

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

“Elaboración de una microencapsulación por gelación iónica a base de kale
(*Brassica oleracea var. sabellica*) y *Lactobacillus spp.* como posible
candidato a simbiótico”

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

P R E S E N T A:

LICENCIADA EN NUTRICIÓN MONICA VILLANUEVA CASTAÑEDA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. América Ivette Barrera Molina

CODIRECTORA:

Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Perla Osorio Díaz

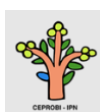
Dra. Sandra Elizabeth García Solís

Dr. Heriberto Manuel Rivera

AGRADECIMIENTOS.

Agradecimiento al Consejo nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme apoyo económico para llevar a cabo este proyecto. A la Facultad de Nutrición de la UAEM la cual ha sido mi casa desde el año 2011, al Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM donde me brindaron el apoyo para realizar parte de mis experimentos, al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Politécnico Nacional y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, donde me abrieron espacios para realizar parte de mi proyecto.

De manera muy especial quiero dar las gracias a mi directora de tesis, la Dra. América Ivette Barrera Molina, quien además ha sido mi mentora e inspiración en esta etapa, a mi codirectora, la Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica por su paciencia, dedicación y cariño en su forma de enseñarme, a la Dra. Sandra Elizabeth García Solís y a la Dra. Perla Osorio Díaz por formar parte de mi comité tutorial y quienes me orientaron durante todo este proceso. Al Dr. Raúl Dávila Delgado y al Dr. Daniel Tapia Maruri quienes me dieron incursión en el área de microscopía y por quienes abrí mi mente a un área de la ciencia que no imaginaba, a mis compañeros de generación Liliana, Nantzin, David y Mayra así como a los profesores de posgrado y más colaboradores que me orientaron y me supervisaron a lo largo de este proyecto.



DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mi familia, quien siempre me ha apoyado para lograr mis sueños, mis hijas Sofía y Tiana, quienes me animan y acompañan cada momento y son la razón de mi existencia, a mi esposo Job Rosales que me anima y me sostiene en cada etapa de mi vida desde que estamos juntos, mi hermana Paulina que sin importar la diferencia de nuestras áreas siempre ha estado ahí para escucharme, mi madre Monica Castañeda Monroy que ha dado todo por sus hijas, a mi abuela Elvira Monroy García quien me muestra su inmenso amor en cada abrazo y en cada mirada, y quien me ha enseñado que todo es posible, a mi abuelo Bernardo Castañeda García quien esta conmigo siempre animandome y despejando mi camino, y a mi padre Francisco Villanueva Pérez quien estaría feliz de ver que seguí sus consejos para superarme.

RESUMEN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son uno de los principales retos para el área de salud a nivel mundial, una de ellas es el sobrepeso y la obesidad, actualmente causante de gran parte de las complicaciones y muertes a nivel mundial ya que favorece la aparición del síndrome metabólico no solo en adultos, si no que aqueja a gran parte de la población infantil, dichos padecimientos alteran la composición de la microbiota intestinal (MI) la cual es considerada un órgano metabólico que debe encontrarse idealmente en estado de eubiosis para promover un correcto estado de salud en el organismo humano. Como estrategia para estimular el alcance de dicho estado se recomienda el consumo de probióticos y prebióticos; una de las dificultades cuando se consumen es, qué, debido a las condiciones que atraviesan en el tracto gastrointestinal, se minimiza la cantidad tanto de prebióticos como de probióticos que deberían llegar al punto de interés para ser efectivos, es por esa razón que, una opción para aumentar la efectividad de este tipo de productos se propone una microencapsulación por gelación iónica cuya barrera otorgue protección ante condiciones digestivas a la matriz que contenga probióticos y al vegetal kale (*Brassica oleracea. var. sabellica*) el cual se estudia actualmente por su contenido nutricional, contenido de polifenoles y su potencial prebiótico. Se propone la elaboración de una microcápsula bajo la técnica de gelación iónica como una estrategia útil para la elaboración de un posible simbiótico, con la realización de pruebas para microencapsulación y, posterior a ello evaluar su viabilidad así como analizar sus características para poner a prueba su

resistencia inicialmente en microcápsulas recién elaboradas, después de un periodo en refrigeración y en congelación para asegurar su vida útil, de tal forma se podría contribuir con propuestas para enriquecer el universo de opciones que hay para tener un estado de eubiosis. De igual forma se busca promover el consumo de alimentos funcionales que otorguen beneficios al organismo humano y que sean de fácil manejo para su industrialización sin perder o modificar sus propiedades ya que ello disminuiría su efecto beneficioso, como resultado de esta investigación se verificó el contenido de polifenoles en el extracto utilizado y se obtuvieron microcápsulas cuyas características son prometedoras, hasta el momento muestran otorgar la protección necesaria para un consorcio bacteriano así como tolerancia al proceso de deshidratación, lo anterior deja abierta la posibilidad para continuar estudiando y perfeccionando el diseño de esta microcápsula con posibilidad de ser un simbiótico.

ABSTRACT

Chronic non-communicable diseases (NCDs) are one of the main challenges for the health area worldwide, one of them is overweight and obesity, currently causing a great part of the complications and deaths worldwide since it favors the appearance of metabolic syndrome not only in adults, but also in a big part of children population, these conditions alter the composition of the intestinal microbiota (IM), which is considered a metabolic organ that should ideally be in a state of eubiosis to promote a correct state of health in the human organism. As a strategy to stimulate the achievement of this state, the consumption of probiotics and prebiotics is recommended; one of the difficulties when they are consumed is that, due to the conditions they go through in the gastrointestinal tract, the amount of both prebiotics and probiotics that should reach the point of interest to be effective is minimized, for this reason, an option to increase the effectiveness of this type of products is proposed a microencapsulation by ionic gelation whose barrier provides protection against digestive conditions to the matrix that contains probiotics and the vegetable kale (*Brassica oleracea. var. sabellica*) which is currently being studied for its nutritional content, polyphenol content and prebiotic potential. The elaboration of a microcapsule under the ionic gelation technique is proposed as a useful strategy for the elaboration of a possible symbiotic, with the realization of tests for microencapsulation and, after that, to evaluate its viability as well as to analyze its characteristics to test its initial resistance in freshly elaborated microcapsules, after a period in refrigeration and freezing to assure its useful life, in such a way it could

contribute with proposals to enrich the universe of options that exist to have a state of eubiosis. Likewise, we seek to promote the consumption of functional foods that provide benefits to the human organism and that are easy to handle for their industrialization without losing or modifying their properties, since this would diminish their beneficial effect, as a result of this research, the content of polyphenols in the extract used was verified and microcapsules were obtained whose characteristics are promising, so far they show to provide the necessary protection for a bacterial consortium as well as tolerance to the dehydration process, which leaves open the possibility to continue studying and perfecting the design of this microcapsule with the possibility of being a symbiotic.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	V
LISTA DE SIGLAS SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.	X
INDICE DE FIGURAS.....	XIII
INDICE DE TABLAS.....	XV
INDICE DE GRÁFICAS.....	XVI
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Introducción	1
1.2 Obesidad y sobrepeso	3
1.3 Microbiota intestinal.....	7
1.4 Probióticos	10
1.5 Prebióticos	13
1.6 Simbióticos	15
1.7 Kale (<i>Brassica oleracea var. sabellica</i>)	18
1.7.1 Fitonutrientes.....	22
1.7.2 Polifenoles.....	23
1.8 Técnica de microencapsulación por gelación iónica.....	25

2. JUSTIFICACIÓN	29
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS.....	31
a. Objetivo general.....	31
b. Objetivos específicos.....	31
5. METODOLOGÍA	32
5.1 Material vegetal y obtención de extractos	32
5.1.2 Cuantificación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu	33
5.1.3 Preparación de la solución.	33
5.1.4 Desarrollo de la cuantificación por el metodo Folin-Ciocalteu.....	34
5.2 Estandarización de la Técnica de inmovilización por gelación iónica.....	35
5.3 Evaluación de la estabilidad de las microcápsulas en distintas condiciones ambientales	35
5.4 Inmovilización de extracto de kale mediante la técnica de gelación iónica.....	36
5.5 Activación de consorcio de bacterias probióticas (<i>Lactobacillus lactis delbruecki</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>)	36
5.5.1 Determinación de características morfológicas y bioquímicas de bacterias probióticas	37
5.6 Cinética de crecimiento de bacterias probióticas en presencia de polifenoles totales de extracto acuoso de Kale comercial	37
5.7 Microencapsulación de bacterias probióticas en presencia de kale	38
5.8 Evaluación morfológica mediante microscopia óptica, de barrido ambiental y confocal laser ..	39
5.9 Evaluación de la viabilidad del consorcio probiótico micro encapsulado	40

5.10 Deshidratación de microcápsulas candidatas a simbiótico (Bacterias probióticas y Kale comercial).....	41
6. RESULTADOS.....	43
6.1 Curvas de calibración de Ácido Gálico para cuantificación de polifenoles.....	43
6.2 Cuantificación de polifenoles totales en Kale.....	44
6.3 Morfología de la microcápsula.....	45
6.4 Identificación bioquímica de consorcio probiótico (Tinción de Gram)	49
6.5 Cinética de crecimiento del consorcio de bacterias probióticas utilizadas en microencapsulación	50
6.6 Evaluación morfológica de microcápsulas adicionadas con Kale y bacterias probióticas.....	53
6.6.1 Tamaño promedio de microcápsulas adicionadas con Kale y bacterias probióticas de acuerdo con las condiciones ambientales temperatura	53
6.6.2 Evaluación morfológica de microcápsula adicionadas con Kale y bacterias probióticas recién elaboradas	54
6.6.3 Evaluación morfología de microcápsula adicionadas con Kale y bacterias probióticas posterior a 15 días en refrigeración.....	56
6.6.4 Evaluación morfológica de microcápsula adicionadas con Kale y bacterias probióticas posterior a 15 días en congelación	58
6.7 Viabilidad de Microcápsulas de AS al 1.3%, kale al 1% y consorcio de <i>Lactobacillus</i>	60
7. DISCUSIÓN	65
8. CONCLUSIONES.....	67
9. BIBLIOGRAFÍA	68

LISTA DE SIGLAS SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
MI	Microbióta intestinal
OMS	Organización mundial de la salud
IMC	Indice de masa corporal
OPS	Organización panamericana de la salud
INEGI	Instituto nacional de estadística y geografía
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
SII	Síndrome de intestino irritable
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
UFC	Unidades formadoras de colonias
pH	Potencial de hidrógeno

ECV	Enfermedades cardiovasculares
USDA	U.S, Department of Agriculture
AS	Alginato de sodio
GBA	Goma gelana de bajo ácido
MeOH	Metanol
H ₂ O	Agua
Ca	Calcio
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
BAL	Bacteria ácido lácticas
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
g	Gramos
C°	Grados celcius
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio

μm	Micrometros
μL	Microlitros
λ	Absrbancia
nm	Nanometros
mg	Miligramos
E.A.G.	Equivalentes de ácido gálico
μg	Microgramos
AG	Ácido Gálico
mm	Milímetros
\emptyset	Diámetro

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones de la Microbiota Intestinal.	8
Figura 2. Filos presentes en la microbiota intestinal.....	9
Figura 3. Actividad del conjunto probiótico–prebiótico y sus subproductos.....	17
Figura 4. Kale <i>Brassica oleracea var. sabellica</i>	19
Figura 5. Diagrama de clasificación de polifenoles y sus estructuras.	24
Figura 6. Estructura química del Alginato de Sodio.	27
Figura 7. Esquema reacción de Alginato de Sodio en presencia de Cloruro de Calcio.	28
Figura 8. Esquema del deshidratador.....	42
Figura 9. Evaluación estructural de Microcapulas de alginato de sodio al 1.3%	46
Figura 10. Morfología de Microcapulas de alginato de sodio al 1.3% y Kale al 1%..	46
Fig. 11 Evaluación estructural de Microcapulas de alginato de sodio al 1.3% y Kale al 1% en distintas condiciones ambientales.	48
Fig 12. Evaluación morfológica y bioquímica de bacterias probióticas.	50
Fig.13 Evaluación estructural de Microcapulas de alginato de sodio al 1.3%, Kale 1% y consorcio de <i>Lactobacillus</i> recién elaboradas	55

Fig. 14 Evaluación estructural de Microcapulas de alginato de sodio al 1.3%, Kale 1% y consorcio de <i>Lactobacillus</i> refrigeradas	57
Fig. 15 Evaluación estructural de Microcapulas de alginato de sodio al 1.3%, Kale 1% y consorcio de <i>Lactobacillus</i> posterior a periodo en congelación	60
Figura 16. Evaluación de la viabilidad de las microcápsulas de AS al 1.3%, Kale 1% y consorcio de <i>Lactobacillus</i>	61
Figura 17. Proceso de fermentación.	61
Fig. 18 Evaluación de la viabilidad de las microcápsulas de Alginato de Sodio al 1.3%, Kale 1% y consorcio de <i>Lactobacillus</i> analizadas en microscopio confocal	62
Fig. 19 Evaluación estructural de Microcapulas de alginato de sodio al 1.3%, Kale 1% y consorcio de <i>Lactobacillus</i> deshidratadas.....	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Contenido de minerales en vegetal kale.....	20
Tabla 2 Contenido nutricional de vegetal kale.	21
Tabla 3 Contenido de vitaminas en vegetal kale.....	21
Tabla 4. Polifenoles totales del extracto metanólico y acuoso de Kale marca Euphoria.....	45
Tabla 5. Analisis estadistico de cinetica de crecimiento.	51
Tabla 6. Tamaño de microcápsulas sometidas a distintas condiciones ambientales.	54

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de calibración del A.G. en MeOH.....	43
Gráfica 2. Curva de calibración del A.G en H2O.....	44
Gráfica. 3. Crecimiento de consorcio bacteriano en presencia de liofilizado de extracto acuoso de Kale.....	52

1. ANTECEDENTES

1.1 Introducción

Durante décadas se ha observado el deterioro de la salud poblacional debido al aumento en la aparición de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) tales como obesidad y sobrepeso, las cuales hoy forman parte de las principales causas de mortalidad y debido a ello tienen la atención de la comunidad científica para tratar de llegar a comprender mejor las causas y estrategias más adecuadas para disminuir su aparición y efectos en todos los grupos de edad, género, nacionalidades, culturas y regiones del mundo (1). La tendencia al aumento de sobre peso y obesidad en la población se ha documentado desde la década de los ochenta y se ha estudiado para encontrar las mejores estrategias que contribuyan a la modificación de los hábitos que serán responsables de que, en los próximos años la salud desde la infancia se deteriore cada vez más(2), entre las principales razones de esta problemática existen los malos hábitos de alimentación y la falta de actividad física (3,4). De acuerdo con Maza-Ávila y cols. 2022 es de suma importancia concientizar con estrategias más efectivas que contribuyan con la promoción de hábitos alimenticios saludables y estilos de vida que eviten y favorezcan la disminución de sobrepeso y obesidad, lo anterior debido a que son factores promotores de ECNT(5) mismas de las cuales se ha evidenciado tienen una estrecha relación con la composición de la Microbiota Intestinal (MI) la cual tiene una gran influencia en el estado de salud (6). Según la organización Mundial de la Salud (OMS) hasta el año 2015 el sobrepeso y obesidad infantil afectaba de manera

grave a casi 43 millones de niños menores de 5 años, estudios como el de Rivas y cols. en 2014 evidenciaron que la composición de la MI se veía asociada al aumento de tejido adiposo en la población infantil, estudios similares llevados a cabo por Vals y cols. en 2016 demostraron que niveles altos de bacteroidetes en niños se asocian a una mayor probabilidad sufrir alteraciones de la MI en la vida adulta (3). El equilibrio que alcanza cada individuo en la composición bacteriana de su MI debe estar determinada principalmente por la relación que existe entre las principales familias bacterianas que ocupan el tracto intestinal como son firmicutes y bacteroidetes, los cuales ocupan el 90% del total de la MI, se debe considerar que el fortalecimiento de la misma depende en su mayoría de la dieta de cada individuo, es por ello que se han establecido diversas estrategias enfocadas a la disminución de factores que predisponen al padecimiento de enfermedades como el sobrepeso y sus consecuencias, estas pueden ser sociales, culturales, económicas y por supuesto orgánicas, las cuales abarcan el desequilibrio de la diversidad de la MI (7,8)

Una de las principales estrategias para la restauración de la MI es la recomendación del consumo de probióticos y prebióticos tanto en niños como adultos; la evidencia muestra que para lograr una modulación que contribuye a la disminución de trastornos gastrointestinales, malabsorción, cáncer entre otras (9). En estudios como el de Martin y cols. en 2017 se ha evidenciado que la adición de diferentes cepas de *Lactobacillus* a una dieta puede disminuir la masa de la grasa corporal, el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo II y la resistencia a la insulina (10,11). Una gran variedad de estudios muestra que la interacción de probióticos y prebióticos

con el huésped favorece a tener un mejor estado de salud debido al beneficio en el metabolismo y respuesta inmune, el cual contrarresta un estado de disbiosis, término acuñado a principios de el año 2000 para establecer la existencia de un desequilibrio microbiano de la MI y el cual ejerce efectos adversos en el individuo (12). Para mejorar los efectos de estos se ha observado que es preferible su consumo en conjunto con alimentos como el consumo de yogur natural con frutos rojos, chocolate natural con kéfir entre otros, y sí potencializar su efecto en el organismo humano debido a una actividad simbiótica, para lo anterior es fundamental que existan más y mejores opciones de productos simbióticos con la formulación y viabilidad adecuada, así como regular de manera más efectiva el diseño de estos proponiendo alimentos probióticos y prebióticos más efectivos con relación a la seguridad de obtener el beneficio de los probióticos y prebióticos en el sitio de interés, como el colon (13,14).

1.2 Obesidad y sobrepeso

La obesidad y sobrepeso de acuerdo con la Secretaría de Salud, desde 2017 se han definido como una acumulación excesiva y dañina de tejido adiposo siendo un grave riesgo para la salud humana. La Organización Mundial de la Salud (OMS) las clasifica de menor a mayor gravedad tomando como referencia el Índice de Masa Corporal (IMC), el cual permite clasificar el nivel de riesgo que tiene el paciente que

curso dichos padecimientos (15). En México la NOM-008-SSA3-2017 indica que existe una susceptibilidad genética para esta condición así como también trastornos sociales, metabólicos y psicológicos que incrementan el riesgo para el padecimiento de ECNT (16), tales como diabetes mellitus tipo II, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, las cuales son responsables de más del 70% de muertes en el mundo según lo reportado por la Organización Panamericana de Salud (OPS) hasta 2016, así mismo se han establecido distintas recomendaciones en el área médica y epidemiológica para reforzar el ámbito de promoción en salud que tiene como finalidad la mejora de hábitos alimentarios y de vida en los individuos. Debido al rápido incremento en la presencia de estos padecimientos se ha establecido por parte de la OMS el “Dia Mundial contra la Obesidad” el cual tiene como finalidad concientizar a la población y así aumentar el interés en la prevención en el padecimiento de sobrepeso y obesidad. Actualmente la población mexicana ocupa uno de los primeros cinco lugares en el padecimiento de obesidad y sobrepeso a nivel mundial tanto en población infantil como adulta (15).

Es prioridad en el mundo atender esta problemática considerada ya como una epidemia la cual afecta más a países latinoamericanos (17), México se destaca por el aumento en la presencia de obesidad y sobrepeso así como el aumento en el riesgo de padecer alguna de estas enfermedades, son notables las cifras del grupo de edad de niños en edad escolar (5 -11 años) el cual conforme aumenta de edad, aumenta el riesgo de sufrir este tipo de padecimientos (OPS). Evidencia como la de Aguilera-Bocanegra SP y cols. en 2022 demuestran que son más susceptibles los niños en adquirir malos hábitos de alimentación por su exposición a los alimentos

ultraprocesados, muy altos en azúcares, grasas y sodio, lo anterior se resume en una alimentación elevada en calorías y deficiente en cuanto a vitaminas y minerales ocasionando problemas de sobrepeso y obesidad desde edades tempranas (18). Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en México es más notoria la presencia de obesidad y sobrepeso infantil en las regiones norte y zonas metropolitanas de todos los estados del país debido al ritmo de vida acelerado que llevan las familias y el acceso que tiene cualquier miembro de la familia a alimentos no saludables, aunado a ello se deben tomar en cuenta la problemática en cuanto a la realización de actividad física y malos hábitos de sueño (17)

Lo anterior deja como resultado que más del 35% de la población en primera infancia padece sobrepeso u obesidad, siendo la obesidad la que más aumento tuvo desde la Encuesta de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018 y a la cual comparada a la versión 2020 mostró un aumento, también el riesgo de padecimientos como el síndrome metabólico, riesgo cardiovascular, hipertensión y síndrome metabólico.

