



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos

**Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei*  
Shirota en una gelatina de pitaya  
(*Stenocereus griseus* H.)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

**Q. A. MARTHA CELIA LOZANO PÉREZ LARA**

DIRECTORAS DE TESIS:

**M. en C. María del Carmen Beltrán Orozco**

**Dra. Yadira Rivera Espinoza**



México, D. F.

2011



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F. siendo las 10 horas del día 13 del mes de Diciembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La E. N. C. B. para examinar la tesis titulada:

**"Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei* Shirota en una gelatina de pitaya (*Stenocereus griseus* H.)"**

Presentada por el alumno:

<u>Lozano</u> Apellido paterno	<u>Pérez Lara</u> Apellido materno	<u>Martha Celia</u> Nombre(s)
-----------------------------------	---------------------------------------	----------------------------------

Con registro: 

B	0	7	0	9	6	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**Maestría en Ciencias en Alimentos**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

M. en C. María del Carmen Beltrán Orozco

Dra. Yadira Rivera Espinoza

Dra. Tzayhri Gallardo Velázquez

M en C María Teresa Cruz y Victoria

Dr. Alejandro Azaola Espinosa

Dr. Ramón Juan Arana Erasquin

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López

SENER  
SEBIO  
SECRETARÍA NACIONAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENTÍFICA E INVESTIGACIÓN TECNOLÓGICA  
SECRETARÍA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo, en el Laboratorio de Nutrición y en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos del Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la M. en C. María del Carmen Beltrán Orozco y de la Dra. Yadira Rivera Espinoza.

Durante el desarrollo de sus estudios, la sustentante fue becaria del Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 210893.

Además se contó con una beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI), dentro de los proyectos claves, 20080056 Enero a Diciembre 2008 y 20090168 de Enero a Diciembre del 2009.

No.	INDICE	Página
1	RESUMEN	1
1.1	ABSTRACT	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
3.	ANTECEDENTES	5
3.1	Alimentos funcionales	5
3.2	Probióticos	7
3.2.1	Beneficios por el consumo de probióticos	8
3.2.2	Características que poseen los microorganismos probióticos	9
3.2.3	Géneros microbianos utilizados como probióticos	11
3.2.4	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	13
3.2.5	Supervivencia o viabilidad de los probióticos en productos alimenticios	14
3.3	Cactáceas	17
3.3.1	Pitaya	19
3.4	Antioxidantes	22
3.4.1	Compuestos fenólicos	24
3.5	Relación entre microorganismos probióticos y antioxidantes.	26
4	JUSTIFICACIÓN	28
5	OBJETIVOS	29
a.	Objetivo General	29
b.	Objetivos Particulares	29
6.	MATERIALES Y METODOS	30
6.1	Materiales	30
6.1.1	Materia prima	30
6.1.2	Reactivos	30
6.1.3	Equipos	31
6.2	Desarrollo experimental	32
6.2.1	Desarrollo experimental del proyecto	32
6.2.2	Desarrollo experimental de elaboración de gelatinas de pitaya	33
6.2.3	Desarrollo experimental para la cuenta microbiológica	34
6.3	Métodos	35
6.3.1	Adquisición y acondicionamiento de la materia prima	35
6.3.2	Determinaciones fisicoquímicas de la pitaya y de las gelatinas	35
6.3.3	Cuantificación de la capacidad antioxidante del jugo de pitaya	35

	por el método de DMPD.	
6.3.4	Cuantificación de polifenoles en la pulpa de pitaya y en las gelatinas mediante el método de Folin-Ciocalteu	36
6.3.5	Preparación del inóculo	37
6.3.5.1	Tinción de Gram	37
6.3.5.2	Prueba de catalasa	39
6.3.5.3	Escala de Mc Farland	39
6.3.6	Elaboración de la gelatina de pitaya y adición del microorganismo	40
6.3.7	Evaluación de la viabilidad del microorganismo probiótico en la gelatina de pitaya.	42
6.3.8	Análisis estadístico de los resultados	42
7	RESULTADOS Y DISCUSION	43
7.1	Caracterización fisicoquímica del jugo de pitaya	43
7.2	Cuantificación de la capacidad antioxidante total del jugo de pitaya por el método DMPD.	45
7.3	Cuantificación de los compuestos fenólicos del jugo de pitaya por el método de Folin-Ciocalteu.	45
7.4	Preparación del inoculo	48
7.5	Influencia del pH, contenido de sólidos solubles y acidez titulable en la viabilidad del microorganismo durante la vida de anaquel de las gelatinas.	50
7.5.1	Efecto del tiempo en el pH	50
7.5.2	Efecto del tiempo en los sólidos solubles (°Brix)	53
7.5.3	Efecto del tiempo sobre la acidez titulable	54
7.5.4	Estudio de la viabilidad de <i>L. casei</i> Shirota	57
7.6	Cambios en los compuestos antioxidantes durante la vida de anaquel.	60
7.7	Relación entre la concentración de los compuestos antioxidantes y la viabilidad del probiótico	63
8	CONCLUSIONES	67
9	BIBLIOGRAFIA	68
10	ANEXOS	76

## INDICE DE CUADROS

No.		Página
1	Cepas comunes utilizadas como probióticos	11
2	Composición química de la Pitaya en base húmeda	20
3	Clasificación taxonómica <i>Stenocereus griseus</i>	22
4	Escala de Mc-Farland	40
5	Muestras de gelatina.	41
6	Determinaciones fisicoquímicas del jugo de pitaya	43
7	Comparación de resultados fisicoquímicos del jugo de pitaya	44
8	Capacidad antioxidante de las muestras de jugo de pitaya (n= 3).	45
9	Compuestos fenólicos totales de las muestras de jugo de pitaya (n= 3).	46
10	Comparación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales del jugo de pitaya (n= 3).	47
11	Resultados absorbancias de la Escala de Mc Farland	49
12	Comparación de la viabilidad con otros trabajos.	59
13	Resultados en la concentración de antioxidantes totales ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ gelatina) durante la vida de anaquel	60

## INDICE DE FIGURAS

No.		Página
1	Micrografía electrónica de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota.	13
2	Diferentes formas de administración de Probióticos	15
3	Pitaya de mayo sin espinas	20
4	Clasificación de los compuestos fenólicos	25
5	Diagrama del desarrollo experimental del proyecto	32
6	Diagrama elaboración gelatinas	33
7	Diagrama del desarrollo de la cuenta microbiológica	34
8	Observación macroscópica de las colonias aisladas a partir de Yakult en MRS.	48
9	Tinción de Gram del microorganismo aislado a partir de Yakult en MRS	49
10	Resultados de pH durante la vida de anaquel de las gelatinas y el jugo con inóculo (donde n= 3)	51
11	Gráfica de interacciones, análisis estadístico para pH.	52
12	Resultados de sólidos solubles durante la vida de anaquel de las gelatinas y el jugo con inóculo (donde n= 3)	53
13	Gráfica de interacciones, análisis estadístico para °Brix	54
14	Resultados de la acidez titulable expresada en % de ácido láctico durante la vida de anaquel de las gelatinas y el jugo con inóculo (donde n= 3)	55
15	Gráfica de interacciones, análisis estadístico para % ácido láctico.	56
16	Viabilidad de <i>L. casei</i> Shirota durante la vida de anaquel de las gelatinas inoculadas con UFC/ g de gelatina.	57
17	Gráfica de interacciones, análisis estadístico del contenido de antioxidantes en las gelatinas sin inóculo.	61
18	Gráfica de interacciones, análisis estadístico del contenido de antioxidantes en las gelatinas inoculadas	62
19	Relación entre viabilidad y concentración de antioxidantes de la gelatina con 30% de jugo de pitaya (n=3).	63
20	Relación entre viabilidad y concentración de antioxidantes de la gelatina con 60% de jugo de pitaya (n=3).	64
21	Relación entre viabilidad y concentración de antioxidantes de la gelatina con 90% de jugo de pitaya (n=3).	65
22	Relación entre viabilidad y concentración de antioxidantes del jugo de pitaya (n=3).	66

## **RESUMEN**

La pitaya es un fruto temporal proveniente de una cactácea columnar, cubierta con una cáscara delgada y suave, que lleva aréolas con cerdas, espinas o pelos. La pitaya es rica en antioxidantes debido a su contenido de polifenoles y betalainas (Oliva, 2006; Wu et al, 2006). Los antioxidantes son componentes protectores que consisten en un arreglo enzimático y nutrientes indispensables cuya función principal es prevenir la formación de radicales libres e interceptar los que ya se han generado (Morrisey y O'Brien, 1998; Calligaris et al, 2004; Parker et al, 2007). Los probióticos son cultivos activos que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal, ayudan a reforzar nuestro sistema inmunológico y tienen efectos positivos en la salud (Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Esquivel, 2004; Ipek et al, 2005). Durante muchos años estos microorganismos han sido administrados a través de productos lácteos. Hoy en día se pretende diversificar la disponibilidad de los productos probióticos en el mercado. En el presente trabajo se probó viabilidad de una cepa probiótica muy conocida, con efectos positivos en la salud comprobados científicamente, en una gelatina preparada con pitaya. La gelatina se utilizó como un vehículo para que los probióticos lleguen al consumidor en un producto no lácteo. La pitaya aportó propiedades sensoriales a la gelatina, además, por su composición química es una excelente fuente de fibra y de compuestos antioxidantes.

Se logró aislar a *L. casei Shirota* a partir de una alícuota de Yakult en agar MRS, se identificó al observar bacilos en cadena gram-positivos catalasa (-).

Se determinaron las características fisicoquímicas del jugo de pitaya así como su capacidad antioxidante total expresada en  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  por el método de Fogliano en jugo de pitaya fresco y tratado térmicamente.

Se elaboraron gelatinas al 3.5% de gretina y 12% de azúcar con 50% de jugo de pitaya tratado durante el análisis en la vida de anaquel de las gelatinas se determinaron parámetros fisicoquímicos como pH, sólidos solubles y % de ácido láctico. Además se realizó el conteo microbiológico observando que *L. casei*

*Shirota* el microorganismo probiótico es capaz de sobrevivir sin descender su cuenta del intervalo aceptado para productos probióticos.

### **1.1 ABSTRACT.**

Pitaya (*Stenocereus griseus* H.) is a Mexican temporary fruit –only harvested in may- of columnar cacti, it is also known as “pitaya de mayo”, which has been reported to have an important antioxidant capacity due to the high total phenolic content and the presence of the pigments betalains composed by betacyanins and betaxanthins. *Lactobacillus casei Shirota* is an acid-lactic bacteria considered as a probiotic which has beneficial health effects. The aim of this work was to establish the viability of *Lactobacillus casei Shirota* in a pitaya’s jelly. Pitayas were acquired at the market “Central de Abastos”. The pulp was conserved in zip-lock bags at –20°C. The juice obtained with Braun™ blender was filtered to eliminate the seeds and characterized with the following determinations by triplicate pH, °Brix (soluble solids), citric acid content and total antioxidant capacity by Fogliano’s method. To elaborate jellies 12% of sucrose, 3.5% of gelatin, 50% of pitaya’s juice previously treated at 92°C for 26s in order to eliminate pitaya’s endogenous microorganisms were mixed. Then the probiotic microorganism was quantified by Mc Farland’s method to add  $1 \times 10^9$  CFU/mL to the jelly, when the temperature was 30°C. The probiotic was previously isolated from Yakult™ and also identified as gram-positive and catalase negative. Pitaya’s jellies were analyzed each 48 h by triplicate measuring pH, °Brix and viable cells counts were determined by the standard plate method with MRS after 48h of incubation at 35°C. The pitaya’s juice characterization was pH=5.8 ± 0.114, °Brix = 10.26 ± 0.115, 0.15 ± 0.07 for the citric acid content and the total antioxidant capacity was 162.5 ± 18.11 µmolTrolox/mL. The viability of the microorganism at the jelly after 3 weeks was  $1 \times 10^8$  CFU/g, so the jelly was still considered as a probiotic product because this value is between the established ranges for probiotics which are  $1 \times 10^6$  –  $1 \times 10^8$  CFU/g.. It was observed that pitaya’s jelly was capable to provide good support keeping the viability of the probiotic microorganism.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos conocidos como probióticos cuando son consumidos en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud incluyendo la reducción del nivel de colesterol, mejorando las funciones gastrointestinales y fortaleciendo el sistema inmunológico (Yoon *et al*, 2006). Por extensión de la palabra, también se le llama probiótico a los productos alimenticios que son vehículo de tales microorganismos (Schrezenmeir y De Vrese, 2001).

Este tipo de microorganismos se han consumido en alimentos tales como el yogurt, tal vez por cientos de años, pero no fue sino a inicios del Siglo XX que los científicos comenzaron a investigar las razones de los beneficios de su consumo (Young, 1998). El premio Nobel Elie Metchnikoff asoció la salud y la longevidad con la ingesta de bacterias presentes en leches fermentadas. Se creyó que las bacterias presentes en el yogurt controlaban las infecciones causadas por microorganismos patógenos entéricos y sus toxinas. Estas observaciones indujeron un incremento en la manufactura y consumo de productos que tuvieran microorganismos benéficos para la salud. La investigación para el desarrollo específico de bacterias probióticas se inició en Japón en la década de los treinta del siglo XX, lográndose aislar y reforzar a la primera cepa probiótica en el mundo, llamada *Lactobacillus casei Shirota*, la cual dio origen a la primera leche fermentada con características de producto probiótico (Esquivel, 2004).

Un gran número de bacterias y levaduras se han utilizado como probióticos, incluyendo *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus* (Blandino, 2003).

La incorporación de los cultivos probióticos a los alimentos no ha sido tan sencilla, la viabilidad de un probiótico en el producto terminado depende de factores como la disponibilidad de los nutrientes, factores de crecimiento e inhibidores de crecimiento, la concentración de los solutos, el nivel de inoculación, la temperatura

de incubación y la temperatura de almacenamiento del alimento (Donkor *et al*, 2006).

La mayoría de los productos encontrados en el mercado son lácteos sin embargo hoy en día las frutas representan un excelente vehículo para la administración de probióticos debido a los nutrientes benéficos como minerales, vitaminas, azúcares fermentables y antioxidantes que contienen, los cuales favorecen la viabilidad de los microorganismos probióticos en el producto final.

En particular la fruta pitaya de mayo, proveniente de una cactácea columnar nativa de México, tiene un alto contenido de compuestos fenólicos incluyendo los pigmentos betalainas que le confieren capacidad antioxidante. Los antioxidantes son componentes protectores, que previenen la formación de radicales libres e interceptan los que ya se han generado, algunos ejemplos son enzimas como la superóxido dismutasa, nutrientes indispensables como vitamina C y E, fosfolípidos, pigmentos y compuestos fenólicos.

En general los compuestos fenólicos ayudan a prevenir el riesgo de enfermedades crónicas como cáncer, degeneración neuronal relacionada con la edad y enfermedades cardiovasculares (Teow *et al*, 2007), en su estructura química poseen un anillo aromático unido a por lo menos un grupo hidroxilo.

En la actualidad, existen muy pocos estudios que informen acerca del comportamiento de microorganismos probióticos en presencia de compuestos antioxidantes.

Durante la realización de este proyecto, se evaluó la viabilidad de una cepa probiótica con efectos benéficos a la salud científicamente probados, en una gelatina, preparada con pitaya que posee un alto contenido de compuestos antioxidantes, para así obtener un alimento funcional.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos productos alimenticios que gracias a sus componentes alimentarios proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica, es decir, producen un impacto benéfico, clínicamente comprobado sobre la salud; curando enfermedades o disminuyendo el riesgo de tenerlas. Entre sus principales características encontramos que cuentan con cualidades nutritivas y benéficas para diversas funciones del organismo, mejoran el estado de salud, previenen o disminuyen el riesgo de contraer enfermedades y su consumo no posee efectos nocivos (Krause, 2004; Prado *et al*, 2008).

Desde los 80's se les ha llamado alimentos medicinales, nutraceuticos, alimentos terapéuticos, super-alimentos, alimentos de diseño entre otros (Prado *et al*, 2008).

Los nutraceuticos son alimentos o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades, además, de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético; también son productos de origen natural con propiedades biológicas activas. Se puede definir como un suplemento dietético, presentado en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), de una sustancia natural bioactiva concentrada presente usualmente en los alimentos y que, tomada en dosis superior a la existente en esos alimentos, presumiblemente, tiene un efecto favorable sobre la salud, mayor que el que podría tener el alimento normal (Krause, 2004).

En diversas investigaciones se ha visto que la adición de probióticos a los alimentos, provoca beneficios en la salud como mejorar las funciones

gastrointestinales, fortalecer el sistema inmunológico y disminuir el riesgo del cáncer de colon (Yoon *et al*, 2006).

El beneficio de la adición de prebióticos a los alimentos es que estimulan la activación del crecimiento de bacterias buenas como Bifidobacterias, Lactobacilos y otras bacterias en el intestino grueso. Los prebióticos son productos alimenticios no digeribles o fibra que estimula el crecimiento de las especies bacterianas, que están presentes en el colon y mejoran la salud del huésped, contiene sustratos que nutren a la microbiota o microflora intestinal benéfica. Ejercen influencia en la digestión y absorción de carbohidratos en el intestino delgado así como en el metabolismo de lípidos y glucosa y en la protección en contra de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Holzapfel y Schillinger, 2002).

Son ejemplos de prebióticos, la fibra alimentaria y los fructooligosacáridos (FOS), así como la inulina que son azúcares simples de cadena corta (neoazúcares), con una longitud de 3 a 10 unidades de azúcar de los cuales por lo menos dos son fructosa (Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Krause, 2004; Luckow y Delahunty, 2004; Ipek *et al*, 2005).

Otros prebióticos en estudio son: galacto-oligosacáridos, isomalto-oligosacáridos, lactosacarosa y xylooligosacáridos. Algunas fuentes de prebióticos por su alto contenido en fibra son miel, cerveza, cebolla, espárragos, centeno, alcachofa, plátano, maple, avena, cebolla, espárragos (Cagigas y Blanco, 2002).

Cuando un producto alimenticio contiene probióticos y prebióticos, se le llama simbiótico y su efecto involucra dos regiones del tracto gastrointestinal es decir el intestino delgado y el grueso (Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Ipek *et al*, 2005).

### **3.2 Probióticos**

La palabra probiótico significa en pro de la vida. Son cultivos activos tales como las bacterias lácticas y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal, para restituir la población del medio interno y proteger la integridad intestinal, debido a que son capaces de sobrevivir la digestión llegando vivas al colon (Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Esquivel, 2004; Ipek *et al*, 2005).

Estas bacterias ayudan a reforzar nuestro sistema inmunológico y tienen efectos positivos en la salud. De acuerdo a la FAO/OMS (2001) los probióticos son microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del huésped.

Por extensión de la palabra, también se le llama probiótico a los productos alimenticios que contienen microorganismos viables, en una población suficiente para que su viabilidad y actividad metabólica se mantengan en todas las etapas del proceso de producción del alimento (Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Esquivel, 2004; Ipek *et al*, 2005; Cruz *et al*, 2009).

El premio Nobel Elie Metchnikoff asoció la salud y la longevidad con la ingesta de bacterias presentes en leches fermentadas. Se creyó que las bacterias presentes en el yogurt controlaban las infecciones causadas por microorganismos patógenos entéricos y sus toxinas. Estas observaciones indujeron un incremento en la manufactura y consumo de productos que tuvieran microorganismos benéficos para la salud. La investigación para el desarrollo específico de bacterias probióticas se inició en Japón en la década de los treinta del siglo XX, lográndose aislar y reforzar a la primera cepa probiótica en el mundo, llamada *Lactobacillus*

*casei Shirota*, la cual dio origen a la primera leche fermentada con características de producto probiótico (Esquivel, 2004).

Recientemente se han incrementado marcadamente la calidad y cantidad de estudios publicados que documentan los beneficios a la salud y los mecanismos de acción de los microorganismos probióticos. Al mismo tiempo ha aumentado globalmente la disponibilidad y variedad de productos comerciales (Tuorila *et al*, 1998; Young, 1998).

### **3.2.1 Beneficios por el consumo de probióticos**

Los probióticos inhiben el desarrollo de bacterias tóxicas, al competir con los sitios de adhesión y nutrientes, inhiben la proliferación de microorganismos patógenos y promueven el crecimiento de las bacterias características del tracto gastrointestinal. Estos producen ácidos orgánicos que reducen el pH intestinal y retardan el crecimiento de bacterias patógenas sensibles al ácido. Otros beneficios que aportan las bacterias probióticas son las que se mencionan a continuación.

#### 1. Nivel nutricional

- \* Producen vitaminas, hacen disponibles los minerales y oligoelementos.
- \* Producen enzimas digestivas muy importantes como la  $\beta$ -galactosidasa la cual a su vez alivia la intolerancia a la lactosa en el intestino delgado.
- \* Generan un efecto antagónico en contra de diarrea infecciosa, que es causada por antibióticos.
- \* Disminuyen el colesterol por asimilación, modifican la actividad hidrolasa de las sales biliares y tienen efecto antioxidante.

#### 2. Nivel terapéutico

- \* Mantienen la integridad de las mucosas, aumentan la movilidad del intestino aliviando el estreñimiento.

