



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SEMILLA de *Salvia hispanica* L.  
“CHÍA” EN EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS  
*Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

AUTOR

SAMANTHA ACUÑA CARMEN

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

ASESORA

RUTH LILIANA CRISTÓBAL DELGADO

COASESORA

MARIA SALAS ARRUZ

LIMA-PERÚ  
2019

## **AGRADECIMIENTOS**

Ante todo, expresar en resumidas palabras mi gratitud hacia Dios, mi padre celestial, por proporcionarme la fortaleza y la sabiduría necesaria durante días y noches; así como por colocar personas buenas como guías en el proceso de mi trabajo de tesis.

A mis padres Juan y Liliana, hermano Ismael y mi padrino Luis por su motivación constante y apoyo incondicional. A toda mi familia por sus palabras de aliento y por sus oraciones. En especial una dedicatoria, a mi abuelita Esther Falcón, que desde un pedacito del cielo sé que cuida mis pasos en el andar de la vida.

A mi asesora Ruth Cristóbal por el apoyo, entera paciencia y de quién aprendí a desarrollar mayor empatía, la importancia de dar más que recibir, a mejorar mi habilidad para la observación durante el proceso de investigación, así como también la formulación de mi propio libre pensamiento. Además, agradecerle la orientación y los consejos, pues fueron precisos en esos tiempos.

En general a los profesores de investigación del área de Microbiología, Doctora Dora Mautua, Patricia Burgos y Yuri Puicón; en conjunto lograron cambiar mis propias percepciones sobre el papel como mujer en el avance de la investigación en el área de ciencias y por sobre todas las cosas guardar mis esperanzas en Dios. Con algo de nostalgia, guardo los buenos tiempos del laboratorio y también sus enseñanzas de vida.

A mis colaboradores a distancia, María Salas y Mario Salas, por la colaboración durante la elaboración de curvas de crecimiento así como por la confianza depositada en mi proyecto. También, al profesor Edgar Zárate, profesor de la Universidad Nacional del Callao, quien me orientó con los programas aplicados para las curvas de crecimiento. Así como también, al doctor Alfonso Tapia Bautista, por el apoyo a distancia y palabras de aliento.

Al equipo del área de Microbiología Sr. David, Ángela, Sra. Betty, Erla, Yuri, William, por su buena disposición y constante apoyo en los laboratorios de microbiología, en el uso de equipo del mismo y permisos constantes que solicitaba para los usos del laboratorio en horarios nocturnos y fines de semana.

Al profesor César Puicón por su generosa ayuda en la parte estadística así como la revisión quirúrgica en la etapa final de mi tesis. A Omhar Chávez por su aporte en los análisis fisicoquímicos de mis muestras. A mi amiga Flor Huamaní, por su ayuda en la preparación de material y medios.

A todos aquellos amigos que con su motivación y apoyo estuvieron acompañándome a lo largo del camino de tesis.

*“Dejad que los alimentos sean la medicina, y la medicina sean los alimentos”*  
– Hipócrates.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	8
1.1.	Semillas de chía .....	9
1.1.1.	Antecedentes de las semillas de chía .....	9
1.1.2.	Composición nutricional de las semillas de chía .....	10
1.1.3.	Cultivos de chía y uso en la industria alimentaria .....	11
1.1.4.	Beneficios del consumo de las semillas de chía .....	12
1.2.	Prebiótico.....	13
1.2.1.	Concepto de prebiótico.....	13
1.2.2.	Consideraciones de los prebióticos .....	14
1.2.3.	Metabolismo de prebióticos.....	14
1.3.	Probiótico.....	16
1.3.1.	Concepto de probiótico .....	16
1.3.2.	Consideraciones de los probióticos.....	16
1.3.3.	Ejemplos de probióticos .....	17
1.3.4.	Beneficios del consumo de probióticos.....	17
1.3.5.	<i>Lactobacillus</i> .....	19
1.4.	Alimentos simbióticos.....	20
1.5.	Viabilidad .....	22
1.6.	Crecimiento microbiano .....	22
1.6.1.	Curva de crecimiento .....	22
1.6.2.	Velocidad media de crecimiento y tiempo de duplicación.....	24
1.6.3.	Modelo matemático de Gompertz.....	24

II.	OBJETIVOS.....	26
	A. OBJETIVO GENERAL.....	26
	B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
III.	HIPÓTESIS.....	26
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
	4.1. Procesamiento de la chía molida .....	27
	4.2. Medios de cultivo para la estimación de parámetros de crecimiento y de supervivencia .....	28
	4.3. Microorganismos .....	29
	4.4. Control microbiológico de la materia prima .....	29
	4.5. Reactivación de cepas certificadas .....	30
	4.6. Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas .....	30
	4.7. Determinación de parámetros cinéticos de supervivencia de las cepas.....	32
	4.8. Análisis fisicoquímico de la materia prima.....	33
	4.9. Análisis estadísticos.....	34
V.	RESULTADOS .....	35
	5.1. Control de la materia prima .....	35
	5.2. Reactivación de las cepas .....	35
	5.3. Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas .....	36
	5.3.1. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 .....	36
	5.3.2. Crecimiento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 .....	40
	5.4. Determinación de parámetros cinéticos de supervivencia de las cepas .....	44
	5.4.1. Supervivencia de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 .....	44
	5.4.2. Supervivencia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 .....	48

5.5. Análisis fisicoquímico de la Chía .....	52
VI. DISCUSIÓN.....	53
VII. CONCLUSIONES.....	61
VIII. RECOMENDACIONES.....	62
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	63
ANEXOS .....	74

## RESUMEN

En los últimos años, el consumo de alimentos procesados ha impactado en el equilibrio de la microflora intestinal humana, lo que ha conllevado a una alta incidencia de desórdenes metabólicos. Los microorganismos probióticos, como los del género *Lactobacillus*, son considerados alimentos funcionales, debido a los beneficios que ofrecen tales como el mantenimiento del equilibrio en la flora intestinal, la estimulación del sistema inmunitario así como la producción de metabolitos benéficos entre otros. Sin embargo, durante el período de almacenamiento de estos alimentos, las condiciones ambientales afectan la viabilidad de los microorganismos lácticos. La semilla de *Salvia hispanica* L. (“chía”) presenta propiedades nutricionales que podrían estimular el crecimiento de bacterias lácticas con características probióticas. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de las semillas de *Salvia hispanica* L. (chía) en el crecimiento de las cepas probióticas *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Para ello, se comparó la velocidad máxima de crecimiento (log UFC/ml\*h), el tiempo de generación (minutos) y el tiempo de viabilidad celular (días) de las cepas lácticas en un medio con adición y sin adición del sustrato propuesto. Las curvas de crecimiento y de supervivencia expresadas como el recuento de microorganismos viables (log UFC/ml) en horas y días, fueron elaboradas mediante la aplicación matemática del modelo de Gompertz. La adición de semilla molida de *Salvia hispanica* L. (chía) presentó un efecto favorable en el crecimiento y viabilidad de *Lactobacillus casei* ATCC 334, la cual muestra un aumento en la velocidad específica de crecimiento ( $0.39 \pm 0.03$  UFC/ml\*h [ $P=0.02$ ]) y una disminución en el tiempo de duplicación ( $46.0 \pm 3.3$  minutos [ $P=0.02$ ]). La viabilidad de *L. casei* en el mismo medio alcanza un período de 19 días, tiempo mayor al tiempo de viabilidad en agua ( $P=0.02$ ) con una concentración de  $1.78 \times 10^6$  UFC/ml. Mientras que *L. acidophilus* ATCC 4356, la adición de chíá molida no estimula la velocidad máxima de crecimiento exponencial ( $0.35 \pm 0.03$  UFC/ml\*h<sup>-1</sup> [ $P=0.06$ ]); ni el tiempo de duplicación ( $52.6 \pm 4.8$  minutos [ $P=0.14$ ]); a pesar que exhibe un tiempo de viabilidad de 4 días, tiempo mayor con relación al control de agua destilada [ $P=0.02$ ]. La cantidad de fibra cruda, carbohidratos y proteínas presentes en el sustrato chíá podría explicar la estimulación de crecimiento y el mantenimiento de la viabilidad de *L. casei* en el presente estudio. Se concluye que, la adición de semillas molidas de *Salvia hispanica* L. (chía) favorece el crecimiento e incrementa el tiempo de viabilidad de *Lactobacillus casei* ATCC 334.