En los últimos años diversas investigaciones en todo el mundo han evidenciado la estrecha relación que existe entre los problemas de sobrepeso y el exceso de consumo de azúcares que son usados como endulzante en la industria alimentaria(19), estos al ser metabolizados mayormente en hígado se utilizan para la formación de ácidos grasos que participan en el almacenamiento de energía en el organismo, todo ello en conjunto con la falta de actividad física aumenta la probabilidad de padecer sobrepeso y obesidad (17). Estos padecimientos afectan el correcto desempeño de los diversos sistemas del organismo humano y uno de ellos es el funcionamiento de la MI, alterando con ello la homeostasis en el

organismo humano. Además de la dieta, es importante considerar el ejercicio físico, los hábitos de sueño y el estrés como factores determinantes para alterar la composición de la MI ya que modifican el equilibrio que existe entre las distintas familias bacterianas que la ocupan, y debido a la gran abundancia en su presencia se puede generalizar su clasificación principalmente entre Firmicutes y Bacteroidetes (20)

Algunos estudios como el de Backhed y cols. Muestran que cuando se presenta un deterioro en la composición de la MI hay mayor producción energética que ocasiona un aumento en la acumulación de tejido adiposo en el organismo (21), creando un ciclo repetitivo que lleva a dañar cada vez más al ser humano que padece alguna de estas enfermedades, es por ello que, es de suma importancia valorar y llevar a cabo nuevas estrategias alimentarias y de actividad física que contribuyan a recuperar un estado de eubiosis intestinal desde los primeros años de vida y con ello favorecer a devolver el estado de homeostasis humana (20,22)

Actualmente ha resultado interesante para la comunidad científica estudiar los efectos que tiene una dieta con alimentos funcionales, probióticos y prebióticos enfocada a la mejora del estado de salud humana debido a que se ha evidenciado hay resultados favorables en cuanto a reducción de peso corporal y mejora en las funciones gastrointestinales (22)

1.3 Microbiota intestinal

Considerada actualmente como un importante órgano metabólico gracias al conjunto de funciones que lleva a cabo, la microbiota intestinal (MI) juega un papel relevante en la salud de los seres humanos debido a que alberga a una gran comunidad de bacterias que llevan a cabo un papel sumamente importante para el metabolismo humano, otra de sus funciones es su valiosa contribución al correcto funcionamiento del sistema inmune, tiene gran participación en la síntesis de diversos metabolitos y con ello trae beneficios para la homeostasis (23)

La MI de un ser humano se forma y se enriquece desde el nacimiento de un ser vivo y a partir de ahí también se inicia el desarrollo del sistema inmune en un individuo; la vía de nacimiento de un individuo y la edad gestacional en el momento del nacimiento e incluso los fármacos que son administrados a la madre durante el parto, la lactancia materna y la exposición a fármacos antibióticos influyen de manera muy importante en la MI ya que esta se va diversificando a lo largo del crecimiento y desarrollo del individuo en sus distintas etapas de vida y sufre alteraciones por las mismas razones por las cuales se va enriqueciendo, es decir, que si hay cambios en el estilo de vida, tratamientos farmacológicos e incluso la presencia de estrés habría cambios en la composición de la MI (24).

Con relación a sus funciones asombran la capacidad de regulación e intervención en la protección que otorga para beneficio del organismo humano, sobretodo el hecho de que la MI asimile compuestos que no son digeribles, además de contar con una gran capacidad de barrera ante patógenos (22,25) (Fig. 1).

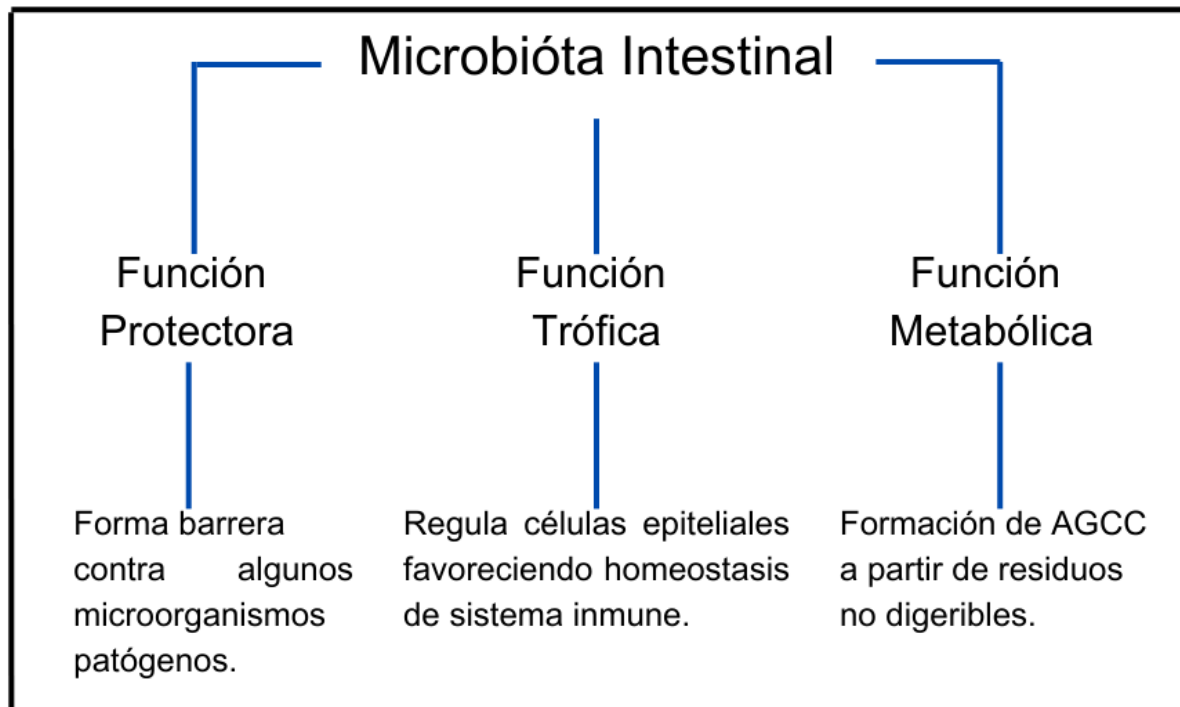


Figura 1. Funciones de la Microbiota Intestinal. Villanueva M. 2023

El ecosistema de la MI es de gran tamaño, esta compuesta de cuatro principales grupos de filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria y Fusobacteria, sin embargo esta predominada por Firmicutes y Bacteroidetes (Fig. 2). En general la relación entre los dos grupos predominantes, así como la etapa de vida del individuo va a determinar si existe o no un estado de eubiosis intestinal, el

cual se define como el equilibrio ideal de bacterias en la MI para tener un estado de salud adecuado que contribuya a un estado de homeostasis en el organismo (25–27).

Densidad de la diversidad bacteriana en microbióta intestinal.

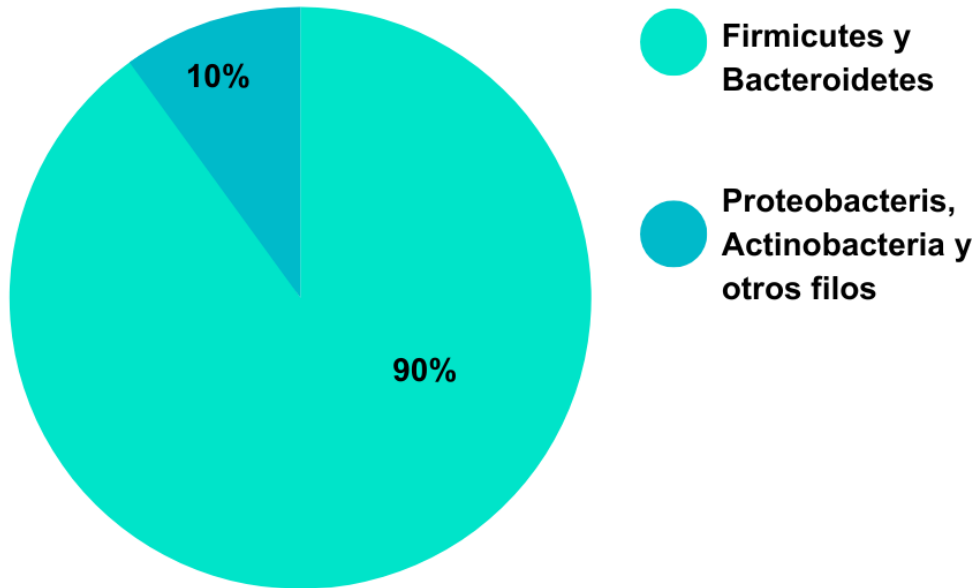


Figura 2. Filos presentes en la microbiota intestinal (Villanueva M. 2023).

El organismo humano tiene una composición microbiana distinta en cada individuo y es fácilmente alterable, factores como tiempo de tránsito colónico o la migración influyen a la par de los hábitos alimenticios y la presencia de enfermedades ya que la ocupación bacteriana disminuye o aumenta con estos factores, sin embargo, no es la cantidad de especies lo importante si no que, cada individuo cuente con una diversidad bacteriana conveniente, ha sido extremadamente raro el reporte de efectos adversos por consumo de probióticos de forma individual como *Lactobacillus rhamnosus*, estos efectos adversos se han presentado (1 caso en 10

millones) en consumidores cuya barrera intestinal esta demasiado afectada, es por ello que se recomienda el consumo de diversas especies de bacterias probióticas para compensar la cantidad de especies de las que se carecen en la MI y estimular el aumento en la diversidad de las que ya habitan ahí, aunado a lo anterior es de suma importancia añadir a sus promotores, los cuales conocemos como prebióticos, ambos son capaces de tener un efecto simbiótico que promueve la fermentación y actividad metabólica permitiendo beneficios para la salud en todas las etapas de la vida fortaleciendo el sistema inmune, mejorando la absorcion de nutrientes, disminuyendo la inflamación y problemas gastrointestinales entre otros (24,26,28).

1.4 Probióticos

Debido al aumento en la aparición de problemas de salud relacionados con las Enfermedades Crónico no Transmisibles (ECNT) en el sector salud se ha aclarado que no solo es importante el equilibrio entre la ingesta y el gasto energético, sino también las estrategias que contribuyan a la regulación de la MI para favorecer el estado de eubiosis, una de las recomendaciones que más fuerza ha tomado por sus efectos favorables es el consumo de probióticos (29)

Los probióticos se han definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como “microorganismos vivos que proporcionan un beneficio a la salud del hospedador cuando son ingeridos en las cantidades adecuadas”,(30) y en la última

década el estudio de los probióticos ha ido en aumento debido a la variedad de beneficios que se ven reflejados en la salud de quien los consume, al día de hoy la industria alimentaria ha añadido probióticos a sus productos como un principio activo para ofrecer beneficios en el organismo de los consumidores, algunos de los productos probióticos comerciales que actualmente se consumen son Sinuberase® o Enterogermina®, una de las razones que justifica el aumento en el consumo de suplementos comerciales se debe a que se ha reportado que los probióticos contribuyen a la disminución de los patógenos en el tracto gastro intestinal armonizando la respuesta inmune y promoviendo la generación de compuestos bioactivos que también potencializan actividades metabólicas benéficas para el huésped, sin embargo, no siempre existe la seguridad de que su consumo sea eficaz, lo anterior debido a que se ha evidenciado que los suplementos probióticos sufren una pérdida en su volumen durante su trayecto al punto de interés como el paso por distintos niveles de pH, (31)

La importancia de los probióticos radica en los resultados obtenidos en quien los consume restaurando la disbiosis en el caso de síndrome de intestino irritable (SII), disminuyendo la inflamación, favoreciendo la motilidad intestinal y contribuyendo a la generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como butirato y acetato, contribuyendo con ello a una mejora en el fortalecimiento del sistema inmune favoreciendo la formación de la barrera intestinal evitando el paso de bacterias patógenas (32)

Por todo lo anterior los estudios actuales están dirigidos a la relación de la microbiota y su importante papel en la salud digestiva así como su influencia en la

prevención de enfermedades crónicas como la diabetes tipo II, obesidad y enfermedades cardiovasculares; se han observado resultados favorables en la modificación de la ingesta de alimentos probióticos y el mejoramiento de la salud de los individuos (32)

Podemos decir que la MI es el ecosistema que conforma al intestino y los factores que influyen para la composición de este son el sistema inmune y los sustratos digestivos; dicho ecosistema está compuesto por una gran variedad de microorganismos que pueden ser o no patógenos, la importancia de un adecuado estado de salud radica en la diversidad y cantidad de todos los que ocupan un lugar en este ecosistema. Los probióticos se dividen en géneros, especies y cepas y al ser ingeridos muestran los beneficios que otorgan a la salud; entre ellos el tratamiento y prevención de enfermedades digestivas y por supuesto la modulación de la MI, algunas cepas tienen un efecto modulador mayor que otras y su eficacia depende mayormente de la dosis en la que se administran (33)

Los probióticos son una de las principales recomendaciones para combatir infecciones gastrointestinales en población pediátrica gracias a que muestra disminución en diarreas, náuseas, estreñimiento y distensión, con una tolerancia adecuada y escasos efectos adversos (34) *Lactobacillus* especie *delbrueckii* y especie *lactis* al igual que *Streptococcus thermophilus* son algunas de las bacterias más usadas en la industria de alimentos fermentados por los beneficios que otorgan ya que parecen ejercer efectos inmunomoduladores en la MI por su efecto probiótico, sus requerimientos nutricionales dependen de su especie, por lo tanto se recomienda consumir en consorcio; crecen en un rango de 30 a 40°C y en

condiciones de acidez de 4.0 - 5.5 pH (35) Las enzimas que utilizan y sus vías de regulación continúan en estudio, mientras siguen bajo la mirada de la comunidad científica se puede contar con que no solo tienen actividad probiótica si no, que además tienen relación con la modulación de la respuesta inmune y su contribución a la mejora de las propiedades organolépticas y de conservación de productos para consumo humano. Por su amplia resistencia a temperatura, manejo y niveles de pH juegan un papel importante en alimentos, para su uso industrial se encuentra normado que, para que efectúe beneficios en quien los consuma un producto debe contener un determinado número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por dosis. Las dosis usadas varían entre 10⁶ a 10⁹ UFC, esta última si es de forma terapéutica (36).

1.5 Prebióticos

El término “prebiótico” fue introducido en 1995 por Gibson y Roberfroid, en su mayoría los prebióticos son un tipo de fibra soluble (oligosacáridos y polisacáridos), de cadena corta y tienen bajo peso molecular, no son digeribles y se pueden encontrar principalmente en algunas frutas y verduras, uno de los más conocidos y usados en la industria de prebióticos es la inulina. Se han hecho diversos estudios que arrojan como evidencia múltiples beneficios como resultado para quien los consume de forma regular como la reducción de niveles de colesterol, aumento de la saciedad, mejora en la motilidad y vaciamiento gástrico (37), también hay elevación de la biodisponibilidad de polifenoles y su actividad gastrointestinal entre

otros (38) Lo anterior se debe al estímulo que ejercen sobre varios tipos de bacterias que habitan la MI debido a que llegan al colon sin ser hidrolizados y es ahí donde son metabolizados selectivamente por bacterias que tienen efectos benéficos en la MI. Los prebióticos provienen de la dieta y son fermentados de forma selectiva promoviendo cambios que favorecen el mantenimiento de la eubiosis intestinal ya que sirven como alimento de los probióticos (39). Habitualmente los prebióticos deben resistir las condiciones del trayecto intestinal tales como el pH y la hidrólisis enzimática hasta llegar al punto donde serán fermentados; para que una sustancia sea considerada prebiótico debe ser resistente a ácidos gástricos, estimular el crecimiento de bacterias que favorecen la eubiosis intestinal, debe ser preferido por una o más bacterias benéficas de la MI y fermentable por la misma, bajo estas condiciones se pueden obtener AGCC los cuales forman parte de la fuente de energía para la MI y modifican en nivel de pH, con ello se ocasiona que se disocien compuestos patógenos alcalinos que conducen a enfermedades graves como el cáncer (40) gracias a esta acción se evita su absorción en el intestino; también promueven el aumento de la biomasa celular bacteriana benéfica para la MI estimulando la disminución de la inflamación gastrointestinal, mayor motilidad intestinal, flujo sanguíneo y en consecuencia fortalece el sistema inmune evitando la invasión de bacterias patógenas en la barrera del epitelio intestinal para prevenir el deterioro de la salud (39), también se influye así en la absorción de nutrientes la cual mejora la función digestiva; incluso en pacientes críticos es importante tomar en cuenta la recomendación del aumento de consumo de prebióticos en su dieta ya que se ha evidenciado que disminuye la respuesta al estrés, se altera el pH y la barrera intestinal se ve deteriorada, al administrar prebióticos en la dieta de un

paciente en condiciones críticas se promueve una recuperación de la MI para disminuir el número de bacterias patógenas que gracias al padecimiento y deterioro del ambiente intestinal se ven aumentadas (41,42).

Hay evidencia que muestra como la implementación o aumento de consumo de prebióticos ha inducido, mantenido y modulado toda la actividad de la MI a favor de un mejor estado de salud (39)

1.6 Simbióticos

En la industria alimentaria este término se utiliza para referirse a la combinación de un probiótico y un prebiótico, gracias a esta unión se otorgan beneficios a la salud de quien los consume de forma aumentada en contraste a los beneficios que se obtienen cuando se consumen por separado, su unión se destaca por rehabilitar y conservar la homeostasis (43). Debido a la urgencia de encontrar opciones que ofrezcan soluciones o que contribuyan a resolver la problemática que acarrea a nivel mundial el aumento en la presencia de obesidad, sobrepeso y ECNT se proponen el consumo de simbióticos ya que se ha observado que multiplican los beneficios que sus componentes ejercen, así como, contribuir al aumento del número de la población bacteriana intestinal por el hecho de trabajar en conjunto (44)

Entre los más consumidos están los preparados lácteos con adición de fibras vegetales y yogur con frutos como “Danone cereales” ó “yoghurt lala griego con frutos rojos” (45), tras varios años de estudio se ha identificado que el consumo de

simbióticos produjo cambios en la composición de la MI de quien los consumió trayendo con ello cambios metabólicos como disminución de la inflamación intestinal, reducción de peso, menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV), cambios en indicadores bioquímicos de perfil lipídico y protección hepática gracias a la actividad de los subproductos metabólicos que surgen de esta unión como lo son los AGCC (22), a estos se les conoce como butirato, acetato y propionato, son producto de la fermentación bacteriana de fibra no digerible por el humano en la región anatómica del colon donde los restos de fibra que provienen de estómago, duodeno e íleon se acapara y se metaboliza; de acuerdo con Louis y cols. en su análisis de 2014 se confirmó que esta actividad la debemos a enzimas como las betaglucosidasas que los transforman en monómeros de glucosa que dan origen a moléculas de piruvato que darán pie a la formación de estos AGCC los cuales son captados por las células epiteliales intestinales, ingresados mediante mecanismos de difusión y que tienen efecto positivo en el mantenimiento del sistema gastrointestinal y sistema inmunológico contribuyendo al equilibrio de la diversidad bacteriana(46) y el mantenimiento de un pH que frena el crecimiento de bacterias patógenas, también se generan productos como las bacteriocinas que son péptidos sintetizados por los probióticos y estas contribuyen a la muerte de células

patógenas por medio de una desnaturalización de sus enzimas o alterando la permeabilidad de sus membranas (47) (Fig 3).

