniformes, mediante la evaluación de pruebas reológicas y velocidad de hidratación para su uso en la encapsulación.

La técnica de gelificación iónica logró formar cápsulas de diferentes tamaños respecto a la viscosidad de las muestras evaluadas.

Se determinó el número de \log^{10} UFC/ml de BAL QJ y QR antes de la encapsulación, siendo 8.17 y 8.06 respectivamente.

La viabilidad de las BAL encapsuladas resultó ser negativa por diferentes factores y/o procesos de la encapsulación.

IX.- RECOMENDACIONES

La liberación controlada de la encapsulación de varias sustancias, ha sido importante para los compuestos que engloban o atrapan a velocidades controladas bajo la influencia de condiciones específicas. Para cumplir el objetivo se deben de considerar varios factores

- Realizar estudios específicos mediante el análisis por SEM, para observar morfología y estructura de la cápsula, así como el compuesto encapsulado y supervivencia.
- Mejorar la técnica de encapsulación, aplicando nuevos mecanismos de tiempo y manejo.
- Evaluar la capacidad de supervivencia de las BAL en un tiempo corto para la encapsulación de los biopolímeros aplicados.
- Realizar estudios para verificar la calidad mediante el análisis de cenizas, humedad, higroscopicidad, solubilidad, actividad acuosa, estabilidad del color y distribución celular.

X.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, A. M. (2011). Microencapsulación de biocidas, capítulo II: Proceso de microencapsulación. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. Química Analítica.

Andrade, A. J. A. (2018). Inhibición de bacterias patógenas por bacterias ácido lácticas en queso de cabra. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila.

Arapa, T. V. (2017). Determinación de tiempo y temperatura en la obtención de mucilago de chíá (*Salvia hispánica* L.) por dos métodos de extracción. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad De Ciencias Agrarias.

Audet, P., Paquin, C., Lacroix, C. (1988). Immobilized growing lactic acid bacteria with κ -carrageenan-locust bean gum gel. *Appl Microbiol Biotechnol*, 29. Pp.11-18.

Ayerza, R., Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25. Pp. 995-1003.

Azadnia, P., Zamani, M. H., Ahmad, G. S., Khalegh, B. A., Karimi, J. M., Taarof, N. (2011). Isolation and Identification of Thermophilic Lactobacillus from Traditional Yoghurts of Tribes of Kaserum. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(6). Pp. 774-776

Bach-Carhuamaca, V. Z. (2013). Estudio de la reducción del contenido de lactosa del lactosuero producido por las industrias lácteas utilizando mucílago nopal (*Opuntia ficus indica*). Tesis Licenciatura. Universidad Nacional del Centro del Perú. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

Bueno, M., Di Sapio, O., Barolo M., Busilacchi, H., Quiroga M., Severin, C. (2010). Análisis de la calidad de los frutos de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) comercializados en la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9. Pp.221-227.

- Burey, P., Bhandari, B. R., Howes, T., Gidley, M. J. (2008). Hydrocolloid gel particles: formation, characterization and application. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 48. Pp. 361-377
- Cahill, J. P. (2003) Ethnobotany of chia, *salvia hispanica* L. *Econ. Bot.* 57. Pp.604-618.
- Canizales, J. R., Rodríguez, G. R. V., Avila, J. A. D., Saldaña, A. M. P., Parrilla, E. A., Ochoa, M. A. V. (2018). Encapsulation to protect different bioactives to be used as nutraceuticals and food ingredients. In J.-M. Mérillon, & K. G. Ramawat (Eds.). *Bioactive molecules in food* (pp. 1–20). Cham: Springer
- Capitani, M. I. (2013). caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata.
- Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4). Pp.81-370.
- Castillo, S. L., Alvarado, J. M., Baez, J. G., Macías, E., Ramírez, B. P., Candelas, C. M. G., Gallardo, C. T. (2017). Diseño de Microcápsulas de alginato don matriz prebiótica de Aloe vera para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2. Pp. 531-536.
- Chagas, B. S., Machado, L. P., Haag, R. B., de Sousa, C. R., Lucas, E. F. (2004). Evaluation of hydrophobically associated polyacrylamide containing aqueous fluids and their potential use in petroleum recovery. *J. Appl*, 91. Pp. 3686–3692.
- Chandramouli, V., Kalasapathy, K., Peiris, P., Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulated gastric conditions. *J Microbiol Meth*, 56. Pp. 27-35.
- Chen, R.H., Chen, W.Y. (2001). Rheological properties of the water-soluble mucilage of a green laver, *Monostroma nitidium*. *Journal of Applied Phycology*, 13. Pp. 481-488.
- Cuapio, M. G. (2012). Caracterización fisicoquímica y microbiológicas de cubiertas comestibles a base de mucilago de chía (*Hyptis suaveolens*) aplicadas en manzana para prolongar la vida de anaquel. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma agraria Antonio Narro.