- \* Reducen las reacciones alérgicas inflamatorias.
- \* Efectos anticancerígenos en el colon.
- \* Refuerza el sistema inmunológico de respuesta inespecífica, incrementa la actividad fagocítica de células blancas, induce la síntesis de citocinas, incrementa la actividad lítica de las células, aumenta los niveles de inmunoglobulinas.
- \* Ayudan a controlar enfermedades urinarias en mujeres.
- \* Disminuyen el pH intestinal y destruyen las sustancias tóxicas.
- \* Producen compuestos antimicrobianos (bacteriocinas) que inhiben a los microorganismos patógenos.
- \* Minimizan los efectos perjudiciales de la terapia con antibióticos.

(Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Holpzafel y Schillinger, 2002; Ipek *et al*, 2005).

El consumo de probióticos ha probado tener efectos antimutagénicos, incluyendo la inhibición de la actividad de enzimas implicadas en la generación de carcinógenos y en la supresión de tumores. Se conoce que el ácido láctico producido por los probióticos se une a los pirolisatos (sustancias mutagénicas) y los degrada para su eliminación, otro mecanismo es el de la adsorción o secuestro de carcinógenos (aminas heterocíclicas, aflaxotina B1 y benzopirenos), lo que disminuye la mutagenicidad (Esquivel, 2004).

### **3.2.2 Características que poseen los microorganismos probióticos.**

Para que una cepa microbiana sea seleccionada como probiótica (Cuadro 1) debe cumplir con algunos criterios, el más importante es que dicha cepa sea segura para el organismo, que posea características deseables para el producto donde se quiere utilizar y que cumpla con los siguientes aspectos:

1. Aspectos generales como origen, identidad y resistencia a mutaciones.

2. Aspectos técnicos (propiedades de crecimiento *in vitro*, supervivencia durante el proceso y viabilidad durante transporte y almacenamiento).
3. Aspectos fisiológicos como resistencia al estrés del medio, a factores antimicrobianos que se encuentran en el paso estómago-duodeno (pH 2.5, jugo gástrico, sales biliares y jugo pancreático).
4. Aspectos funcionales y benéficos; adhesión a las células intestinales, colonización de la mucosa, competitividad, antagonismo con patógenos, estimulación del sistema inmunológico, estimulación del crecimiento de las bacterias autóctonas del tracto gastrointestinal.
5. Aspectos de seguridad; que no transfieran resistencia a antibióticos ni factores virulentos (Esquivel, 2004; Ipek *et al*, 2005).

La supervivencia de las cepas en el producto final dependerá de muchos factores como pH, presencia de conservadores y de sustancias inhibidoras de crecimiento potenciales. En un estudio realizado por Vinderola *et al*, (2002) se encontró que el acesulfame, colorantes rojo y naranja naturales, acetoína, saborizantes de durazno y fresa no interfieren con el crecimiento de cultivos iniciadores de bacterias lácticas y probióticos. Se determinó que en las siguientes concentraciones compuestos como KCl (2 % p/V), sacarosa (20 % p/V), aspartame (0.12 % p/V), saborizante de vainilla (0.14 % p/p) y plátano (0.2 % p/V) si inhibían el crecimiento. En específico las únicas cepas que probaron sobrevivir en presencia de nicina (antibiótico producido por *L. lactis* contra gram-positivos utilizado como conservador en quesos y otros productos lácteos) fueron *L. acidophilus* y *S. thermophilus*.

### **3.2.3 Géneros microbianos utilizados como probióticos.**

Los principales microorganismos que se han utilizado como probióticos (Cuadro 1) son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus* (Blandino, 2004).

El uso de las cepas del género *Lactobacillus* como microorganismos probióticos se ha determinado por:

- \* Su asociación con productos fermentados tradicionales y su gran aceptabilidad.
- \* Su asociación con el tracto gastrointestinal interactuando benéficamente con el ecosistema del intestino delgado.
- \* La adaptación a productos lácteos y otros alimentos y su larga historia de aplicaciones en la Industria Alimentaria.

**Cuadro 1. Cepas comunes utilizadas como probióticos**

<b><i>Bifidobacterium sp</i></b>	<b><i>Lactobacillus sp</i></b>	<b>Otros</b>
<i>B. adolescentes</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>B. animalis</i>	<i>L. bifidus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides dextranicum</i>
<i>B. breve</i>	<i>L. brevis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. brevis</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>Pediococcus acidophilus</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>L. casei</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>B. infantis</i>	<i>L. casei rhamnosus</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>B. lactis</i>	<i>L. casei Shirota</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>B. longum</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>Pediococcus acidophilus</i>
<i>B. thermophilum</i>	<i>L. collinoides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
	<i>L. cremoris</i>	
	<i>L. crispatus</i>	
	<i>L. delbriekii bulgaricus</i>	
	<i>L. dextranicum</i>	
	<i>L. fermentum</i>	

	<i>L. gallinarum</i>	
	<i>L. lactis</i>	
	<i>L. lactis biover oliacetylactis</i>	
	<i>L. plantarum</i>	
	<i>L. reuteri</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	
	<i>L. ruminis</i>	
	<i>L. salivarius</i>	
	<i>L. vitulinus</i>	
	<i>L. paracasei</i>	
	<i>L. johnsonii</i>	
	<i>L. gasseri</i>	

(Blandino *et al*, 2003; Ipek *et al*, 2005)

Las especies del género *Lactobacilos* son microorganismos exigentes o fastidiosos ya que para su crecimiento óptimo requieren carbohidratos fermentables, aminoácidos, vitaminas del complejo B, ácidos nucleicos y minerales (Gomes y Malcata, 1999). Tienen una amplia historia de ser utilizados en productos alimenticios fermentados, se distinguen por su capacidad de atravesar en gran número la barrera gástrica y sobrevivir durante el tránsito intestinal, para así poder desarrollar sus efectos benéficos en el intestino (Cobo *et al*, 2006).

En particular al microorganismo *Lactobacillus plantarum* se le adjudica ser un probiótico seguro, con el potencial de reducir el colesterol sérico y los niveles de triglicéridos según los resultados de un estudio de Nguyen *et al*, (2007) en el cual se demostró que disminuyó el 7% del total de colesterol y el 10% de triglicéridos en el grupo de ratas que se alimentaron con dicho microorganismo comparado con el grupo control.

### **3.2.4 *Lactobacillus casei* Shirota**

*Lactobacillus casei* Shirota es una bacteria Láctica, gram-positiva, no esporulada (Figura 1) que pertenece al Phylum Firmicutes, Clase Bacilli, Orden Lactobacillales.

El metabolismo de *L. casei* Shirota es heterofermentativo gracias a que posee una enzima llamada fosfoacetolasa, que le permite poder seguir la vía de las pentosas convirtiendo hexosas (principalmente glucosa) en pentosas y teniendo como productos finales una variedad de compuestos reducidos además de lactato, como ácido acético, etanol, bióxido de carbono y además a partir de piruvato produce peróxido de hidrógeno (Boone et Castenholz, 2001).

Es una bacteria anaerobia facultativa es decir crece de manera óptima en condiciones anóxicas, pero puede presentar crecimiento si la concentración de oxígeno es baja, debido a que posee enzimas como NADH oxidasa, NADH peroxidasa que minimizan la toxicidad de compuestos activados por el oxígeno (González *et al*, 2004).

*Lactobacillus casei* Shirota se considera una bacteria GRAS (generalmente reconocida como segura) y un microorganismo probiótico (Boone y Castenholz, 2001)



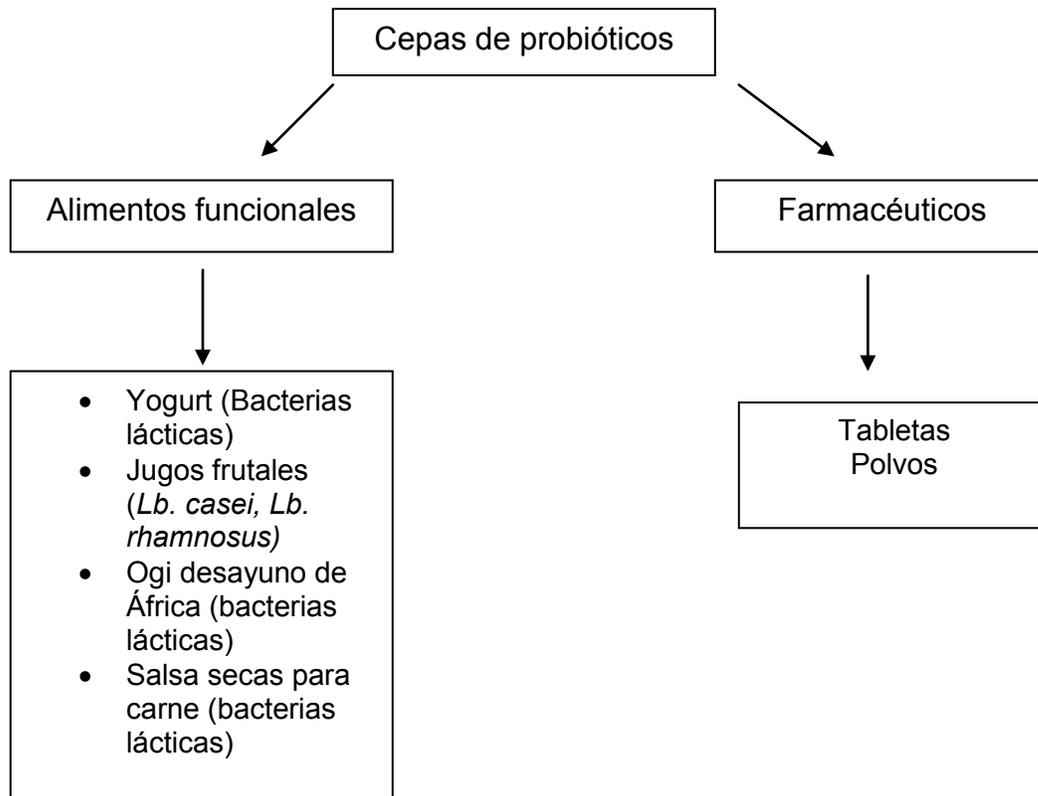
Figura 1. Micrografía electrónica de *Lactobacillus casei* Shirota.

Al probiótico *Lactobacillus casei* Shirota se le han comprobado beneficios como: inhibir microorganismos patógenos (*Salmonella*, *Shigella* y *Helicobacter*), reducir la intolerancia a la lactosa y aumentar la respuesta inmunológica (Maragkoudakis *et al*, 2006). Además previene los malestares intestinales, mantiene el balance de la microflora intestinal y disminuye la actividad enzimática fecal (Magariños *et al*, 2008).

En un estudio realizado por Tuohy *et al*, (2007) se comprobó la habilidad de *L. casei Shirota* de sobrevivir el paso del tracto gastrointestinal humano, comprobando su presencia aún después de una semana sin consumir el producto probiótico. Además en otro estudio realizado por Maragkoudakis *et al*, (2006) este microorganismo sobrevivió a pH = 3 durante 3 horas y pH=2 durante 1 h, es resistente a la pancreatina y a las sales biliares, no presenta actividad hemolítica.

### **3.2.5 Supervivencia o viabilidad de los probióticos en el producto**

La incorporación de los cultivos probióticos a los alimentos no ha sido tan sencilla, esto es por las condiciones que dichos microorganismos necesitan para desarrollarse, entre ellas se destacan atmósferas anaeróbicas, pH entre 5,6 y 7. Hasta la fecha, han sido desde sus comienzos, muchos los productos lácteos (yogurt, helado, leches fermentadas y queso) que han servido de vehículo a las bacterias probióticas (Heenan *et al*, 2004).



**Figura 2. Diferentes formas de administración de Probióticos**  
(Ipek *et al* 2005; Leroy *et al*, 2006; Omemu *et al*, 2007).

Las bacterias probióticas se han aplicado en muchos productos a nivel mundial (Figura 2). Han sido adicionadas a los alimentos, en productos farmacéuticos y en la alimentación de animales. Una consideración muy importante es que los productos contengan una dosis efectiva de células viables durante toda su vida de anaquel, aún no existe un acuerdo que establezca cual es la mínima concentración de microorganismos probióticos en un producto para obtener beneficios en la salud. Sin embargo, se ha establecido por diversos estudios que la concentración mínima deberá ser mayor a  $10^8$  UFC/mL (Donkor *et al*, 2006; Cruz *et al*, 2009).

La aplicación de probióticos en los alimentos depende de factores como: actividad acuosa (*aw*), pH, concentración de sal y de otros ingredientes que puedan funcionar como antimicrobianos y del estrés mecánico provocado por el proceso (Ipek *et al* 2005).

Además de las propiedades en beneficio de la salud, los probióticos deben cumplir ciertos requerimientos para poder desarrollar un producto comercial, tales como la supervivencia, la actividad en el producto y la estabilidad durante el almacenamiento. No deberán afectar las características de sabor o aroma del producto ni acidificarlo durante su vida de anaquel (Donkor *et al*, 2006)..

La viabilidad de un probiótico en el producto terminado dependerá de factores como la disponibilidad de los nutrientes, factores de crecimiento e inhibidores de crecimiento, la concentración de los solutos, el nivel de inoculación, la temperatura de incubación y la temperatura de almacenamiento (Donkor *et al*, 2006). Otros factores que determinan la viabilidad de los microorganismos en el alimento son la cepa seleccionada, las interacciones entre las especies microbianas presentes, la producción de peróxido de hidrógeno por metabolismo bacteriano y la acidez final del producto (Cruz *et al*, 2009). Muchos probióticos al tener origen en el intestino, son sensibles al oxígeno, calor y concentraciones elevadas de ácido lo que les genera estrés y esto provoca que se desempeñen pobremente en muchos alimentos (Dave y Shah, 1997).

Las matrices más comunes para bacterias probióticas en alimentos han sido diferentes tipos de productos lácteos fermentados. Durante los últimos años la necesidad de diversificar los probióticos en el mercado ha aumentado, por lo que hoy en día se ha demostrado que los jugos frutales son un vehículo adecuado para los probióticos, últimamente ha crecido el interés por aplicarlos en productos cárnicos fermentados, al encontrarse que la carne protege las bacterias lácticas en contra de la acción letal de la bilis (Gänzle *et al*, 1999).

Además, se han realizado estudios con gretina para conocer su efecto en la viabilidad como agente encapsulante de microorganismos probióticos, actuando como una barrera física en contra de condiciones externas adversas (Kailasapathy, 2002; Chandramouli *et al*, 2004; Jales *et al*, 2007). Se han aplicado también en productos infantiles como leches en polvo y en otros productos basados en cereales y leguminosas (Lourens-Hatting y Viljoen, 2001; Schrezenmeir y De Vrese, 2001)

Las frutas y vegetales representan las nuevas matrices en alimentos que se comportan como vehículos de probióticos, son un medio ideal porque contienen nutrientes benéficos como minerales, vitaminas, fibra dietética y antioxidantes (Lucklow y Delahunty, 2003).

Existen estudios donde se determina la viabilidad de probióticos en diferentes productos reportándose que a pesar de la disminución del pH los microorganismos probióticos permanecieron por encima del nivel terapéutico de  $10^6$  UFC/g (Donkor *et al*, 2006). En particular *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus paracasei*; sobrevivieron por encima de  $10^7$  UFC/mL en jugo de naranja y  $10^6$  UFC/mL en jugo de piña durante 12 semanas (Sheehan *et al*, 2007).

### **3.3 Cactáceas**

Los cactus son un grupo de plantas con una gran variación, porque tienen que adaptarse a los diferentes ambientes en los que se los encuentra. Su capacidad de adaptación es muy grande y se cree que se han originado en un período de tiempo de aproximadamente 20 000 años (Lamb y Lamb, 2003).

La familia *Cactaceae* originaria de América, constituye uno de los grupos más representativos de la flora de México, en donde se cultivan principalmente los géneros *Opuntia spp.*, *Hylocereus spp.*, y *Stenocereus spp.* (López, 2006).

Estas plantas se identifican mediante la presencia en sus tallos de aréolas sin necesidad de dividir sus flores o frutos. La aréola es una estructura de aspecto algodonoso de donde surgen fibras lanosas, cercas, espinas, flores y frutos. Generalmente están muy desarrollados sus tejidos de almacenamiento (parénquima) lo que les permite conservar agua y nutrientes en sus tallos y raíces para sobrevivir durante prolongados períodos de sequía. Poseen flores muy vistosas, algunas veces son tan grandes que llegan hasta 40 cm de largo o tan pequeñas de medio centímetro. Sus colores son variados y combinados, las nocturnas siempre son blancas con algunos tonos amarillos o rojizos y las duernas son blancas, púrpura, amarillas, anaranjadas y verdes.

Una característica que les confiere su adaptación es que utilizan de manera eficiente el agua, es decir de cinco a diez veces mayor que los cultivos convencionales. Esta característica de aprovechamiento del agua, se debe a la vía fotosintética para esta familia, la vía del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) en estas plantas, los estomas se abren y capturan el dióxido de carbono en la noche cuando la transpiración es baja (Esquivel, 2004).

Las cactáceas columnares son elementos abundantes y diversos desde épocas prehispánicas. Han sido recursos económicos, culturales y alimenticios importantes entre la población indígena y rural, especialmente por el agua que contienen sus tejidos, por la gran cantidad de hidratos de carbono en sus frutos y las proteínas y grasas de las semillas. Las comunidades indígenas y los animales aprovechan los tallos de diversas especies, en épocas de sequía, para calmar la sed y el hambre, masticando la jugosa pulpa (Valles y Rodríguez, 1997; Pérez, 2004; Oliva, 2006).

En las cactáceas, los principales pigmentos son las clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos. Sin embargo los pigmentos hidrosolubles más importantes, que dan el color a las flores y los frutos son: las betacianinas (coloración rojo-violeta) y las betaxantinas (coloración amarilla), ambos son compuestos nitrogenados (Wu *et al*, 2006).

### **3.3.1 Pitaya**

El término pitaya es de procedencia haitiana que significa “fruta escamosa”.

El pitayo es una cactácea columnar, nativa de México, que se ha utilizado como complemento de la dieta desde tiempos ancestrales en Oaxaca. Posee un tallo arborescente de 6-9 m con un tronco ramoso de 35 cm de diámetro y flores de 10 cm blancas que produce frutos jugosos comestibles conocidas como pitayas las cuales son bayas con forma ovoide o elipsoide, a veces algo ficoides piriformes, cubiertas con una cáscara o pericarpio más o menos delgados y generalmente suave, que lleva aréolas con cerdas, espinas o pelos, estas aréolas son caducas al madurar el fruto; a veces están sustentadas por una escama de forma, consistencia y tamaño variable según la especie (Yáñez *et al*, 2005).

La pitaya consta de un lóculo o cámara en su interior donde se encuentran numerosas semillas. La pulpa posee un aroma intenso, es jugosa y muy azucarada, generalmente de color rojo purpúreo, pero pueden ser blancas con tintes más o menos intensos, rosados o amarillentos, rara vez verdosos. La importancia alimenticia de la pitaya radica en el alto contenido de azúcares y cantidades considerables de vitaminas B, C y E. La composición química de la pitaya se enlista en el Cuadro 2 (Guzmán, 2000; Oliva, 2006)

## Cuadro 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA PITAYA EN BASE HUMEDA

<i>Prueba</i>	<i>Valor</i>
Humedad (%)	84.5
Proteína (%)	1.3
Fibra cruda (%)	2.1
Grasa (%)	0.1
Densidad relativa (jugo)	1.04
pH	4
Azúcares reductores	8.12

(Guzmán, 2000)

El género *Stenocereus* (gr. *steno* = delgado y lat. *cereus* = vela de cera), comprende unas 24 especies distribuidas desde el límite de los Estados Unidos hasta Perú y Venezuela, así como también en las Antillas. En México, el género está representado por 19 especies distribuidas en casi toda la República, pero siendo más abundantes al Sur y Sureste del eje Volcánico Transversal.

En la zona de la Mixteca Baja y Valle de Tehuacan, Puebla se cultiva y comercializa en estado fresco, como mermelada, pulpa concentrada o en aguas frescas y helados la “pitaya de mayo” fruto de *Stenocereus griseus* (Figura 3) (Felger y Moser, 1985).



Figura 3. Pitaya de mayo sin espinas.

Las plantas pertenecientes a este género, crecen en climas tropicales, se desarrollan en suelos con poca humedad, drenados y con un pobre contenido de nutrientes. Se encuentran gradualmente en lugares con poca precipitación; las temperaturas donde prosperan por lo general son elevadas.

Normalmente una huerta inicia su producción 3 años después de plantada. Su floración ocurre de febrero a marzo, el fruto madura de mayo a agosto dependiendo del tipo de fruto que se trate. La planta solo florece de noche produciendo flores grandes y blancas que comúnmente se les llama “Flores de Luna” o “Reina de la Noche”. Una plantación puede durar alrededor de 25 a 30 años produciendo flores (Felger y Moser, 1985; Esquivel, 2004).

La pitaya se cosecha manualmente cuando cambia de color verde pálido a rosado o rojizo, se cortan con gancho que es una vara larga de otate o carrizo de 4.8 m de largo, cuya punta se divide en cuatro partes dando el aspecto de una pequeña canasta, así se sujeta al fruto y se deposita en un recipiente (Oliva, 2006).