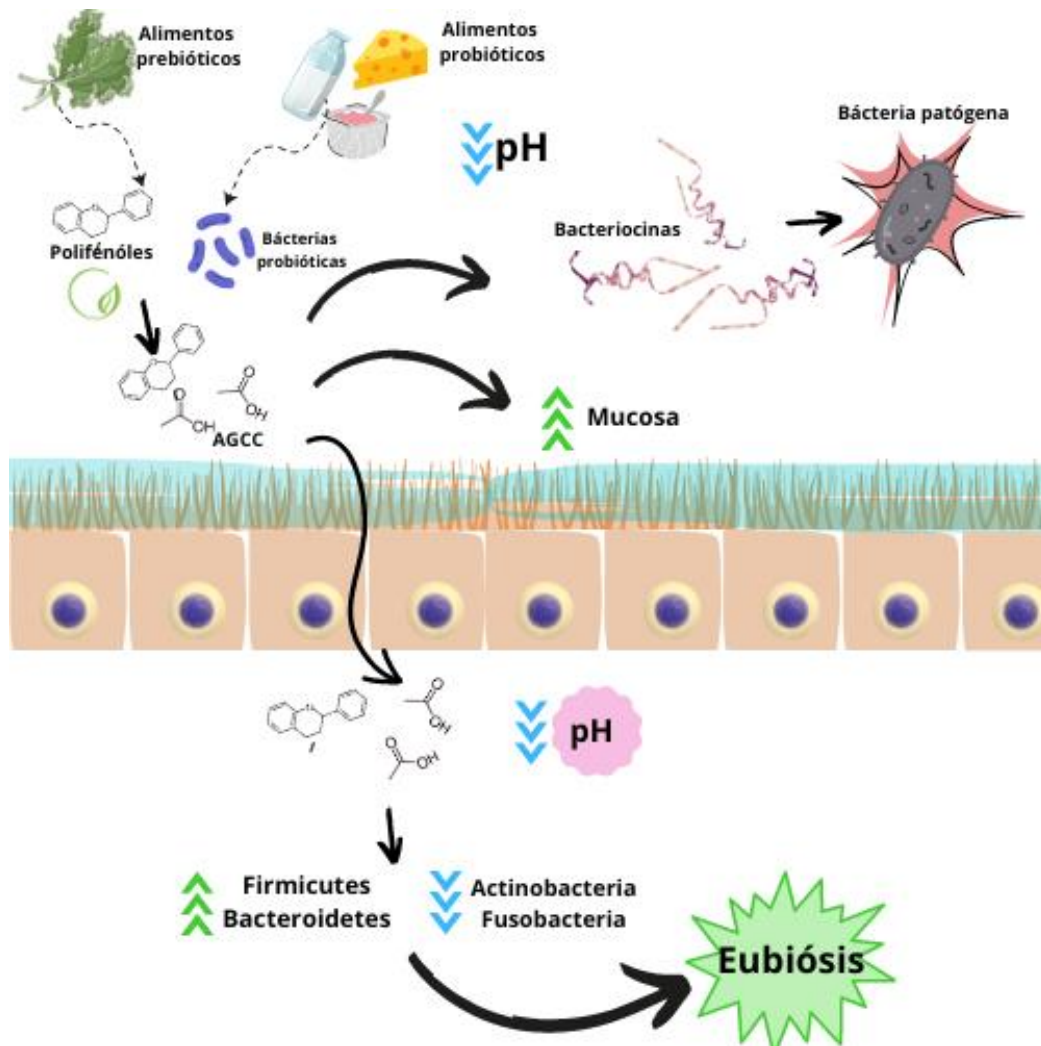


Figura 3. Actividad del conjunto probiótico–prebiótico y sus subproductos favoreciendo la regulación de la Microbiota intestinal (Villanueva M. 2023).

Los simbióticos son recomendables no solo para contrarrestar al sobrepeso y obesidad, gracias a diversos estímulos que favorecen la lipogénesis debido a la regulación del entorno, sino que, también son útiles ante otras ECNT como la diabetes mellitus; estudios como el de Vona y cols. en 2019 en el que se menciona como la regulación de la MI interactúa de manera positiva para contrarrestar los efectos de esta enfermedad, por lo anterior se puede afirmar que son una estrategia adecuada para disminuir incluso el síndrome metabólico, esta afirmación está evidenciada por Matsumoto y cols. 2019, quienes establecieron que la predominancia de Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacterias así como menor cantidad Actinobacteria phyla y Fusobacteria serían la combinación adecuada a nivel de colon en individuos sanos.

1.7 Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*)

Derivado de los requerimientos en atención a la inseguridad alimentaria en la población se ha aumentado la producción de vegetales como hortalizas, las más cultivadas son las que pertenecen a la familia *Brassicaceae* (48). Una de ellas es el kale o también conocido como “col rizada”, con nombre científico *Brassica oleracea* var. *sabellica*, es un vegetal crucífero de forma alargada que está compuesto por tallos y hojas (Fig. 4).



Figura 4. Kale Brassica oleracea var. sabellica

Es de origen europeo, específicamente de Italia y comenzó a extenderse rápidamente por América del norte en el año 2012, actualmente es de amplio consumo en Asia y Canadá, se está introduciendo en América latina y el resto del mundo por su densidad nutricional y su “nobleza” en el cultivo, ha ganado fama como uno de los alimentos que más beneficios para la salud que ofrece al ser consumido (49). En relación con los nutrientes que integran al kale y sus funciones en el organismo humano; de acuerdo con la U.S, Department of Agriculture (Usda) se destacan entre sus propiedades el alto contenido de fibra dietética, betacarotenos, vitamina K, vitamina A, calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio y antioxidantes. (Ver tablas 1, 2 y 3). Recientemente ha sido reconocida en el área de alimentos funcionales, los cuales se definen desde la década de los ochenta como alimentos con contenido de sustancias bioactivas que, incluidas en la dieta de un individuo son capaces de desencadenar procesos en el metabolismo que propician beneficios para la salud, al igual que muchos vegetales un ejemplo de alimento funcional son los prebióticos (50,51).

La forma en que habitualmente se consume la col rizada es cruda, en ensaladas o bebidas y debido a la popularidad que está cobrando están surgiendo nuevas formas de preparación para su consumo y, al ser un vegetal con contenido de hidratos de carbono insolubles en recientes estudios se ha comenzado a considerar que, esta col rizada tiene actividad prebiótica. Aunado a lo anterior y la evidencia actual se continua con su estudio como un alimento funcional debido a su alto contenido de polifenoles, lo cual hace del kale un alimento funcional con potencial prebiótico que podría contribuir en gran medida para que los individuos que cursen o no con alguna patología los integren como estrategia en la búsqueda de un estado de eubiosis (52,53).

Mineral	Por cada 100 g (Usda)
Calcio	254 mg
Hierro	1.6 mg
Magnesio	32.7 mg
Fosforo	55mg
Potasio	348mg

Tabla 1 Contenido de minerales en vegetal kale.

Nutriente	Por cada 100 g (Usda)
Energía	35 kcal
Proteína	2.92 g
Lípidos	1.49 g
Carbohidratos	4.42 g
Fibra dietética	4.1 g
Glucosa	0.4 g
Fructosa	0.4 g

Tabla 2 Contenido nutricional de vegetal kale.

Vitaminas	Por cada 100 g (Usda)
Vit C	93.4 mg
Timina	0.113 mg
Riboflavina	0.347 mg
Niacina	1.180 mg
Ácido pantoténico	0.37 mg
Vit B6	0.147 mg
Vit E	0.66 mg
Foláto	62 µg
Vit A	241 µg
Vit K	390 µg
Betacaroteno	2870 µg

Tabla 3 Contenido de vitaminas en vegetal kale.

1.7.1 Fitonutrientes

Las frutas y vegetales son indispensables para nuestro organismo ya que nos proporcionan nutrientes como vitaminas, minerales y antioxidantes; sin embargo de acuerdo con Ames y cols. a inicios de la década de los noventa además de estos hay otros nutrientes que nos otorgan los vegetales, estos son los fitoquímicos o fitonutrientes, de manera general son los pigmentos que dan color a las frutas y vegetales, estos como lo describe su nombre de origen griego “fito” (planta) son químicos en las plantas y son compuestos bioactivos que podemos encontrar tanto en frutos, vegetales y granos (54). Dando continuidad a estudios previos Balch y cols. describen en 1999 que hasta entonces ya se habían identificado por lo menos 5,000 tipos de fitonutrientes en el planeta pero se cree que aún hay más, actualmente se ha evidenciado que uno de sus beneficios que otorga el consumo de fitonutrientes es la disminución del estrés oxidativo que inducen los radicales libres en un individuo. Los humanos al respirar oxígeno, como parte del metabolismo diario pueden conllevar a la formación de radicales libres de oxígeno, y estos pueden dañar células y tejidos del cuerpo, debido a sus efectos se recomienda a la población en general consumir alimentos que contengan variedad de colores y así procurar el mayor consumo de fitoquímicos (55)

1.7.2 Polifenoles

El efecto protector que otorgan una gran variedad de alimentos ha sido atribuido a la presencia de fitoquímicos los cuales son compuestos bioactivos que ejercen acción antioxidante, entre los cuales se destacan los polifenoles, estos son productos secundarios del metabolismo de los vegetales, y forman un gran grupo de fitoquímicos (56). Se consideran compuestos fenólicos (polifenoles) aquellos en los cuales hay al menos un fenol unido a uno o más grupos hidroxilos (57). Pueden unir varias moléculas incluyendo glucósidos en distintas posiciones lo que da como resultado diversos tipos de polifenoles (56,58)

A los polifenoles en específico podemos encontrarlos mayormente en frutas y verduras, incluyendo las crucíferas. Estos compuestos son producto del ciclo shikimico de las plantas y tienen como finalidad otorgar protección a las mismas ante depredadores además de ser los responsables de brindarles su coloración. Se ha dado mayor importancia al estudio de los polifenoles encontrados en uvas, té y verduras crucíferas en su mayoría debido a la actividad antioxidante que muestran. Al ser consumidos por el ser humano no tienen actividad nutriente propiamente, sino que, dichos compuestos son metabolitos secundarios que promueven que la actividad metabólica de un individuo sea la adecuada para la homeostasis (55,59)

Se pueden encontrar clasificados en distintos metabolitos que se conocen como polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos principalmente (60,61).

dependiendo de la cantidad de anillos fenol que tienen, y también de acuerdo con su ruta biosintética. (Figura 5).

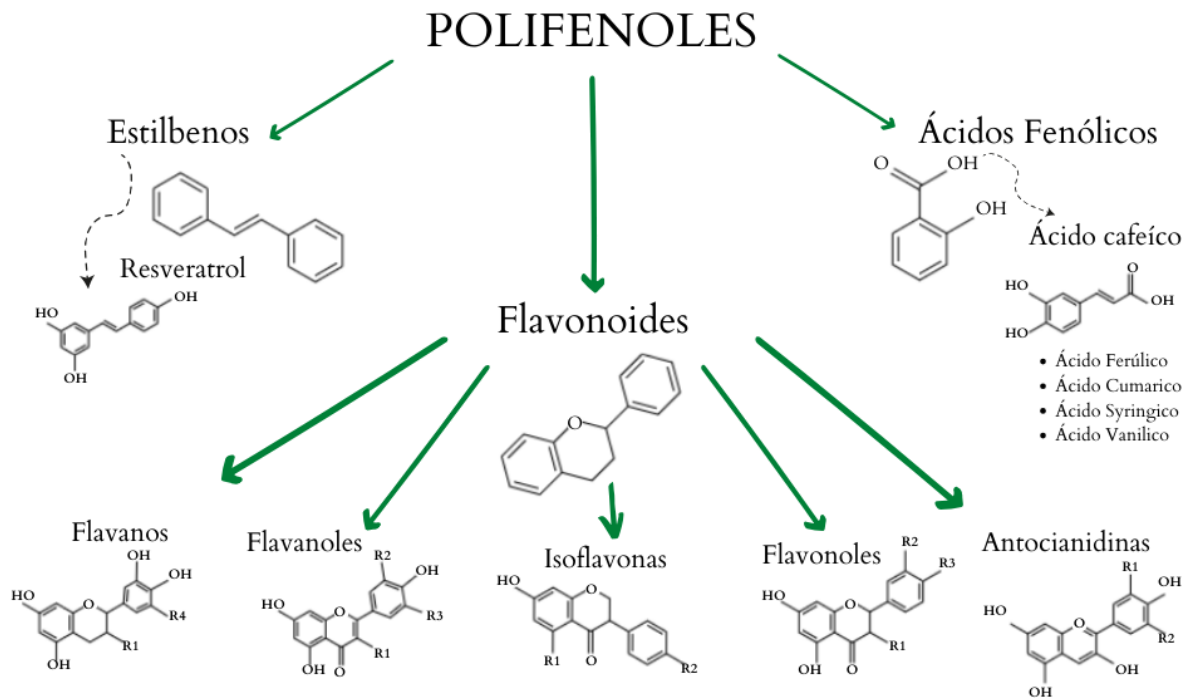


Figura 5. Diagrama de clasificación de polifenoles y sus estructuras (Villanueva M. 2023).

Tras diversos estudios se ha estimado que la recomendación de consumo de polifenoles para la población en general es de 0,9 g por día y así promover efectos en el organismo como reducción de enfermedades cardio vasculares (ECV) y diabetes mellitus tipo II (62).

De acuerdo con la comunidad científica las ECNT se consideran actualmente la mayor amenaza para la salud pública y se han vuelto un blanco para buscar estrategias de prevención y manejo nutricional, la evidencia nos dice que esta

problemática está estrechamente relacionada a alteraciones inflamatorias y metabólicas. Dentro de las recomendaciones a las cuales más acuden los profesionales de la salud que lidian con estas dificultades se encuentra el consumo de probióticos acompañados de prebióticos para aumentar su actividad en el organismo humano y contribuir en la modulación de la MI (55).

Hoy se considera a una nueva clase de prebióticos los cuáles se conocen como compuestos fenólicos, estos al ser consumidos se transforman en metabolitos secundarios por la MI y se ha observado que estimulan poblaciones de *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* principalmente en el tramo del colon, a expensa de bacterias que son altamente patógenas.

1.8 Técnica de microencapsulación por gelación iónica

La aplicación comercial de las microencapsulaciones tuvo su origen en 1930, el objetivo era retener sustancias bioactivas en una matriz para su protección ante condiciones ambientales, una microencapsulación consiste en crear una membrana semipermeable y esférica que rodee a un líquido o sólido (63)

Existen actualmente numerosas técnicas y materiales para elaborar microcápsulas en relación al material de pared, entre los más usados se encuentran el alginato de sodio, quitosano, gelatina y goma arábica, la mayoría con un mecanismo de liberación mecánico; para elegir el método de microencapsulación es importante verificar que la barrera no debe ser reactiva con el material a encapsular, esta debe

garantizar la máxima protección a la matriz interna y permitir su liberación por los mecanismos adecuados (64)

El alginato de sodio (AS) actualmente es uno de los ingredientes más empleados en la industria alimentaria para encapsular, la sal de sodio cuenta con alta solubilidad en agua fría y una especial transición solución-gel de forma instantánea cuando está en contacto con el ión calcio, lo anterior de acuerdo con Funami y *co/s.* en 2009. El AS es un biopolímero con excepcionales características para encapsular, dicho proceso es conocido como gelación iónica, el cual se diseñó para inmovilizar células bacterianas ya que no necesita temperaturas elevadas ni disolventes, para ello se han utilizado biopolímeros aniónicos para material pared (65). En este tipo de procesos destaca también el uso de la goma gelana bajo acilo (GBA) la cual se caracteriza por formar geles fuertes, pero en determinado momento se vuelve quebradiza, en contraste el AS es un polisacárido natural extraído de algas, principalmente *Laminaria hiperbórea*, también puede ser producida por *Pseudomona fluorescens* y *Pseudomonas putida* (66,67).

El método de gelación iónica está basado en interacciones entre hidrocoloides y se usa habitualmente para encapsular y así prevenir un posible daño de compuestos bioactivos presentes en alimentos, un ejemplo serían los jugos cítricos y así evitar su degradación por su corto tiempo de vida útil (68).

En la industria alimentaria se tiene el inconveniente con relación al tamaño, ya que representa una dificultad generar microcápsulas muy pequeñas por la viscosidad de los componentes, sin embargo, tratándose de bacterias probióticas resulta ser conveniente que sean de mayor tamaño ya que se ha observado que ese supuesto

inconveniente resulta dar mayor protección ante condiciones gástricas aumentando el tiempo necesario para degradarse, la evidencia dice que el tamaño ideal debería estar en un rango $>350 \mu\text{m}$ de diámetro dependiendo del microorganismo que albergara (66,69).

El AS está compuesto por ácido D-manurónico y L- gulurónico, es poco soluble en presencia de agua lo que le da su característica viscosa, el pH tiene influencia en las soluciones de alginato presentando inestabilidad por arriba de pH 10 (Fig. 6). El mecanismo de gelificación se lleva entre grupos carboxilos con valencias primarias y grupos hidroxilos, que actúan como un sitio de unión para iones de calcio, produciendo una estructura tridimensional (65) (Fig. 7).

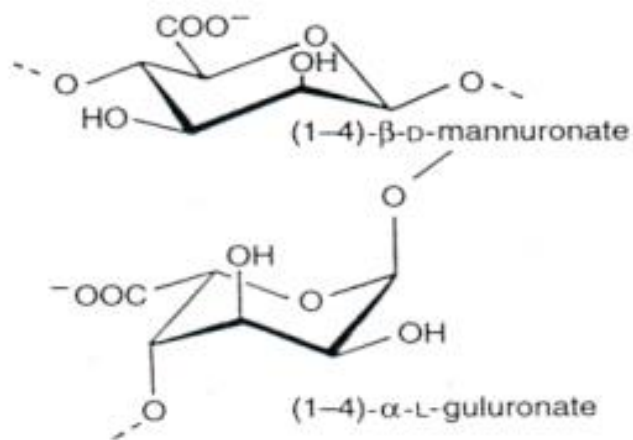


Figura 6. Estructura química del Alginato de Sódio (Cruz Pacheco, 2007).

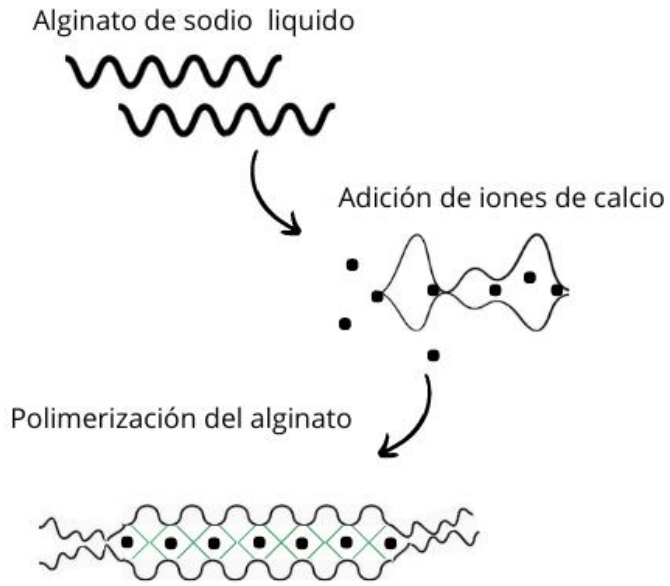


Figura 7. Esquema reacción de Alginato de Sodio en presencia de Cloruro de Calcio (Villanueva M. 2023).