## PALABRAS CLAVE

Chía, *Salvia hispanica* L., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, probiótico, prebiótico, simbiótico.

## ABSTRACT

In recent years, the consumption of processed foods has impacted the balance of the natural human gut microflora, which leads to a high incidence of metabolic disorders. Probiotic microorganisms, such as the genus *Lactobacillus*, are considered functional foods, due to the benefits they offer such as the maintenance of balance in the intestinal flora, stimulation of the immune system, as well as the production of beneficial metabolites and so on. However, during the period of storage of these foods, the environmental conditions affects the viability of these lactic acid bacteria. The seed of *Salvia hispanica* L. ("chía") has nutritional properties that could stimulate the growth of lactic acid bacteria with probiotic characteristics. The objective of this study was to evaluate the effect of *Salvia hispanica* L. seed (chía) on the growth of probiotic strains such as *Lactobacillus casei* ATCC 334 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. For this purpose, the maximum growth rate (log CFU/ml\*h), doubling time (minutes) and cell viability (in days) of these bacteria with and without addition of the proposed substrate were calculated. Growth and survival curves were expressed as number of viable microorganisms (log CFU/ml) in hours and days, and adjusted using the Gompertz model. The ground seed of *Salvia hispanica* L. (chía) favors the growth and the viability of *Lactobacillus casei* ATCC 334, which shows an increase in the maximum growth rate ( $0.39 \pm 0.03$  CFU/ml\*h [ $P=0.02$ ]) and a decrease in the duplication time ( $46.0 \pm 3.3$  minutes [ $P=0.02$ ]) while the viability of *L. casei* in the same medium reached 19 days of growth time greater than distilled water ( $P=0.02$ ), at a concentration of  $1.78 \times 10^6$  CFU/ml. Whereas *L. acidophilus* ATCC 4356 does not show growth stimulation with the addition of ground chia ( $0.35 \pm 0.03$  CFU / ml \* h<sup>-1</sup> [ $P=0.06$ ]); or decrease in the duplication time ( $52.6 \pm 4.8$  minutes [ $P= 0.14$ ]), although it exhibits a viability of 4 days ( $P=0.02$ ) in relation to the control in distilled water. The amount of crude fiber, carbohydrates and proteins present in the chia substrate could explain the stimulation of growth and the maintenance of the viability of *L. casei* in the present study. It is concluded that the addition of ground seed of *Salvia hispanica* L. (chía) presents the beneficial effect on the growth of *Lactobacillus casei* ATCC 334 and increases its viability compared to distilled water.

## KEYWORDS:

Chia, *Salvia hispanica*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, probiotics, prebiotics, symbiotics.

## I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales son aquellos que poseen un valor nutritivo propio y también, proporcionan una función activa que mejora la salud del individuo que la ingiere. En otras palabras, confieren un efecto preventivo o terapéutico en la salud del organismo, además de aportar los nutrientes necesarios (1-7). Es así que, la demanda de estudios de investigación con relación a estos alimentos se ha incrementado en los últimos años.

Desde el inicio de la vida, los microorganismos coexisten con nosotros como parte de un proceso evolutivo, por el cual mientras el ser humano otorga un ambiente para los residentes microbianos, ellos ofrecen un paquete enzimático para el metabolismo de nutrientes. Durante el momento del parto y la lactancia materna, los microorganismos provenientes de la madre son transferidos hacia el feto; empezando así a colonizar las paredes del epitelio intestinal y desarrollando una microbiota rudimentaria protectora que se mantiene a largo de la vida del sujeto. Luego, a medida que la persona crece, la microbiota interactúa con las células humanas, influenciando en la fisiología de las células epiteliales, en el metabolismo de los alimentos y/o sustancias que este ingiere, así como en el estado inmunológico del huésped, a través de la producción de ciertos metabolitos (8); como resultado la microbiota intestinal mantiene el estado gastrointestinal de salud de cada individuo.

Sin embargo, los cambios en los patrones alimentarios, el estilo de vida sedentario moderno y el consumo de antibióticos de manera indiscriminada, han afectado el acceso y la colonización de bacterias comensales en el intestino conllevando a una alteración en la composición microbiana conocida como disbiosis intestinal; la cual está actualmente asociada a enfermedades como obesidad, diabetes tipo-II, enfermedades cardiovasculares e incluso en el desarrollo de células cancerígenas (1,8,9). De esta manera, es indispensable la suplementación de sustancias en la dieta que compensen esta situación. Una alternativa en particular es el consumo de alimentos con propiedades prebióticas y probióticas que podrían modular la microbiota intestinal en el hospedero de forma positiva. En este estudio se propone la convergencia de ambos, inclinando nuestra balanza hacia la elaboración de alimentos simbióticos.

## 1.1. Semillas de chía

### 1.1.1. Antecedentes de las semillas de chía

La semilla de *Salvia hispanica* L. o comúnmente conocida como “chía”, proviene de vocablo *chian* del lenguaje Náhuatl de los aztecas, que significa aceitoso; más tarde los españoles aplicaron el mismo nombre a otras especies de semillas con usos similares a través de Nueva España (10). Esta especie pertenece a la familia de la menta, *Lamiaceae*, de orden *Lamiales*, y del reino *Plantae*; crece hasta 1 m de altura y presenta hojas ordenadas de forma opuestas. El color de las semillas de “chía” varía desde negro, gris y negro con puntos blancos, y la forma es ovalada con un tamaño variable entre 1-2 mm. Presenta además flores moradas (11,12) (Figura1).

Figura1.- *Salvia hispanica* L.



Planta de *Salvia hispanica* L., “Chía”. Pertenece a la familia *Lamiaceae*. Fuente (12).