Los comercializadores se encargan de limpiar (quitar las aréolas y espinas), algunas veces es sencillo y otras se requiere utilizar una navaja. Las pitayas limpias se colocan en canastos de otate “chiquihuites”, cajas o cubetas, dependiendo de la lejanía del lugar de la venta; las pitayas se acomodan en capas entre hojas de fresno o alfalfa para conservarlas frescas mientras llegan al consumidor. Sin embargo, es preferible que el envasado y traslado de los frutos a los centros de consumo o de venta se realice sin quitarles las aréolas con el fin de evitar el daño que sufre el fruto al eliminárselas, de esta forma se pretende aumentar su periodo de vida y que se proteja de golpes durante el transporte. En el cuidado postcosecha se sabe que la pitaya es muy sensible al etileno, sin embargo, soporta bien el CO<sub>2</sub> (Felger y Moser, 1985; Lezama, 1990; Oliva, 2006). Existen estudios donde se plantea que el almacenamiento de las pitayas en cartón a 9 °C es el mejor tratamiento que permite conservar su potencial y prolongar su

vida de anaquel, conservando las mejores características de calidad (físicas, químicas y fisiológicas).

Comercialmente se conocen dos tipos de pitayo, a los cuales se les llama comúnmente pitayo de mayo (Cuadro 3) y pitayo de temporal; el primero tiene su periodo de fructificación desde la segunda quincena de abril a junio y el segundo lo hace en los meses de julio a septiembre (Guzmán, 2000; Oliva, 2006).

**Cuadro 3. Clasificación Taxonómica de *Stenocereus griseus***

<i>Reino</i>	Vegetal
<b>Subreino</b>	<i>Embryophyta</i>
<b>División</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Clase</b>	<i>Dicotyledoneae</i>
<b>Orden</b>	<i>Cactales</i>
<b>Familia</b>	<i>Cactaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Cereoideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Pachycereae</i>
<b>Subtribu</b>	<i>Stenocereinae</i>
<b>Género</b>	<i>Stenocereus</i>
<b>Especie</b>	<i>griseus</i>

(Guzmán, 2000; Oliva, 2006)

La pitaya roja es rica en antioxidantes debido a su contenido de polifenoles y por su contenido de betalaínas (Valles y Rodríguez, 1997; Oliva, 2006), debido a esto se le podría considerar un alimento funcional. Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles que dan el color a las flores y los frutos, incluyen dos compuestos, betacianinas (color rojo-violeta) y betaxantinas (amarillas). Las betacianinas no son flavonoides pero contienen un grupo fenólico y al pertenecer a las betalaínas tienen un grupo amino cíclico, por lo que previenen la oxidación lipídica interactuando con radicales peróxilos y alcoxilos (Kanner *et al*, 2001; Wu *et al*, 2006).

### **3.4 Antioxidantes**

Los antioxidantes son componentes protectores que consisten en un arreglo enzimático y nutrientes esenciales (como vitaminas, pigmentos, aminoácidos) cuya función principal es prevenir la formación de radicales libres e interceptar los que ya se han generado (Morrisey y O'Brien, 1998). Existen antioxidantes naturales contenidos en los alimentos y también sintéticos, elaborados por la industria y adicionados a los alimentos.

En particular, los antioxidantes naturales (hidrosolubles y liposolubles) pueden funcionar como compuestos reductores, interrumpen la cadena de formación de radicales libres, inhiben o impiden la formación de oxígenos libres e inactivan los metales pro-oxidativos (Dugan, 1979). Los radicales libres se forman en el organismo mediante la respiración aeróbica y existen en diferentes formas como: anión superóxido, hidroxilos, peróxidos, y alcóxilos (Teow *et al*, 2007).

Existen muchas fuentes de antioxidantes naturales: avena, soya, hojas de té, granos de café, especias, arroz, aceites vegetales, vegetales, frutas, productos microbianos. En una sola fuente pueden encontrarse muchos compuestos, por lo que la actividad antioxidante de todo el producto será distinta si se purifican las fracciones y se mide su actividad antioxidante (Dugan, 1979).

Se ha demostrado que los antioxidantes contenidos en frutas son efectivos en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Serrano *et al*, 2007).

Los principales compuestos que tienen actividad antioxidante son: carotenoides, fosfolípidos, tocoferoles (vitamina E), vitamina C, compuestos fenólicos, flavonoides, pigmentos, algunos aminoácidos y sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Calligaris *et al*, 2004; Parker *et al*, 2007).

Las vitaminas E, C y los  $\beta$ -carotenos son importantes antioxidantes que funcionan de manera sinérgica inhibiendo la formación de radicales libres (Morrisey y O'Brien, 1998). Los compuestos fenólicos interfieren con el proceso de oxidación al reaccionar con radicales libres, quelan metales catalíticos y capturan el oxígeno (Woraratphoka *et al*, 2007).

En general, la actividad antioxidante aumenta cuando existen grupos hidroxilo o grupos donadores de hidrógeno en la estructura molecular del compuesto. Por lo tanto, las betalainas de la pitaya al contener grupos imino (cuyo nitrógeno puede donar electrones) e hidroxilo contribuyen al poder antioxidante (Solomons, 2000; Wu *et al*, 2006).

#### **3.4.1 Compuestos fenólicos**

Los polifenoles o compuestos fenólicos son sustancias orgánicas que poseen un anillo aromático, unidos a uno o más grupos hidroxilo. Los cuales agrupan un amplio intervalo, de sustancias que difieren en el número de átomos de carbono, que las constituyen en conjunto con el esqueleto fenólico básico, además del número y posición de los sustituyentes hidroxilo. Su clasificación se observa en la Figura 4 (Tura et Robards, 2002; Sakakibara *et al*, 2003; Itagaki *et al*, 2009).

Los polifenoles se consideran antioxidantes fuertes y secuestradores de radicales libres que inhiben la oxidación de lípidos (Priego *et al*, 2007).

En general, los polifenoles ayudan a prevenir el riesgo de enfermedades crónicas como cáncer, degeneración neuronal relacionada con la edad y enfermedades cardiovasculares (Teow *et al*, 2007). La actividad antioxidante se debe a la presencia del ortodiol o catecol en la estructura de los diversos compuestos, esto les da la capacidad de quelar metales, interceptar radicales libres y modular la actividad enzimática (Itagaki *et al*, 2009).

El consumo promedio de polifenoles al día es de 1g siendo las principales fuentes frutas, té y café, además de encontrarse en cereales, legumbres y vegetales (Parkar *et al*, 2008).

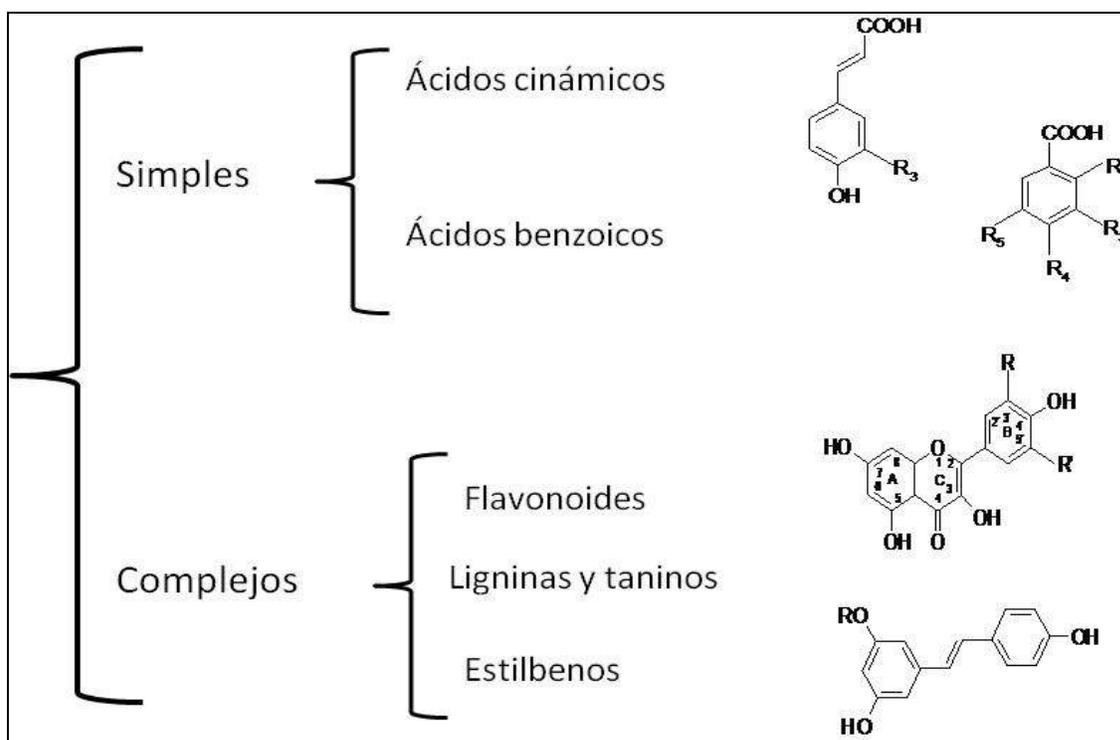


Figura 4. Clasificación de los compuestos fenólicos.

Algunos de los principales efectos biológicos que les confieren actividad antioxidante son:

- Suprimen la oxidación de lipoproteínas de baja densidad.
- Presentan antagonismo hacia receptores carcinogénicos.
- Modulan la secreción de las citocinas, así como la expresión de las cinasas proteicas en la proliferación de tumores.
- Inducen la expresión de enzimas anticarcinogénicas o inhiben la inducción de enzimas promotoras de cáncer
- Tienen propiedades antiinflamatorias, anti bacteriales y anti fúngicas (Sakakibara *et al*, 2003; Priego *et al*, 2007).

Las plantas y los alimentos contienen una gran variedad de derivados de polifenoles incluyendo polifenoles simples, derivados del ácido benzoico, flavonoides, taninos, ligninas (Xu y Chang, 2007). Sin embargo, la mayoría de los polifenoles presentes en alimentos están en sus formas conjugadas, los fenoles libres se encuentran únicamente en tejidos muertos (Imeh et Khokhar, 2002).

Los flavonoides que incluyen a las flavanonas, flavonoles y taninos condensados, funcionan como quelantes de metales, atrapan radicales libres, inhiben la xantina-oxidasa asociada a la formación de especies reactivas del oxígeno y la proliferación de células cancerígenas en pulmones, estómago y colon, además, previenen enfermedades coronarias. Los flavonoles se distribuyen en sus formas sin conjugar lo que les da una significancia metabólica (Lee *et al*, 2006; Xu et Chang, 2007).

### **3.4 Relación entre probióticos y compuestos antioxidantes.**

Existen diversos experimentos *in vitro* que demuestran que los flavonoides pueden ser metabolizados por las bacterias fecales humanas formando ácidos fenólicos y otros compuestos aromáticos.

En el estudio realizado por Lee *et al*, (2006) se encontró que el crecimiento de microorganismos patógenos como *E. coli* y *S. typhimurium* se inhiben con la presencia de compuestos fenólicos del té y particularmente por sus metabolitos aromáticos. Las bacterias probióticas evaluadas, en particular, *Lactobacillus casei Shirota*, no sufrieron inhibición de crecimiento en la presencia de dichos compuestos fenólicos. Es posible que las bacterias de la flora intestinal hayan desarrollado una mejor tolerancia a estos compuestos.

Distintos autores han sugerido que algunos compuestos fenólicos se comportan como activadores o en ocasiones como inhibidores de crecimiento dependiendo de su estructura química y su concentración.

García-Ruiz *et al*, (2008) encontraron que si la concentración de compuestos fenólicos es  $\geq 500$  mg/L el efecto es tóxico en el crecimiento microbiano, mientras que si la concentración está entre 100-250 mg/L, los microorganismos los toleraron e incluso los metabolizaron.

En el estudio de Parkar *et al*, (2008) encontraron que polifenoles como la naringina, catequina y epicatequinas presentan una fuerte actividad antibacteriana. Sin embargo, no establecieron que existiera una relación entre la estructura y la actividad de los polifenoles, únicamente que la glicosilación está directamente relacionada con una baja actividad antibacteriana.

Encontraron que *Lactobacillus rhamnosus* es menos sensible a los polifenoles, ya que la concentración mínima inhibitoria fue de 125 $\mu$ g/mL mientras que en el caso de patógenos como *S. typhimurium* o *E. coli* fue de 8  $\mu$ g/mL, con lo que los investigadores concluyen que la viabilidad del lactobacilo no será afectada por los polifenoles presentes en el intestino grueso.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El interés en desarrollar alimentos adicionados con probióticos últimamente ha crecido debido a los beneficios en la salud que se han comprobado científicamente de diversos microorganismos probióticos.

Actualmente en el mercado se encuentran alternativas como suplementos en forma de tabletas y cápsulas, algunas utilizan gretina y otras gomas para favorecer la viabilidad de los microorganismos.

Para satisfacer las nuevas exigencias los probióticos se han incorporado en bebidas a base de frutas, debido a que contienen nutrientes benéficos. Sin embargo, no hay estudios sobre el efecto de los compuestos antioxidantes de las frutas en la viabilidad de estos microorganismos.

Las pitayas al igual que todos los frutos de temporada, presentan problemas para su industrialización. Sin embargo, actualmente se están desarrollando estrategias para aprovechar las especies de cactáceas que se desarrollan en el mismo hábitat y en temporadas distintas. Además de que recientemente la pitaya ha llamado mucho la atención entre los productores por su valor económico al añadirse a alimentos y por sus propiedades antioxidantes debido a su alto contenido de polifenoles, sin embargo, es necesario procesarla ya que su vida útil es de pocos días y esta es la principal limitante para su comercialización.

En el presente trabajo se pretende estudiar la viabilidad de una cepa probiótica *L. casei* Shirota en una gelatina preparada a partir del jugo del fruto de la pitaya y de esta manera establecer si la presencia del *Lactobacillus casei* Shirota modifica la capacidad antioxidante de la pitaya y si este microorganismo es capaz de sobrevivir en la presencia de compuestos con actividad antioxidante.

## **5. OBJETIVOS**

### **a. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la viabilidad de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus casei* Shirota) en una gelatina de pitaya (*Stenocereus griseus* H.) y cuantificar la actividad antioxidante durante la vida de anaquel de dicho producto.

### **b. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Caracterizar de manera fisicoquímica el jugo de pitaya (*Stenocereus griseus* H.) mediante la determinaciones de: acidez titulable, contenido de sólidos solubles y pH.
2. Determinar la actividad antioxidante del jugo de pitaya mediante el método de DMPD.
3. Cuantificar el contenido total de polifenoles del jugo de pitaya mediante el método de Folin-Ciocalteau.
4. Elaborar una gelatina de pitaya estableciendo la formulación con las características sensoriales adecuadas, probando diferentes concentraciones de jugo de pitaya.
5. Conocer las modificaciones de las propiedades fisicoquímicas de la gelatina de pitaya durante su vida de anaquel mediante la determinación del porcentaje de acidez, sólidos solubles, y pH de gelatina de pitaya, durante su vida de anaquel.
6. Evaluar la viabilidad del microorganismo probiótico en las diferentes formulaciones de gelatina de pitaya a lo largo de su vida de anaquel, en medio de cultivo MRS.
7. Estudiar los cambios de la actividad antioxidante en la gelatina de pitaya durante su vida de anaquel mediante el método de DMPD.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Materiales

#### 6.1.1 Materia prima

Pulpa de pitaya (*Stenocereus griseus* H.) homogenizada y congelada, adquirida en la Central de Abastos, Ciudad de México, proveniente de Tecomavaca, Oaxaca.

Grenetina en polvo marca Duché® Bloom 275.

Microorganismo *Lactobacillus casei* Shirota aislado a partir de Yakult®.

Agua Nestlé Pureza Vital®.

Azúcar Refinada marca Great Value®.

#### 6.1.2 Reactivos

Agar MRS marca Difco®.

Peptona de caseína marca Bioxon®.

Juego de colorantes para tinción de Gram.

DMDP (N, N-dimetil-pfenildiamina dihidroclorada) marca Fluka®.

Ácido ascórbico marca Fluka®.

Cloruro férrico 0.1mM marca Fermont®.

Trolox marca Fluka®.

Ácido gálico marca Alyt®.

Reactivo de Folin-Ciocalteu marca Merck®.

Carbonato de Sodio marca Alyt®.

Solución reguladora de acetatos 0.1M, pH = 5.25.

Metanol grado HPLC marca Burdick and Jackson®.

Agua desionizada tipo II

Reactivos de uso común en laboratorio.

### **6.1.3 Equipo**

Extractor de jugos marca Black and Decker ®.

Refractómetro marca modelo ATAGO N-1 · Bx.

Potenciómetro marca Thermo Orion modelo 410 A+ ®.

Incubadora marca WTC Binder ®.

Autoclave marca Felisa ®.

Campana de flujo laminar marca Alder ®.

Vortex marca Genie 2 ®.

Horno de microondas marca LG®.

Bomba de vacío marca Welch gem 1.0

Balanza analítica marca Mettler AE100 y granataria marca Mettler Toledo

Espectrofotómetro Génesis 10 UV, Thermo Spectronic®.

Refrigerador marca Mabe ®.

## 6.2 Desarrollo experimental.

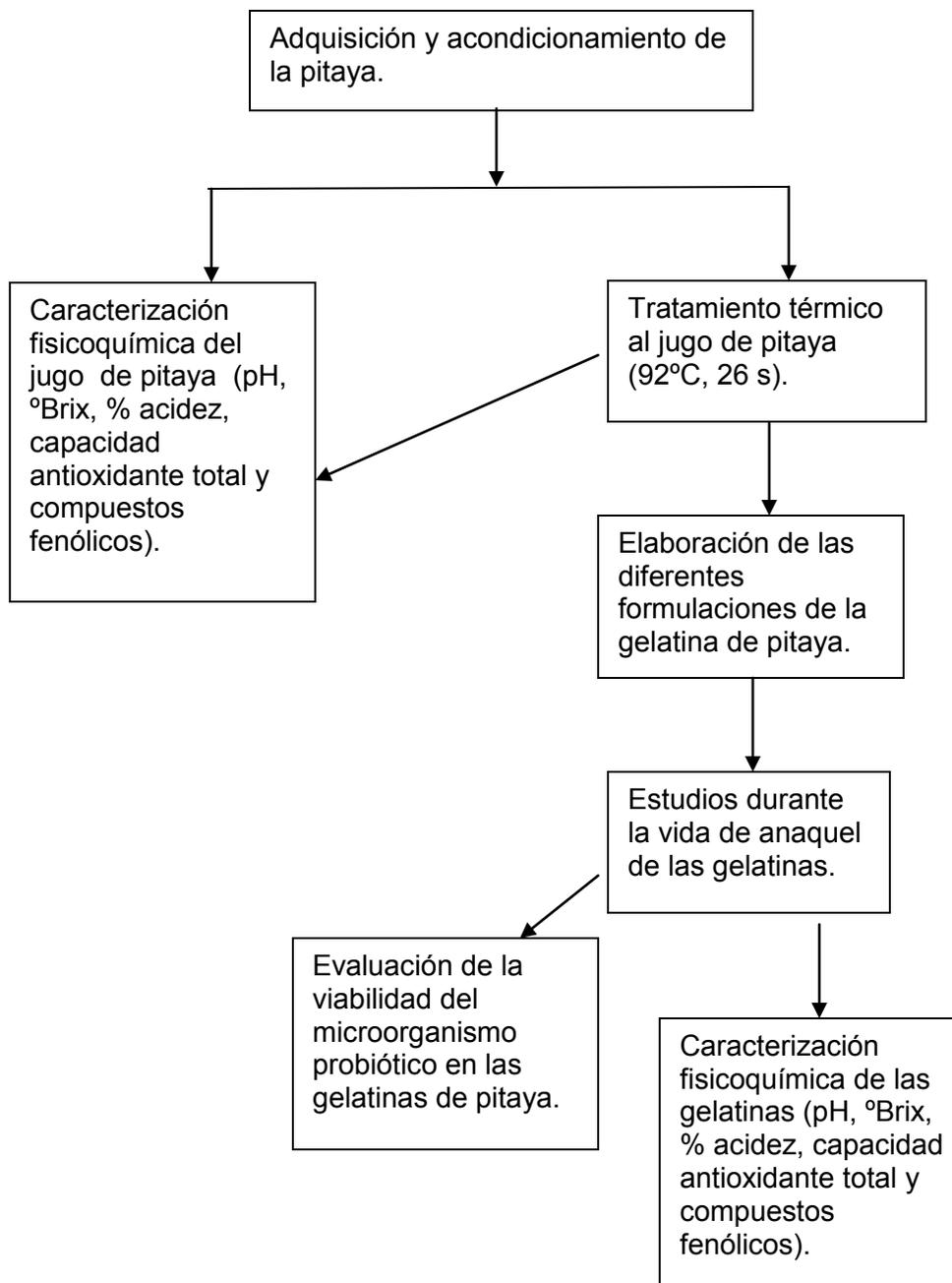


Figura 5. Diagrama del desarrollo experimental del proyecto.