2. JUSTIFICACIÓN

Recientes estudios han evidenciado que uno de los factores que predisponen el padecimiento de ECNT es un cambio en MI de los individuos, lo que pone de manifiesto el interés por conocer los mecanismos por los cuales se podría modular un cambio positivo en la MI. Se sabe que la dieta juega un papel importante para esta regulación un ejemplo de estos son los alimentos conocidos como probióticos y prebióticos debido a que influyen en la composición bacteriana del hospedero. Sin embargo, el tránsito de estos componentes por la vía digestiva es un factor determinante para dicha función. El consumo de *Lactobacillus spp.* como probiótico ha favorecido no solo para la modulación del equilibrio bacteriano en el tracto intestinal, cuando se combina con un prebiótico adecuado contribuye también al fortalecimiento del sistema inmune; la col conocida como kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) es un alimento funcional que otorga múltiples beneficios al ser consumido y cumple las pautas para ser tomado en cuenta como prebiótico. La implementación de técnicas tales como la gelación iónica se han caracterizado por favorecer la estabilidad de los compuestos inmovilizados, resistencia a condiciones gatrointestinales, viabilidad en condiciones de congelación y mayor vida de anaquel. En este sentido la implementación de microcapsulas mediante gelación ionica que generan la inmovilización de bacterias probióticas y compuestos prebióticos nos podría garatizar un efecto benefico en sitios especificos.

3. HIPÓTESIS

La microencapsulación por gelación iónica de kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) y *Lactobacillus spp* permitirá mantener las características estructurales del vehículo, lo que permitirá su posible uso como simbiótico.

4. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Diseñar una microcápsula por medio de gelación iónica a base de kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) y *Lactobacillus spp.* con un posible efecto simbiótico.

b. Objetivos específicos

1. Cuantificar el contenido de polifenoles totales de kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) comercial marca Euphoria mediante método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.
2. Elaborar microcapsulas mediante gelación iónica en presencia Kale liofilizado y *Lactobacillus sp.*
3. Evaluar mediante técnicas de microscopia la morfología de la superficie, estructura interior y soporte de las partículas inmovilizada de la microcápsula expuestas a diferentes temperaturas.
4. Determinación viabilidad de *Lactobacillus sp.* posterior al atrapamiento mediante gelación iónica

5. METODOLOGÍA

5.1 Material vegetal y obtención de extractos

Para el proyecto se utilizó col rizada (*Brassica oleracea var. sabellica*) orgánica en polvo marca comercial (Euphoria) en presentación de 200 g. Se llevaron a cabo dos tipos de tratamiento para obtener el extracto metanólico y extracto acuoso como se describen a continuación.

Para la obtención del extracto metanólico se utilizaron 25 g de kale en polvo, los cuales se extrajeron mediante maceración con metanol (MeOH) durante 2 horas a temperatura ambiente por triplicado. El disolvente fue eliminado mediante el uso de un rotaevaporador a presión reducida, al finalizar el proceso de rotaevaporación se adicionó al matraz 20 mL de MeOH agitando suavemente para desprender la muestra de las paredes, al resto del extracto no recuperado del matraz se le agregaron 10 ml de hexano. Ambas fases se dejaron evaporando a temperatura ambiente.

Las fases obtenidas de metanol y hexano se concentraron para llevar a cabo una extracción líquido - líquido agregando a cada extracto 20 ml de disolvente respectivamente para ser colocados a embudo de separación y colocar ambas fases nuevamente a rotaevaporador a presión reducida para obtener el rendimiento y posteriormente cuantificar los polifenoles totales siguiendo la metodología de Jurado y cols; 2016.

Con la finalidad de obtener muestras libres de metanol y hexano se procedió a realizar una segunda extracción a base de agua.

Para el extracto acuoso se prepararon 30 mL de solución al 1 % de kale en polvo de la marca comercial y se colocó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente (metodología modificada de Petigny y cols., 2014; Liu y cols., 2014,) una vez transcurrido el tiempo se filtró a vacío.

Posteriormente para ser liofilizados se colocaron 30 mL del extracto en frascos LABCONCO de 600mL y con ayuda de nitrógeno líquido se congelaron a -40 °C tratando de obtener una capa delgada y homogénea de extracto en la pared del frasco, a continuación los frascos fueron colocados en la liofilizadora LABCONCO® por un periodo de 5 horas aproximadamente.

5.1.2 Cuantificación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

Para determinar el rendimiento de los extracto metanólico, hexánico y acuoso, se utilizó el método colorimétrico Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología de Jurado y cols., 2016 misma que esta basada en Singleton y cols; 1999.

5.1.3 Preparación de la solución.

El reactivo Folin-Ciocalteu de Sigma-Aldrich fué preparado en una dilución 1:2 con agua destilada, se colocó en un frasco color ambar protegiendolo de la luz, enseguida se preparó una solución de bicarbonato de sodio al 7,5% adicionando 1.5 g de NaHCO₃ a 20 mL de agua destilada.

Para elaborar la curva de calibración se utilizó como control el ácido gálico Sigma – Aldrich a partir de una solución stock de 1 mg/mL y se realizaron diluciones en serie de 100, 75, 50, 25, 10 y 5 μg /mL.

5.1.4 Desarrollo de la cuantificación por el método Folin-Ciocalteu

Para determinar la cantidad de polifenoles se siguió la metodología descrita por Jurado y cols. 2016.

De los extractos obtenidos (metanólico, hexánico y acuoso) en un vial ámbar se adicionaron 300 μL de cada dilución más 225 μL del reactivo Folin Ciocalteu 1 N (diluido 1:2 con H₂O) y se dejó reposar durante 5 minutos, luego se agregaron 225 μL de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 20% y 900 μL de H₂O, se homogenizó cada vial y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Por último se adicionaron 200 μL de cada muestra en una placa de 96 pozos y se leyó a λ 760 nm en un equipo de lector de placas Multiskan. Adicionalmente se usó agua como control negativo.

Para el análisis estadístico se determinó la ecuación de la recta de la curva de calibración del ácido gálico, por interpolación se determinaron valores de las muestras, expresado en mg de ácido gálico/ 100 g de extracto (mg E.A.G./100g E.)

5.2 Estandarización de la Técnica de inmovilización por gelación iónica

Para el diseño de las cápsulas mediante la técnica de gelación iónica, se prepararon distintas concentraciones de Alginato de Sodio marca Cosmopolita (1.3%, 1.5% y 2%) disueltos en 10 mL de agua destilada. Posteriormente se realizó una solución de cloruro de calcio al 5% en un volumen final de 200ml. La mezcla de alginato de sodio se dejó caer por goteo mediante el uso de una bomba peristáltica de la marca INTELLAB sobre la solución cloruro de calcio a temperatura ambiente.

Una vez formadas las microcápsulas se eliminó el exceso de cloruro de calcio mediante lavados con agua destilada.

5.3 Evaluación de la estabilidad de las microcápsulas en distintas condiciones de temperatura.

Posteriormente para determinar la resistencia de las microcápsulas (superficie e interior) estas fueron almacenadas bajo diferentes condiciones de temperatura (Temperatura ambiente, refrigeración, congelación), durante 15 días. Transcurrido el tiempo de las microcápsulas de tratamiento. se realizaron evaluaciones mediante técnicas de microscopía óptica, de barrido ambiental y confocal laser.

5.4 Inmovilización de extracto de kale mediante la técnica de gelación iónica

Para determinar la capacidad de soporte de moléculas dentro del interior de la microcapsula, se diseñaron microcápsulas en presencia de distintas concentraciones de Kale, orgánico comercial en presencia de AS, siguiendo la metodología previamente descrita para la elaboración de microcápsulas.

5.5 Activación de consorcio de bacterias probióticas (*Lactobacillus lactis delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*)

Para la activación de las cepas del consorcio de bacterias probióticas usadas típicamente para la elaboración de yoghurt marca ALCATRAZ, se agregaron 500 µg de consorcio liofilizado en leche orgánica y se incubó durante 24h a 37°C en en atmósfera microaerófila (5% de O₂) en un contenedor de anaerobiosis marca MERK. Para generar las condiciones de anaerobiosis se utilizó un sobre de GasPak- Merk, posteriormente la biomasa obtenida de las bacterias probióticas previamente activadas se resembró en medio líquido MRS (Man, Rogosa and Sharp) e incubó bajo las condiciones antes descritas por 24 horas. Una vez obtenida la biomasa se almacenó en condiciones de refrigeración (4°C) hasta su uso.

5.5.1 Determinación de características morfológicas y bioquímicas de bacterias probióticas

Para confirmar la presencia de (*Lactobacillus lactis delbruecki*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) de la biomasa obtenida anteriormente se llevó a cabo la prueba bioquímica de catalasa mediante la adición de peróxido de hidrógeno sobre la muestra bacteriana de la biomasa obtenida. A continuación se llevo a cabo la evaluación de características morfológicas mediante tinción de Gram siguiendo el protocolo descrito por Hans Christian Gram (1884). La observación de las bacterias se realizó mediante microscopía óptica a 100X.

5.6 Cinética de crecimiento de bacterias probióticas en presencia de polifenoles totales de extracto acuoso de Kale comercial

Para determinar el efecto prebiótico de los polifenoles totales del kale obtenido de la muestra de Kale comercial, se llevó a cabo una cinética de crecimiento.

Se prepararon en tubos soluciones de caldo MRS con distintas concentraciones de extracto acuoso de Kale (0.2%, 0.4% y 0.6%), posteriormente se adicionaron 500 µL de cepas del consorcio de bacterias previamente activadas y se dejó incubar durante 24h a 48h. Se consideraron como controles negativos caldo MRS, caldo MRS con BAL y caldo MRS con las concentraciones de extracto de kale previamente descritas.

Posteriormente se tomaron 200 μ L de cada muestras cada dos horas a partir del tiempo 0 hasta las 48h y se colocaron en placas de 96 pozos para su lectura a 620nm.

5.7 Microencapsulación de bacterias probióticas en presencia de kale

Una vez obtenida la estabilidad de la microcápsula en presencia de kale, se prosiguió a realizar el atrapamiento del consorcio probiótico.

Para determinar la capacidad de microencapsulación de bacterias probióticas en presencia de kale, se siguió la metodología antes mencionada en el proceso de microencapsulación, adicionando a la mezcla 1mL de bacterias probióticas, kale al 1% y alginato al 1.3%. La solución se mantuvo en agitación brevemente en un agitador magnetico marca BIOSAN para asegurar su homogeneidad, enseguida se retiró del agitador magnetico y se dejó caer por goteo con ayuda de una bomba peristáltica marca INTELLAB sobre una solución de cloruro de calcio al 5% (previamente estandarizada), las microcápsulas recuperadas se separaron en 4 lotes, se colocaron en recipientes esteriles y se procedió a almacenar en diferentes condiciones durante 15 días a temperatura ambiente, refrigeración y congelación respectivamente. Adicionalmente se separa un último lote para procesarlo en condiciones de deshidratación.

5.8 Evaluación morfológica de la microcápsulas mediante microscopia óptica, de barrido ambiental y confocal laser

Para evaluar la formación de las microcápsulas en distintas concentraciones de AS se utilizó microscopio invertido modelo DMI8 Leica con objetivo 10X y 40X, y así comprobar que porcentaje de AS otorgaba mayor estabilidad.

Posteriormente se evaluó la estructura superficial y estabilidad interna de las microcapsulas en presencia de Kale. Posteriormente se evaluó el atrapamiento y viabilidad de las bacterias probióticas.

Una vez evaluada la morfología de las microcápsulas compuestas con Kale y el consorcio bacteriano se prosiguió al análisis estructural en diferentes condiciones a las que se sometieron las microcapsulas (recién elaboración, refrigeración y congelación) mediante microscopía óptica con un Estereomicroscopio Olympus MVX10 con objetivo 1X, iluminación tipo luz blanca y acoplado a cámara Olympus XM10 CCD. Para llevar a cabo la microscopía electrónica la cual tiene como objetivo ver a detalle la estructura de la muestra sin necesidad de aplicar tratamientos que podrían alterar o dañar el objeto de estudio, se colocaron las muestras en stubs de aluminio con cinta conductora de carbono de doble cara y fueron observadas directamente bajo un Microscopio electrónico de barrido ambiental (Carl Zeiss, EVO LS10, Alemania) con un voltaje de aceleración de 15 kV y una presión de 70 Pa. Se utilizó un detector de electrones retrodispersados (NTS BSD), las imágenes se obtuvieron en escala de grises y se almacenaron en formato TIFF con una resolución de 1024 x 768 píxeles. De igual forma, y para identificar los componentes

de las microcápsulas gracias a la fluorescencia que emiten, cada muestra se montó en portaobjetos de vidrio y se observó mediante un CLSM (Carl Zeiss, LSM800, Alemania) acoplado a una AxioCam HD color (Carl Zeiss, Modelo 305, Alemania). Se utilizó el software ZEN (Zeiss efficient navigation) versión 2.6 Blue edition. Se adquirieron las micrografías con objetivo apocromático de 5X y 20X, apertura numérica de 0.8 y 1.3 respectivamente, todas se almacenaron en formato TIFF con una resolución de 2048 x 2048 píxeles, por último se colocaron sobre portaobjetos de vidrio y se observaron mediante un CLSM (Carl Zeiss, LSM800, Alemania) con platina motorizada (X,Y,Z). Se utilizó el software ZEN (Zeiss efficient navigation) versión 2.6 Blue edition. Se adquirieron las micrografías con objetivo apocromático de 20 X, apertura numérica de 0.8 (valor adimensional), se utilizó la herramienta “lambda mode” para identificar autofluorescencia en las muestras para lo cual se emplearon los láseres de estado sólido a 488 (verde) y 640 nm (rojo) a 5 % de excitación y un pinhole de 0.8 AU (Airy unit). Para la prueba de viabilidad se utilizaron como contratincciones Naranja de Acridina y Yoduro de Propidio III.

5.9 Evaluación de la viabilidad del consorcio probiótico microencapsulado

Para evaluar la viabilidad de *Lactobacillus spp.* posterior al atrapamiento las microcapsulas se matuvieron en refrigeración (4°C, -18°C) durante 15 días, A continuación se sometieron a una prueba de fermentación en leche y medio MRS. Se colocaron 20 mL de leche y 20 mL de medio MRS a los cuales se le incorporarán 15-20 microcápsulas, se dejarán en refrigeración por 48hrs y posteriormente se

evaluó el cambio de pH en cada tratamiento para determinar el proceso de fermentación, así mismo se analizaron las características organolépticas de la leche.

Posterior al a la refrigeración las microcapsulas fueron evaluadas mediante microscopía electrónica confocal laser bajo la metodología descrita con anterioridad para microscopio confocal añadiendo la aplicación de 2 contrastaciones; Naranja de acridina la cual tiene afinidad para unirse al material genético de organismos vivos tornandose verde y Yoduro de Propidio III quien se une al núcleo celular de organismos no vivos emitiendo color naranja o rojo.

5.10 Deshidratación de microcápsulas candidatas a simbiótico (Bacterias probióticas y Kale comercial)

Para determinar la resistencia o cambios estructurales las microcápsulas bajo condiciones de deshidratación, se realizó a las capsulas previamente evaluadas un proceso de secado mediante secado en lecho fluidizado. Para llevar a cabo la deshidratación se construyó un secador cuyo diagrama se muestra en la figura 8. Se colocaron 20 cápsulas húmedas en el secador y se hizo pasar una corriente de aire a temperatura ambiente. La velocidad de flujo de aire se mantuvo constante durante cuatro minutos y se dio reposo de 1 minuto, se repitió el proceso hasta alcanzar el tamaño deseado, el tiempo de secado fue de 2 h aproximadamente para el lote de cápsulas.

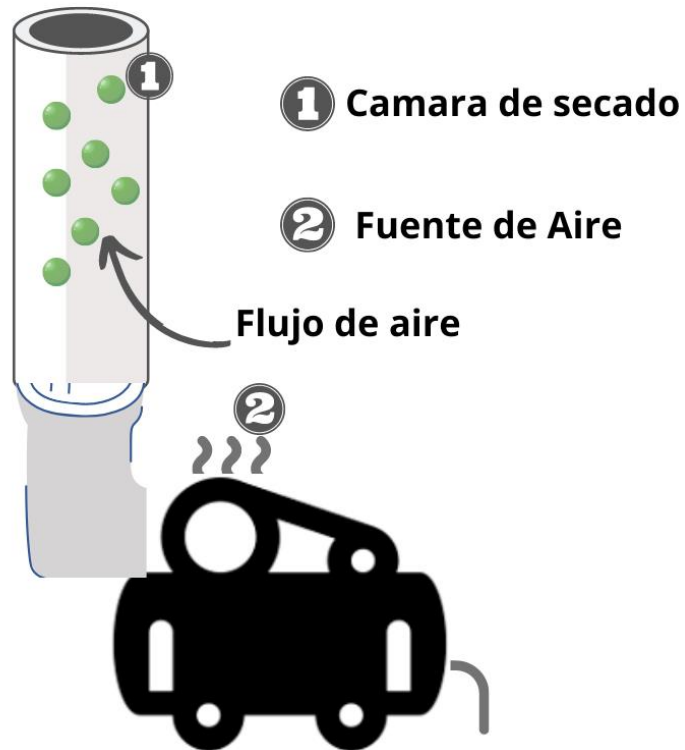
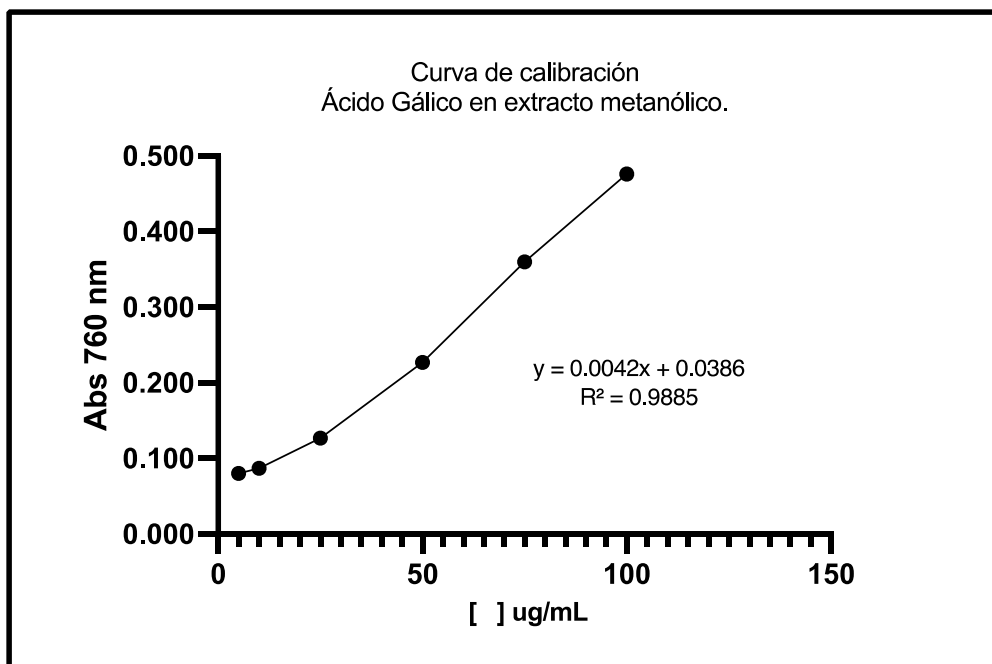


Figura 8. Esquema del deshidratador.
(Villanueva M. 2023).