Esta planta era utilizada ampliamente en Mesoamérica precolombina, dentro de la región de México, como parte de los tributos aztecas, también como alimento, medicina y materia prima para producir un aceite que era empleado como base en pinturas decorativas y ungüentos cosméticos; luego, estas semillas se dispersaron en la región de Guatemala, donde también tuvieron un gran valor como alimento, medicina y como aceite; un segundo

cultivo precolombino fue encontrado en la región sur de Honduras y Nicaragua, aquí esta semilla poseía usos médicos (10,11). Años después del descubrimiento de América, los cultivos de chía fueron desplazados por los cereales aportados por los españoles; por lo que aquellos sobrevivieron en las áreas montañosas de México y Guatemala a finales del siglo pasado (11). De esta manera, se evidencia el uso medicinal en Mesoamérica, la adaptación y la expansión de esta semilla a lo largo del continente.

### 1.1.2. Composición nutricional de las semillas de chía

En connotaciones científicas modernas, los beneficios de las semillas de chía se encuentran con base en la composición nutricional de esta; tales como la presencia de un gran porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados esenciales como Omega 3 y Omega 6, proteínas, vitaminas y minerales, y un alto porcentaje de fibra dietética y carbohidratos. Las características nutricionales le confieren un alto potencial como alimento funcional para ser insertado en una dieta balanceada.

En el contenido lipídico, esta semilla posee ácidos grasos insaturados, entre ellos principalmente ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n-3), ácido linoleico (C18:2n-6) y ácido erúico (C18:1n-9), siendo el  $\alpha$ -linolénico el de mayor abundancia en la semilla de chía (11). La incorporación de ácidos grasos poliinsaturados a una dieta balanceada permite reducir las proporciones de colesterol y triglicéridos en las vías circulatorias sanguíneas (3, 12, 17, 18), por ende constituye un factor cardiovascular protector (6). Además, reduce el riesgo del desarrollo de algunas enfermedades cerebrovasculares y enfermedades degenerativas (3, 11), por ello presenta un factor cerebro protector. Es a través de la síntesis de otros ácidos grasos esenciales en el organismo por los cuales ejercen sus funciones, tales como; los fosfolípidos estructurales de membrana; como los son el ácido eicosapentaenoico (EPA) el ácido docosahexaenoico (DHA) (14), y también de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (11).

Respecto a la composición de proteínas, la semilla contiene aproximadamente un 20 % de proteínas, un porcentaje más alto en comparación a otros cereales tradicionales como el trigo (13,7 %), el maíz (9,4 %) y el arroz (6,5 %) (11). Dentro del contenido de aminoácidos, se puede encontrar que la proporción de lisina es alta, siendo este un

aminoácido esencial para la estimulación de la hormona de crecimiento y en la absorción de calcio. Los aminoácidos más abundantes son el ácido glutámico y el ácido aspártico (6), que cumplen funciones nerviosas y excretoras, respectivamente; aunque ambos aminoácidos son no esenciales. Lo que es más resaltante, es que se encuentran aminoácidos azufrados de enlaces S-S (cisteína y metionina) favorablemente mayor frente a otras semillas oleaginosas (11) comunes en proteínas de origen animal y utilizadas por el organismo para la formación del antioxidante glutatión, así como la síntesis de queratina y la formación del tejido conectivo.

Por su parte, la semilla de chía ofrece un 26 % de carbohidratos y sobretodo un alto porcentaje de fibra dietética (18-30%). Cuando la semilla es expuesta a partículas de agua, esta exuda una estructura mucilaginosa (15,16), la cual presenta un 44 % de polisacáridos de una mezcla química como D-xilosa, D-manosa, D-arabinosa, D-glucosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico (3, 15), monosacáridos de origen vegetal. Por otra parte, la fibra dietética actúa como un agente digestivo en el intestino, incrementado el tránsito intestinal (6); por lo que las dietas ricas en fibra contribuyen a mantener una salud intestinal saludable.

Aún más, la semilla de chía presenta una buena fuente de vitaminas y minerales. Por ejemplo, vitaminas pertenecientes al complejo B como la niacina, tiamina y ácido fólico, así como vitamina A, y minerales como calcio, fósforo, magnesio, potasio, hierro, zinc y cobre (11,12,17,18). Por último, es notable la presencia de antioxidantes como ácido clorogénico y el ácido cafeico en esta semilla; así como también contiene proporciones de miricetina, quercetina, kaempferol y flavonoles (6,11,12). Estos compuestos de manera sinérgica contribuyen a la fuerte actividad antioxidante de la Chía, siendo comparativamente más fuertes que los antioxidantes comunes como la vitamina C y la vitamina E.

### 1.1.3. Cultivos de chía y uso en la industria alimentaria

Actualmente la chía es cultivada, en regiones como Argentina, Australia, Bolivia, Colombia, Guatemala, México y Perú. Además, se han reportado que es cultivada en el sureste de Asia y en el Caribe (10). En el Perú existen productores del cultivo de chía con

buena adaptación, tanto en la costa así como en ciertas regiones de la sierra; entre algunas provincias donde se cultivan chía se encuentran Arequipa, Cuzco, Lambayeque, La Libertad, Huánuco y Apurímac (17, 18). Esto indica la adaptación de la planta en distintas áreas geográficas así como distintas variedades de la misma.

La industria alimentaria de varios países alrededor del mundo incluyendo Estados Unidos, Canadá, Chile, Australia, Nueva Zelanda y México utilizan ampliamente las semillas de chía así como el aceite de chía o la harina de chía; ofreciendo diferentes aplicaciones en alimentos como los cereales en el desayuno, barras de cereal, galletas, jugos de fruta, queques, productos de panadería y yogur (11,12,19,20). Esto muestra una introducción de las semillas de chía en el mercado debido a sus bondades nutricionales.

#### 1.1.4. Beneficios del consumo de las semillas de chía

De hecho, las semillas de chía y sus derivados se encuentran asociados con aportes beneficiosos para la salud como la reducción del riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, y aquellas relacionadas a desórdenes metabólicos (11,12); por lo cual la incorporación de esta semilla la convertiría en un alimento nutritivo y benéfico para la salud.

En primer lugar, el consumo de esta semilla posee un papel antidiabético, pues la administración de insumos de panadería con la adición de diferentes concentraciones de chía redujo el índice de glucemia postprandial en sujetos sanos (21), lo que aumenta la sensación de saciedad. Aún más, el aceite de chía aumenta la expresión de proteínas relacionadas a la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina como HSP70 (Proteína de Shock Térmico 70) y HSP2 (Proteína de Shock Térmico 2), así como el aceite de chía junto con los granos de chía entera son capaces de restaurar el sistema anti-oxidante en ratas obesas inducidas (22); por tanto esta semilla favorece la tolerancia de las células a la captación de glucosa e insulina en personas con diabetes.