### 6.2.1 Desarrollo experimental para la elaboración gelatinas de pitaya.

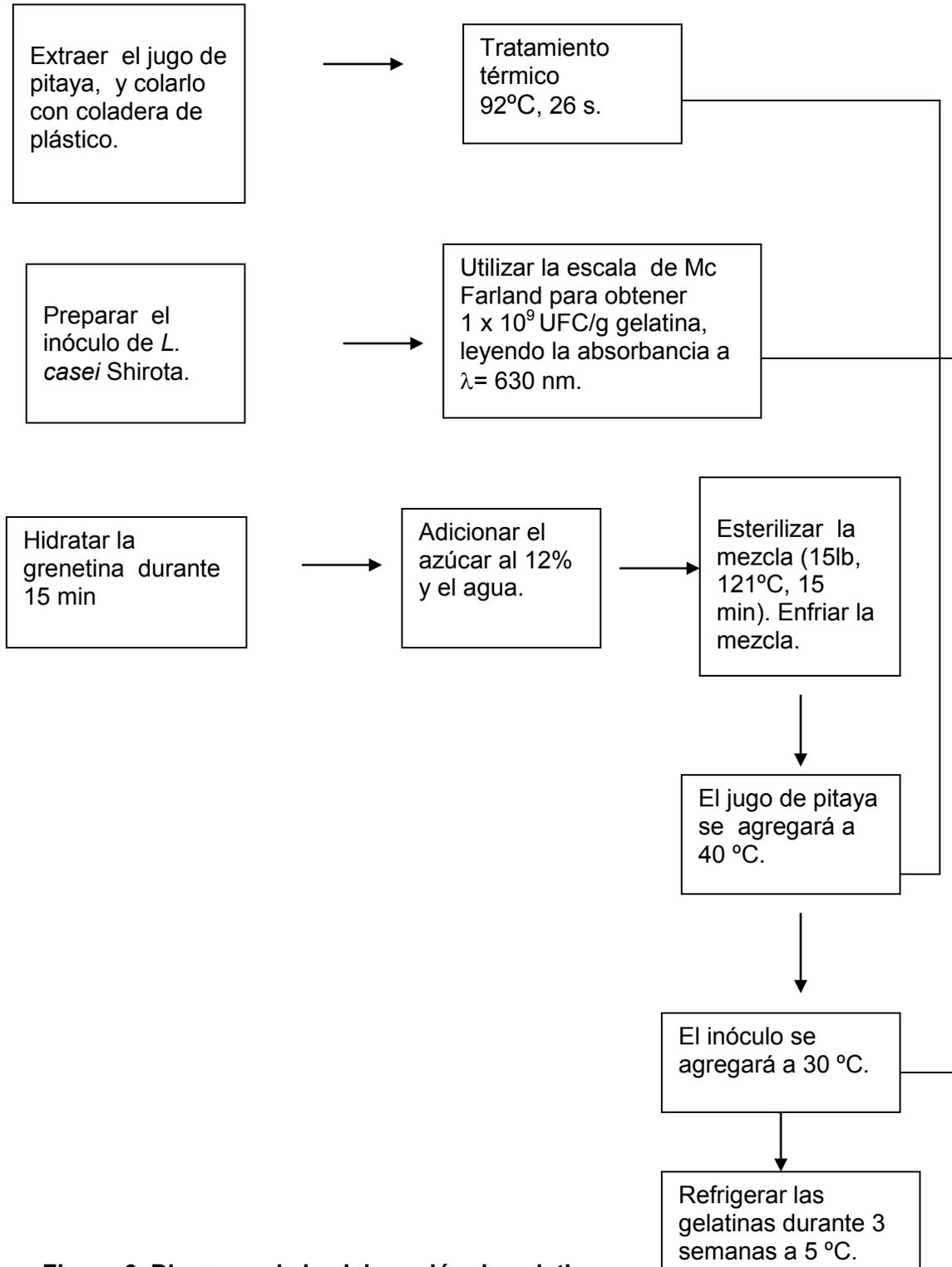


Figura 6. Diagrama de la elaboración de gelatinas de pitaya

## 6.2.2 Desarrollo experimental para la cuenta microbiológica.

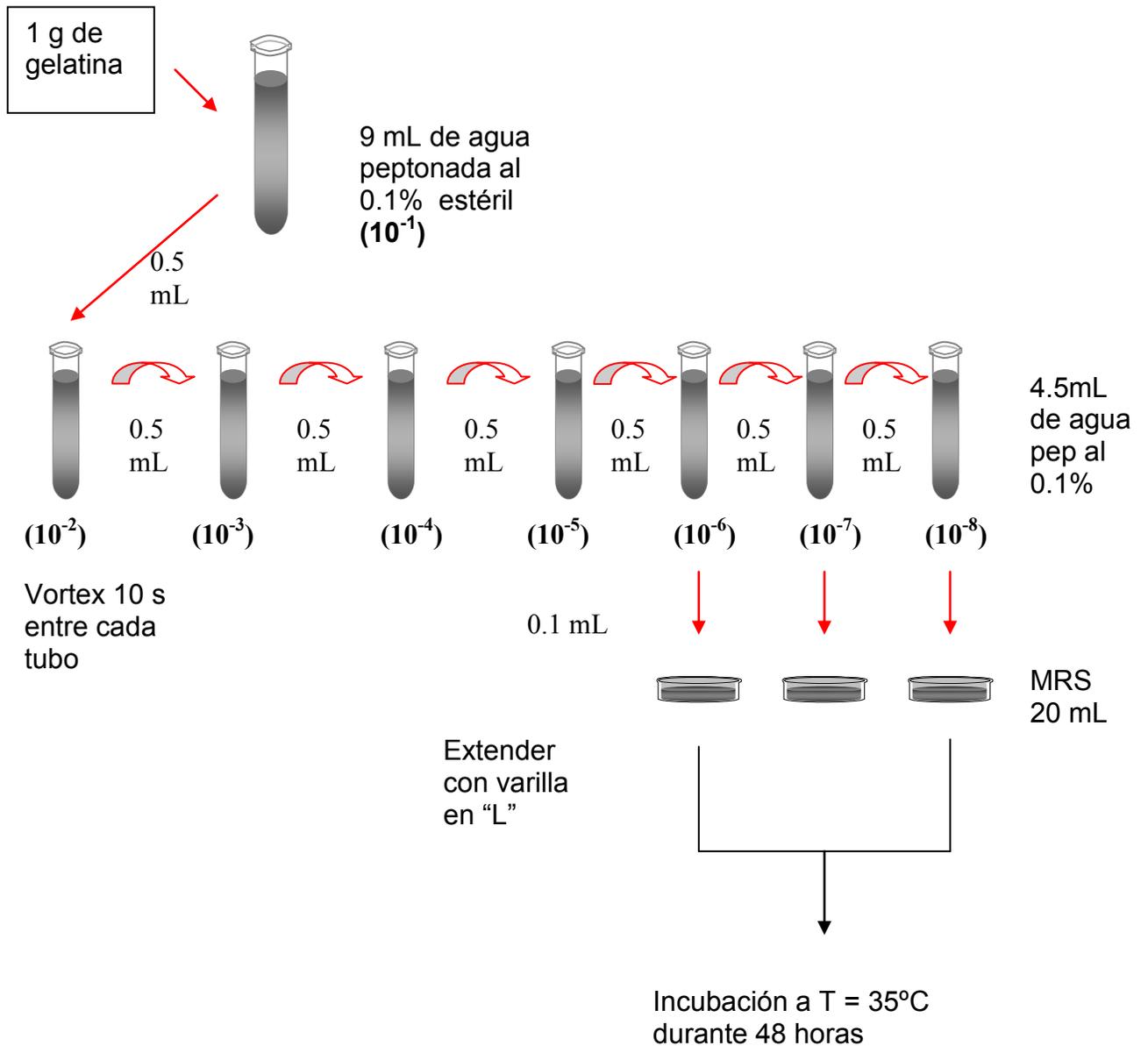


Figura 7. Diagrama del desarrollo de la cuenta microbiológica.

## **6.3 Métodos**

### **6.3.1 Adquisición y acondicionamiento de la materia prima**

Se compraron pitayas (*Stenocereus griseus* H.) en la Central de Abastos, Ciudad de México en junio, provenientes de Tecomavaca, Oaxaca. Se les removieron las espinas y la cáscara, se seleccionaron las pitayas que presentaban la misma madurez (color y firmeza) y se desecharon los frutos dañados. Se conservó la parte comestible en bolsas zip-lock cerradas a una temperatura de -20°C

### **6.3.2 Determinaciones fisicoquímicas de la pitaya y de las gelatinas.**

1. **pH.** Se pesaron 10 g de jugo de pitaya y se adicionaron 100 mL de agua destilada, la muestra se homogenizó y se siguió la metodología planteada por el AOAC (1980).
2. **Sólidos solubles.** Utilizando un refractómetro se determinaron los °Brix de una gota de jugo de pitaya a 20°C.
3. **Acidez titulable.** Se tomó una alícuota de 10 mL de jugo de pitaya y se tituló con NaOH 0.001 N, informando como porcentaje de ácido cítrico (Yoon *et al*, 2005).

### **6.3.3. Cuantificación de la capacidad antioxidante del jugo de pitaya por el método de DMPD (Fogliano *et al*, 1999).**

En condiciones de pH ácido y en la presencia de un solución oxidante ( $\text{FeCl}_3$ ) se forma un catión DMPD<sup>+</sup> (N, N-dimetil p-fenildiamina), cuya máxima absorción se presenta a  $\lambda = 505$  nm. El cual en presencia de compuestos antioxidantes sufre una decoloración por la transferencia de un átomo de hidrógeno que proviene de los antioxidantes.

En la oscuridad, a temperatura ambiente y utilizando guantes de látex; se preparó la solución de DMPD 100 mM disolviendo 209 mg y se aforo en agua desionizada, en un matraz de 10 mL.

Se midieron 100 mL de solución reguladora de acetatos en otro matraz aforado cubierto con papel aluminio se le añadió 1 mL de la solución de DMPD y 0.2 mL de solución de cloruro férrico 0.1mM.

Se midió la absorbancia ( $A_o$ ) a  $\lambda = 505$  nm de 1mL de la solución colorida anterior.

Se realizó una curva tipo a partir de diluciones de una solución madre con 1 mg/mL de Trolox ®.

Para analizar las muestras, se leyó la absorbancia inicial ( $A$ )  $\lambda = 505$  nm de cada muestra de jugo de pitaya (fresco y tratado térmicamente), después se tomaron 50  $\mu$ L de cada jugo de pitaya y por duplicado se colocaron en tubos de ensaye a los cuales se les añadió 950  $\mu$ L de la solución colorida y después de agitarlos continuamente durante 10 min se leyó la absorbancia ( $A_f$ ) a  $\lambda = 505$  nm.

El % de inhibición se calculo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = (1 - A_f / (A_o - A)) \times 100$$

Los resultados se interpolaron en la curva tipo % inhibición vs  $\mu$ g Trolox y se informó como  $\mu$ mol Trolox/mL de muestra.

#### **6.3.4 Cuantificación de polifenoles en la pulpa de pitaya mediante el método de Folin-Ciocalteu (Pastrana *et al*, 2003; Abu *et al*, 2009).**

El reactivo de Folin-Ciocalteu consiste en una solución amarilla (pH ácido) que contiene iones poliméricos formados por ácidos fosfomolibdénicos y fosfotungsténicos.

El cual en presencia de fenoles en el medio forma un complejo azul que incrementa su intensidad linealmente a  $\lambda = 765$  nm.

Para la curva tipo se prepararon soluciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L de ácido gálico. En los tubos de ensaye se adicionaron 50  $\mu$ L de cada una de las soluciones anteriores, 50  $\mu$ L de agua desionizada, 0.5 mL del reactivo de Folin y 0.4 mL de una solución de carbonato de sodio al 7.5%. Los tubos se agitaron durante 10 s y se dejan reposar durante 30 min en la oscuridad antes de leer en el espectro.

Para el análisis de las muestras se maceraron 10 g de muestra y se extrajeron con 10 mL de metanol acidificado con 2% de HCl, las extracciones permanecieron en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se llevaron a un volumen de 50 mL en un matraz volumétrico con el metanol acidificado, se filtraron al vacío y se prepararon los tubos al igual que la curva tipo para después de 30 min leer a  $\lambda = 765$  nm. El contenido de fenoles totales se expresó como equivalente de ácido gálico (GAE) en mg por g de muestra.

### **6.3.5 Preparación del inoculo (Heenan et al, 2004)**

Para aislar al microorganismo *Lactobacillus casei* Shirota, se inoculó en agar MRS 0.1mL de Yakult® se incubo a 35° C durante 48 hrs.

Para identificarlo se realizó una tinción de gram y una prueba de catalasa.

Previo a la elaboración de las gelatinas se realizó una suspensión del microorganismo en agua hervida y se leyó su absorbancia a  $\lambda = 630$ nm.

La lectura se comparó con el nefelómetro de Mc Farland para obtener  $10^9$ UFC/mL.

#### **6.3.5.1 Tinción de Gram**

Es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias. En la cual el colorante cristal violeta penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas) a través de la pared bacteriana. El lugol es un compuesto formado por  $I_2$  (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio), el cual está presente para solubilizar el yodo, y actúa de

mordente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. El  $I_2$  entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.

La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo  $I_2$ /cristal violeta. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos sí lo hacen.

Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules.

Para identificar al microorganismo aislado en condiciones asépticas se tomó una asada de la colonia de *L. casei* Shirota, se colocó en un portaobjetos que tenía una gota de agua destilada, con ayuda del asa se homogenizó. El portaobjetos se dejó secar al aire y después se fijo el frotis, pasando el portaobjetos tres veces junto a la flama del mechero.

Se añadieron dos gotas de cristal violeta y se dejó actuar durante 1 min, se enjuago con agua, se añaden dos gotas de lugol que actúo como mordente del primer colorante se dejo actuar durante 1 minuto, después se enjuago con agua y luego con una solución de alcohol/acetona para Gram y una vez más con agua, se añadió por último dos gotas de safranina y se dejó actuar por un minuto. Se enjuagó. La observación en el microscopio requirió de una gota de aceite de inmersión y se observó a 100x.

El motivo de una reacción gram-positiva no son los constituyentes químicos sino la estructura física de la pared: peptidoglicano y carece de membrana externa (Madigan, M. 1999).

### **6.3.5.2 Prueba de Catalasa (Madigan, 1999).**

El fundamento de la reacción es que la enzima peroxidasa o catalasa es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) formando  $H_2O$  y  $O_2$  que se desprende como pequeñas burbujas.

Una asada de una colonia de *L. casei* Shirota se homogenizó en una gota de  $H_2O_2$  colocada en un portaobjetos limpio en condiciones asépticas. Si se observa la formación de burbujas se considera que la prueba es positiva.

### **6.3.5.3 Escala de Mc Farland (Sutton,2006)**

Los estándares de Mc Farland se utilizan para visualmente aproximarse a la concentración de células en una suspensión. La escala de Mc Farland representa concentraciones específicas en UFC/mL para lo cual se requirió que se preparara una solución de cloruro de bario ( $BaCl_2$ ) al 1% en ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 1% en la campana de extracción y con guantes especiales para ácido, la solución se homogenizó y después en cada tubo se colocó los mL que marca el Cuadro 4, correspondientes a un número específico de bacterias.

Se leyó la absorbancia a  $\lambda = 630$  nm en el espectrofotómetro de cada tubo.

Se comprobó la relación entre el número de bacterias y la absorbancia leída realizando en condiciones asépticas una suspensión en agua estéril del microorganismo probiótico, se leyó su absorbancia y se realizaron diluciones decimale; es decir se tomo 1mL y se le adicionaron 9 mL de agua estéril y así sucesivamente. De cada solución se tomaron 0.1 mL y se colocaron en agar MRS, las cajas se incubaron a  $T = 35^\circ C$  durante 48 horas y se contó las colonias blancas cremosas pequeñas obtenidas que deben ser las correspondientes según el tubo de la escala de Mc Farland utilizado.

**Cuadro 4. Escala de Mc Farland**

<b>Tubo</b>	<b>BaCl<sub>2</sub> 1% (mL)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (mL)</b>	<b>Bacterias/mL x 10<sup>8</sup></b>
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1	9	30

### **6.3.6 Elaboración de la gelatina de pitaya y adición del microorganismo.**

Para preparar la gelatina se utilizó grenetina y azúcar en una concentración de 3.5 % y 12 %, respectivamente (p/v), de acuerdo a las recomendaciones del productor (Grenetina Marca Duché).

El jugo de pitaya recibió un tratamiento térmico a 92°C durante 26 s, de acuerdo al método propuesto por Herbach *et al.* (2006) y se adicionó a la mezcla de la grenetina en las siguientes concentraciones: 30, 60, 90 % (p/v) con adición del microorganismo ( $1 \times 10^9$  UFC/g gelatina).

Con la finalidad de observar cambios que se pudieran presentar en la gelatina independientes a la presencia del inóculo, se realizaron tres controles con las mismas concentraciones de jugo de pitaya pero sin inóculo como se observa en el Cuadro 5. Además para conocer el comportamiento del microorganismo probiótico en las dos matrices, se prepararon dos muestras, una únicamente se componía de

mezcla de gelatina con adición del microorganismo y la otra de jugo de pitaya con adición del microorganismo.

**Cuadro 5. Muestras de gelatina.**

Jugo de pitaya al 30 % inoculado con $1 \times 10^9$ UFC/g de <i>L. casei Shirota</i>
Jugo de pitaya al 60 % inoculado.
Jugo de pitaya al 90 % inoculado.
Jugo de pitaya al 30 %
Jugo del pitaya al 60%
Jugo de pitaya al 90 %
Control inóculo en gelatina
Control inóculo en 100% jugo de pitaya tratado

Una vez preparada la mezcla de gnetina, azúcar y agua. Se registró con el termómetro la temperatura, cuando esta alcanzó los 40°C se añadió el jugo de pitaya, después a los 33°C se añadió el inóculo de *L. casei Shirota*.

Las gelatinas se conservaron en refrigeración a una temperatura de 5°C.

Todas las determinaciones fisicoquímicas y el conteo microbiológico se realizó por triplicado a las 0 hrs y cada 96 horas durante la vida de anaquel de las gelatinas (21 días) y también en dos muestras de jugo de pitaya tratado térmicamente, una con inóculo y la otra sin inóculo.

**6.3.7 Evaluación de la viabilidad del microorganismo probiótico en la gelatina de pitaya (Lourens-Hatting y Viljoen, 2001; Heenan *et al*, 2004; Yoon *et al*, 2005).**

Se realizaron análisis microbiológicos por conteo en placa, en las diferentes formulaciones de gelatina de pitaya al momento de elaborarlas y cada 96 horas, durante 21 días.

En condiciones asépticas se tomó 1 g de gelatina de las diferentes formulaciones de jugo de pitaya y se adicionaron 9 mL de agua peptonada al 0.1%, se homogeneizó con ayuda del vortex y se tomó una alícuota de 0.5 mL que se transfirió a un tubo con 4.5 mL de agua peptonada al 0.1%. Se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-8}$ . De cada dilución se tomó 0.1 mL y se inocularon placas de agar MRS, éstas se incubaron a 35 °C durante 48 horas y se contaron las cajas que tuvieron entre 25-250. Los resultados se informaron como UFC/g de gelatina de pitaya.

**6.3.8 Análisis estadístico de los resultados.**

Los resultados de todas las pruebas realizadas durante la vida de anaquel de las diferentes formulaciones de gelatina se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía, o de dos vías con el programa Minitab v. 15.1

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Caracterización fisicoquímica del jugo de pitaya.

El jugo de pitaya después de filtrarle las semillas se le realizaron tres determinaciones fisicoquímicas y otra porción de jugo recibió un tratamiento térmico a 92°C durante 26 s y de igual forma se caracterizó fisicoquímicamente.

El pH del jugo de pitaya fresco fue de 5.8 y prácticamente no varía al darle el tratamiento térmico siendo un valor de 5.73, mientras que en el caso de los sólidos solubles se observa un aumento de casi 1 unidad al aplicarle el tratamiento térmico y en el caso de la acidez titulable reportada como contenido de ácido cítrico sufre una muy pequeña pérdida al aplicarse el tratamiento, los resultados se observan en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Determinaciones fisicoquímicas del jugo de pitaya**

Determinación	<i>S. griseus</i> H. JP	<i>S. griseus</i> H. JPTT
pH	5.8 ± 0.01	5.73 ± 0.01
°Brix	10.26 ± 0.115	11.13 ± 0.115
% ácido cítrico	0.15 ± 0.07	0.126 ± 0.06

JP = jugo de pitaya fresco; JPTT= jugo de pitaya tratado térmicamente

n = 3

Según Esquivel (2004) el índice de madurez determinante es el color de la cáscara de las pitayas, llegando a ser una coloración completamente roja, sin embargo, otros dos parámetros importantes para definir dicho índice son el pH y los ° Brix.

De acuerdo a lo informado por (Cruz, 1985; Del Toro y Castellón, 1986; Martínez y Cruz, 1995). En el caso de *Stenocereus griseus* se ha informado un pH de 5.2 para el fruto maduro y 12 °Brix en el caso de los sólidos solubles totales.

Por lo tanto, de acuerdo a las características fisicoquímicas obtenidas en este trabajo para el jugo de pitaya fresco y después del tratamiento térmico, el pH encontrado en ambos casos es ligeramente menos ácido a lo reportado en la literatura y los sólidos solubles aumentan después del tratamiento térmico, sin llegar al valor de 12°Brix reportado en la literatura, por lo que se concluye la pitaya se encontraba madura.

En el Cuadro 7, podemos observar la comparación de los resultados obtenidos con otros autores que trabajaron con pitayas, cabe destacar que en el caso de *Stenocereus stellatus* P., es necesario tomar en cuenta las variaciones de estado de madurez, condiciones de cosecha y estación. Además los otros autores tomaban la fruta completa y no únicamente el jugo como es el caso del presente trabajo.