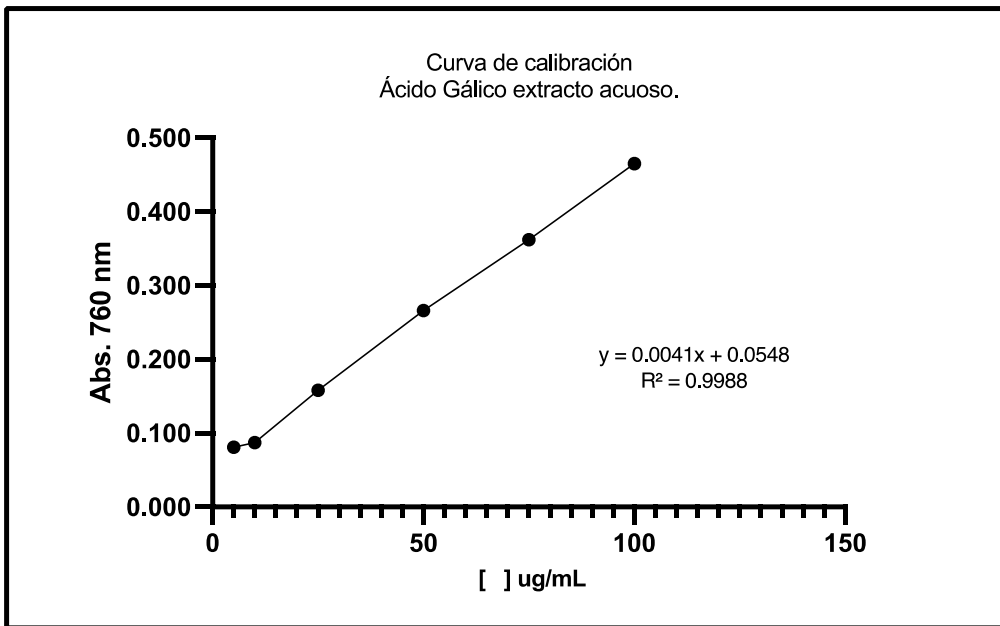
6. RESULTADOS

6.1 Curvas de calibración de Ácido Gálico para cuantificación de polifenoles

Los resultados obtenidos para la determinación de polifenoles totales mostraron una R^2 de 0.98, y la ecuación de la recta $y=0.0042x + 0.0386$ (Gráfica 1) para el extracto metanólico y una R^2 de 0.99, y la ecuación de la recta $y=0.0041x + 0.0548$ (Gráfica 2) para el extracto acuoso, otorgando en ambas un nivel de confiabilidad aceptable.



Gráfica 1. Curva de calibración del A.G. en MeOH.



Gráfica 2. Curva de calibración del A.G en H₂O.

6.2 Cuantificación de polifenoles totales en Kale

Los resultados obtenidos demostrarán que en cada 100 g de extracto metanólico de kale comercial hay un contenido de 1224 mg de polifenoles totales.

En el extracto acuoso de kale se calculó que cada 100 g de extracto de kale comercial contiene 870 mg de polifenoles totales. (Tabla 4).

Contenido de polifenóles totales en extracto metanólico y extracto acuoso de Kale comercial.

Muestra	Absorbancia Promedio	Concentracion AG ($\mu\text{g/ml}$)	Concentracion AG (10 mg/ml)	Contenido de polifenoles (mg Eq AG/100g)	Desviacion S
KC-MeOH	0.4356	94.52	0.095	950	± 0.036
KC-Hex	0.154	27.48	0.027	274	± 0.030
				1224	
KC-H2O	0.3865	80.90	0.081	810	± 0.071

Tabla 4. Polifenoles totales del extracto metanólico y acuoso de kale marca Euphoria.

6.3 Morfología de la microcápsula

En la figura 9 se observa una esfera uniforme, con barrera externa libre de poros sin endiduras o daños aparentes, lo que permite demostrar que la concentración de Alginato (1.3 %) presente en la microcapsula es la concentración idonea para la generación de la esfera.

En la figura 10 se muestra la eficacia del atrapamiento de las partículas de kale, en la microcapsula al 1.3% de Alginato, las flechas azules señalan la pared estable y sin daños aparentes, así como el liofilizado encapsulado.

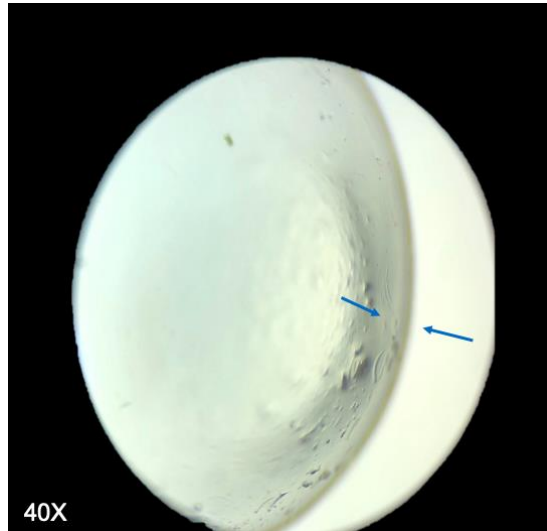


Figura 9. Morfología de Microcapulas de alginato de sodio al 1.3% microscopía óptica 40x. Las flechas indican la formación de la barrera externa.

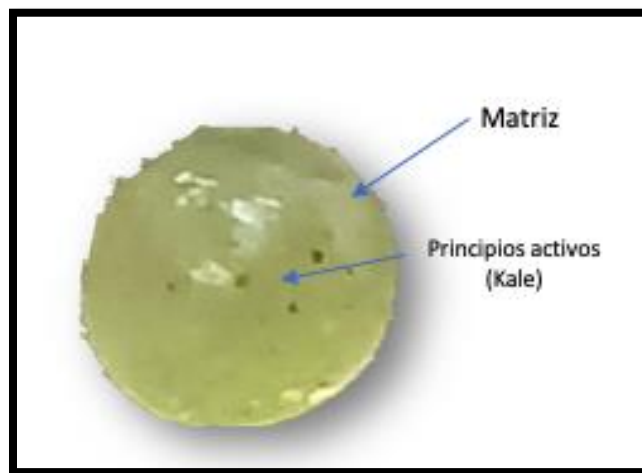


Figura 10. Morfología de Microcapulas de alginato de sodio al 1.3% y Kale al 1%. Microscopía optica 10x. Las flechas indican la posición de los componentes que conforman la estructura.

Las microcápsulas se dividieron en 3 lotes para ser evaluadas en condiciones ambientales (recien elaboradas, refrigeración 4°C y congelación -18°C por 15 días).

La microscopia óptica demostró la formación de una barrera definida y estable en las microcápsulas recién elaboradas como se observa en Fig.11A; La barrera esta constituida por una doble capa de alginato, permitiendo el recubrimiento de las moleculas atrapadas. En la fig. 11B se observan el interior de la microcápsula de recién elaboración y se identifica la presencia de particulas de kale liofilizado (señaladas mediante un circulo azul). Por otro lado las microcápsulas posterior a 15 días en refrigeración fig. 11C , mantuvieron la barrera y como se observa en la fig. 11D se mantiene la protección de la matriz interna de la microcápsula, protegiendo las particulas de kale liofilizado, Sin embargo se logra observar la presencia de algunos daños en la pared de la capsula, esto se debe posiblemente a el agua que se utilizad para la elaboración de la micropacsula, la cual esta sometida a temperatura de refrigeración. En la fig.11E se observó que la microcápsula posterior a 15 dias en congelación logró mantener la barrera de alginato de sodio y en su interior fig. 11F se aprecia la presencia de restos de kale liofilizado (circulo azul), Así mismo se logra observar la presencia de cristales de agua que se produjeron durante el proceso de congelación (circulo rojo) .

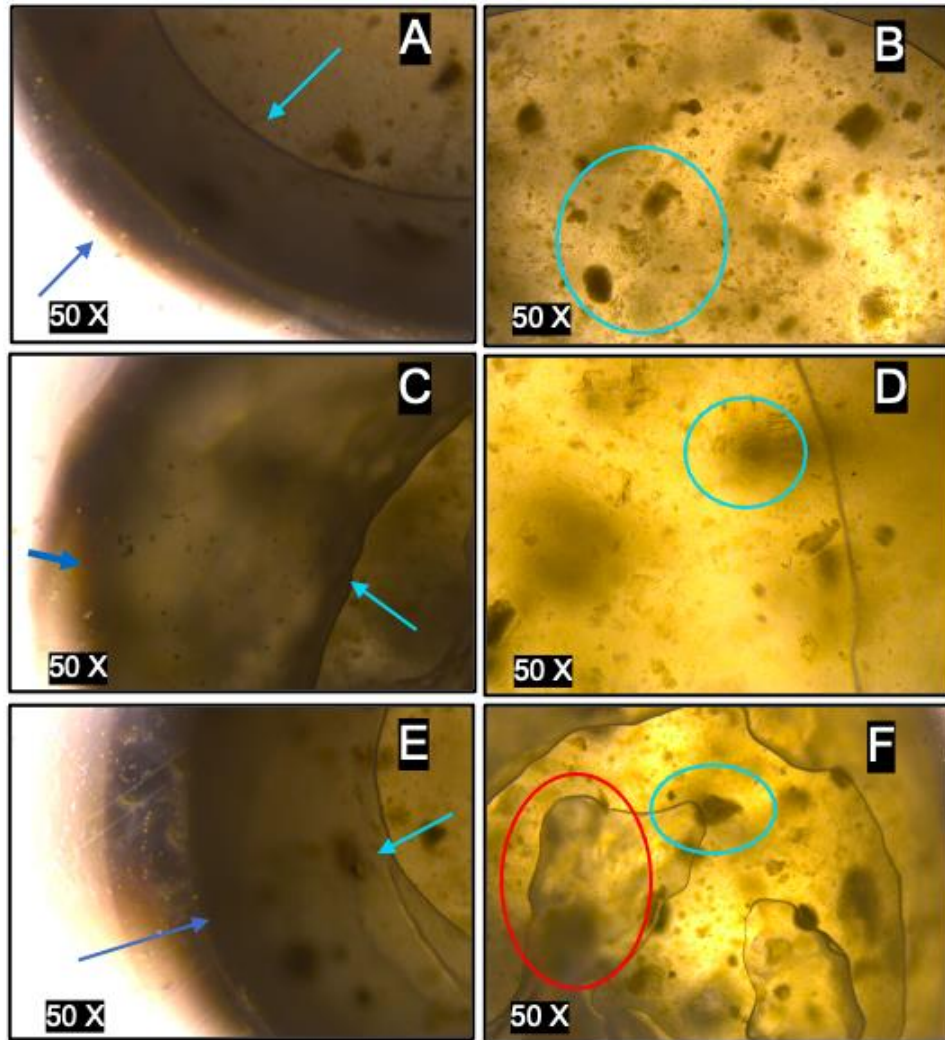


Fig. 11 Microcápsulas sometidas a distintas temperaturas. A) Microcápsulas evaluadas posterior a su elaboración, se observa la formación de una barrera estable y sin daños. B) presencia de restos de Kale en el interior del vehículo recién elaborado. C) microcápsulas posterior a 15 días de refrigeración, se observa la persistencia de la barrera externa sin daños. D) Interior de vehículo posterior a 15 días en refrigeración donde se observa la permanencia del kale en el interior de la matriz. E) microcápsula luego de 15 días en congelación, hubo resistencia de la pared externa sin fisuras. F) se aprecia la presencia de Kale y cristales en el interior de la microcápsula sometida a periodo de congelación.

6.4 Identificación bioquímica de consorcio probiótico (Tinción de Gram)

La figura 12 muestra la presencia de bastones (flecha negra) y cadenas de coco (flecha roja) Gram positivos, características de *Lactobacillus lactis delbruecki*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que corresponden al consorcio de bacteriano.

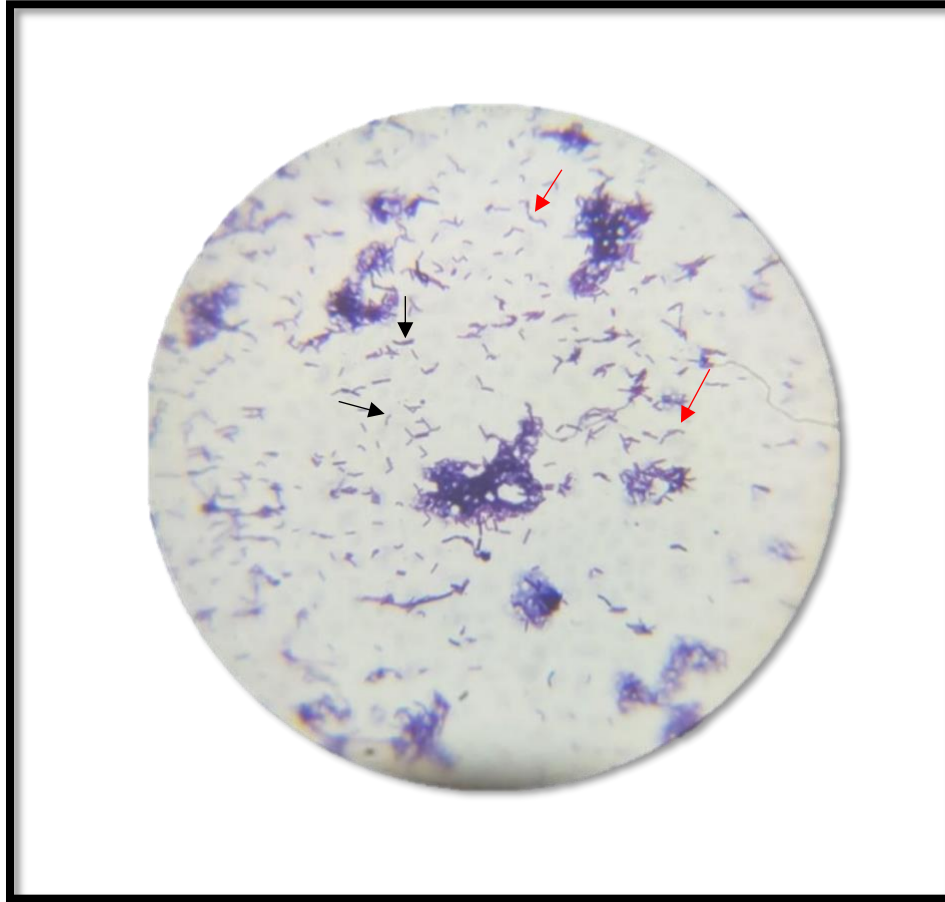


Fig 12. Evaluación morfológica y bioquímica de bacterias probióticas.

6.5 Cinética de crecimiento del consorcio de bacterias probióticas utilizadas en microencapsulación

Con los datos obtenidos de la lectura a 620nm se realizó el análisis estadístico de varianza ANOVA con prueba de Tukey en el programa INFOSTAT. El kale comercial al 0.4% promueve el crecimiento bacteriano a partir de las 2h de incubación, y este se mantiene hasta las 48h con respecto a los controles en Medio MRS y Medio MRS adicionado con bacterias probióticas. Demostrando el efecto prebiótico de los

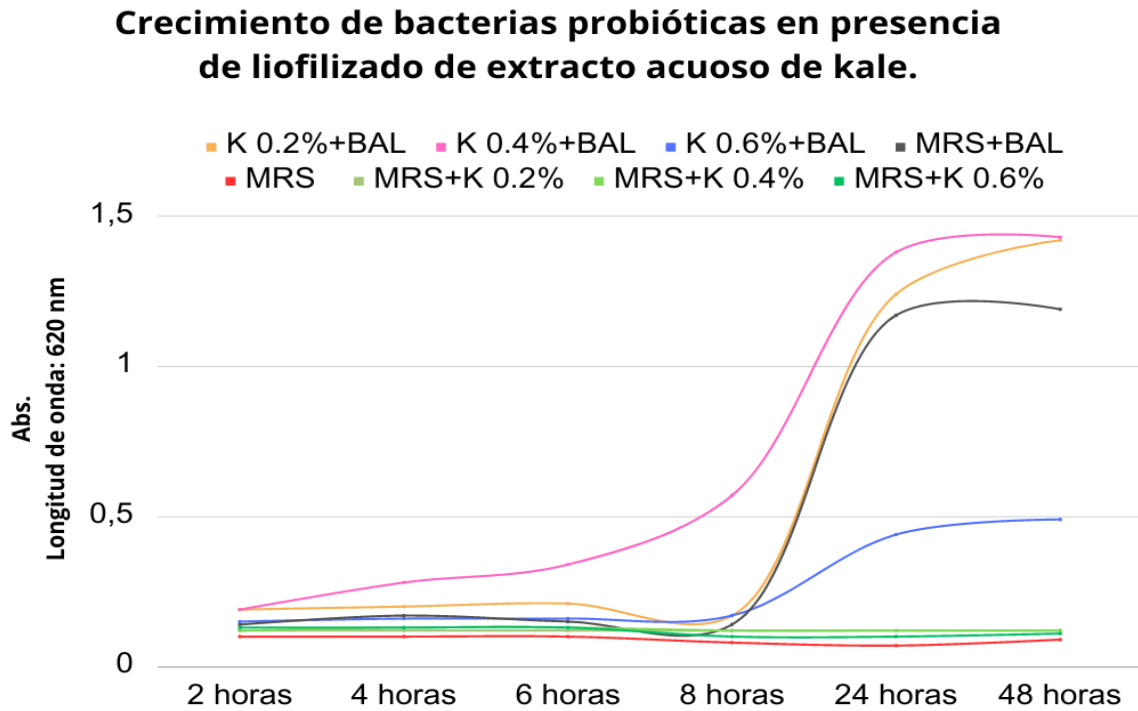
componentes del liofilizado comercial sobre las bacterias probióticas presentes en el consorcio. En la tabla 5 se observa el analisis estadistico en donde se resalta en color gris los resultados estadisticamente significativos de la hora 6 donde se observa que el tratamiento al 0.4% es mas efectivo para la inducción del crecimiento de las bacterias probióticas con respecto a los otros tratamientos, mismo efecto se logra observar en la hora 8.

Crecimiento de bacterias probióticas durante 48 horas en presencia de MRS y kale comercial en distintas concentraciones y cinco controles.

Muestra / Tiempo	2 hrs	4hrs	6 hrs	8 hrs	24 hrs	48 hrs
Control 1 MRS	0.10 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.03 ^a	0.08 ± 0.0012 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.0023 ^a
Control 2 MRS + BAL	0.14 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.04 ^a	0.15 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.03 ^a	1.17 ± 0.05 ^b	1.19 ± 0.09 ^b
Control 3 MRS + Kale 2%	0.12 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.03 ^a
Control 4 MRS + Kale 4%	0.12 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.01 ^a
Control 5 MRS + Kale 6%	0.13 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.00058 ^a
MRS + KALE 0.2% + BAL	0.19 ± 0.06 ^a	0.20 ± 0.04 ^a	0.21 ± 0.08 ^a	0.17 ± 0.02 ^a	1.24 ± 0.06 ^b	1.42 ± 0.06 ^C
MRS + KALE 0.4% + BAL	0.19 ± 0.06 ^a	0.28 ± 0.07 ^a	0.34 ± 0.06 ^{ab}	0.57 ± 0.25 ^b	1.38 ± 0.11 ^C	1.43 ± 0.06 ^C
MRS + KALE 0.6% + BAL	0.15 ± 0.0028 ^a	0.16 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.01 ^a	0.44 ± 0.12 ^b	0.49 ± 0.1 ^b

Tabla 5. Analisis estadistico de cinética de crecimiento.

En la siguiente gráfica se muestra el crecimiento temprano y mas duradero con la concentración 0.4% de liofilizado de extracto acuoso de kale.



Gráfica. 3. Crecimiento de consorcio bacteriano en presencia de liofilizado de extracto acuoso de kale.

6.6 Evaluación morfológica de microcápsulas adicionadas con Kale y bacterias probióticas

En la fig13C se observa la presencia de bacterias probióticas posterior al trapamiento, las flechas azules señalan estructuras bacilares en el interior de la microcápsula, corroborando nuevamente que la concentración usada de alginato de sodio (1.3%) cuenta con la capacidad de atrapar en su interior estos microorganismos para su protección.

6.6.1 Tamaño promedio de microcápsulas adicionadas con Kale y bacterias probióticas de acuerdo con las condiciones ambientales temperatura

Posterior a los tratamientos se observaron cambios en la estructura de las microcápsulas que estuvieron expuestas a diferentes temperaturas, principalmente el efecto que se observó es en el tamaño de la microcápsula. Mediante el programa "ImageJ" se determinaron los siguientes tamaños; microcápsulas recién elaboradas 4.19mm Ø, microcápsulas refrigeradas durante 15 días 4.37mm Ø, microcápsulas congeladas durante 15 días 4.70mm Ø y microcápsulas deshidratadas disminuyeron en más de 40% su diámetro promedio el cual fue de 2.17mm. En la tabla 6 se presentan los datos con desviación estándar para determinar los promedios de diámetro antes mencionados.