En segundo lugar, presenta un efecto preventivo frente al desarrollo de desórdenes metabólicos; así lo muestra un estudio donde la expresión de genes lipogénicos disminuye en el consumo de una dieta suplementada con semillas de chía en una regulación tejido-específica durante el desarrollo del tejido adiposo en corderos (23); y este mismo tipo de

dieta supone una herramienta nutricional para el aumento de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico) y la reducción del ratio n-6/n-3 en tejido adiposo de los corderos, favoreciendo el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de tipo n-3, los cuales cumplen un rol antiinflamatorio en el organismo. También, el consumo de semillas de chía y aceite de chía ejerce un efecto protector contra el estrés oxidativo, contra sustancias reactivas como TBARS (Sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico) y 8-isoprostano en un estudio *in vivo* a ratas obesas inducidas por la dieta (24). Esto debido a la alta proporción de ácidos grasos insaturados en las semillas de chía y de antioxidantes en su composición.

Por último, un beneficio adicional de la incorporación de granos de chía en matrices alimentarias, es la capacidad de la semilla de mantener la calidad organoléptica en el alimento, como el color y textura, así como mejora la humidificación y estabilidad emulsificante del mismo (25); dado que no presenta un determinado sabor en particular, esta semilla podría ser un aditivo nutricional que proporciona ácidos grasos poliinsaturados y alta cantidad de fibra al alimento como una opción sustituyente de grasas saturadas comunes en la dieta.

## 1.2. Prebiótico

### 1.2.1. Concepto de prebiótico

La fibra dietética son aquellos compuestos de origen vegetal resistentes a la hidrólisis por diversas enzimas digestivas humanas, llegando intactas al colon siendo hidrolizadas parcial o completamente por la flora del colon, y otras excretadas por las heces (26,27). Por otra parte, los prebióticos son ingredientes alimenticios fermentables que actúan beneficiando la estimulación del crecimiento selectivo y/o actividad de ciertos microorganismos de la flora intestinal, mejorando así la salud del hospedero (16, 28–35). De manera similar a la fibra, debido a la estructura química que éstas poseen no son hidrolizados por el metabolismo humano; sin embargo, a diferencia de la fibra, el concepto de prebiótico incluye la selectividad que poseen estos compuestos en el crecimiento de microorganismos benéficos en el intestino.

### 1.2.2. Consideraciones de los prebióticos

Además, para que un ingrediente alimenticio sea considerado como un prebiótico debe cumplir los siguientes requisitos: 1) debe ser resistente a la acidez gástrica y enzimas proteolíticas; no debe ser absorbidos en la zona de colon ascendente; 2) debe ser un sustrato selectivo para aquellas bacterias comensales y benéficas del colon, que son estimuladas en su crecimiento y metabólicamente activas; 3) debe ser capaz de alterar la flora en favor de una composición más saludable (31–34); como también poseer buenas propiedades sensoriales y proveer efectos en la salud a través de estudios clínicos humanos (13). Para ejemplificar esto, entre algunos prebióticos conocidos se encuentran los fructooligosacáridos [FOS], galactooligosacáridos [GOS], xilooligosacáridos [XOS], isomaltooligosacáridos [IMOS], inulina, lactulosa, pirodextrinas, polidextrosa (13,16,28,29,34), entre otros.

### 1.2.3. Metabolismo de prebióticos

Para comprender la función biológica de estos compuestos, primero es necesario explicar el metabolismo de la fibra dietética. Este proceso se desarrolla según las condiciones fisiológicas y metabólicas del hospedero así como de la participación de un consorcio de diversidad de enzimas bacterianas presentes en el intestino (16); sobretodo, depende de la estructura química del carbohidrato a metabolizar, de características como el largo de la cadena, grado de polimerización y las ramificaciones de las cadenas del polisacárido (33). Para ello, los microorganismos poseen un conjunto de enzimas como hidrolasas de glucósidos, glicosiltransferasas, liasas de polisacáridos y estereasas de carbohidratos (33), así como la capacidad de hidrolizar enlaces tipo  $\beta$  en polisacáridos, lo que permite la hidrólisis de una amplia variedad de estructuras polisacáridas que alcanzan el tracto gastrointestinal.

Asimismo, según los productos del metabolismo de estos compuestos, se pueden clasificar en dos rutas de fermentación. Por un lado, estos compuestos podrían seguir una ruta sacarolítica, produciendo una alta proporción de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC); entre ellos acetato, propionato y butirato, y también ciertos intermediarios como el succinato, acrilato, lactato, formato, etanol, y gases como  $H_2$ ,  $CH_4$  y el  $CO_2$  (16,29,33).

Por otro lado, podrían continuar por la vía proteolítica, con la producción también de acetato, propionato, butirato, así como ácidos grasos de cadenas ramificadas (AGCR); ácido iso-butírico, iso-valérico, y ácidos 2-metilbutírico, y ciertas sustancias adicionales como fenoles, índoles, amonio y aminas (16). Con frecuencia, los compuestos considerados como prebióticos siguen la fermentación sacarolítica, produciendo en mayor proporción productos como los AGCC, cuyos beneficios se detallarán más adelante.

Una vez más, el equipamiento enzimático bacteriano del tracto intestinal utilizado para procesar sustratos como los prebióticos que consume el hospedero es un claro ejemplo de la relación simbiótica que existe entre el hospedero y su microbiota intestinal. El principal efecto biológico de los productos del metabolismo de sustancias prebióticas en el intestino del hospedero es la acidificación del pH del lumen intestinal, suprimiendo así el crecimiento de determinados patógenos y manteniendo así la integridad del epitelio gastrointestinal (16,29,33).

Uno de los AGCC secretado por los microorganismos como producto metabólico es el acetato, el cual presenta un efecto directo sobre el metabolismo lipídico (16), es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica (33) para ser metabolizado principalmente en el músculo, riñones, corazón y cerebro (29). El segundo de ellos es el propionato, el cual sirve como sustrato para la gluconeogénesis local intestinal y/o hepática (29,33), tiene la función de regular la lipogénesis en el tejido adiposo, reduce la cantidad de ácidos grasos en el hígado y plasma, y mejora la sensibilidad a insulina (16,29). Además, el propionato podría ser considerado como una molécula de señal celular, pues modula las interacciones celulares y la expresión genética (36). El tercer metabolito es el butirato, el cual es metabolizado preferentemente por las células epiteliales del colon y del intestino, siendo sustrato preferencial de estas, aportando el 70% de su energía. Este actúa como un metabolito señal al ser capaz de regular el crecimiento, diferenciación celular y apoptosis de los colonocitos (16, 23, 27, 33, 34). Además, aumenta la producción de mucosa en el intestino, y la proliferación de células saludables y también estimula la producción de factores de crecimiento y citoquinas anti-inflamatorias (37). El efecto de cada uno de estos metabolitos influye en el aporte energético a los enterocitos a nivel local, así como

también puede fortalecer el sistema inmunológico y regular los sistemas metabólicos de la glucosa y de los lípidos a nivel sistémico.

Ahora bien, son precisamente las bacterias lácticas, pertenecientes al consorcio microbiano de la microbiota intestinal, con características probióticas las que poseen el equipamiento enzimático para fermentar los polisacáridos con propiedades prebióticas. Es decir, estos son quienes realmente evalúan el efecto de las semillas de chía.