**Cuadro 7. Comparación de resultados fisicoquímicos del jugo de pitaya**

<b>Determinación</b>	<b><i>S. griseus</i> H. Jugo fresco Presente trabajo</b>	<b><i>S. griseus</i> H. Jugo tratado Presente trabajo</b>	<b><i>S. griseus</i> H. (Ayala, 2008) tipo morada</b>	<b><i>S. stellatus</i> P. (Oliva, 2006) tipo guinda</b>
<b>pH</b>	5.8 ± 0.01	5.73 ± 0.01	4.88 ± 0.04	4.29 ± 0.020
<b>°Brix</b>	10.26 ± 0.115	11.13 ± 0.115	6.63 ± 0.21	9.66 ± 0.289
<b>% ácido cítrico</b>	0.15 ± 0.07	0.126 ± 0.06	0.30 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.867 ± 0.08 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> % de ácido málico.

### **7.2 Cuantificación de la capacidad antioxidante total del jugo de pitaya, por el método de DMPD.**

El jugo de pitaya fresco presentó una capacidad antioxidante de 162.95  $\mu\text{molTrolox/g}$  mientras que el jugo de pitaya tratado térmicamente (microondas 92°C, 26 s) presentó una capacidad antioxidante de 66.24  $\mu\text{molTrolox/g}$ , por lo que la retención de capacidad antioxidante es de 40.65% lo que indica que el tratamiento térmico provocó una pérdida de polifenoles y los pigmentos que le dan la propiedad antioxidante a la pitaya. Los resultados encontrados durante este trabajo, se observan en el Cuadro 9.

**Cuadro 8. Capacidad antioxidante de las muestras de jugo de pitaya (n= 3).**

	<b>Antioxidantes totales <math>\mu\text{molTrolox/g}</math></b>
JP	162.95 $\pm$ 18.11
JPTT	66.24 $\pm$ 25.21

JP Jugo de pitaya (*S. griseus* H.) fresco; JPTT Jugo de pitaya tratado térmicamente (92°C, 26s)

### **7.3 Cuantificación de los compuestos fenólicos totales del jugo de pitaya, por el método de Folin-Ciocalteu.**

El jugo de pitaya fresco presentó un contenido de compuestos fenólicos totales de 441.62 mg Gal/100 g mientras que en el jugo de pitaya tratado térmicamente, el contenido fue de 57.30 mg Gal/100 g, (Cuadro 9) por lo que el porcentaje de retención fue de 12.98 %, así observamos que el tratamiento térmico a lo que más afectó fue a los polifenoles ya que la mayoría de ellos son termolábiles es decir pierden su estructura y potencialidad a temperaturas elevadas.

**Cuadro 9. Compuestos fenólicos totales de las muestras de jugo de pitaya (n= 3).**

<b>Muestras Jugo Pitaya</b>	<b>Compuestos fenólicos mg Gal/100 g</b>
JP	441.62 ± 1.47
JPTT	57.30 ± 10.4

JP Jugo de pitaya (*S. griseus* H.) fresco; JPTT Jugo de pitaya tratado térmicamente (92°C, 26s); Gal ácido gálico

En el estudio realizado por Priego et al, (2007), se comprobó que la eficiencia de la extracción aumenta al añadir etanol ya que favorece la desnaturalización de las membranas celulares y facilita la solubilización de los compuestos polifenólicos, lo cual combinado con una maceración adecuada garantiza la extracción adecuada de las vacuolas celulares donde están alojados en las plantas. Por lo que en este trabajo se hizo una extracción previa utilizando metanol acidificado al 2% con HCl.

Con el fin de comparar los métodos utilizados, se usaron jugos comerciales de manzana, uva y granada a los cuales se les cuantificó su capacidad antioxidante total mediante DMPD y compuestos fenólicos mediante el método de Folin-Ciocalteu. En el Cuadro 11 se muestran los resultados.

**Cuadro 10. Comparación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales del jugo de pitaya (n=3)**

<b>Muestra de jugo</b>	<b>Antioxidantes totales <math>\mu\text{molTrolox/g}</math></b>	<b>Compuestos fenólicos <math>\text{mg Gal/100 g}</math></b>
<b>Pitaya fresco</b>	162.95 $\pm$ 18.11	441.62 $\pm$ 1.47
<b>Pitaya tratado</b>	66.24 $\pm$ 25.21	57.30 $\pm$ 10.4
<b>Manzana<sup>a</sup></b>	8.37 $\pm$ 1.63	371 $\pm$ 11.10
<b>Uva<sup>b</sup></b>	13.86 $\pm$ 1.71	990 $\pm$ 138.05
<b>Granada<sup>c</sup></b>	17.24 $\pm$ 1	446 $\pm$ 21.21

<sup>a</sup> Jugo de manzana pasteurizado marca Tree Top ®

<sup>b</sup> Jugo de uva pasteurizado marca Welch's ®

<sup>c</sup> Jugo de granada pasteurizado marca Good 4 you®

Podemos observar como el jugo de pitaya fresco posee una capacidad antioxidante superior a los otros jugos y aún con el tratamiento térmico, su valor sigue siendo mayor, que el jugo de manzana, uva y granada, por lo que su capacidad antioxidante es muy buena.

En el caso de compuestos fenólicos el valor del jugo fresco tiene una magnitud similar al jugo de granada, superior al de manzana pero comparado con el de uva representa la mitad del valor. Se sabe que la uva tiene una gran cantidad de compuestos fenólicos.

Al ser termolábiles los compuestos fenólicos existe una gran pérdida por el tratamiento en el microondas y el valor del jugo de pitaya tratado es inferior al jugo de pitaya fresco y a los jugos comerciales de manzana, uva y granada.

#### **7.4 Preparación del inoculo**

El microorganismo *Lactobacillus casei* Shirota que se aisló a partir de una muestra de Yakult® se identificó mediante una tinción de Gram y una prueba de catalasa.

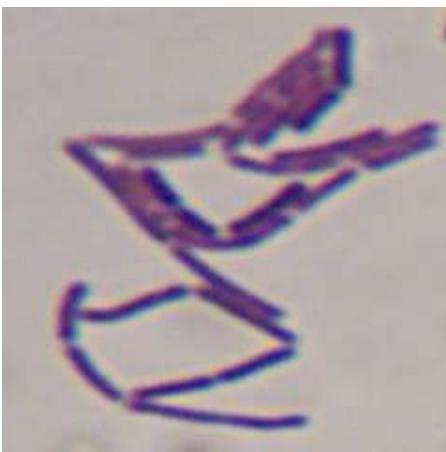
Las colonias aisladas en un medio MRS, fueron redondas blancas cremosas y pequeñas, (Figura 8) este es el crecimiento característico para este lactobacilo en ese medio de acuerdo a Yuki *et al*, (1999).



**Figura 8. Observación macroscópica de las colonias aisladas a partir de Yakult® en MRS.**

En el microscopio se observaron bacilos, en cadena gram-positivos, no esporulados (Figura 9), los cuales resultaron negativos para la prueba de catalasa, es decir no poseen la enzima que hidroliza el peróxido de hidrógeno (Madigan, 1999).

Dichos resultados confirman que la bacteria aislada pertenece a la familia de las bacterias lácticas y posee la forma de bacilos Gram positivos (Boone y Castenholz, 2001).



**Figura 9. Tinción de Gram del microorganismo aislado a partir de Yakult ® en MRS.**

En el Cuadro 11 se observaron las lecturas de absorbancia para cada dilución proporcional a un número de bacterias.

Para comprobar la utilidad de la escala de Mc Farland, con el microorganismo probiótico, se sembraron diluciones seriales en agar MRS de una suspensión del probiótico con una lectura de absorbancia de 0.149, la cual es similar al tubo 1 de la escala de Mc Farland, de esta manera se comprobó el número de 3 bacterias/mL en la dilución  $10^{-8}$  después de incubarlo 48 hrs a 37°C.

**Cuadro 11. Resultados absorbancias de la Escala de Mc Farland**

Tubo	BaCl <sub>2</sub> 1% (mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% (mL)	Bacterias/mL x 10 <sup>8</sup>	Absorbancia λ= 630nm
1	0.1	9.9	3	0.152
2	0.2	9.8	6	0.298
3	0.3	9.7	9	0.429
4	0.4	9.6	12	0.541
5	0.5	9.5	15	0.651
6	0.6	9.4	18	0.746
7	0.7	9.3	21	0.835
8	0.8	9.2	24	0.923
9	0.9	9.1	27	1.061
10	1	9	30	1.178

## **7.5 Influencia de la vida de anaquel en el pH, el contenido de sólidos solubles y la acidez titulable, en la viabilidad del microorganismo en las gelatinas.**

Las muestras control de gelatinas de pitaya y el jugo de pitaya sin inóculo, tuvieron el siguiente comportamiento: un aumento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en la concentración de ácido láctico y una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el pH y °Brix conforme aumentaba la concentración del jugo de pitaya. No se observó que el tiempo de almacenamiento tuviera una influencia positiva o negativa en los resultados de estos tres parámetros fisicoquímicos. Por lo que se concluye que el tratamiento térmico aplicado al jugo de pitaya antes de la elaboración de las gelatinas fue efectivo, al no existir otro microorganismo que pudiera competir con el inóculo, alterando las características fisicoquímicas de las gelatinas por la producción de ácidos orgánicos a partir de la fermentación de los azúcares disponibles. Para comprobarlo, se sembró una dilución de jugo de pitaya tratado térmicamente en una caja de MRS, e incubó 48 hrs a 37 °C sin observar crecimiento alguno, mientras que en el caso del jugo de pitaya fresco se observó crecimiento de hongos y una bacteria rosada.

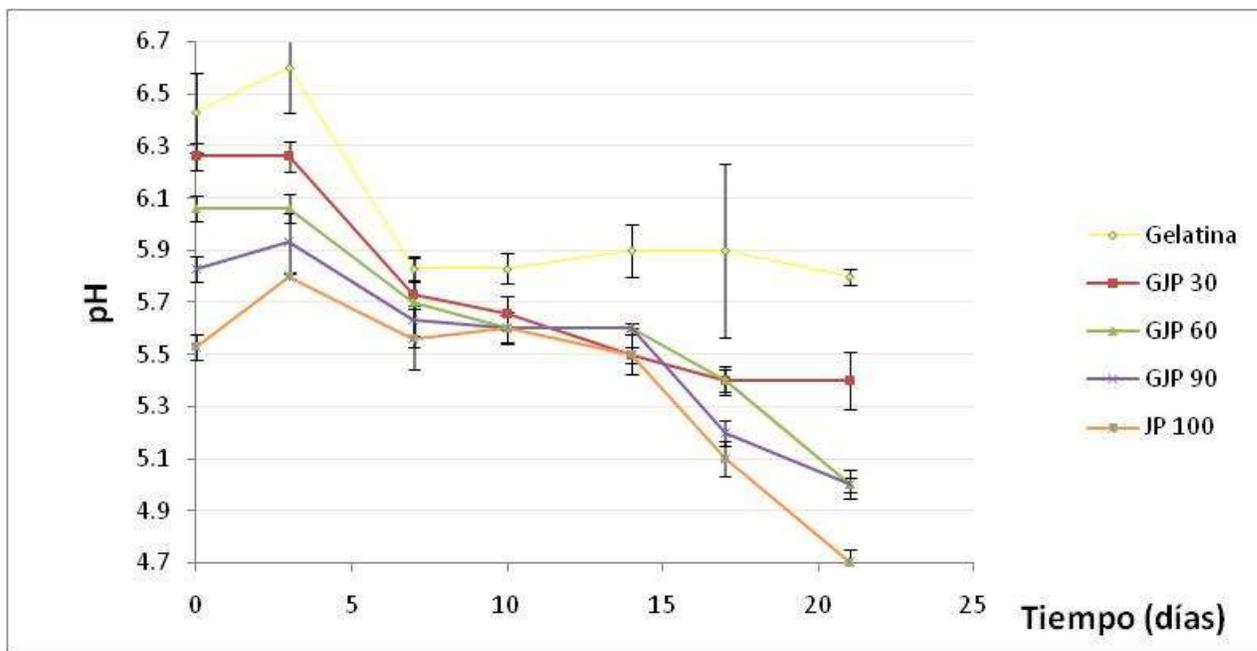
### **7.5.1 Efecto del tiempo en el pH**

Las bacterias del género lactobacilos tienen un pH óptimo de crecimiento entre 6.5-7 (Magariños *et al*, 2008) en este trabajo los resultados (Figura 10) del pH inicial de todas las gelatinas se encuentran en un intervalo de 5.5 a 6.4 valores ligeramente inferiores a lo informado por Magariños, esto contribuye a que el microorganismo probiótico pueda sobrevivir e incluso tenga actividad metabólica fermentando los azúcares disponibles.

Conforme se aumenta la concentración de jugo de pitaya; el pH tiende a disminuir esta disminución del pH está influida tanto por el tiempo de almacenamiento, como

por la concentración de jugo de pitaya así como por la interacción de ambas (Figura 11), obteniendo un valor de 6.4 para la gelatina que no tiene adición de jugo, mientras que se obtuvo un pH de 5.8 para la gelatina que contiene 90% de jugo de pitaya.

El tiempo transcurrido en almacenamiento presentó un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) sobre las variaciones de pH de las gelatinas que contienen jugo de pitaya en su formulación, disminuyendo de un pH casi neutro en el día de su elaboración hasta llegar a un pH de 5 después de 21 días de almacenamiento en todos los casos. Es decir las muestras se acidifican conforme avanza el tiempo de almacenamiento, esto puede explicarse por la producción de ácido láctico, que es el principal producto de fermentación glicolítica de las bacterias lácticas familia a la cual pertenece el microorganismo probiótico utilizado para inocular las gelatinas (Bu'lock, 1991).

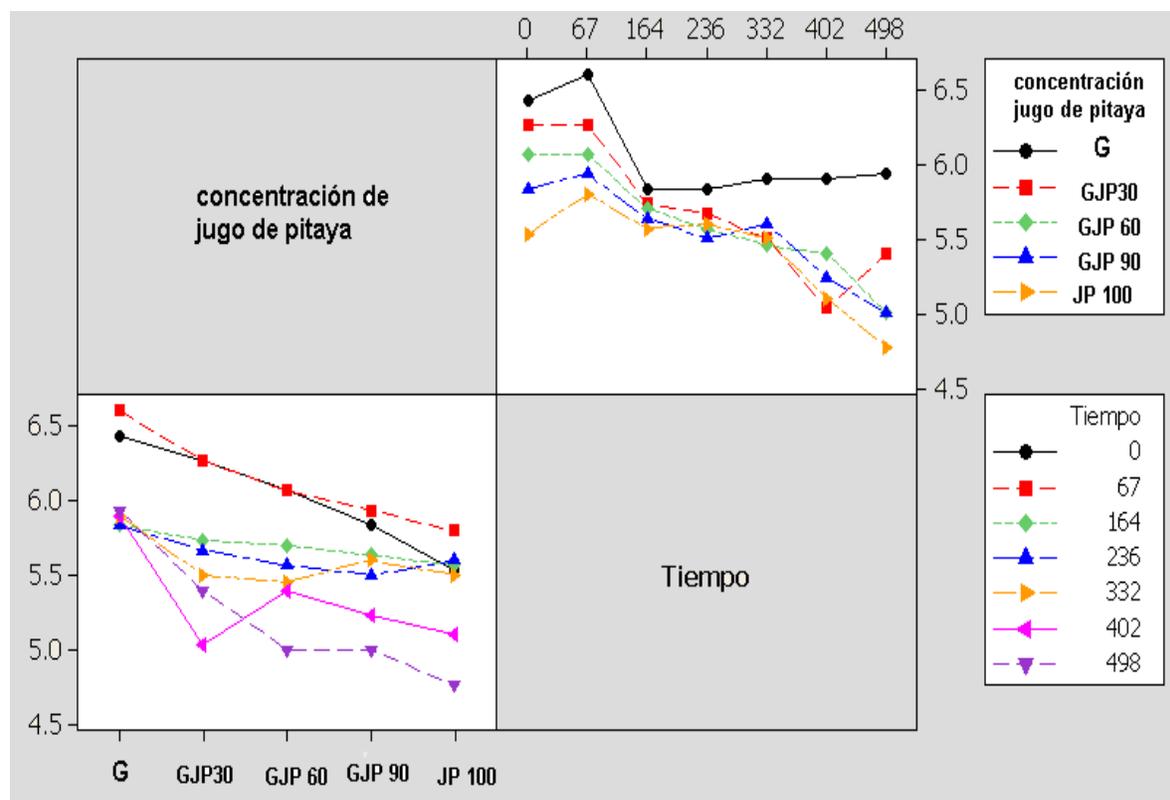


**Gelatina** = mezcla con grenetina, agua y azúcar. **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30, GJP 60 y GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.

**Figura 10. Resultados de pH durante la vida de anaquel de las gelatinas y el jugo con inóculo (donde n= 3)**

La muestra que no contiene jugo de pitaya no presenta diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en sus valores de pH con respecto al tiempo. Este se mantuvo prácticamente constante en un valor cercano al pH 6, en esta muestra el único azúcar disponible es la sacarosa añadida.

En cuanto a los resultados de pH entre cada una de las muestras inoculadas con respecto a su control la única que no presenta diferencia significativa es la muestra que únicamente contiene la mezcla de grenetina, esto indica que el pH en ambos casos es similar, ya que en la muestra de grenetina inoculada únicamente existir sacarosa como azúcar fermentable disponible el microorganismo no produjo las mismas concentraciones de ácido láctico que en las muestras con jugo de pitaya.



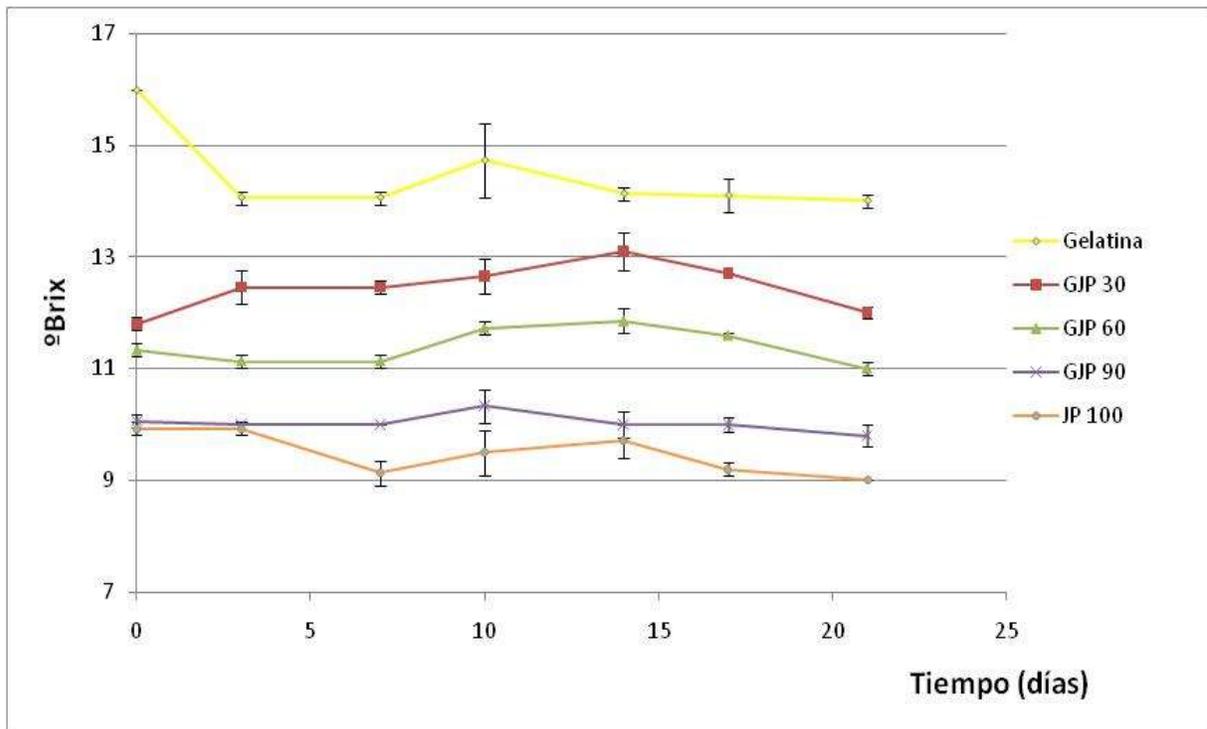
**G** = mezcla con grenetina, agua y azúcar, **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30, GJP 60 y GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.

**Figura 11. Gráfica de interacciones, análisis estadístico para pH, n=3**

### 7.5.2 Efecto del tiempo en los sólidos solubles (°Brix)

Los resultados (Figura 12) en cuanto a sólidos solubles, en las muestras inoculadas, tienen de manera similar a los controles una tendencia a disminuir conforme aumenta la concentración del jugo de pitaya en su formulación. Dicha diferencia es significativa ( $p \leq 0.05$ ).