Tamaño de Cápsulas a base de AS, Kale y Bal en diferentes condiciones de temperatura.

Cápsulas	Diámetro de Feret (mm)	DS
Recien elaborada	4.19 ±	0.38
Refrigerada	4.37 ±	0.25
Congelada	4.70 ±	0.45
Seca	2.17 ±	0.19

Datos incluyen media ± la D.E

Tabla 6. Tamaño de microcápsulas sometidas a distintas condiciones ambientales.

6.6.2 Evaluación morfológica de microcápsula adicionadas con Kale y bacterias probióticas recién elaboradas

Posterior a la elaboración de las microcápsulas se lograron obtener microcapsulas de tamaño promedio de 4.19 mm (tabla 6), resultado obtenido mediante el programa “ImageJ”.

Como se observa en la fig 13A las microcapsulas recién elaboradas presentaron una estructura esferica sin daños aparentes en los bordes. En la fig 13B se aprecia el tamaño de 3.88mm de la microcapsula, así como la extructura en forma esférica sin fisuras ni poros en la superficie. La fig 13C demuestra en un corte transversal la presencia del consorcio bacteriano identificado mediante flechas azules, las características de las bacterias probióticas son similares a las reportadas por *Hernández et. al, Zapata y cols. 2019.*

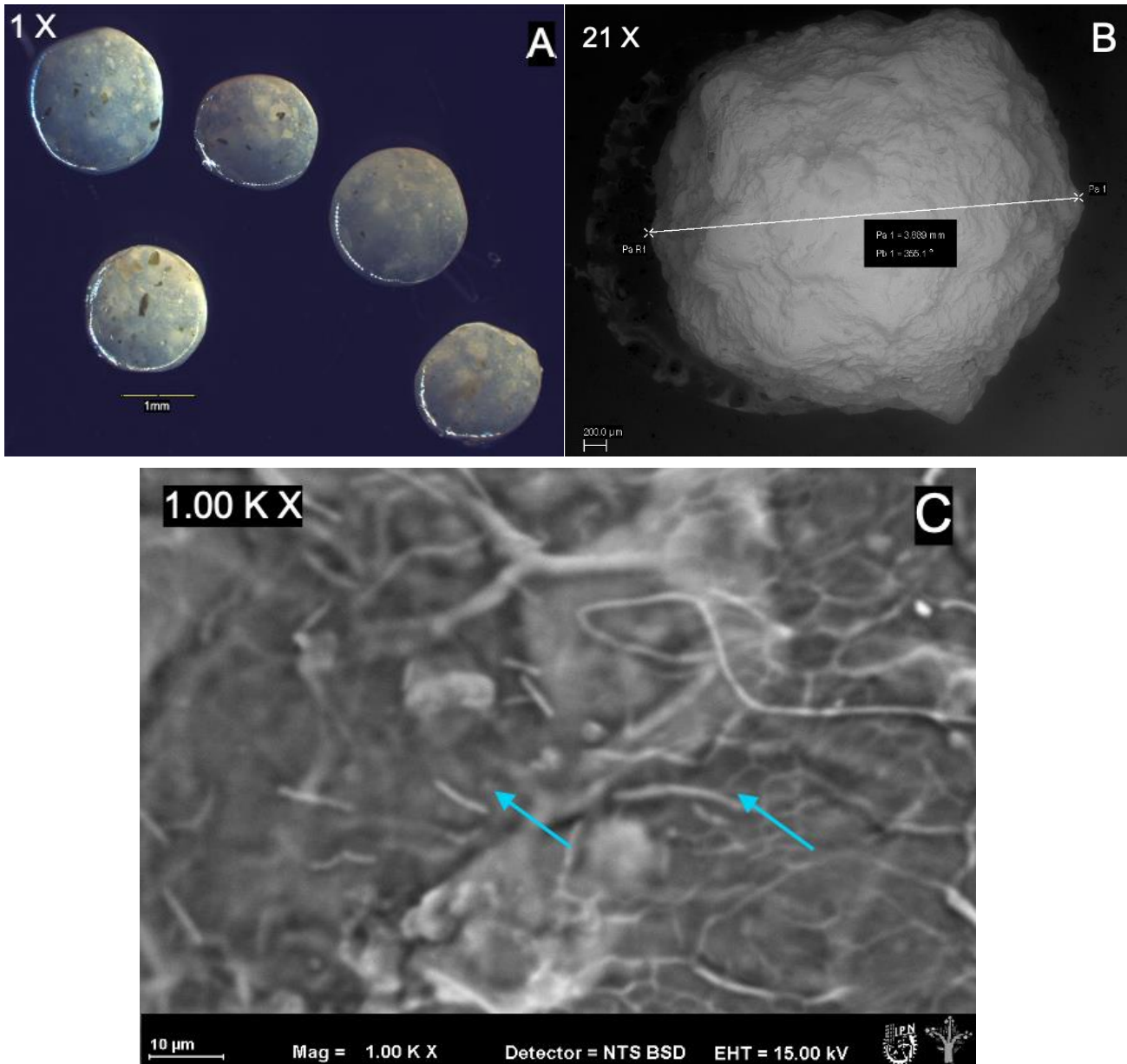


Fig.13 (A) Microscopía obtenida en estereomicroscopio con objetivo 1X de microcápsula compuesta de AS al 1.3%, Kale 1% y consorcio de *Lactobacillus* recién elaboradas donde se muestra forma estable, esférica, con superficie lisa, sin fisuras ni fugas aparentes, (B) Microscopía de barrido ambiental donde se observa estructura de forma esférica de 3.88 mm de diámetro con pequeños bordes sin fisuras ni daño aparente (C) se observa el interior de la microcápsula a escala de 10μm con objetivo 1.00 K X donde se señala con flecha la presencia de bacterias con características prebióticas *Hernandez et. al, Zapata y cols. 2019.*

6.6.3 Evaluación morfología de microcápsula adicionadas con Kale y bacterias probióticas posterior a 15 días en refrigeración

El tamaño promedio obtenido posterior a los 15 días en refrigeración fue de 4.37mm (tabla 6) resultado obtenido con ImageJ, en la fig. 14A se observa microscopía óptica con objetivo de 1X donde se aprecia que permaneció la forma esférica del vehículo, no se observan hendiduras ni rugosidades, en la fig 14B se muestra imagen de microscopía de barrido ambiental con objetivo de 21X en donde se observa la estructura externa detallada de la microcápsula de forma esférica con ligeras rugosidades, sin fisuras en superficie, el tamaño de la microcápsula es de 3.88mm, en la fig 14C se observa microscopía de barrido ambiental del interior de la microcápsula a 10 μm con objetivo 1.00KX donde se señala que continua la presencia de microorganismos observados en vehículos recién elaborados, en la fig 14D se aprecia por microscopía confocal en escala de 500 μm la auto fluorescencia que emiten los componentes de la microcápsula, en mayor cantidad el componente que fluoresce en verde, el cual, con base en lo reportado por *AS Zhu y cols. 2023* , *Gómez–Mascaraque y cols 2023* se considera se trata de alginato de sodio, de igual forma se observa presencia del segundo componente que fluoresce en rojo (flecha) el cual podría tratarse de compuestos fenólicos de acuerdo con lo reportado por *Espinosa- Velázquez y cols 2016*.

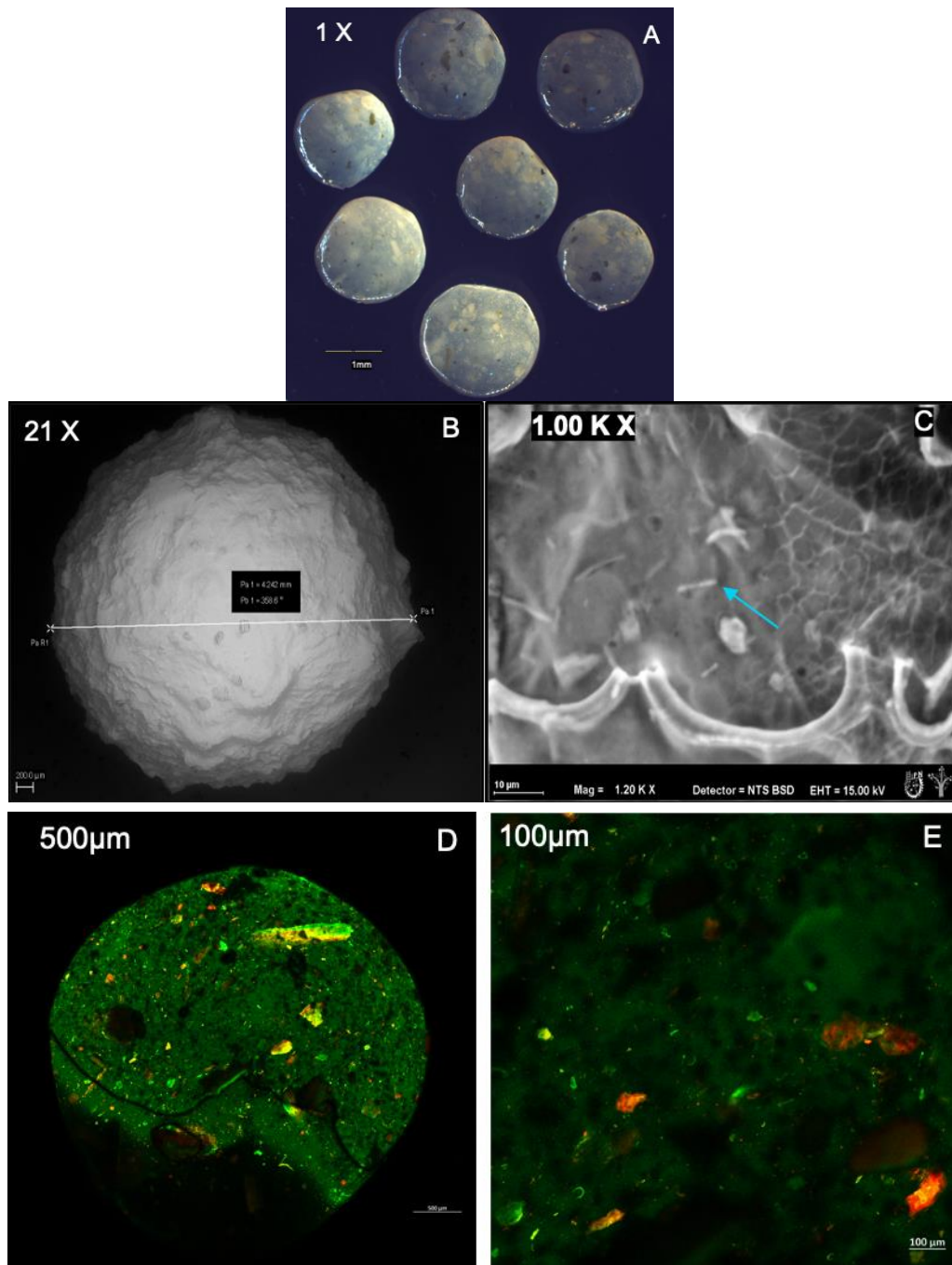
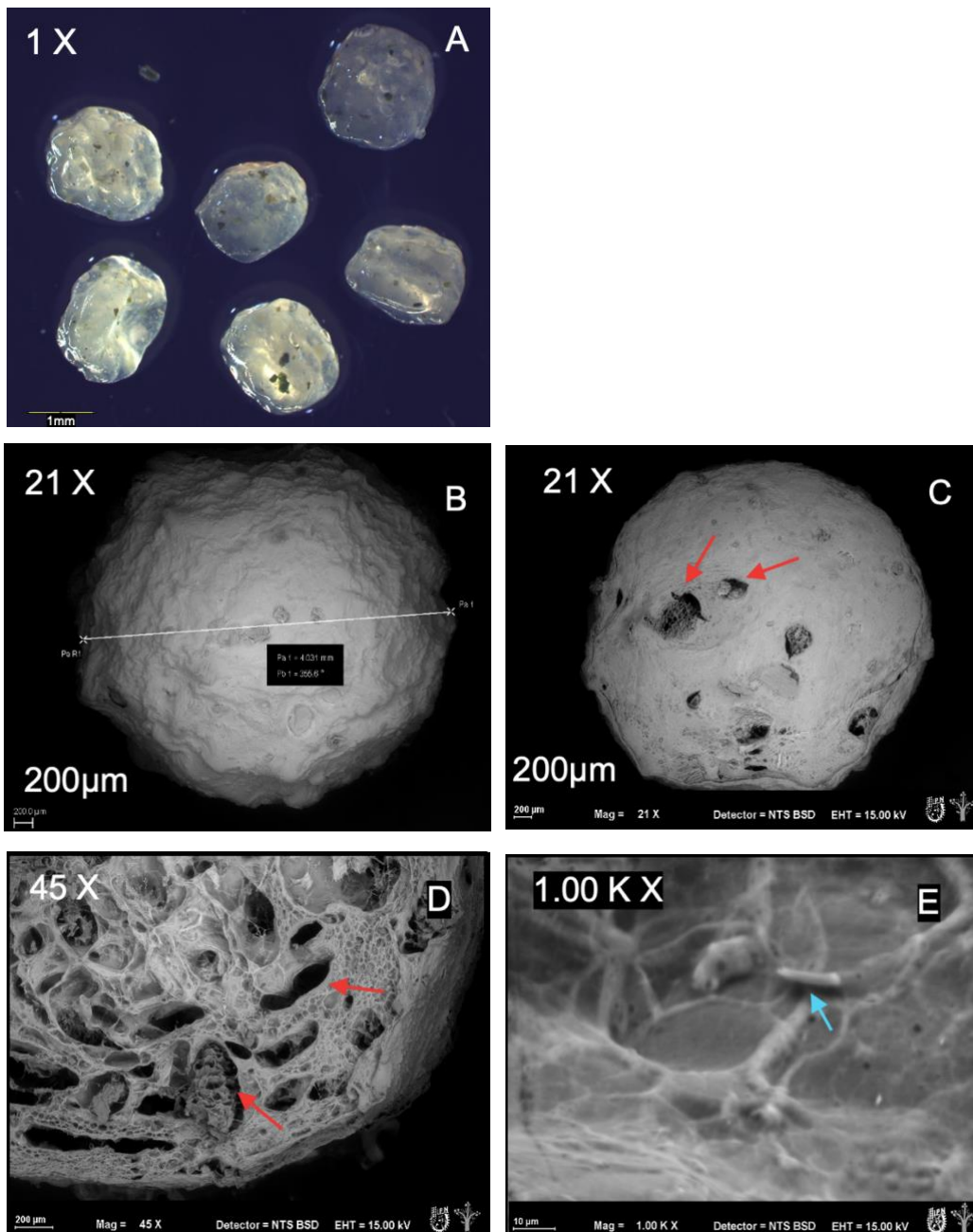


Fig. 14 (A) Microscopía obtenida en estereomicroscopio con objetivo 1X de microcápsula de AS al 1.3%, Kale 1% y consorcio de *Lactobacillus* refrigeradas la cual mantiene superficie esférica lisa y sin daño, (B) Microscopía de barrido ambiental donde se observa estructura con diámetro de 4.24mm de forma esférica con pequeños bordes manteniéndose sin fisuras, (C) se observa el interior de la microcápsula a escala de 10μm y objetivo de 1.00 K X, se señala con flecha la presencia de bacterias (D) microscopía confocal donde se aprecia por autofluorescencia la abundancia del componente AS (verde) **Zhu et.al. 2023, Gomez–Mascaraque et. Al 2023** formando una cubierta (E) componentes de microcápsula en escala de 100μm donde se distingue la presencia de un segundo componente (rojo) el cual se puede inferir como compuestos fenólicos **Garcia y cols 2022, Khatib y cols. 2021**

6.6.4 Evaluación morfológica de microcápsula adicionadas con Kale y bacterias probióticas posterior a 15 días en congelación

Las microcápsulas que se mantuvieron 15 días en congelación mostraron un tamaño promedio de 4.70mm (tabla 6), en la (fig. 15A) se observa microscopía óptica que muestra aparición de hendiduras y pérdida de la forma esférica, hubo pérdida de liquido, lo que les da apariencia un poco rugosa, en la (fig. 15B) se observa microscopía de barrido ambiental con estructura menos regular en comparación a las recién elaboradas y refrigeradas, son notorios bordes más pronunciados en la superficie, en la (fig. 15C) se muestra con microscopía de barrido ambiental un corte de la microcápsula donde se observan cámaras de aire (flecha) mismas que son consecuencia del proceso de congelación, en (fig.15D) se observa con mayor cercanía la formación de cámaras de aire (flecha) así como restos de los compuestos que se encuentran en el interior del vehículo y la formación de cristales como consecuencia del proceso de congelación, en la (fig.15E) se muestra imagen obtenida con barrido ambiental donde se señala (con flecha) como se mantiene en su interior la presencia de microorganismos. En la (fig.15F) se aprecia por microscopía confocal en escala de 500µm la auto fluorescencia que emiten los componentes de la microcápsula, en mayor cantidad el componente que fluoresce en verde, el cual, con base en lo reportado por *AS Zhu y cols. 2023* , Gomez – Mascaraque y *cols 2023* se considera se trata de alginato de sodio, de igual forma se observa presencia de el segundo componente que fluoresce en rojo (flecha) el cual podría tratarse de compuestos fenólicos de acuerdo con lo reportado por

Espinosa- Velazquez y cols 2016, tambien se señala la presencia de aire en el interior de la microcápsula debido al proceso de congelación, en la (fig. 15G) se observa microscopía confocal 100 μ m donde se aprecia con mayor detalle la presencia de ambos componentes mismos que se ha inferido se trata de AS (verde) y compuestos fenólicos (rojo) Garcia y cols 2022, Khatib y cols. 2021.