### 1.3. Probiótico

#### 1.3.1. Concepto de probiótico

De acuerdo a la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO, 2006), los probióticos son “microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios de salud sobre el hospedero o receptor” (35). Entre otras definiciones incluyen la adición de un efecto benéfico a la salud del huésped por encima del mantenimiento del estado de salud general del organismo (8, 22, 38); como la reducción del riesgo a contraer una determinada enfermedad. Por ello, también son catalogados dentro de los alimentos funcionales.

#### 1.3.2. Consideraciones de los probióticos

Para considerar a un microorganismo como probiótico útil, se deben destacar algunos criterios: 1) Deben ser biológicamente seguros GRAS (Generalmente reconocido como seguro), no deben causar infecciones, especialmente para personas inmunodeficientes. 2) Deben ser toleradas por el sistema inmunitario del hospedero, por ello es recomendable su procedencia intestinal. 3) Capaces de sobrevivir al pH gástrico, sales biliares y al tránsito intestinal. 4) Adherirse a las células epiteliales del intestino para colonizar el tránsito intestinal. 5) Generar un efecto barrera, para la producción de sustancias antimicrobianas y proteger la mucosa intestinal 6) Capaces de potenciar las defensas inmunitarias del huésped. 7) Presentar estabilidad y viabilidad en grandes concentraciones para permitir efectos beneficiosos dentro del organismo. De forma general, se deben demostrar las propiedades atribuidas en relación a una mejoría en la calidad de vida, y logrando reducir el riesgo de la adquisición de una determinada enfermedad (4, 5, 39,40). Estas características debieran ser probadas provenientes de estudios tanto in vitro como estudio in vivo.

### 1.3.3. Ejemplos de probióticos

Los principales probióticos utilizados comercialmente con efectos positivos probados en estudios clínicos se encuentran principalmente dentro del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. En representación de algunas especies bacterianas dentro del género *Bifidobacterium* se encuentran; *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis* BB12 (L), *Bifidobacterium longum* BB356 (L); mientras tanto dentro del género *Lactobacillus* están; *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum* 299, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus johnsoni*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* (27-29, 32).

### 1.3.4. Beneficios del consumo de probióticos

Los cambios en los hábitos alimenticios y/o el consumo de fármacos han conllevado a la alteración del microbioma entérico, impactando negativamente en la fisiología del hospedero. Esto desencadena en una serie de enfermedades que afectan al intestino, desde desórdenes gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria de bowel (IBD) a condiciones conocidas como autoinmunes; diabetes tipo I, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, obesidad, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, entre otros (36). Por tanto, la ingesta de microorganismos probióticos podría alterar beneficiosamente la composición de la microbiota intestinal, debido a la producción de sustancias que impactan positivamente la función fisiológica, metabólica e inmunológica del hospedero.

Los mecanismos de acción generales y comunes entre los probióticos son:

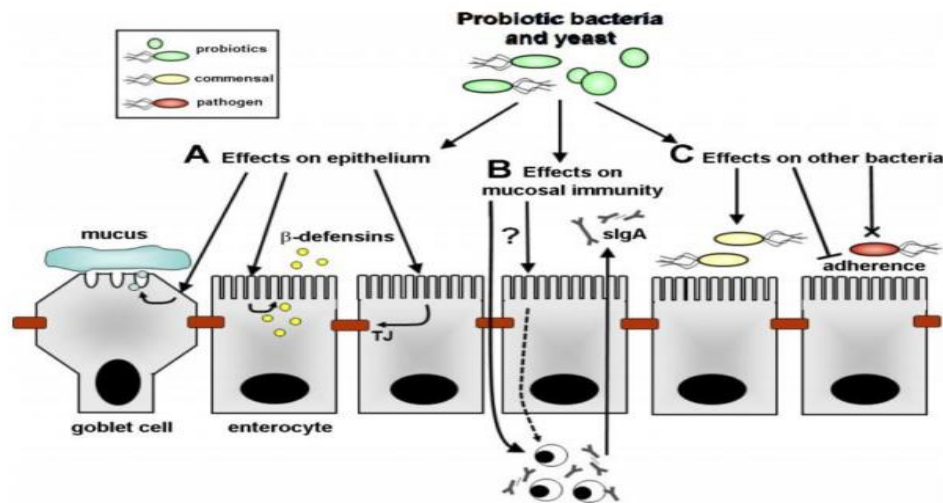
- 1) Mantenimiento de la flora microbiana intestinal: excluyen competitivamente a otros microorganismos y aumentan la resistencia a la colonización de patógenos exógenos o comensales oportunistas a través de antimicrobianos y/o reduciendo el pH del ambiente intestinal (5, 7, 27, 29, 32, 35, 38, 40).
- 2) Producción de ácidos grasos de cadena corta: proveyendo de energía e incrementando el recambio de enterocitos (29, 38).
- 3) Inmunoregulación: a través de la producción de Inmunoglobulina A (IgA) y aumentando la función de barrera inmunológica, son capaces de modular la

protección de la mucosa, induciendo respuestas inmunes protectoras (5, 7, 32, 35, 38, 43).

- 4) Prevención de enfermedades: el consumo de probióticos puede mejorar el metabolismo de la glucosa de manera moderada a través de la reducción de la concentración de glucosa postprandial (42), así como podría ayudar a controlar la dislipidemia e hipertensión en pacientes con DMT2, a través de la reducción de las concentraciones de triglicéridos, colesterol total y niveles de LDL en sangre (5, 7, 27, 37). Además, son propuestas como tratamiento en enfermedades inflamatorias intestinales debido a efectos moduladores positivos como en colitis ulcerosa (41).

Además, algunos microorganismos probióticos son capaces de producir vitamina B12 (36), sintetizar folato así como mejorar la absorción de calcio y de hierro (41). Los mecanismos de acción de los probióticos son múltiples y se han descrito con relación al género, especie y cepa (29). (Figura 2).

**Figura2.-** mecanismos de acción de probióticos en el hospedero



Interacciones entre bacterias probióticas y levaduras en el hospedero; A) Efectos en el epitelio, B) Efectos en la inmunidad mucosa, C) Efectos en otras bacterias como patógenos y comensales, Fuente (43).

### 1.3.5. *Lactobacillus*

En particular, el género *Lactobacillus* es representativo de un grupo de microorganismos con función probiótica, conocidos también como bacterias ácido lácticas, estas constituyen diferentes matrices en los alimentos, en donde ofrecen una serie de beneficios en ellos y para la salud humana. Esos microorganismos crecen de forma óptima en condiciones de ligera acidez y presentan una gran capacidad de fermentar numerosos carbohidratos (33). Adicionalmente, la producción de sustancias antimicrobianas (ácido láctico y ácido acético) y de numerosas bacteriocinas, presenta la capacidad de la inhibición a patógenos implicado en enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. Y *Staphylococcus aureus* (44). Además, aumentan la tolerancia a lactosa en su consumo, a través de la disminución de la concentración de lactosa en el producto fermentado (debido al crecimiento y metabolismo microbiano) y al suministro de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en el lumen intestinal (45). Esto fundamenta su potente acción probiótica, condición inocua, antimicrobiana y bioconservadora.