- Ding, W., Shah, N. (2009). Effect of various encapsulating materials on the stability. *Journal of Food Science*, 74. Pp.100-107
- Doleyres, Y., Lacroix, C. (2005). Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection *Int. Dairy J.* 15. Pp. 973–988.
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak, C. A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4). Pp. 452–490
- Draget, K. I., Skjåk, B. G., Smidsrød, O. (1997). Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21. Pp. 47–55.
- Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A. M., Napolitano, A., Vitale, D., Fogliano, V. (2005). Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Research International*, 38. Pp. 1167–1173
- Favaro, C. S., de Pinho, S. C., Aguiar, G. (2008). Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Braz. J. Food Technol*, 11(2). pp. 103-112
- Fuchs, M., C. Turchiuli, M. Bohin, M. Cuvelier, C. Ordonnaud, M. Peyrat and E. Dumoulin. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75. Pp. 27-35.
- Gandarillas, A. J. P. (2016). Evaluación de películas comestibles de salvia hispánica sobre microorganismos en carne de cerdo Landrace x York. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- George, M., y Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan: a review. *Journal of Controlled Release*, 114. Pp. 1-14.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends *Trends in Food Science & Technology*, 15. Pp. 330-347.

Guiotto, N. E. (2014). Aplicación de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) en alimentos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas.

Hernández, J.A., Miranda, S. (2008). Caracterización morfológica de chía (*Salvia hispanica* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31 (2). Pp. 105-113.

Huerta, H. J. (2018). Desarrollo de geles mucílago de nopal-alginato de sodio conteniendo aceite de ajonjolí mediante gelación iónica. tesis licenciatura. universidad autónoma del estado de México. Toluca México.

Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., Tomás, M. C. (2008). Physical properties of chia (*salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, 28(3). Pp. 286–293.

Jones, O. G., McClements, D. J. (2010). Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications, *compr. Rev. Food Sci. Food Saf*,4. Pp. 374–397.

Koocheki, A., Reza, T. A., Razoui, S. M. A., Bostan, A. (2009). Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. *Food Hydrocolloids*, 23. Pp. 2369-2379.

Korus, J., Tomasik, P., Lii, C. Y. (2003). Microcapsules from starch granules. *Journal of Microencapsulation*, 20. Pp. 47–56.

LEÓN, S. A. A. (2018). Efecto de la proporción de mucilago en polvo de semillas de chía (*salvia hispanica* L.) y membrillo (*cydonia oblonga*) en las características reológicas de un gel. Tesis Licenciatura. Facultad de ingeniería. Universidad César Vallejo.

Liu, Q., Michael, R. A., Yu, W. X. (2007). Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification-internal gelation-adsorption polyelectrolyte coating method. *International Journal of Pharmaceutics*, 339. Pp. 148-156.

López, H. O. D., Gómez, C.M. (2008). Preparación de microesferas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*, 42.

- Luo, Y., Pan, K., Zhong, Q. (2015). Casein/pectin nanocomplexes as potential oral delivery vehicles, *Int. J. Pharm.*, 2. Pp. 59–68.
- Lupo, B. P. (2015). Estudio de la gelificación de alginato para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones de alimentos funcionales. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona.
- Lupo, P. B., González, A. C., Maestro, G. A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3. Pp. 130-151.
- Maldonado, H. M. A. (2015). Evaluación del uso del mucílago de chía y la goma guar en la elaboración de mayonesa. Tesis Licenciatura. Universidad Técnica de Ambato.
- Marineli, R. S., Lenquiste, S. A., Moraes, E. A., Maro, S. M. R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Research International*, 76. Pp. 666-674.
- Martínez, H. J. L., Michelena, A. G., Ilinà, A., Nava, R. E. (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. *Revistas Científicas de América Latina*, 66. Pp. 64-70.
- McClements, D. J. (2014) Nanoparticle- and Microparticle-Based. Delivery Systems. Pp.37- 42.
- McClements, D. J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219. Pp. 27–53.
- McMaster, L., Kokott S., Mazutti P. 2005. Microencapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21. Pp. 723–728.
- Minga, C., Florely, E., Huamani, P., Rebeca, K. (2017). Evaluación tecnológica para la extracción del mucílago de la semilla de chía (*salvia hispánica* L.), y su aplicación como estabilizante en un néctar de fresa. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa, Perú.
- Mofidi, N., Aghaj, M. M., Sarbolouki, M. N. (2000). Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*, 35. Pp. 885–888.

Mohd, A. N. Keong, Y. S., Yong, H. W., Kee, B. B., Wei, T. S., Guan, T. S. (2012). The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Pp.1–10.

Mokarram, R. R., Mortazavi, S., Najafi, M. B., Shahidi, F., (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, 42. Pp.1040–1045.

Montes, R. L. M. (2013). Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469). Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia.

Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian J. Biotechnol*, 5(1). Pp. 1-18.

Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*. 108. Pp. 216–224.

Murúa, B., Beristain, C. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91. Pp. 380–386.