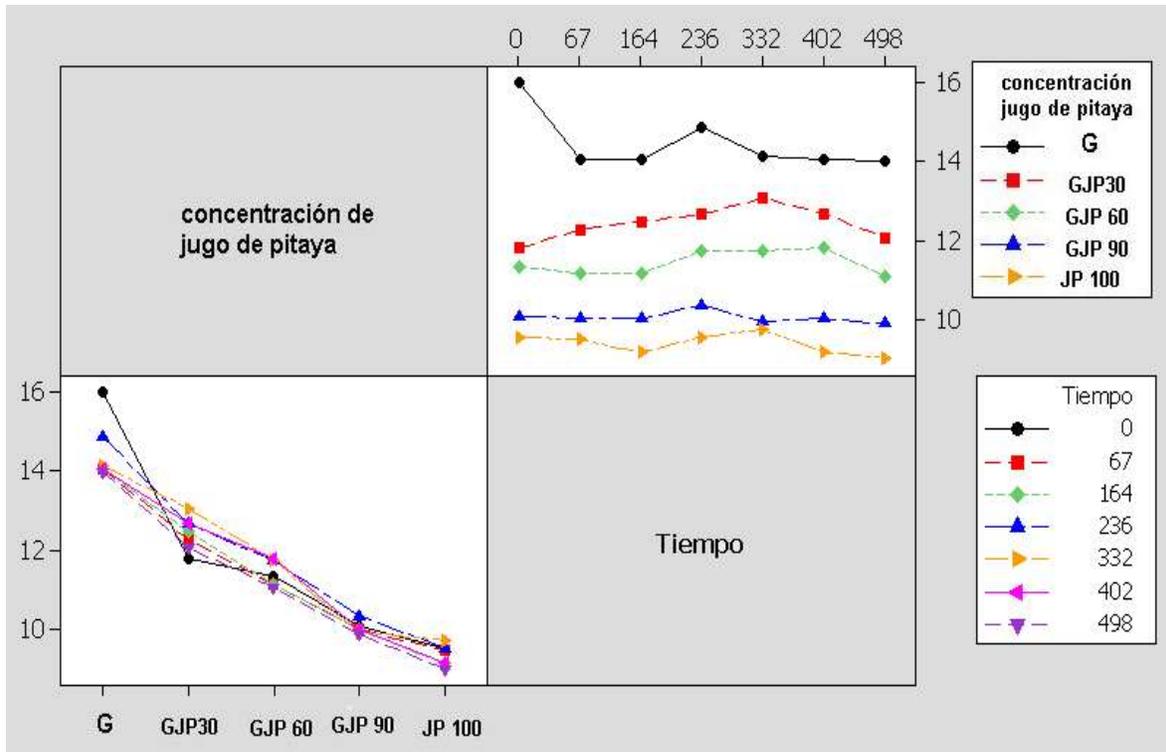
En el análisis de cada una de las muestras inoculadas con respecto al tiempo, todas presentan una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), de igual forma que en el caso del pH, la variación es decir la disminución los sólidos solubles, está influenciada por el tiempo y por la concentración del jugo de pitaya así como por la interacción de estos dos parámetros, (Figura 13) dicho resultado se atribuye a que *L. casei* Shirota consume los azúcares solubles en las muestras que contienen jugo de pitaya durante su supervivencia y los metaboliza produciendo ácido láctico (Bu'lock, 1991).



**Gelatina** = mezcla con grenetina, agua y azúcar, **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30, GJP 60 y GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.

**Figura 12. Resultados de sólidos solubles durante la vida de anaquel de las gelatinas y el jugo con inóculo (donde n= 3)**

Comparando cada muestra inoculada con su respectivo control todas las muestras que contienen jugo de pitaya presentan diferencias significativas siendo mayores los sólidos solubles en el caso de las muestras control (sin inóculo) esto indica que el microorganismo utiliza los azúcares disponibles en el jugo para fermentarlos durante su supervivencia y de esta forma disminuye los sólidos solubles en las gelatinas.



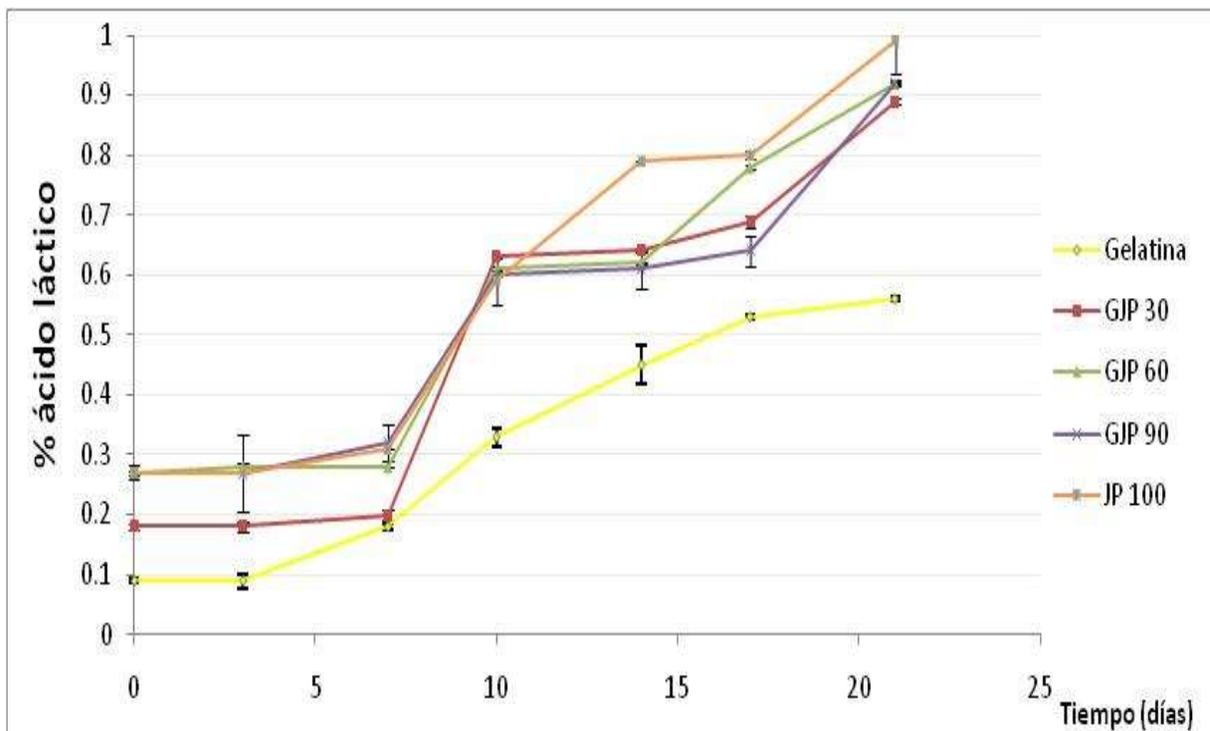
**G** = mezcla con grenetina, agua y azúcar, **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30, GJP 60 y GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.

**Figura 13. Gráfica de interacciones, análisis estadístico para °Brix**

### 7.5.3 Efecto del tiempo sobre la acidez titulable

Los resultados de la acidez titulable (Figura 14) expresada como porcentaje de ácido láctico son muy similares en el tiempo cero para las diferentes muestras de gelatina y para el jugo. Es decir la adición de jugo de pitaya no modifica la acidez titulable ( $p \leq 0.05$ ).

Por otro lado, el tiempo de almacenamiento sí afectó de manera significativa el contenido de ácido láctico después de 21 días de almacenamiento se presentó un incremento en ácido láctico en todas las muestras, se observa claramente que conforme aumenta el contenido de jugo de pitaya en el día 21 hay una mayor concentración de ácido láctico, esta diferencia es significativa ( $p \leq 0.05$ ). Tanto el tiempo como la concentración de jugo de pitaya y la interacción entre ambas tienen influencia en dicha tendencia (Figura 15).

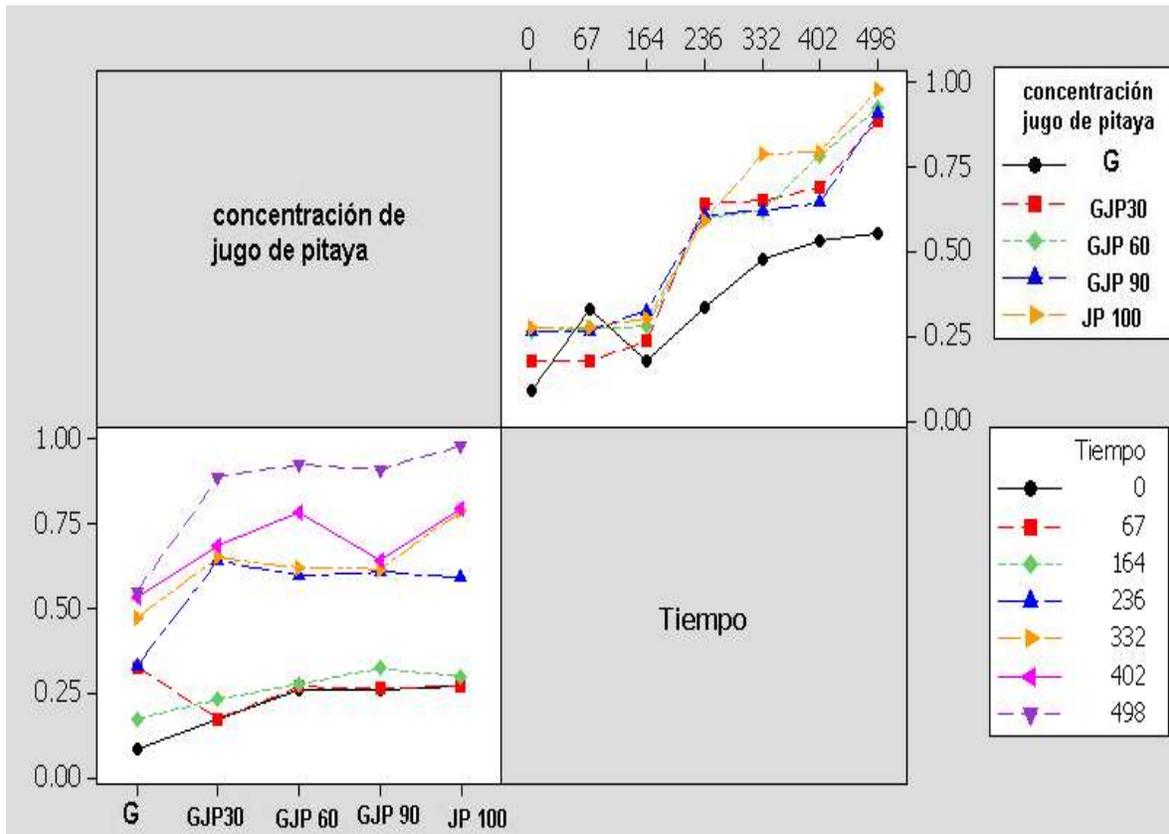


**G** = mezcla con grenetina, agua y azúcar, **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30**, **GJP 60** y **GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.

**Figura 14. Resultados de acidez titulable expresada en % de ácido láctico durante la vida de anaquel de las gelatinas y el jugo con inóculo (donde n= 3)**

Este resultado se atribuye a que *L. casei* Shirota utiliza los azúcares fermentables del jugo de la pitaya que son principalmente glucosa y fructosa, a partir de los cuales produce ácidos orgánicos tales como ácido láctico y ácido acético conforme avanza el tiempo de supervivencia. De acuerdo con los resultados de Van der Meulen *et al* (2008) en un experimento *in-vitro*, dependiendo de la fuente de carbono *L. casei* Shirota produce a partir de glucosa 13.2 g/L de ácido láctico y

0.6 g/L de ácido acético y al utilizar fructosa, produce 12.5 g/L de ácido láctico y 0.4 g/L de ácido acético. Consideramos necesario verificar los resultados obtenidos en el trabajo, utilizando un método más sensible para la detección de ácido láctico.

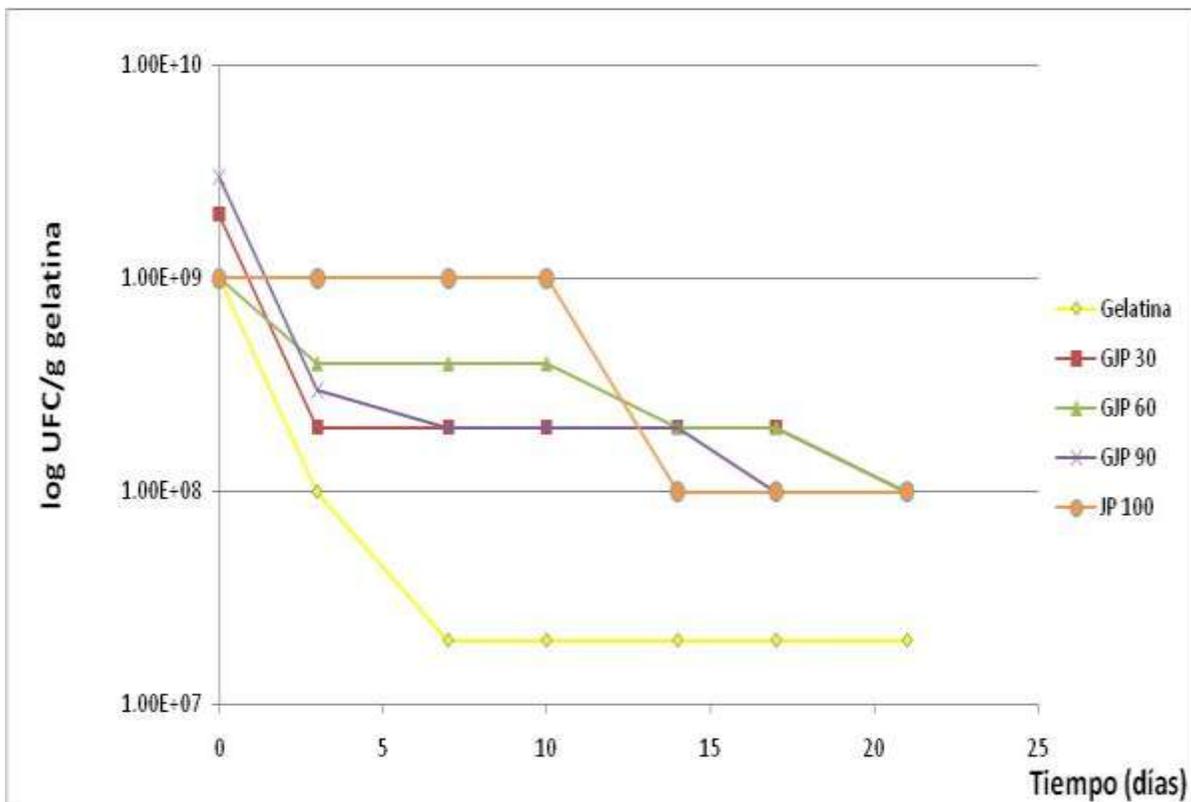


**G** = mezcla con grenetina, agua y azúcar, **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30, GJP 60 y GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.

**Figura 15. Gráfica de interacciones, análisis estadístico para %ácido láctico.**

#### 7.5.4 Estudio de la viabilidad del microorganismo probiótico en las gelatinas de pitaya.

En las cuentas de *L. casei* Shirota (Figura 16) se observa que en todas las gelatinas existe una disminución de un ciclo logarítmico después de las primeras 72 horas de almacenamiento y mantiene esta cuenta hasta el final del almacenamiento en refrigeración, mientras que en el jugo de pitaya el comportamiento es distinto manteniendo la cuenta en el orden de  $10^9$  hasta el cuarto muestreo es decir 10 días de almacenamiento y después disminuye un ciclo logarítmico.



**Gelatina** = mezcla con grenetina, agua y azúcar, **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30, GJP 60 y GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.

**Figura 16. Viabilidad de *L. casei* Shirota durante la vida de anaquel de las gelatinas inoculadas con UFC/ g de gelatina.**

Las gelatinas y el jugo de pitaya inoculados mantuvieron sus cuentas por encima del mínimo establecido para los productos probióticos que es  $1 \times 10^6$  UFC/mL ó g del producto, (Donkor *et al*, 2006) después de 21 días de almacenamiento a 5°C, es decir no presentaron diferencias significativas entre sí ( $p \leq 0.05$ ) ni con respecto al tiempo. Sin embargo, cabe destacar que en la muestra de 100% jugo de pitaya la cuenta inicial de  $10^9$  UFC/ g se mantiene por 10 días, mientras que todas las formulaciones de gelatina disminuyen un ciclo logarítmico después de los primeros 3 días de almacenamiento. En el caso de la gelatina que no contiene jugo de pitaya disminuye dos ciclos logarítmicos después de 7 días y ahí se mantiene hasta el final de la vida de anaquel.

Este comportamiento entre las gelatinas con pitaya y el control sin pitaya, puede atribuirse a que el jugo de pitaya aporta azúcares fermentables y otros nutrientes como vitaminas y minerales que el microorganismo requiere para sobrevivir, esto es de acuerdo a los resultados de Yáñez-López *et al*, (2005) donde analizaron 6 tipos de pitaya (*Stenocereus griseus*), ellos informaron que las pitayas contenían 7.6-9.3% de azúcares reductores (glucosa y fructosa) y 7.6-10.3% de azúcares totales. Y a los resultados de Bravo, (1978) del análisis del jugo de *S. griseus* que contiene 21.7 mg/100g de vitamina C, 9.13 mg/100g de Riboflavina y 0.47mg/100 g de niacina.

En este estudio se describió la incorporación y supervivencia de un microorganismo probiótico en una matriz no láctea que fue la gelatina de pitaya. El resultado obtenido para las tres formulaciones de gelatina de pitaya (Cuadro 12) es muy similar al reportado por Magariños *et al* (2008) en su estudio de viabilidad de dos diferentes cepas probióticas *L. casei* Shirota y *Bifidobacterium animalis lactis* en un postre de leche con salsa de arándano en el cual el lactobacilo disminuyó su cuenta inicial en un ciclo logarítmico después de 21 días de almacenamiento a 5°C. El resultado obtenido para las gelatinas de pitaya también es comparable con los resultados informados en el estudio de Sheehan *et al*, (2007) en un estudio con jugos de piña, naranja y arándano en el que observó que

*L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. casei*, sobrevivieron por encima de  $10^7$  UFC/mL en jugo de naranja y de  $10^6$  UFC/mL en jugo de piña después de 12 semanas.

Así mismo, el resultado de viabilidad de las gelatinas de pitaya es comparable con lo informado por el estudio de Heenan *et al*, (2004) en el cual *L. acidophilus* y *L. paracasei paracasei* sobrevivieron en su cuenta inicial de  $10^7$  UFC/g en un postre vegetariano congelado hecho a base de soya, después de 3 semanas de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Cuadro 12. Comparación de la viabilidad con otros trabajos.**

	<b>Microorganismo</b>	<b>Alimento</b>	<b>Condiciones almacenamiento</b>	<b>Supervivencia o viabilidad</b>
Presente trabajo	<i>L. casei</i> Shirota <b><math>10^9</math> UFC/g</b>	Gelatina de pitaya al 30,60 y 90%	21 días a $5^{\circ}\text{C}$	Disminuyó un ciclo logarítmico. <b><math>10^8</math> UFC/mL</b>
Magariños <i>et al</i> , (2008)	<i>L. casei</i> Shirota <i>Bifidobacterium animalis lactis</i> <b><math>10^9</math> UFC/g</b>	Postre salsa de arándano	21 días a $5^{\circ}\text{C}$	Disminuyó un ciclo logarítmico. <b><math>10^8</math> UFC/mL</b>
Sheehan <i>et al</i> , (2007)	<i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> y <i>L. casei</i> <b><math>10^8</math> UFC/mL</b>	Jugo naranja Jugo de piña	12 semanas	<b><math>10^7</math> UFC/mL</b> <b><math>10^6</math> UFC/mL</b>
Yoon <i>et al</i> , (2004)	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>L. delbrueckii</i> <b><math>10^9</math> UFC/g</b>	Jugo de tomate	4 semanas a $4^{\circ}\text{C}$	<b><math>10^8</math> UFC/mL</b>

## 7.6 Cambios en los compuestos antioxidantes durante la vida de anaquel.

En el Cuadro 13 podemos observar el cambio de las concentraciones iniciales de antioxidantes en cada formulación con respecto a su control.

La determinación de este parámetro se ve influenciada por muchas variables, como por ejemplo el sustrato a oxidar, el mecanismo de oxidación y el medio de reacción (Giovannelli et Buratti, 2009).

Al inicio de la vida de anaquel conforme aumenta la concentración de jugo de pitaya se observa un aumento en la concentración de antioxidantes totales manteniendo una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), tanto en las gelatinas inoculadas como en las no inoculadas.