#### 1.3.5.1. *Lactobacillus casei*

*Lactobacillus casei* ATCC 334 son bacilos Gram positivos no formadores de esporas dispuestos de forma individual o en cadenas, catalasa negativos, no motiles. Crecen de 10°C hasta 45°C y son de metabolismo heterofermentativo facultativo, con la mayor producción de L-(+)- ácido láctico (46). Son resistentes a ambientes ácidos, tolerando un pH de 4.5 por un período de 20 minutos debido a la capacidad en la acumulación de histidina dentro del medio, tolerando incluso hasta un pH de 2 (47), lo que explica la capacidad de resistencia a la acidez gástrica en su ingesta. Aún más, esta cepa presenta la propiedad de producir dos péptidos antimicrobianos, m2163 y m2386, con la habilidad de desencadenar mecanismos apoptóticos en líneas celulares de cáncer colorectal humano (48), lo que muestra su capacidad como probiótico.

#### 1.3.5.2. *Lactobacillus acidophilus*

En el caso de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, estos también son bacilos Gram positivos no esporulados, catalasa-negativos y se observan como varillas con extremos redondeados dispuestos de forma individual, en parejas o en cadenas corta. A diferencia de

*L. casei*, son microorganismos de metabolismo homofermentativo que producen ácido láctico 1.0 – 1.9%; crecen a una temperatura entre 20-45°C en condiciones anaeróbicas (49). Entre sus bondades se encuentra la formación de la capa-S; la cual es la parte más externa de la envoltura celular bacteriana que presenta la capacidad de adhesión del microorganismo en tracto gastrointestinal así como un efecto protector frente a factores ambientales hostiles (50). En *L. acidophilus* ATCC 4356, la capa S muestra actividad mureín-hidrolasa lo que la hace competitivamente más fuerte frente a patógenos como a las paredes de *Salmonella* entérica serovar Newport (51).

De esta manera, *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 son microorganismos representativos del género *Lactobacillus* spp. para el estudio del comportamiento de la chíá. Con esta finalidad, se tomarán dos metodologías puntuales; la evaluación del tiempo de viabilidad de cada microorganismo con la adición de sustrato prebiótico durante la fase de supervivencia así como el cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento como la velocidad máxima de crecimiento y el tiempo de duplicación durante la fase exponencial, como indicadores del mantenimiento y la estimulación de crecimiento de las cepas lácticas, respectivamente.

#### 1.4. Alimentos simbióticos

En suma, las sustancias prebióticas junto con los microorganismos probióticos forman parte de los alimentos simbióticos (24,29,31), así de manera sinérgica, los prebióticos estimularían el crecimiento de cepas específicas contribuyendo a la instalación de una microflora bacteriana con efectos beneficiosos para la salud.

La composición nutricional de la chíá contiene un porcentaje alto de fibra dietética (11,12), por ello ha sido incorporado a matrices alimentarias fermentadas como en un mix de cereales conjunto con las semillas de linaza y trigo con los probióticos *Lactobacillus brevis* UN y *Lactobacillus spicheri* G2 (57); lo que sugiere su actividad favorable en el crecimiento de microorganismos probióticos como los *Lactobacillus*.

Ciertos productos naturales de origen peruano y andino presentan también actividad favorable en el crecimiento de microorganismos benéficos como la harina de yacón (*Smallanthus sonchifolius*), la cual promueve el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y

*Bifidobacterium brevis*, incrementando su viabilidad hasta una concentración de  $10^8$  UFC/ml; debido a un alto porcentaje de carbohidratos fermentables (80-90%) como la presencia de inulina y/o FOS (59), sustancias reconocidas como prebióticas. Asimismo, hidrolizados de soya, quinua y cebada permiten mantener la viabilidad del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 con una población mayor a  $10^8$  UFC/mL, garantizando la supervivencia del microorganismo; mientras que solo los hidrolizados de soya muestran una mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación de *L. acidophilus* (52). Baeza (2) evalúa la adición de linaza como prebiótico, donde se observa que *Lactobacillus casei* presenta un comportamiento probiótico en la evaluación de viabilidad en el tiempo. Obando (58) estudia la incorporación de microorganismos probióticos como *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5 y *Bifidobacterium* BB12 en el procesamiento de queso Cottage, obteniendo una viabilidad superior a  $10^6$  UFC/g durante la vida útil.

En el trabajo de Rodríguez-Barona, las matrices de mora liofilizadas presentan un efecto favorable en el crecimiento y la viabilidad del microorganismo *Lactobacillus casei* ATCC 393 en condiciones ambientales con recuentos superiores a  $10^6$  UFC/ml por más de 40 días (60), mientras que el albedo de naranja presenta bajos tiempos generacionales y una alta producción de ácidos orgánicos en otras cepas probióticas como *Pediococcus pentosaceus* y *Aerococcus viridans* en comparación a la inulina (61).

Además, se han llevado a cabo la preparación de alimentos y bebidas de productos naturales con la incorporación de microorganismos probióticos, como el caso de la bebida probiótica utilizando el *Aloe perfoliata* var. vera (Sábila), la cual introduce el microorganismo estandarizado *Lactobacillus casei* shirota con una concentración de  $10^7$  UFC/ml (56); o la bebida a base de zumo de lulo (*Solanum quitoense*) junto con el probiótico *Lactobacillus acidophilus* CECT 903 (62).

## 1.5. Viabilidad

La viabilidad es la concentración de cultivo viable al final de la vida útil de un producto alimenticio, esta es de gran consideración como propiedad del microorganismo para la incorporación en los alimentos durante la manufactura (13). La definición de un producto probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos que lo integran durante todo el periodo de vida útil de dicho producto para garantizar la efectividad de proveer sus beneficios en su consumo (5). Si una sustancia cumpliría un efecto favorable de crecimiento, esta debe mantener en altas concentraciones los microorganismos considerados como probióticos en un periodo de tiempo. Por otro lado, la vitalidad es la habilidad inherente del microorganismo de resistir condiciones de estrés que ocurren en el alimento durante su vida útil (13), estas condiciones dependen de las características metabólicas y fisiológicas de las bacterias lácticas en los medios de cultivo determinados.

Sin embargo, existen otros factores externos que pueden afectar la supervivencia de las bacterias probióticas en los alimentos causada por la disminución del pH, presencia del oxígeno disuelto, capacidad de medio buffer, temperatura de almacenamiento y la naturaleza de los ingredientes en la matriz del alimento (7,13). La dosis de efectividad de las cepas probióticas debe encontrarse entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC/ml o gr en el tiempo de consumo (4, 5, 7) para que estos microorganismos alcancen el tracto gastrointestinal hasta cumplir su función benéfica en la salud del huésped. Del mismo modo, para que lleguen a tener efectividad los *Lactobacillus*, deben mantenerse en el mismo rango de concentración en el alimento.