Nag, A. (2011). Development of microencapsulation technique for probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 431 using a proteinpolysaccharide complex. Thesis for the grade of Masters in Food Technology, Massey University, New Zealand.

Orona, T. D., Valverde, M. E., Paredes, L. O. (2017). Chia—The new golden seed for the 21st century: nutraceutical properties and technological. *Uses Sustainable Protein Sources*. Pp. 265–281.

Ozturk, B., McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions, *Current Opinion in Food Science.*, 7. Pp. 1-6.

- Pavunc, A. L., Beganovi, J., Kos, B., Uroic, K., Blazic, M., Suskovic, J. (2012). Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technology and Biotechnolgy*, 50. Pp. 141– 151.
- Pedroza, I. R. (2002). Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de Alimentos para larvas de especies acuícolas. VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Pp. 439-447.
- Peperkamp, M. (2014). Chia from Bolivia: A modern super seed in a classic pork cycle. CBI Marketed Intelligence. Pp. 1-15.
- Ramírez, N. J. (2006) Introducción a la reología de los alimentos. Colombia: Recitela.
- Reyes, C. E., Tecante, A., Valdivia, L. M. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107. Pp. 656-663.
- Reyes, N. L. A. (2010). Optimizacion y caracterización de la microencapsulación de la proteasa hemisfericina refinada. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Rodríguez, H. M. E. (2005). Microencapsulación por secado por aspersión de emulsiones múltiples W/O/W conteniendo carotenoides. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rojas, R. M. A. (2016). Evaluación técnica de microencapsulación de compuestos bioactivos empleando los métodos de coacervación y gelificación. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Manizales, Colombia.
- Rovati, A., Escobar E., Prado, C., (2008). Particularidades de la semilla de chíá (*Salvia hispanica* L.). *EEAOC- Avance Agroindustrial*. 33. Pp. 39-43.
- Salgado, C. M., Cedillo, L. D. Orozco, B. (2015). Estudio de las propiedades funcionales de la semilla de chíá (*salvia hispánica*) y de la fibra dietaría obtenida de la misma. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Guanajuato, México. Pp. 358-366.

- Serván, A. M. A. (2018). Interés Farmacéutico de los mucílagos. Tesis Licenciatura. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia.
- Souza, C. J. F., Garcia, R. E. E., Melo, N. R., Gaspar, A., Lins, J. F. C. (2013). Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides, *Food Hydrocoll*, 1. Pp. 375–381.
- Sparks, R. E., Jacobs, I. C. (1999). Controlled-release delivery systems for pesticides. HB.Scher, California. Pp. 4-11.
- Speranza, B., Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Altieri, C., Sinigaglia, M. (2015). Selection of autochthonous strains as promising starter cultures for Fior di Latte, a traditional cheese of southern Italy, *Journal of Science and Food Agriculture*, 95. Pp. 88–97.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., Holzapel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7. Pp. 377.
- US Department of Agriculture. (2004). Seeds, chia seeds, dried. nutrient database for standard reference, Release 27: Basic report: 12006. Report date, march 16, 2015.
- Us-Medina, U., Ruiz, R. J. C., Quintana, O. P., Segura, C. M. R. (2017). *Salvia hispanica* mucilage-alginate properties and performance as an encapsulation matrix for chia seed oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41. Pp. 1-9.
- Us-Medina, U., Segura, C. M. R. (2014). Microencapsulación de aceite de chía (*salvia hispanica*) con potencial nutracéutico. 6° Foro de Ciencias Químicas y Bioquímicas. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Valdivia, L. M. Á., Tecante, A. (2015). Chia (*Salvia Hispanica*). *Advances In Food And Nutrition Research*. Pp.53–75.
- Vazquez, G. J. (2010). Extracción y caracterización físico-química del mucilao de dos variedades de chan (*Hypis suaveolens*) Poit). XII congreso nacional de ciencia y tecnología de alimentos. Guanajuato, Guanajuato. Pp. 87.

- Vázquez, S. M., Suarez, H., Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producido por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36. Pp. 64-71.
- Vehring, R. (2008). Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical Research*, 25. Pp. 999-1022.
- Villena, M., Morales, H., Lara, G., Martínez, R. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica*, 50. Pp. 43-50.
- Wang, J., Schwendeman, S. P. (1999). Mechanisms of solvent evaporation encapsulation processes: prediction of solvent evaporation rate. *Journal of Pharmaceutical Science*, 88. Pp. 1090-9.
- Wei, Z., Huang, Q. (2019). Assembly of protein–polysaccharide complexes for delivery of bioactive ingredients: A perspective paper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67. Pp. 1344–1352.
- Williams, P. A., Phillips, G. O. (2000). Introduction to food hydrocolloids. In Phillips GO, Williams PA, editors. *Handbook of Hydrocolloids*. CRC Press, New York. Pp. 1-19.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2. Pp. 2-4.
- Yáñez, J., Salazar, J., Chaires, L., Jiménez, J., Márquez, M., Ramos, E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva*, 21. Pp. 313-319.