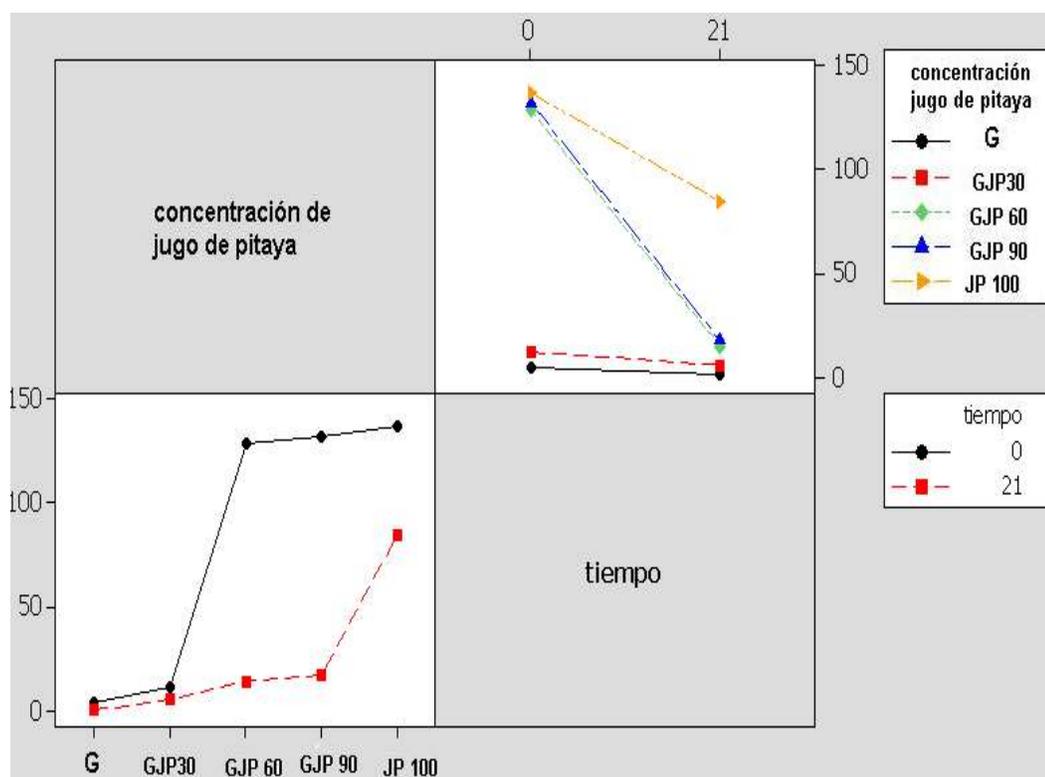
**Cuadro 13. Resultados en la concentración de antioxidantes totales ( $\mu\text{mol Trolox/g gelatina}$ ) durante la vida de anaquel.**

	CONTROLES ( $\mu\text{mol Trolox/g gelatina}$ )		MUESTRAS ( $\mu\text{mol Trolox/g gelatina}$ )	
	T 0 (días)	T 21 (días)	T 0 (días)	T (21 días)
<b>GELATINA</b>	4.12 $\pm$ 0.40	0	12.64 $\pm$ 0.55	0
<b>GJP 30</b>	11.65 $\pm$ 1.77	5.41 $\pm$ 0.72	11.07 $\pm$ 0.44	0
<b>GJP 60</b>	128.56 $\pm$ 7.36	14.42 $\pm$ 0.21	128.09 $\pm$ 3.37	6.01 $\pm$ 4.47
<b>GJP 90</b>	131.92 $\pm$ 6.39	17.15 $\pm$ 7.11	159.63 $\pm$ 4.31	56.98 $\pm$ 9.06
<b>JP 100</b>	136.54 $\pm$ 84.42	84.41 $\pm$ 31.88	161.38 $\pm$ 4.98	66.86 $\pm$ 15.14

**Gelatina** = mezcla con grenetina, agua y azúcar, **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30, GJP 60 y GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.  
**CONTROLES** no tienen inóculo, **MUESTRAS** están inoculadas. (n=3)

La disminución de la capacidad antioxidante que se observa con respecto al tiempo si es significativa ( $p \leq 0.05$ ), en el análisis de varianza se observa, como tanto el tiempo como la concentración de jugo de pitaya y la interacción de ambas tiene un efecto en dicha disminución en ambos casos, gelatinas inoculadas y en las no inoculadas (Figuras 17 y 18).

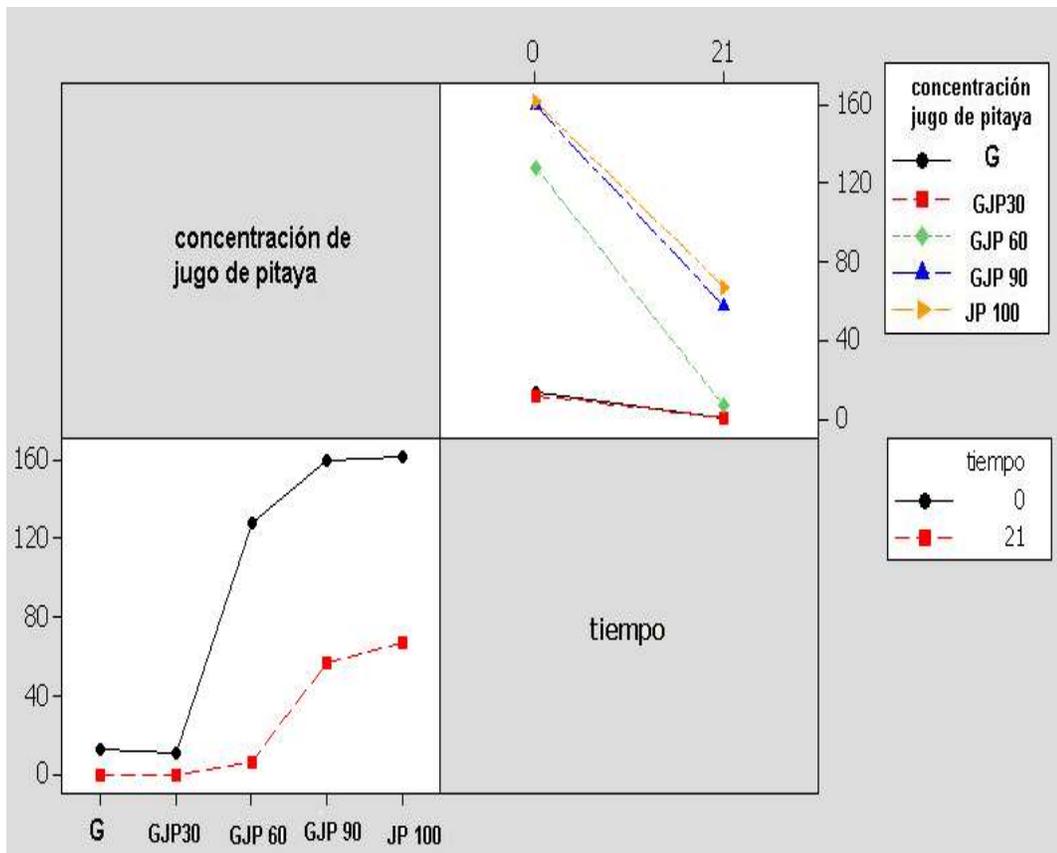
Es importante resaltar que los cambios en la concentración de antioxidantes no se deben a la presencia del microorganismo, ya que en las gelatinas no inoculadas hay una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ), al final de la vida de anaquel es decir después de 21 días, con respecto a la concentración inicial, esto se observa en las tendencias que tienen las dos gráficas de análisis estadístico.



**G** = mezcla con grenetina, agua y azúcar, **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30, GJP 60 y GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.

**Figura 17. Gráfica de interacciones, análisis estadístico antioxidantes.**

En la gráfica 18 podemos observar como conforme aumenta la concentración de jugo de pitaya en las gelatinas la disminución de la concentración de antioxidantes es mayor.



**G** = mezcla con grenetina, agua y azúcar, **JP 100** = jugo de pitaya tratado térmicamente  
**GJP 30**, **GJP 60** y **GJP 90** = corresponden a las gelatinas con jugo de pitaya al 30%, 60% y 90%.

**Figura 18. Gráfica de interacciones, análisis estadístico antioxidantes gelatinas con inoculo.**

## 7.7 Relación entre la concentración de los compuestos antioxidantes y la viabilidad del probiótico.

El comportamiento que presentaron cada una de las gelatinas comparando la viabilidad con respecto a los cambios en los compuestos antioxidantes a lo largo de la vida de anaquel se observa en las siguientes figuras.

En la gelatina que fue elaborada con 30% de jugo de pitaya, se observa (Figura 19) como la viabilidad del microorganismo disminuye un ciclo logarítmico después de los 21 días pero esto es independiente de la disminución en la concentración de antioxidantes, ambas gelatinas parten de una concentración baja de antioxidantes totales alrededor de  $11 \mu\text{mol Trolox/g}$  gelatina presentando una disminución del 53.56% en la gelatina con probiótico y en el caso de la gelatina sin microorganismo los antioxidantes disminuyen hasta llegar a cero, es decir hay una pérdida total de antioxidantes al final de la vida de anaquel, por factores ajenos al microorganismo, tales como las condiciones de almacenamiento es decir la temperatura de refrigeración, la humedad dentro del refrigerador, la luz que se colaba dentro de la caja que contenía las gelatinas.

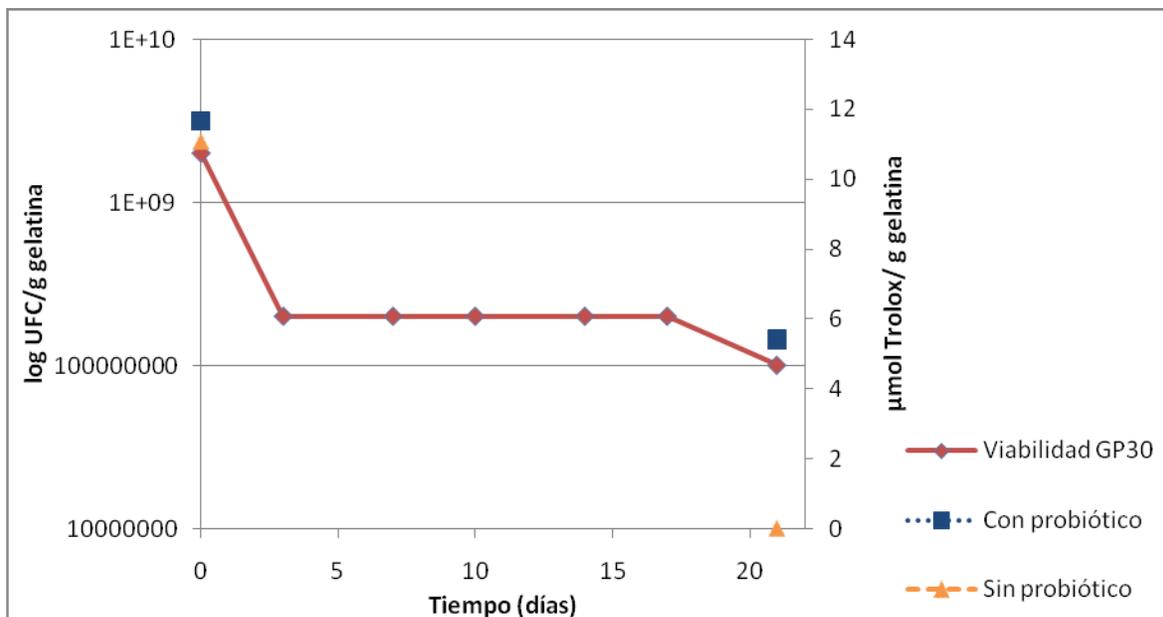
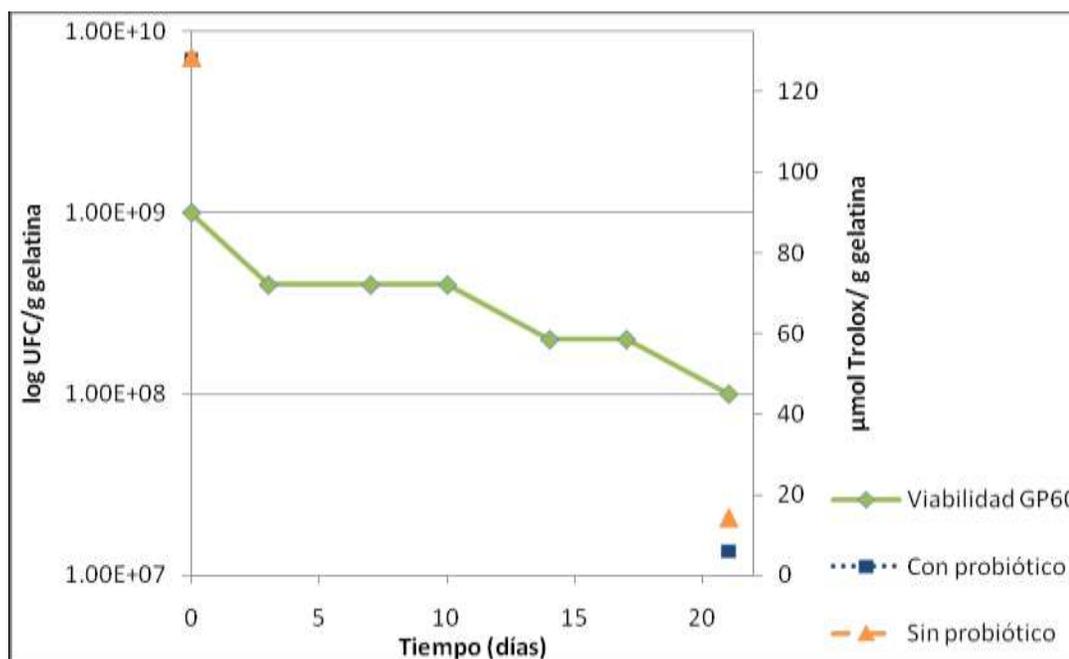


Figura 19. Relación entre viabilidad y concentración de antioxidantes de la gelatina con 30% de jugo de pitaya (n=3).

De forma similar al caso anterior, en la gelatina con 60% de jugo de pitaya, el valor de la concentración de los antioxidantes al inicio de la vida de anaquel es prácticamente igual y la concentración de microorganismo disminuye un ciclo logarítmico.

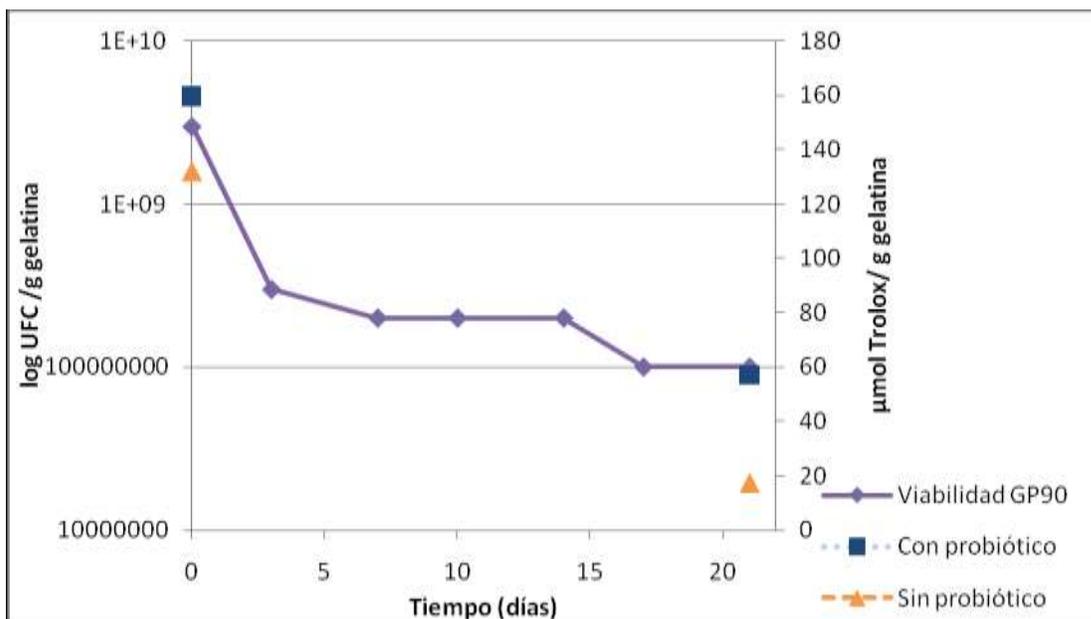
Al final de la vida de anaquel la disminución de compuestos antioxidantes es mayor en el caso de la gelatina inoculada, 95.32% comparada con 88.74% de pérdida de la gelatina sin inóculo (Figura 20) esto podría atribuirse a que el microorganismo consumió compuestos antioxidantes, diversos autores han propuesto que microorganismos probióticos son capaces de metabolizar compuestos fenólicos para favorecer su supervivencia, (García-Ruiz *et al*, 2008) estos compuestos tienen un gran poder antioxidante y se observó están presentes en la pitaya.



**Figura 20. Relación entre viabilidad y concentración de antioxidantes de la gelatina con 60% de jugo de pitaya (n=3).**

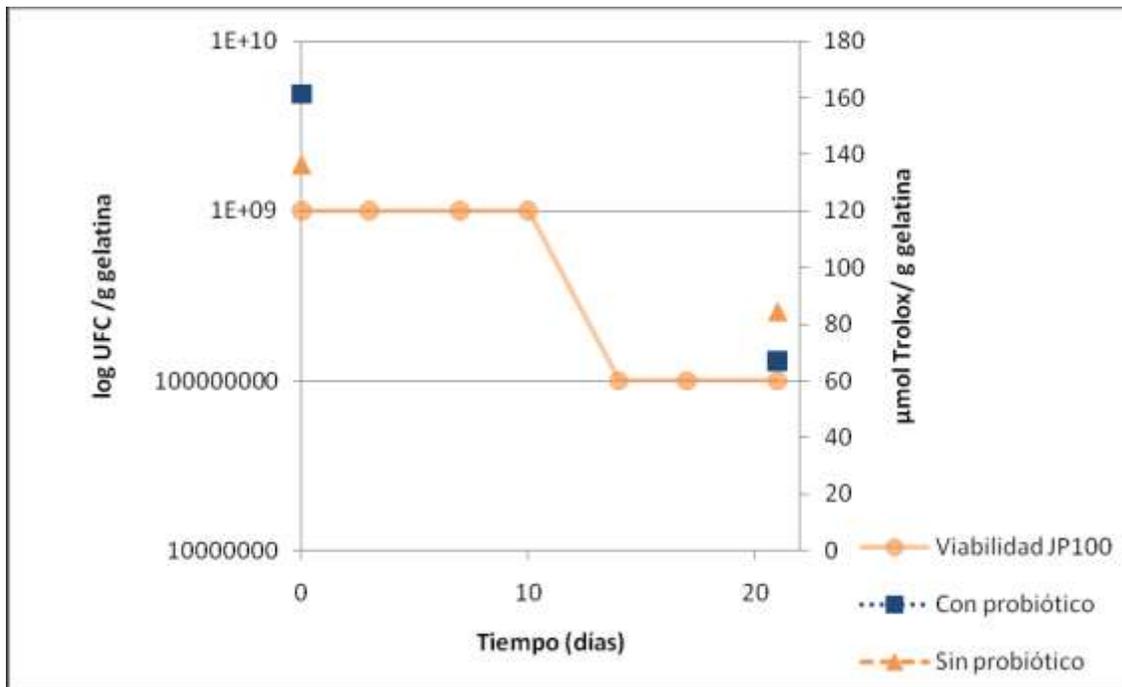
La formulación de gelatina al 60% de jugo de pitaya, por los resultados obtenidos resulta una buena opción para producirse, ya que la concentración final de antioxidantes sigue siendo comparable con jugo de manzana y ya antes se había mencionado que está dentro del intervalo para considerarse un producto probiótico, por esto sería un alimento con dos características para ser un alimento funcional.

Para la gelatina al 90% de jugo (Figura 21) observamos que la viabilidad disminuye un ciclo logarítmico después de los 21 días, mientras que después de partir de una concentración inicial de antioxidantes similar en ambas gelatinas, al final de la vida de anaquel de manera independiente al microorganismo siendo 64.30 % la disminución en la gelatina inoculada y de 86.99 % en la gelatina sin inóculo.



**Figura 21. Relación entre viabilidad y concentración de antioxidantes de la gelatina con 90% de jugo de pitaya (n=3).**

Por último, para el jugo de pitaya inoculado, se observa como la viabilidad inicial se mantiene por 10 días, hasta disminuir un ciclo logarítmico y así llegar al final de la vida de anaquel, mientras que de manera independiente la concentración inicial de antioxidantes disminuye en un 47.69% en la gelatina con probiótico y un 51.03% en la gelatina sin inóculo, hasta obtener un valor similar al que se encontró en el jugo de pitaya tratado.



**Figura 22. Relación entre viabilidad y concentración de antioxidantes del jugo de pitaya (n=3).**

Es importante destacar que todas las gelatinas conservan una excelente cuenta microbiana del microorganismo probiótico y además la cuenta total de antioxidantes al final de la vida de anaquel, aporta una buena concentración de antioxidantes para ser un alimento refrigerado.

## 8 CONCLUSIONES

La capacidad antioxidante del jugo de pitaya, así como el contenido de polifenoles se mantuvieron en valores superiores a los encontrados en la literatura para otras frutas, aún después del tratamiento térmico.-

Las tres formulaciones de gelatina elaborada con jugo de pitaya no presentaron un efecto negativo en la viabilidad de *Lactobacillus casei* Shirota, manteniéndose en todos los casos una cuenta en el orden de  $10^8$  UFC/g de gelatina después de 21 días de almacenamiento, aportando así la concentración necesaria de microorganismo viable para obtener un efecto benéfico en la salud del consumidor. Se observó que la adición de jugo de pitaya en diferentes concentraciones no ocasionó un detrimento en las cuentas finales del microorganismo en la gelatina.

Los cambios observados en el pH, contenido de sólidos solubles y de ácido láctico en las gelatinas de pitaya, se atribuyen al aumento de concentración de jugo de pitaya así como a la supervivencia del probiótico durante la vida de anaquel.

*L. casei* Shirota no tuvo un efecto en la concentración final de compuestos antioxidantes, después de 21 días de almacenamiento de las diferentes formulaciones de gelatina de pitaya.

La presencia de compuestos fenólicos y otros compuestos antioxidantes no afectó la viabilidad del microorganismo probiótico en la gelatina.