## 1.6. Crecimiento microbiano

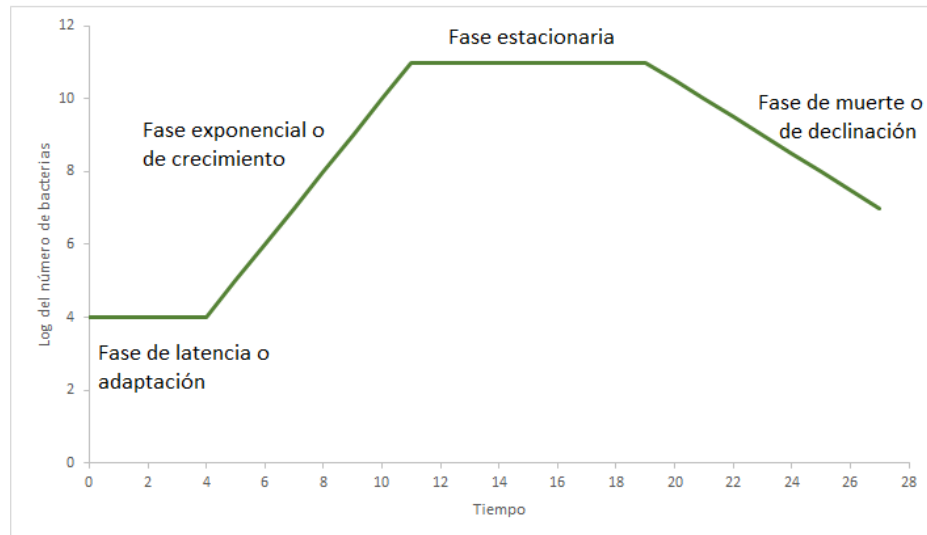
### 1.6.1. Curva de crecimiento

Para el cálculo de parámetros de crecimiento exponencial, es necesaria la elaboración de curvas de crecimiento microbiano. El crecimiento microbiano se define como el aumento de componentes celulares, que puede tener como resultado un incremento de la población microbiana (53). Este proceso se lleva a cabo mediante la multiplicación por fisión binaria, siendo representado gráficamente como el logarítmico de número de células frente al

tiempo. En esta curva resultante se obtiene cuatro fases: fase latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (53,54) (Figura 3).

- ❖ **Fase de latencia:** es el período previo al inicio de la división celular, de adaptación fisiológica y enzimática de crecimiento en este medio nuevo (53,54).
- ❖ **Fase exponencial:** en esta fase los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible. Aquí, la velocidad de crecimiento es constante durante esta fase, es decir, los microorganismos se dividen y duplican en número a intervalos regulares(53).
- ❖ **Fase estacionaria:** es el período en el cual el número total de microorganismos viables permanece constante pues existe un equilibrio entre la división y muerte celular debido a la limitación de nutrientes del medio así como la acumulación de residuo tóxicos, cuando estos crecen en un sistema cerrado. Las bacterias llegan normalmente a esta fase estacionaria cuando el nivel de población es de aproximadamente  $10^9$  células/ml (53,54).
- ❖ **Fase de muerte:** Una privación de nutrientes mayor y la acumulación de residuos tóxicos en el medio originan la disminución del número de células viables. Esta fase al igual que el crecimiento es normalmente logarítmica se mantiene una velocidad de decrecimiento constante, aunque esta velocidad de muerte celular por lo general es más lenta (53).

**Figura3.- CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN CUATRO FASES**



Gráfica que describe el crecimiento bacteriano en un medio cerrado (log) en el tiempo.

#### 1.6.2. Velocidad media de crecimiento y tiempo de duplicación

Durante la fase exponencial, la población duplicará su número de forma regular y constante, por lo cual se puede calcular la *constante de velocidad media de crecimiento*, así como la duplicación de número celular en un período determinado de tiempo nos resulta en el *tiempo de generación o de duplicación* (54,55), estas son características de un determinado microorganismos en un medio definido. El cálculo de estos parámetros cinéticos es de utilidad para la comparación de aquellos factores que estimulen o inhiben el crecimiento (54), es así como definirán el efecto de la sustancia puesta a prueba sobre el crecimiento de los *Lactobacillus*.

#### 1.6.3. Modelo matemático de Gompertz

El uso de modelos matemáticos como el modelo de Gompertz son empleados en el campo de la microbiología predictiva con aplicaciones en seguridad alimentaria, evaluación de riesgos de origen microbiológico, estimación de tiempo de vida útil así como en el desarrollo e investigación de alimentos (70). Para la elaboración de curvas de crecimiento y de supervivencia para la estimación de viabilidad de las bacterias lácticas en la presencia de

un candidato a prebiótico fue de utilidad la elaboración de curvas de crecimiento y de supervivencia según el modelo de Gompertz modificado, detallado en la sección de métodos.

Por todo planteamiento previamente expuesto, se propone el estudio de la semilla chía, *Salvia hispanica* L., como un candidato a sustrato prebiótico en el crecimiento de microorganismos probióticos tales como *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, debido a las propiedades nutricionales que posee esta semilla, entre las que destaca un alto contenido de fibra soluble, carbohidratos, ácidos grasos insaturados y de proteínas. En el caso de las cepas probióticas, estas producirían metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta en el intestino, lo cuales serían beneficiosos para la salud. El propósito del estudio se orienta a la incorporación de las semillas de chía con la adición de microorganismos probióticos en la formulación de alimentos simbióticos.

## II. OBJETIVOS

### A. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar el efecto de la semilla de *Salvia hispanica* L. (chía) en el crecimiento y la viabilidad de las cepas *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

### B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Contrastar las velocidades máximas de crecimiento exponencial ( $\mu_m$ ) de *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en medio selectivo MRS con adición de semillas de chía molida frente únicamente a medio MRS como control en una curva de crecimiento.
- ❖ Contrastar los tiempos de generación ( $T_g$ ) de *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en medio selectivo MRS con adición de semillas de chía molida frente únicamente a medio MRS como control en una curva de crecimiento.
- ❖ Contrastar los tiempos de viabilidad ( $T_v$ ) y establecer la viabilidad celular de *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en agua destilada con adición de semillas de chía molida frente al agua destilada como control en una curva de supervivencia.
- ❖ Realizar análisis fisicoquímicos de los componentes nutricionales de las semillas de chía.