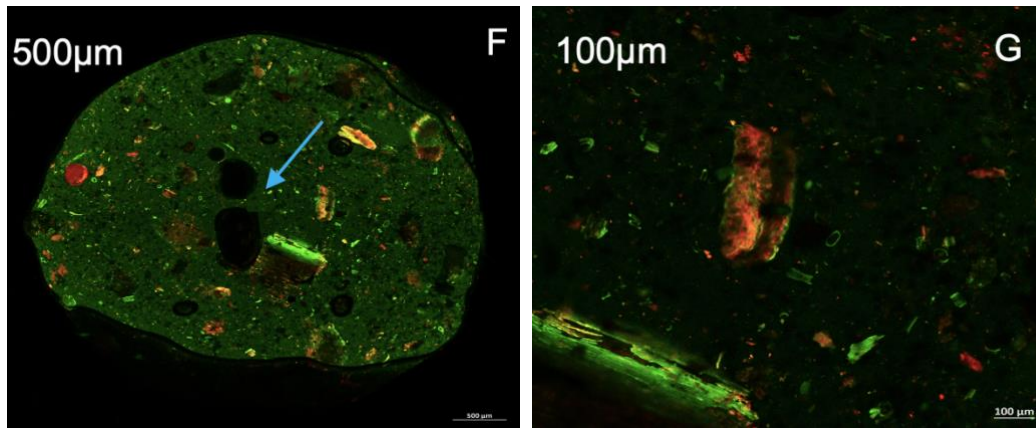


Fig. 15 (A) microscopía óptica de Microcápsulas de AS al 1.3%, Kale 1% y consorcio de *Lactobacillus* posterior a periodo en congelación que presentan rugosidad y aparente daño en la barrera exterior como resultado de la baja temperatura, (B) Microscopía de barrido ambiental donde se observa estructura con diametro de 4.031mm con bordes y pequeñas rugosidades en la estructura, (C) corte de microcápsula donde se observa la formación de camaras de aire como consecuencia de la congelación. (D) corte de microcápsula con objetivo de 45X donde se señala ademas de las camaras de aire, los restos del componente vegetal, (E) Microscopía de barrido ambiental donde se muestra la permanencia de bacterias (F) microscopía confocal donde se aprecia por autofluorescencia la continuidad de la abundancia del componente AS (verde) con la adición de camaras de aire señalada con flecha (G) componentes de microcapsula donde se distingue a mayor detalle la presencia del segundo componente (rojo) considerado como compuestos fenólicos presentes en la microcápsula **Garcia y cols 2022, Khatib y cols. 2021**

6.7 Viabilidad de Microcápsulas de AS al 1.3%, kale al 1% y consorcio de *Lactobacillus*

Para comprobar la viabilidad de las microcápsulas elaboradas con el consorcio de bacterias probióticas se colocaron en medio lácteo y medio de cultivo MRS (fig 16), luego de haber transcurrido 48 horas en refrigeración, se corroboró la viabilidad debido a que se observó un cambio organoléptico en el producto lácteo (fig. 17), lo que indica un proceso fermentativo de lactosa mediado por el consorcio de bacterias utilizado, este proceso tambien mostró una disminución en el pH y desnaturalización

de sus proteínas lo cual quedo evidenciado por la separación del medio lácteo. La microscopía electrónica confocal laser mostró viabilidad las microcápsulas recién elaboradas debido a la presencia de microorganismos emitiendo coloración verde (fig.18A), en las microcápsulas refrigeradas por 15 días (fig.18B) también se observó cantidad considerable de organismos viables (verde) por acción de la Naranja de acridina y en contraste se observa menor cantidad de microorganismos no vivos por efecto del Yoduro de Propidio III

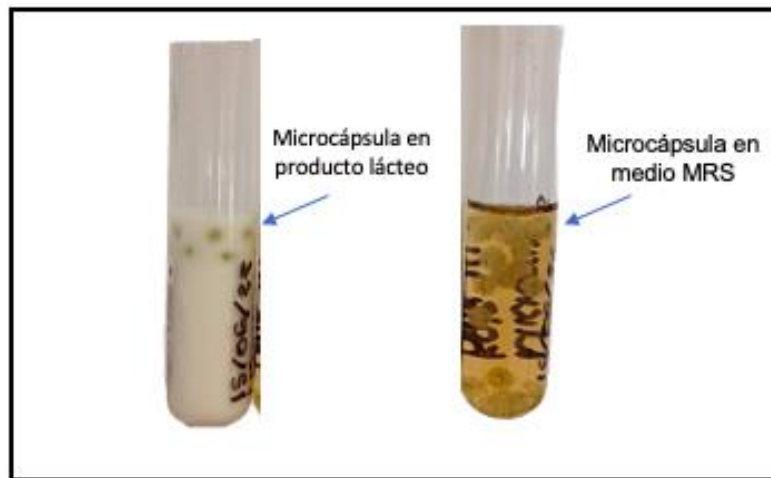


Figura 16. Evaluación de la viabilidad de las microcápsulas de AS al 1.3%, Kale 1% y consorcio de *Lactobacillus* sometida por un periodo de 15 días a refrigeración.

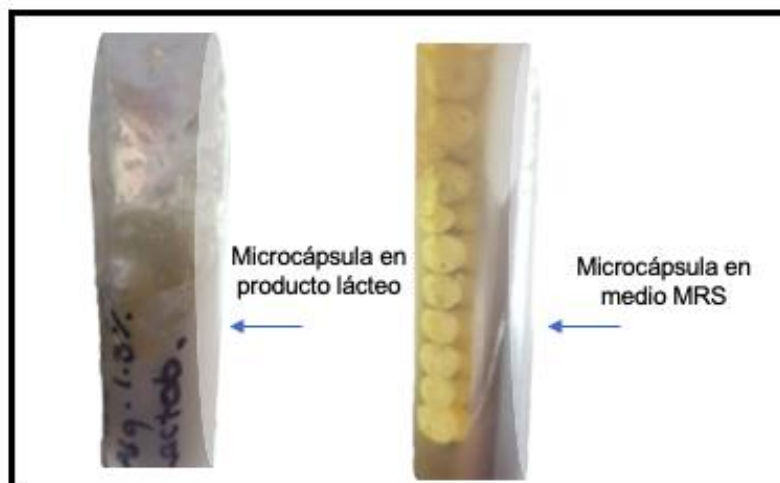


Figura 17. Se observa separación del medio lácteo debido al cambio de pH.

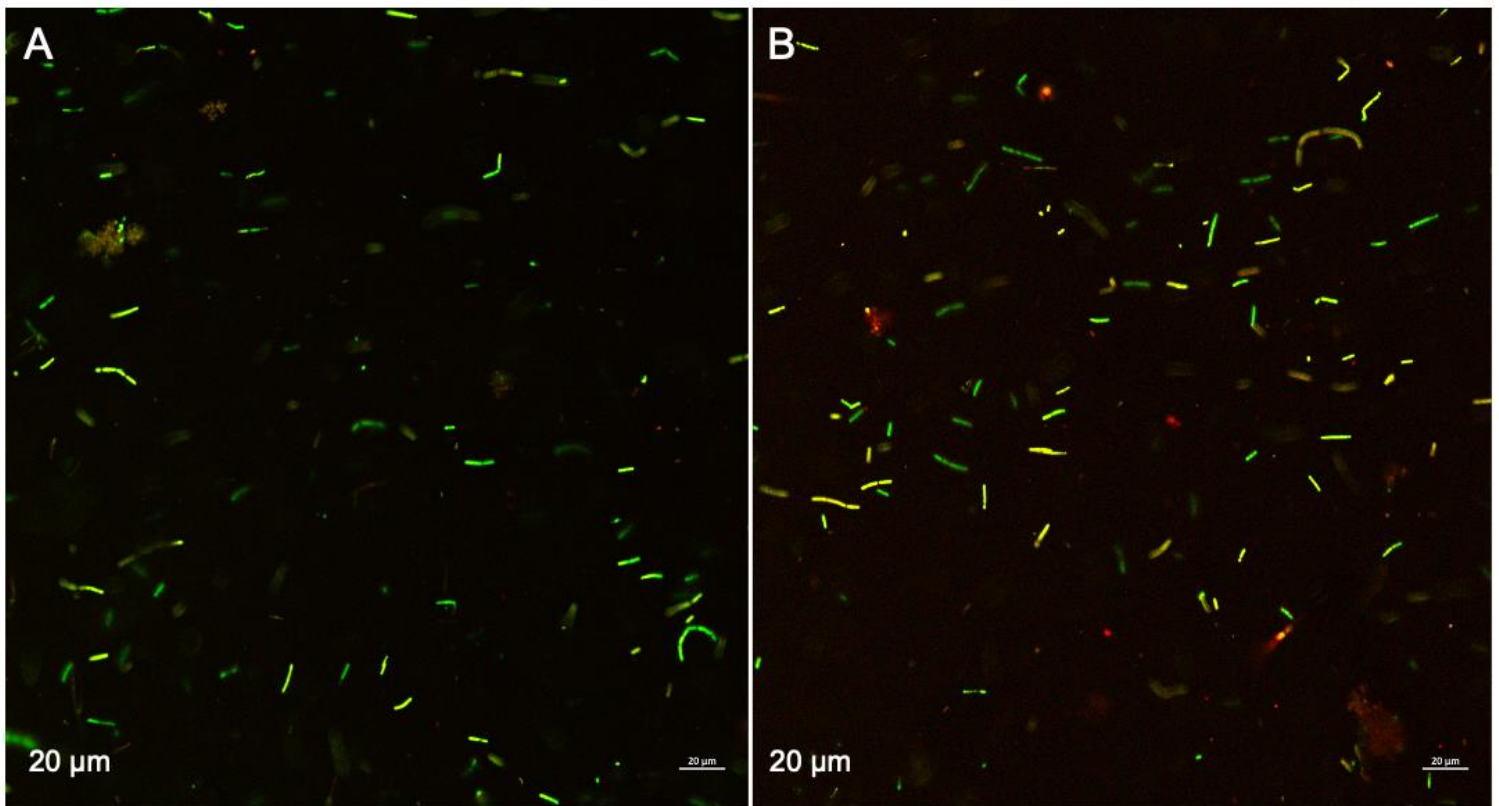


Fig. 18 Evaluación de la viabilidad de las microcápsulas de Alginato de Sodio al 1.3%, Kale 1% y consorcio de *Lactobacillus* analizadas en microscopio confocal Zeiss., se utilizó Naranja de Acridina para identificar organismos viables y, usando como contra tinción Yoduro de Propidio III para organismos no viables emitiendo fluorescencia naranja o roja.

A) Microcápsulas recién elaboradas, B) Microcápsulas en refrigeración (4°C)

6.8 Evaluación morfológica de microcápsula adicionadas con Kale y bacterias probióticas deshidratadas

En la figura (19A) se muestra microscopía óptica donde se observan microcápsulas que fueron sometidas a deshidratación, se observa que en comparación a las muestras no deshidratadas estas tienen un tamaño promedio de 2.17 μm (tabla 5), 49% menos aproximadamente, se modificaron de manera drástica perdiendo la forma esférica y presentando mayor rugosidad en la superficie externa, se realizó microscopía de barrido ambiental (fig.19B) donde se confirma que hubo reducción en el tamaño de la partícula, cambio en su morfología la cual es irregular y con hendiduras pronunciadas, (fig 19C) se observa microscopía confocal laser la cual permite identificar por autofluorescencia la permanencia de las coloraciones antes descritas en las microcápsulas, verde (AS) y rojo (compuestos fenólicos) de acuerdo a lo anteriormente inferido, en comparación a las microcápsulas no deshidratadas hay variación en la cantidad de compuestos expuestos, ya que, hay mayor visibilidad del componente que emite fluorescencia roja, lo anterior se logra apreciar con mayor detalle en la (fig 19D) así como las hendiduras formadas por la pérdida de agua.

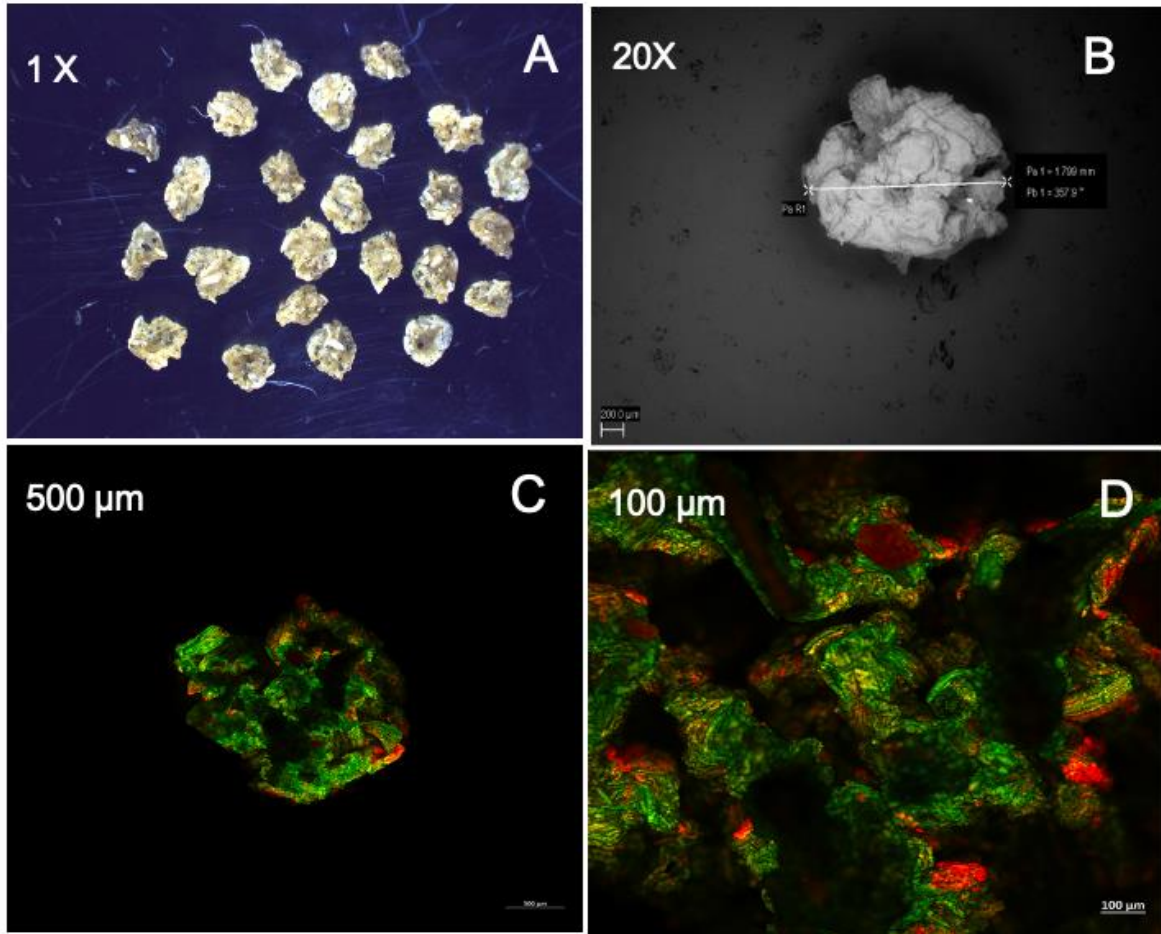


Fig. 19 (A) Microscopía de microcápsulas de AS al 1.3%, Kale 1% y consorcio de *Lactobacillus* deshidratada de apariencia rugosa y dura, (B) microscopía de barrido ambiental donde se observa estructura de forma rugosa, superficie irregular y diametro de 1.79mm, (C) microscopía confocal donde se aprecia por autofluorescencia la presencia del componente AS (verde) y lo que se puede considerar polifenoles (rojo) considerando con ello la disminución de la capa superficial debido al proceso de deshidratación (D) microcapsula donde se distingue el componente con fluorescencia roja que ha quedado al descubierto.

7. DISCUSIÓN

Los polifenoles presentes en alimentos son de suma importancia ya que pueden ayudar en la reducción de ECV y diabetes mellitus tipo II, entre otras. Además de su efecto antioxidante para combatir radicales libres en el organismo humano. Recientemente los polifenoles en conjunto con probióticos y prebióticos se han considerado de suma importancia para la regulación de la microbiota intestinal, promoviendo la formación de bacterias como *Lactobacillus*. En específico al vegetal de estudio, “kale”, se estudió para cuantificar contenido de polifenoles bajo diferentes métodos de extracción, uno de los más recientes es la cuantificación de Fadhlurohman MF y cols 2022.

En el presente trabajo se cuantificó el contenido de polifenoles de un extracto metanólico a partir de kale liofilizado de una marca comercial (Euphoria), obteniéndose $1,224 \pm 0.030$ mg E.A.G./ 100 g de extracto, valor semejante al reportado por Montiel-Castillo 2021 para kale deshidratado (1364 mg E.A.G./ 100 g) Es probable que sea en el proceso de liofilizado donde se pierda el rendimiento de estos.

Por otro lado, además del extracto orgánico, se cuantificó el contenido de polifenoles de una solución acuosa al 1 % de kale misma marca (extracto acuoso), esta condición es igual a la utilizada para la elaboración de las microcápsulas. El resultado de esta fue de 810 ± 0.071 mg E.A.G./ 100 g de extracto, siendo alrededor de un 44 % menos que el extracto metanólico.

La diferencia entre ambos extractos es la polaridad del disolvente que se está aplicando al extracto, el metanol es menos polar que el agua, por lo tanto facilita la extracción de polifenoles.

Se observó que la concentración utilizada de alginato de sodio para la formación de la microcápsula ha sido adecuada para proteger el material que se pretende encapsular así como la cantidad adecuada de Kale para favorecer el crecimiento de las bacterias probióticas que se utilizan en la encapsulación. Las microcápsulas son capaces de resistir distintas condiciones ambientales y muestran viabilidad después de varios días. Para ofrecer una opción en cuanto a conservación se mostró que es posible reducir su tamaño en más de 40% gracias a la deshidratación y que dicho proceso no daña los componentes de la microcápsula, restaría hacer una evaluación más a fondo luego de dicho proceso, así como comprobar si realmente resistirían las condiciones gastrointestinales por lo que es altamente recomendable que se lleve a cabo la siguiente fase experimental. Se debe tomar en cuenta que debido al contenido de calcio del kale una vez que se añade el alginato de sodio se debe actuar de manera rápida ya que comienza lentamente a polimerizarse y la viscosidad aparente aumenta, ello puede interferir en la forma y tamaño de las microcápsulas.

Con respecto al contenido de probióticos se evidenció la permanencia de ellos en la microcápsula aún después de un periodo en refrigeración, por lo tanto es bastante prometedor que se continúen con los experimentos necesarios para asegurar su viabilidad y someterlas a pruebas más completas.

8. CONCLUSIONES

Hasta el momento se puede concluir que se ha llevado a cabo un procedimiento adecuado para la microencapsulación, las microcápsulas mostraron estabilidad y se mantiene la hipótesis acerca de que la microencapsulación puede otorgar un vehículo seguro para transportar al probiótico, para la realización de todo el proceso se deben considerar las herramientas, así como la rapidez y precisión con el fin de evitar el aumento de viscosidad durante la preparación de la microcápsula.

Así mismo, se puede concluir que el extracto de kale liofilizado que se utilizó contiene 1224 mg E.A.G/100g de polifenoles totales en extracto metanólico y 810 mg E.A.G/100g de polifenoles totales en extracto acuoso, y que hay actividad probiótica en presencia de los polifenoles de este vegetal incluso mayor que con medio MRS lo que lo hace un vegetal no solo con alto contenido de compuestos fenólicos, sino, con potencial prebiótico.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Tinoco García Ana Lorena. Evaluación del estado de nutrición, estilos de vida y su relación con los factores de riesgo de las enfermedades crónicas no transmisibles en estudiantes de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad de Nutrición, Composición Corporal y Gasto de Energía. 2020;
2. Shamah-Levy TT, Cuevas-Nasu L, Gaona-Pineda EB, Gómez-Acosta LM, Morales-Ruán M del C, Hernández-ávila M, et al. Overweight and obesity in children and adolescents, 2016 Halfway National Health and Nutrition Survey update. *Salud Publica Mex.* 2018 May 1;60(3):244–53.
3. Ángel M, Valdés S, Serra Ruíz M, Viera García M. Las enfermedades crónicas no transmisibles: magnitud actual y tendencias futuras Non Transmissible Chronic Diseases: Current Magnitude and Future Trends. 2018;
4. Nazar-Carter G, Sáez-Delgado F, Maldonado-Rojas C, Mella-Norambuena J, Stuardo-álvarez M, Meza-Rodríguez D. Interventions in child obesity. A systematic review of the literature. *Hacia la Promocion de la Salud.* 2022;27(1):213–33.
5. Maza Avila FJ, Caneda-Bermejo MC, Vivas-Castillo AC. Hábitos alimenticios y sus efectos en la salud de los estudiantes universitarios. Una revisión sistemática de la literatura. *Psicogente.* 2022 May 2;25(47):1–31.