La gelatina al 60% de jugo de pitaya, resulta una buena opción para producirse, sería un alimento con dos características para ser un alimento funcional.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abu, M. F., Mohamed, M., Rahmat, A., Fry J. 2009. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). Food Chem. **113**:479-483.
- Ayala-Camarillo, K., C. 2008. Caracterización del fruto y pulpa de la pitaya *Stenocereus griseus* H., de su capacidad antioxidante y extracción de pigmentos y compuestos fenólicos. Tesis Maestría Ciencias en Alimentos, ENCB, IPN. 103 págs.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., Webb, C. 2003. Review Cereal-based fermented foods and beverages. Food Res. Int. **36**: 527-543
- Bravo, H. H., Sánchez M., 1978. Las Cactáceas de México. 2ª Ed. UNAM. México Vol 1.
- Boone, R., Castenholz, R. (Eds.) 2001. Bergey's Manual of systematic bacteriology, 2ª edición, Editorial Springer, USA, Vol. 1 pág. 148-150,153,163
- Bu'Lock, J. (1991),. Biotecnología básica. Editorial Acribia, España. Pág: 36
- Cagigas, A., Blanco, J. 2002. Prebióticos y probióticos una relación beneficiosa. Rev. Cubana Aliment Nutr.16(1):63-68.
- Calligaris, S., Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C. 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. Int. Dairy J. **14**:421-427
- Capocasa, F., Scalzo, J., Mezzetti, B., Battino, M. 2008. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. Food Chem. **111**:872-878
- Chandramouli, V., Kailasapathy, 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**:27-35
- Charalapompoulos, D., Pandiella, S.S., Webb, C. 2002. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. J. Appl. Microbiol. **92**:851-859

- Cobo, J.M., Mateos, J. A., Muñoz, A. 2006. Efecto de *Lactobacillus casei* sobre la incidencia de procesos infecciosos en niños/as. *Nutr. Hosp.* 4:547-551
- Cruz, A. G., Antunes, A., Sousa, A. L., Faria, J., Saad. S. 2009. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Res. Int.* doi: 10.1016/j.foodres.2009.03.020
- Cruz, H. J. P. 1985. Caracterización del fruto en cuatro tipos de Pitaya *Stenocereus stellatus* R. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Fruticultura, Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. Págs. 53-79
- Dave, R. I., Shah, N.P. 1997. Effect of level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteri in yoghurts. *Food Aus.* **49**:164-168
- Del Toro, M. E., Castellón, A. j. P. 1986. Fisiología del desarrollo del fruto del Pitayo *Stenocereus griseus* Haworth y su aprovechamiento en la elaboración de mermeladas. Tesis profesional. Dpto. de Industrias Agrícolas. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N. P. 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.* **16**:1181-1189
- Esquivel, P. 2004. Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. *Agronomía Mesoamericana.* **15**:215-2197
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A.1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* **47**:1035-1040
- Gänzle, M., Hertel, C., Van der Vossen, J., Hammes, W., 1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. Food Microb.* **48**: 21-35
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. 2008. Potencial of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control.* **19**:835-841

- Giovanelli, G., Buratti, S. 2009. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chem.* **112**:903-908.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium spp.*, and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. *Trend Food Sci. Tech.* **10**:139-157.
- González, R., Blancas, A., Santillana, R., Azaola, A., Wacher, C. 2004. Growth and final product formation by *Bifidobacterium infantis* in aerated fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**:606-610.
- Guzman, O. 2000. Obtención de un colorante natural a partir de la pitaya. Tesis Maestría, IPN, ENCB. México
- Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W., Fleet, G.H. 2004. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **37**:461-466.
- Herbach, K., Maier, C., Stinzinger, F., Carle, R. 2006. Effects of processing and storage on juice colour and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyhizus*) juice. *Eur. Food Res. Technol.* **224**:649-658.
- Imeh, U., Khokhar, S. 2002. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 6301-6306.
- Ipek, G., Vijay, K., Mohamed, A. 2005. Probiotics in food safety and human health. Library of Congress, Nueva York. Págs. 1-25, 38-55, 67-83, 95-103
- Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., Iseki, K. 2009. In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem.* **114**:466-471.
- Jales, S. T. L., Soares-Sobrinho, J. L., Nunes, L. C. C., Roca, M. F., Lima, E. Q., Ximenex, E. C. P. A., Rolim-Neto, P. J. 2007. Formulations technology of a probiotic (*Zymomonas mobilis*) in a gelatinous capsules. *Latin American J. Pharm.* **26**:553-557.

- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **3**:39-48.
- Kanner, J., Harel, S., Granit, R. 2001. Betalains- a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **49**:5178-5185.
- Krause, M. 2004. *Nutrición y Dietoterapia*, 10ma edición. Editorial Mc Graw Hill, México.
- Kröckel, L. 2006. Use of probiotic bacteria in meat products. *Fleischwirtschaft.* **86**:109-113.
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., Lee, Y. K. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. In Microl.* **157**:876-884.
- Lima, D., Duarte, A., Esteves, V. 2007. Solid-phase extraction and capillary electrophoresis determination of phenols from soil after alkaline CuO oxidation. *Chemosphere.* **69**:561-568.
- Lourens-Hatting, A., Viljoen, B. 2001. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Res. Int.* **34**:791-796.
- Luckow, T., Delahunty, C. 2003. Which juice is "healthier"? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Qual. and Pref.* **15**:751-759.
- Luckow, T., Delahunty, C. 2004. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Res. Int.* **37**:805-814.
- Luckow, T., Sheehan, V., Fitzgerald, G., Delahunty, C. 2006. Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite.* **47**:315-323.
- Madigan, M.T., 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8ª Edición, Prentice Hall, España. Pág: 15,78, 116,514, 718-722.
- Martínez, G. J., Cruz, H. J. 1995. Caracterización de frutos de pitaya *Stenocereus griseus* H., en la Mixteca. *Revista Chapingo. Serie Horticultura.* **1(4)**:77-81
- Magariños, H., Cartes, P., Fraser, B., Selaive, S., Costa, M., Figuerola, F., Pizarro, O. 2008. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus casei*

- Shirota and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) in a milk-based dessert with cranberry sauce. Society of Dairy Tech. **61**:96-101.
- Morrisey, P.A., O'Brien, N.M. 1998. Dietary antioxidants in Health and Disease. Int. Dairy J. **8**:463-472.
  - Oliva-Coba, T. G. 2006. Estudio de la actividad antioxidante presente en la pulpa de la pitaya. (*Stenocereus stellatus*) Tesis Maestría Ciencias, IPN, ENCB. México
  - Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C., Sellappan, S., Krewer, G. 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. J. Agric and Food Chem. **51**:5497-5503.
  - Parkar, S., Stevenson, D., Skinner, M. 2008. The potencial influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. Int. J. Food Microbiol **124**:295-298.
  - Pérez, A. 2004. Aspectos demográficos de dos poblaciones de *Stenocereus stellatus*, una cactácea endémica del centro de México. Tesis Biología, UNAM, FES-Iztacala. México.
  - Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., Soccol, C. R. 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. Food Res. Int. **41**:111-123.
  - Priego, F., Luque, J. M., Luque, M. D. 2007. Determination of phenolic compounds in grape skin by capillary electrophoresis with simultaneous dual fluorescence and diode array absorption detection after dynamic superheated liquid leaching. J. Chrom. A. **1139**:301-307.
  - Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. 2010. Non-dairy probiotic products. Food Microbiol. **27**:1-11
  - Rivero-Pérez, M. D., Muñiz, P., González-San José, L. 2007. Antioxidant profile of red wines evaluated by Total Antioxidant Capacity, scavenger activity and biomarkers of oxidative stress methodologies. J. Agric. and Food Chem. **55**:5476-5483
  - Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. 2003. Simultaneous determinations of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. J. of Agric. Food Chem. **51**:571-581

- Schrezenmeir, J., De Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *The American J. of Clin. Nutr.* **73**:36IS-40S.
- Serrano, J., Goñi, I., Fulgencio, S. C. 2007. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res. Int.* **40**:15-21.
- Sha, B. B., Yin, X. B., Zhang, X. H., He, X. W., Yang, W.L. 2007. Capillary electrophoresis coupled with electrochemical detection using porous etched joint for determination of antioxidants. *J. Chrom.* **1167**:109-115.
- Shah, N. P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technol.* **55**:46-53.
- Sheehan, V. M., Ross, P., Fitzgerald, G. F. 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **8**:279-284.
- Sutton, S. (Ed). 2006. Measurement of cell concentration in suspension by optical density. *PMF Newsletters.* **12**:3-13.
- Teow, C.C., Truong, V. D., McFeeters, R., Thompson, R., Pecota, K., Yencho, G. 2007. Antioxidant activities, phenolic and  $\beta$ -carotene contents of sweets potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem.* **103**:829-838.
- Tsen, J. H., Lin, Y. P., King, V. 2003. Banana puree fermentation by *Lactobacillus acidophilus* immobilized in Ca-alginate. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**:357-361.
- Tuohy, K. M., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney, A. L., Gibson, G. R. 2007. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *J. Applied Microbiol.* **102**:1026-1032.
- Tuorila, H., Anderson, A., Martikainen, A., Salovaara, H. 1998. Effect of product formula, information and consumer characteristics on the acceptance of a new snack food. *Food Qual. Prefer.* **9**:313-320.

- Tura, D., Robards, K. 2002. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *J. Chrom.* **975**:71-93.
- Vaillant, F., Perez, A., Davila, I., Dornier, M., Reynes, M. 2005. Colorant and antioxidant properties of red-purple pitayaha (*Hylocereus* sp.) *Fruits.* **60**:1-10.
- Valles, C., Rodriguez, L. 1997. *Suculentas mexicanas, Cactáceas mexicanas.* CVS Publicaciones, México. Págs. 27-35
- Van der Meulen, R., Camu, N., Van Vooren, T., Heymans, C., De Vuyst, L. 2008. In vitro kinetic análisis of carbohydrate and aromatic amino acid metabolism of different members of the human colon. *Int. J. Food Microbiol.* **124**:27-33.
- Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* **111**:816-823.
- Wu, L., Hsu, H., Chen, Y., Chiu, C., Lin, Y., Ho, J. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem.* **95**:319-327.
- Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B., Mitka, K., Kowalski, P., Mizrahi, Y. 2007. Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. *J. Phytochem.* **68**:251-259.
- Xu, B.J., Chang, S.K. 2007. A comparative study on Phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Science.* **72**:159-166.
- Yáñez-López, L., Domínguez, J., Fajardo, M. C., Malpica, F., Soriano, J., Pelayo, C. 2005. Quality atributes of different types of cactus pitaya fruits (*Stenocereus griseus*). *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Postharvest Symp. Acta Hort.* **682**:645-650.
- Yoon, K.Y., Woodams, E. E., Hang, Y.D. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensm-Wiss. U- Technol.* **38**:73-75.
- Yoon, K. Y., Woodams, E., Hang, Y. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Tech. Elsevier.* **97**:1427-1430.
- Young, J. 1998. European market developments in prebiotic- and probiotic cointaining foodstuffs. *Brit. J. Nutr.* **80**:231-233.

- Yuki, N., Watanabe, K., Mike, A., Tagaami, Y., Tanaka, R., Ohwaki, M., Morotomi, M. 1999. Survival of a probiotic *Lactobacillus casei* Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from feces and identification using monoclonal antibodies. Int. J. Food Microbiol. **48**:51-57.

## 10. ANEXOS

### Medios de cultivo

➤ Peptona de Caseína (BIOXON)

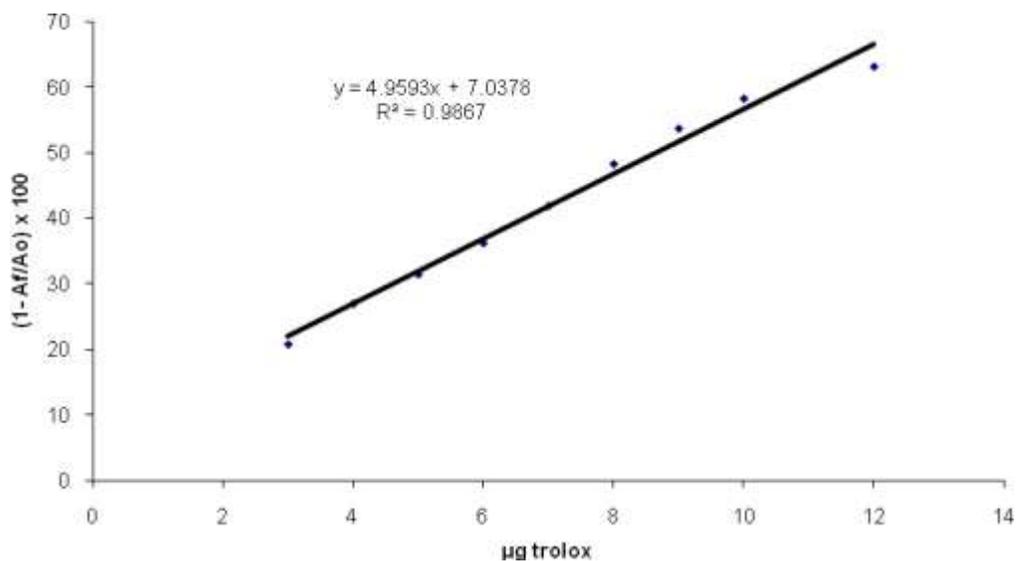
Nitrógeno total	10%
Residuo de ignición	15%
Pérdida en el secado	5%
pH (Solución al 2%)	6.5 – 7.5

➤ Agar MRS (DIFCO)

Peptona proteica	10 g
Extracto de res	10 g
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	20 g
Polisorbato 80	1 g
Citrato de amonio	2 g
Acetato de sodio	5 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Fosfato de dipotasio	2 g
Agar	15 g

## Curvas tipo

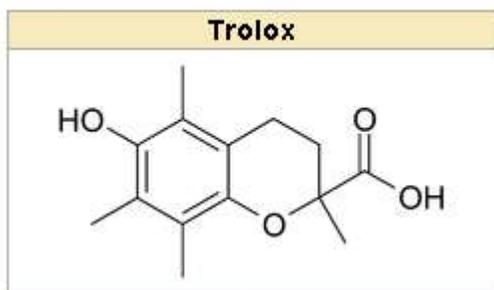
### 1. Método de DMDP



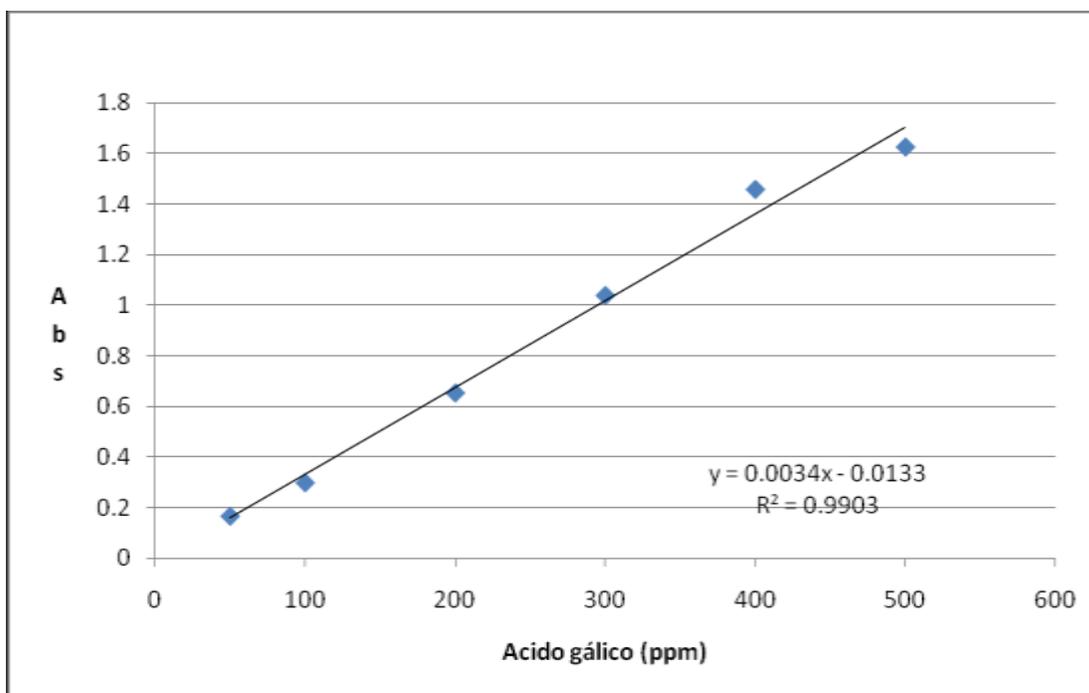
**Curva tipo de Trolox®**

### Trolox

Derivado hidrosolúvel da Vitamina E, cuja fórmula química é 6-hidroxi, 2,5,7,8-tetrametilcroman, 2-ácido carboxílico.



## 2. Método de Folin-Ciocalteu



**Curva tipo de ácido gálico**

### Reactivo de Folin

Es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos.

Funciona midiendo la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del reactivo.

### **Ácido Gálico**

El ácido gálico es un ácido orgánico también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico. La fórmula química es  $C_6H_2(OH)_3COOH$ .

## AGRADECIMIENTOS

- Al programa de **Becas de CONACyT** que todavía cree en los estudiantes mexicanos, sin este tipo de instituciones sería más complicado lograr un postgrado, en el área científica
- Al **IPN** por abrirme las puertas y ayudarme en mi formación académica.
- A mis **asesoras** por su ayuda y conocimientos: M. en C. Ma. Del Carmen Beltrán Orozco y Dra. Yadira Rivera Espinoza, ENCB, IPN.
- A mi abuela Doña Queta por enseñarme tanto acerca de la comida y la cocina.
- Al QFB Alejandro Camacho por su asesoría y uso del Cepario, FQ, UNAM.
- A mis **amigos y compañeros de Alimentos** Karla Ayala, Claudia Velázquez, Raquel González, Raquel Cuamba, Nancy Ordaz, Erik y Atzin. por sus múltiples consejos y su agradable compañía.
- A mis pequeñas compañeras de laboratorio que con tanto empeño compartieron su tiempo y sus ganas de aprender, Selene Rosales Sosa y Alejandra Díaz Bautista.
- Al Bibliotecario de la ENCB, IPN Jesús Vázquez por su excelente atención y ayuda cada vez que lo necesité.
- A Miguel Angel Amaya de **Duché** por sus consejos acerca de las gelatinas.
- Al Sr. Felipe Echeverría por toda su ayuda y atenciones en el laboratorio.
- A la M. Sarah Ochoa por su orientación en cuestiones microbiológicas.
- Al Dr. Osorio por sus prácticos y amables consejos.
- Al M. Luis Presuel por sus prestaciones en la Central de Biotecnología.
- Al Dr. Ramón Arana por todo su tiempo al ayudarme a realizar los análisis estadísticos.
- De manera muy especial a la Dra. Gabriela Vargas por todo el tiempo que invirtió en ayudarme y por las prestaciones de la UNAM- FES Cuautitlán.

## DEDICATORIA

- A la vida, la ciencia y el conocimiento; que están en constante avance y transformación.
- A la memoria de una excelente persona y maestra Dra. Biserka Sveshtarova.
- A la memoria de mi abuelo Don Rafa quien me enseñó el valor de leer un libro y con su gran ejemplo me impulsó a alcanzar mis metas.
- A mis Maestros que con sus palabras, ejemplo y pasión, me ayudaron a definir mi camino hacia la química y a su vez a la microbiología, que contribuyeron enormemente en mi formación académica y profesional: QA. Claudia Mancilla, Ing. Daniel Aguiñaga, Dra. Josefina De Gyves, QFB. Alejandro Camacho, Dr. Guillermo Aguilar, Dra. Amanda Galvez, Martha Giles, Dr. Adelfo Escalante, Dra. Yadira Rivera.
- A mi madre Martha Pérez Lara, la mejor mamá... quien siempre me ha enseñado a reflexionar sobre la vida y el amor, gracias por sembrar la semilla de la curiosidad científica en mi y por saber escucharme y quererme sin condiciones.
- A mi padre Rafael Lozano, que es el hombre más valiente que conozco, quien me ha regalado muchas lecciones de vida y siempre ha creído en mi potencial.
- A mi querida amiga Irma Canseco que con su tiempo y dedicación me enseñó a pescar y además con mucho cariño, siempre me impulsó a perseguir mis sueños.
- A mis amigas y amigos que siempre creyeron que trabajaba con “pitufresas” o “gummiebayas”, sin embargo me apoyaron mucho con su cariño y tiempo: Eileen, Yuri, Valeria, Gretel, David, Juan Ignacio y Dieter.
- A mis amigas y compañeras que saben lo que significa trabajar un día completo en un laboratorio, gracias por estar ahí cuando más las necesitaba: Bonnie, Alice, Berenice, Andrea, Karla, Nancy, Raquel, Gaby, Alaide, y Nikte.

**A mi pequeño enano bigotón Huskie por todas las aventuras que hemos vivido.**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México, D.F., el día 6 de abril del 2011, la que suscribe Martha Celia Lozano Pérez Lara alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Alimentos con número de registro B070961, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la M. en C. María del Carmen Beltrán Orozco y la Dra. Yadira Rivera Espinoza y cede los derechos del trabajo intitulado Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei* Shirota en una gelatina de pitaya (*Stenocereus griseus* H.), al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: macarmenorozco@gmail.com, espinoza4@hotmail.com, pumpkin\_07@yahoo.com, si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Martha Celia Lozano Pérez Lara

Dra. Yadira Rivera Espinoza

Vó. Bo  
Directores de Tesis:

M en C. Maria del Carmen Beltrán Orozco