6. Álvarez-Calatayud G, Guarner F, Requena T, Marcos A. Diet and microbiota. Impact on health. *Nutr Hosp*. 2018 Sep 1;35(Ext6):11–5.
7. Elizabeth Padilla-Vinueza VI, Darwin Tisalema-Tipan HI, Iván Jerez-Cunalata EI, Aracely Moreno-Carrión aracelymorenocb A V, Daniela Salvador Aguilar AV, Elizabeth Padilla Vinueza V, et al. Obesidad Infantil y Métodos de Intervención Ciencias de la Salud Artículo de revisión Obesidad Infantil y Métodos de Intervención Childhood Obesity and Intervention Methods Obesidade Infantil e Métodos de Intervenção Obesidad Infantil y Métodos de Intervención. núm 1 Enero-marzo [Internet]. 2022;8(1):961–71. Available from:
<http://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/index><https://orcid.org/0000-0001-6869-7738><https://orcid.org/0000-0002-8162-7600>
8. Nazar-Carter G, Sáez-Delgado F, Maldonado-Rojas C, Mella-Norambuena J, Stuardo-álvarez M, Meza-Rodríguez D. Interventions in child obesity. A systematic review of the literature. *Hacia la Promocion de la Salud*. 2022;27(1):213–33.
9. Chordà S, Jesús. ¿Pueden los probióticos modificar las complicaciones asociadas a la obesidad infantil? 2022 [cited 2023 May 9]; Available from: <https://roderic.uv.es/handle/10550/83623>
10. Martín R, Chain F, Miquel S, Motta JP, Vergnolle N, Sokol H, et al. Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2017 [cited 2023 May 9];035:49–70. Available from: https://academic.oup.com/femsre/article/41/Supp_1/S49/4084367

11. Microbiota intestinal y obesidad. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. 2021 Nov;5(6):11033–43.
12. Myers SP. The Causes of Intestinal Dysbiosis: A Review. *Alternative Medicine Review* x. 2004;9.
13. Ducatelle R, Eeckhaut V, Haesebrouck F, Van Immerseel F. A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: Present status and future perspectives. *Animal*. 2014 Jul 30;9(1):43–8.
14. Quigley EMM. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 May 9];17(2):333–44. Available from: <http://www.cghjournal.org/article/S154235651831019X/fulltext>
15. Obesidad y sobrepeso [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
16. Oficial D, Sección P, Mexicana A, Cirugía DE, Academia AC, De Pediatría M, et al. Viernes 18 de mayo de 2018.
17. Vista de El sobrepeso y la obesidad infantil en México y su relación con el consumo de azúcares | JÓVENES EN LA CIENCIA [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3555/3051>
18. Aguilera-Bocanegra SP, Gamez-Fernández A, Navarro-Perez JA, Solares-Alvarado AP, Tinajero-Castro CM, Trejo-Nava EP, et al. El sobrepeso y la

obesidad infantil en México y su relación con el consumo de azúcares. JÓVENES EN LA CIENCIA [Internet]. 2022 Sep 9 [cited 2023 May 9];16:1–7. Available from: <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3555>

19. Cabezas-Zabala CC, Hernández-Torres BC, Vargas-Zárate M. Azúcares adicionados a los alimentos: efectos en la salud y regulación mundial. Revisión de la literatura. Revista de la Facultad de Medicina [Internet]. 2016 [cited 2023 May 9];64(2):319–29. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112016000200017&lng=en&nrm=iso&tlng=es
20. Barreto IB, Cruz YAM, López JAP, Carassa DCM. Relationship between obesity and chronic noncommunicable and infectious diseases. Vol. 54, Medicina (Brazil). Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto - U.S.P.; 2021.
21. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V., Gou YK, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2004 Nov 2 [cited 2023 May 9];101(44):15718–23. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0407076101>
22. de SOUZA CA, Rocha R, Costa PR de F, Almeida NS, Cotrim HP. PROBIOTIC, PREBIOTIC OR SYMBIOTIC SUPPLEMENTATION IMPACTS ON INTESTINAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: A SYSTEMATIC REVIEW. Arq Gastroenterol

- [Internet]. 2022 Apr 15 [cited 2023 May 9];59(1):123–8. Available from: <http://www.scielo.br/j/ag/a/P73C6fxQCygCHXN3tdXjzQL/>
23. Guillot CC. Microbiota intestinal y salud infantil Intestinal microbiota and child health [Internet]. Vol. 90, Revista Cubana de Pediatría. 2018. Available from: <http://scielo.sld.cu>
 24. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz de Pipaon M, et al. Microbiota intestinal y salud. Gastroenterol Hepatol. 2021 Aug 1;44(7):519–35.
 25. Giulio P. Intestinal dysbiosis: definition, clinical implications, and proposed treatment protocol (Perrotta Protocol for Clinical Management of Intestinal Dysbiosis, PID) for the management and resolution of persistent or chronic dysbiosis. Archives of Clinical Gastroenterology. 2021 Jul 26;056–63.
 26. Rivas Montoya E. Desarrollo de un prototipo simulador del tracto gastrointestinal mediante reactores químicos automatizados.
 27. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. Microb Ecol Health Dis [Internet]. 2015 Feb 2 [cited 2023 May 9];26(0). Available from: </pmc/articles/PMC4315779/>
 28. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. The Lancet. 2003 Feb 8;361(9356):512–9.
 29. Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, Boccuto L, Salehi B, Sharifi-Rad J, et al. Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. Nutrients [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2023 May 9];11(11). Available from: </pmc/articles/PMC6893459/>

30. James A, Wang Y. Characterization, health benefits and applications of fruits and vegetable probiotics. <http://mc.manuscriptcentral.com/tcyt> [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Jun 10];17(1):770–80. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19476337.2019.1652693>
31. Valdovinos-Díaz MÁ. Probiotics in irritable bowel syndrome: Are they ready for clinical practice? *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2021;51(3):271–8.
32. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* [Internet]. 2017 Sep 15 [cited 2023 May 9];9(9). Available from: </pmc/articles/PMC5622781/>
33. Guillot CC. Probióticos, puesta al día Probiotics: an update [Internet]. Vol. 90, *Revista Cubana de Pediatría*. 2018. Available from: <http://scielo.sld.cu>
34. Microbiota Probióticos Prebióticos. 2022; Available from: www.ergon.es
35. Vista de Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/4379/4020>
36. Salinas RR, Loaiciga VZ, Jaramillo SH. revista medica sinergia. *Revista Medica Sinergia* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 May 9];6(6):e686–e686. Available from: <https://www.revistamedicasinergia.com/index.php/rms/article/view/686>

37. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int Dairy J.* 1999 Jan 1;9(1):69–80.
38. Gil-Sánchez I, Cueva C, Tamargo García A, González de Llano D, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B. Impacto de la suplementación con probióticos en el metabolismo intestinal de los polifenoles de la uva. [cited 2023 May 9]; Available from: <https://digital.csic.es/handle/10261/228868>
39. Rojas-Renjifo K, Urrego LM, Sebastián Ramírez-Navas J. Prebiotics, their effect in patients with gastrointestinal diseases *Alimentos Funcionales e Ingredientes Naturales* View project *Leptospirosis* View project [Internet]. Available from: <https://orcid.org/0000-0003-2789-4107>
40. Huazano-García A, Shin H, López MG. Modulation of Gut Microbiota of Overweight Mice by Agavins and Their Association with Body Weight Loss. *Nutrients* 2017, Vol 9, Page 821 [Internet]. 2017 Aug 23 [cited 2023 May 9];9(9):821. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/9/821/htm>
41. Microbios intestinales | Organización Mundial de Gastroenterología [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://www.worldgastroenterology.org/publications/e-wgn/e-wgn-expert-point-of-view-articles-collection/gut-microbes>
42. Agudelo-Ochoa GM, Giraldo-Giraldo NA, Barrera-Causil CJ, Valdés-Duque BE. Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Critically Ill Patients. *Perspectivas en Nutrición Humana* [Internet]. 2016 Oct 19 [cited 2023 May

9];18(2):205–22. Available from:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-41082016000200205&lng=en&nrm=iso&tlng=es

43. Probiotics, prebiotics and synbiotics for weight loss and metabolic syndrome. [cited 2023 May 9]; Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/
44. Flesch AG, amarra T, Poziomyck AK, irjner, Damin DC, arvalho. THE THERAPEUTIC USE OF SYMBIOTICS. *Arq Bras Cir Dig* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2023 May 9];27(3):206. Available from: [/pmc/articles/PMC4676381/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26146763/)
45. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy N. role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015 [cited 2023 May 9];21(29):8787–803. Available from: <http://www.wjgnet.com/esps/HelpDesk>:[http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx:8787-8803](http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx?8787-8803) Available from: URL:<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i29/8787.htm> DOI:<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
46. Larrea Santos V, Quiles Chuliá MD, Hernando Hernando MI, Morell Esteve P. Alimentos funcionales: probióticos, prebióticos y simbióticos. 2023 [cited 2023 Jun 10]; Available from: <https://riunet.upv.es/handle/10251/191694>
47. idUS - Papel de la microbiota intestinal en nuestro organismo: una relación de beneficio mutuo [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://idus.us.es/handle/11441/82795>

48. Valencia D, Choque L, Mamani ET. Evaluación de la col rizada (*Brassica oleracea* var. *Sabellica*) a diferentes volúmenes de sustrato y concentraciones de biol: Valencia Daniela, Choque Limber, Esther Tinco Mamani. Revista Estudiantil AGRO-VET [Internet]. 2022 Jun 30 [cited 2023 May 9];6(1):22–7. Available from: <https://agrovet.umsa.bo/index.php/AGV/article/view/119>
49. Michalak M, Gustaw K, Waśko A, Polak-Berecka M. Composition of lactic acid bacteria during spontaneous curly kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) fermentation. *Microbiol Res*. 2018 Jan 1;206:121–30.
50. Hahn C, Müller A, Kuhnert N, Albach D. Diversity of Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*): Glucosinolate Content and Phylogenetic Relationships. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2016 Apr 27 [cited 2023 May 9];64(16):3215–25. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.6b01000>
51. Enríquez Estrella M, Kevin MV, Uvidia Cavadiana H. ALIMENTOS FUNCIONALES LA TENDENCIA DE CONSUMO DEL SIGLO XXI. *reciena*. 2022 May 13;1(3):10–9.
52. Lotti C, Iovieno P, Centomani I, Marcotrigiano AR, Fanelli V, Mimiola G, et al. Genetic, Bio-Agronomic, and Nutritional Characterization of Kale (*Brassica Oleracea* L. var. *Acephala*) Diversity in Apulia, Southern Italy. *Diversity* 2018, Vol 10, Page 25 [Internet]. 2018 Apr 17 [cited 2023 May 9];10(2):25. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-2818/10/2/25/htm>
53. De Ancos B, Fernández-Jalao I, Sánchez-Moreno C. Compuestos funcionales en productos de... Begoña de Ancos y cols FUNCTIONAL COMPOUNDS IN

FRESH-CUT AND READY-TO-EAT PRODUCTS. Rev Iber Tecnología Postcosecha. 2016;17(2):130–48.

54. Corti I, Meligeni D. Fitonutrientes: Fuente de clorofila para la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles. 2013;
55. Gasaly N, Riveros K, Gotteland M. Phytochemicals: A new class of prebiotics. Revista Chilena de Nutricion [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2023 May 10];47(2):317–27. Available from: https://www.researchgate.net/publication/341168521_Fitoquimicos_una_nueva_clase_de_prebioticos
56. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr Hosp. 2012;27(1):76–89.
57. Vista de PERFIL FITOQUÍMICO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINALES | JÓVENES EN LA CIENCIA [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/1667/1174>
58. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular [Internet]. [cited 2023 Mar 7]. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009

59. Mageney V, Neugart S, Albach DC. A Guide to the Variability of Flavonoids in Brassica oleracea. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2023 May 9];22(2). Available from: [/pmc/articles/PMC6155772/](#)
60. Van Hul M, Cani PD. Targeting Carbohydrates and Polyphenols for a Healthy Microbiome and Healthy Weight. *Curr Nutr Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 May 10];8(4):307. Available from: [/pmc/articles/PMC6904403/](#)
61. Liu J, He Z, Ma N, Chen ZY. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on High-Fat Diet-Induced Obesity Linking with Modulation of Gut Microbiota. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2020 Jan 8 [cited 2023 May 10];68(1):33–47. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.9b06817>
62. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 May 9];13(1):1–30. Available from: [/pmc/articles/PMC7833401/](#)
63. Reyes Tisnado R. Alginatos extraídos de *Macrocystis pyrifera* para usos en alimentos e impresiones dentales. 2001 [cited 2023 May 9]; Available from: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/2887048>
64. Entregable E1. TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN.
65. Lupo Pasin B, González Azón C, Maestro Garriga A, Av Florencio Jiménez A. (). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* [Internet]. 2012;3(1):130–51. Available from: <http://www.rvcta.org>

66. Cruz Pacheco K, Durán Páramo E, Valencia del Toro Fabián Robles Martínez G. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LACTOBACILLUS DELBRUECKII LIBRE E INMOVILIZADO BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS IN VITRO.
67. González RE, Tarón A, Morón LB. Formación de Microcápsulas de Tamaño Controlado por Gelación Iónica Utilizando Mezclas Biopoliméricas Binarias. Información tecnológica [Internet]. 2015 [cited 2023 May 9];26(6):31–8. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642015000600005&lng=es&nrm=iso&tlng=p
68. Castañón-Rodríguez JF, Soto-Gómez MG, Uresti-Marín RM, Castañón-Rodríguez JF, Soto-Gómez MG, Uresti-Marín RM. Evaluación de la estabilidad de cápsulas de jugo de naranja obtenidas mediante gelificación iónica. CienciaUAT [Internet]. 2020 Jan 31 [cited 2023 May 10];14(2):117–32. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582020000100117&lng=es&nrm=iso&tlng=es
69. Obtaining size-controlled microcapsules by ionic gelation with high and low acyl gellans containing *Lactococcus lactis*.

ANEXOS

Votos Aprobatorios



FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la L.N Monica Villanueva Castañeda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10053481, y que lleva por título "Elaboración de una microencapsulación por gelación iónica a base de kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) y *Lactobacillus spp.* como posible candidato a simbiótico" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra. Delia Vanessa López Guerrero

Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 18 días del mes de noviembre de 2023.

Calle Iztacchuatl Núm. 100 Col. Los Volcanes, Cuernavaca, Mor., C.P. 62350
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7951 315 04 35 / academicanutricion@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2023-11-23 08:58:49 | Firmante
qeG9+yY+Eryx3RdKINdeEZg9SnPDd406pZYCb0p7jriewx3KsrTuH8xYnWqzJbPowmZRYWDA1jQwPcYaq1i/wOKukR8nxB+9t7stXn19haFmHNe7TjYuC1807GgFz/1j1MICV96
eWqkKovLjJQo7Mn3Kkxau4n6Doh3GSe9N5kGDTRSXiGQnQxEy7wGbowLmSiFOae3QIH6be9umJbD/3qU/dqyQuCDXVkZZgbt+lvITyVAMhEmQHhnb9+MTHWBy+OOK77VGQ
lJSamE1sCYUI7IQVQnVBDzJzH/TWmOE87EFbZx5bM5HyWvKb8cNNk911+hwI7YwVwA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[LjrMuOKbE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4zCDQxEGqeMrczYLJBoFLLhNFE3KG1Y>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la L.N Monica Villanueva Castañeda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10053481, y que lleva por título “Elaboración de una microencapsulación por gelación iónica a base de kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) y *Lactobacillus spp.* como posible candidato a simbiótico” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra. Berenice Andrade Carrera

Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 18 días del mes de noviembre de 2023.

Calle Iztaccihuatl Núm. 100 Col. Los Volcanes, Cuernavaca, Mor., C.P. 62350
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7951 315 04 35 / academicanutricion@uaem.mx





Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

BERENICE ANDRADE CARRERA | Fecha:2023-11-23 08:46:42 | Firmante
FjxL8+tJbLZvXQaQlqntbpye8vwTZztyNlawGobd1rKY2VfXrRihuMY2Y3508wrW2F1b8sCPwX9IbHM4FyJPVcJZ5G5h5dFSolli6Q51RlRFnp+uR4v2MDt+YDi4MgGAgCj4CkoF
TsBKu6ORUhlVp8bnW7FWqVn0TTPmpaNgZEecpEjA3ukaAii+K0RM4FjI9MP5JPWSTdKcFKk+a9DeJpei8I9gDrW2V9hb1Od1+VC0JFXR+dx3+KrbDEoaXJW80sP+XUU/1N
MwEz+nOuZm8gzBVIWTSZQjUBm+13hTLyVeyScCi2mnl7qz6PXH9gb7RaV9KvT7yOeg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Qs4ZHhRyV](#)

<https://efirma.uaem.mx/nc/Repudio/p3lGbb8VbHynE2enzjdbKnEqoNPQiq8>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la L.N Monica Villanueva Castañeda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10053481, y que lleva por título “Elaboración de una microencapsulación por gelación iónica a base de kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) y *Lactobacillus spp.* como posible candidato a simbiótico” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dr. Daniel Tapia Maruri

Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 18 días del mes de noviembre de 2023.

Calle Iztacchuatl Núm. 100 Col. Los Volcanes, Cuernavaca, Mor., C.P. 62350
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7951 315 04 35 / academicanutricion@uaem.mx



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DANIEL TAPIA MARURI | Fecha:2023-11-22 20:50:32 | Firmante
FRnDN1AXpbl4ucm5kj7E/QsJJdb85b7gvQY8JKq6jI/G+aaUjBjN0q1YH5X9OK0a/UX4APXZDlzxQ6zgEDCJ9ojjZMOWiBcWe6Lk6MQ/AJKCBhCiPDn3c6Bjpv2N24IDjcdz4NnSp3h6miJ1y2EyOOPHFhJ3C4R+LNH0VSF7evbHeZpBP03LDY3DbtOmFW4SsrA+HlZrbuAE7aSHMT@8dPvj+RNDaGeNC01vzeNMIYEhp40lpR19/CvAbP2vwe+LHKA GvxivtnWC2GW N1RZX8gERT6i8hd035pzXVlnLkYb7rvjeH99WkqTtkQQXHKlGlnH9n5Z5WdurKAz1Og==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[EnpvJVchx](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/k8YrHRW4dDEK8DOe7q4VQ6uucc7Hl0qX>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la L.N Monica Villanueva Castañeda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10053481, y que lleva por título “Elaboración de una microencapsulación por gelación iónica a base de kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) y *Lactobacillus spp.* como posible candidato a simbiótico” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica

Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 18 días del mes de noviembre de 2023.

Calle Iztacchuatl Núm. 100 Col. Los Volcanes, Cuernavaca, Mor., C.P. 62350
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7951 315 04 35 / academicanutricion@uaem.mx



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA | Fecha:2023-11-22 21:43:39 | Firmante
jFb3lb61oXwoEyj6QqYpaO1LsmFMg5YiG+eTGicM7h9GNb0v9KYJLGHZNiNvoLWN0Xd1ApcacRIAD6XG2MoGfVouJSWFsaefnRmZJ7Gkjt69zCRVVBVq/8ikNZ0hfP9Qp5Gz
ePDkclFwY7mPoh6mireEst1JalvAYFctkYeHMcUoSn89VDNOE3HG0BRBNb+MAs48HAE4JhubVL31yNAcnfAhHbixbmrVcvsjLhytkXCYpRWLIayM6RhwKvoGkuuDC70cG+a
N7D4yI9Q79Hngd3zC0aIlPVg3sq3iVY6G+OxKh3ZM3x3OVmG9r45Hd1X+JiuXd6yQy0glfPAA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



P2X30nv9R

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/fyP2qjwD0MSurVxxAdbmcvT1t9xUuMeB>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la L.N Monica Villanueva Castañeda, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10053481, y que lleva por título “Elaboración de una microencapsulación por gelación iónica a base de kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) y *Lactobacillus spp.* como posible candidato a simbiótico” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra. Ollin Celeste Martinez Ramirez

Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 18 días del mes de noviembre de 2023.

Calle Iztacchuatl Núm. 100 Col. Los Volcanes, Cuernavaca, Mor., C.P. 62350
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7951 315 04 35 / academicanutricion@uaem.mx



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OLLIN CELESTE MARTINEZ RAMIREZ | Fecha:2023-11-22 20:26:27 | Firmante
QMIL9QGnDZp9noiUWS0ry7qPi6tbvLIXKSbHq35i1bo9Exw7XhNEG7VFS3JmVdhcCrRaI5ELdoOhJDVz/L1TmuuArg1wqm9nkCVXXCZZlyHhQTPhe9/AmCM3jcYVZk6MnDHjz
oQlOspOnETpBlBwa5Mo/XBkTcjrT9yNS4rfaTozne9qBvBkzXPkmVM+Btc52i5wg7g/akbPTMeXsYsQB0oiBskjgg6/i32j5OsallaLHCgoSF6BbgRQ49XxPM4LIQdpV/oJqLm3D18A
QvuHCDzYFvdGKsnEuE.jhShaTKNaNtmAKuAIdooTgYs0Z7kgzIC/Fzsk0Rj+PJU3Lg==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[5cHJGukb2](#)

<https://efirma.uaem.mx/hc/Repudio/Uk1nL2ZjKe27dFnIaxbRUHsJnewFxih>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023