## III. HIPÓTESIS

La suplementación del medio con semilla molida de *Salvia hispanica* L. (chía) favorece el crecimiento y la viabilidad de las cepas *Lactobacillus casei* ATCC 334 o *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

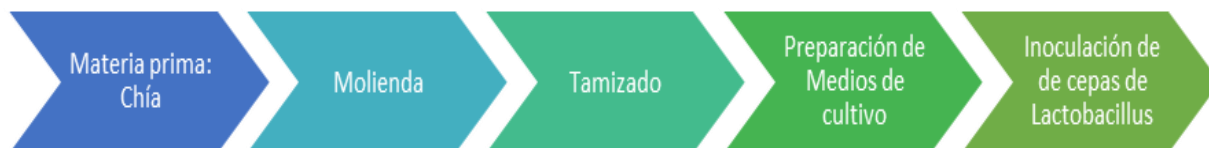
## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Bacteriología dentro de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Facultad de Ciencias y Filosofía - Alberto Cazorla Talleri de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### 4.1. Procesamiento de la chía molida

Las semillas de grano entero de chía se obtuvieron a partir de la adquisición de 6 productos embolsados y procesados adquiridos de un centro de abastecimiento de productos naturales con registro sanitario (Santa Natura; Agroindustrias Floris S.A.C) del distrito de San Miguel en Lima, Perú. Para la obtención de chía molida (CM), las semillas de chía se trituraron a través de un molinillo de café y granos enteros (Bosch, EE.UU) y fueron pasadas por tamices (USA Standard Test Sieve) con mallas de tamaños n° 60 y n°80 para la obtención de partículas 180-250  $\mu\text{m}$ . De acuerdo a la aplicación de cada experimento, se prepararon los medios de cultivo correspondientes con la adición de la chía en presentación molida. Finalmente, los medios preparados se inocularon con las cepas *Lactobacillus* como cultivos iniciales (figura 4).

**Figura4.-ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE CHÍA A PARTIR DE MATERIA PRIMA**



#### 4.2. Medios de cultivo para la estimación de parámetros de crecimiento y de supervivencia

Los medios de cultivo utilizados para la estimación de parámetros cinéticos durante el crecimiento de las bacterias lácticas se encuentran en la Tabla1. Mientras que los medios de cultivo utilizados para la estimación de parámetros cinéticos durante la fase de supervivencia del crecimiento de las mismas están en la Tabla2. Se utilizó el medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe, DIFCO, EE.UU; Himedia, India) en forma de caldo y agar. Además, se utilizaron compuestos adicionales para mejorar la selectividad de los medios mencionados, tales como ácido acético glacial (CDH) y L-cisteína (Himedia, India). Para confirmar la identificación del perfil de cada cepa, se usó el sistema API 50 CHL (BioMérieux, EE.UU). También, para el control de esterilidad (64) se utilizó el medio Tioglicolato con Resazurina (MERCK, EE.UU). La conservación de las cepas se realizó en leche descremada (Sbelt, Laive, Perú).

**Tabla1.-** ESPECIFICACIONES DE LOS TÉRMINOS USADOS PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO Y LAS CONCENTRACIONES EN PORCENTAJE PARA LA ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

	ABREVIACIÓN	MEDIO	CONCENTRACIÓN	CONTENIDO
<b>BLANCO</b>	MRS	MRS	-	100 ml de Caldo MRS
<b>CHÍA MOLIDA</b>	MRS-chía	MRS	0.25% de chía molida (*)	99.75 ml de caldo MRS + 0.25 gr chía molida

(\*) La concentración óptima de chía molida para el crecimiento de *L. casei* (65).

**Tabla2.-** ESPECIFICACIONES DE LOS TÉRMINOS USADOS PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO Y LAS CONCENTRACIONES PARA LA ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DURANTE LA FASE DE SUPERVIVENCIA DE LOS MICROORGANISMOS

	<b>ABREVIACIÓN</b>	<b>MEDIO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>CONTENIDO</b>
<b>BLANCO</b>	Agua destilada	Agua destilada	-	100 ml agua destilada,
<b>CHÍA MOLIDA</b>	Chía	Agua destilada	0.25% (*)	99.75 ml de agua destilada + 0.25 gr de chía molida

(\*) La concentración óptima de chía molida para el crecimiento de *L. casei* (65).

#### **4.3. Microorganismos**

Las cepas probióticas utilizadas fueron *Lactobacillus casei* ATCC® 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356 (Microbiologics, St. Cloud Minnesota, EE.UU). Por separado, se llevó a cabo la reactivación de las cepas a partir del aislamiento de un escobillón individual en caldo y agar MRS.

Para la medición del inóculo inicial se utilizó un espectrofotómetro (GENESYS™ 20, Thermo Scientific, EE.UU). Para la incubación de los cultivos se utilizaron estufas a 37°C (VWR Scientific Inc., EE.UU); y para el mantenimiento de las cepas se usaron refrigeradoras (FRIGIDAIRE, EE.UU) a 4°C y una congeladora (BOSCH, EE.UU) a -20°C.

#### **4.4. Control microbiológico de la materia prima**

Previo a los experimentos, se realizó una prueba de esterilidad para controlar los posibles microorganismos que pudiesen interferir en el desarrollo de los ensayos. Según la Farmacopea de Estados Unidos de América (64), para sustratos sólidos se describe la incubación de las muestras en medio tioglicolato para el cultivo de microorganismos anaerobios y aerobios. Siguiendo estas recomendaciones.

Así, se colocó 0.5 gr del sustrato propuesto en 200 ml de Medio Tioglicolato con Resazurina Sódica 0.1%. Las muestras fueron incubadas por 14 días a una temperatura de 30-35°C en aerobiosis, siendo revisado periódicamente. Para corroborar la ausencia de crecimiento de microorganismos del sustrato, se realizó una siembra en agar Tripticasa de Soya (TSA). Este paso adicional se realizó para descartar crecimiento microbiano en placa. En caso existiese evidencia de flora microbiana presente en el sustrato, entonces se aplicaría un método de control de la misma antes del inicio de los experimentos que consistiría en la adición de ácido acético al 0.13% a los medios de cultivo MRS. En caso contrario, el sustrato evaluado cumpliría con la prueba de esterilidad.

#### **4.5. Reactivación de cepas certificadas**

La identificación de las cepas se realizó mediante tinción Gram, la prueba de catalasa y oxidasa. Adicionalmente, se confirmó la identificación de las cepas proporcionadas mediante API® 50 CHL, y la interpretación se llevó a cabo mediante el programa informático de identificación apiweb™. La conservación de las cepas se efectuó en leche descremada a -20°C hasta su reactivación. Durante el transcurso de los experimentos, se realizó la corroboración del crecimiento de estas cepas mediante sus características en placas MRS, tinción Gram y en la observación microscópica.

#### **4.6. Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas**

La elaboración de curvas de crecimiento de las cepas lácticas a través del tiempo fue realizada de acuerdo a la metodología propuesta por Díaz-Vela *et al.*, 2012 (61); con la modificación en el uso del medio agar y caldo MRS con 0.13% de ácido acético (67) para ambas cepas y controles. Además, para lograr el crecimiento *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en un medio anaerobio, se utilizó L-cisteína al 0.05% añadida en los caldo MRS (68). Los medios base fueron suplementados con 0.25 % (p/v) de chía molida MRS-chía (medio propuesto) y finalmente el blanco de comparación, MRS. Para la reactivación de las cepas respectivas, los cultivos en congelación fueron inoculados en caldo MRS durante 24 horas a 37°C en microaerofilia. Para el inicio de las curvas, los cultivos fueron reactivados por dos veces consecutivas empleando agar MRS. Con la finalidad de obtener un inóculo inicial para la curva, se utilizó una aproximación de lectura directa en el

espectrofotómetro de 0.125 de absorbancia a 625 nm de longitud de onda, considerando un valor de densidad celular de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml según la escala de McFarland (69). Si el valor de absorbancia sobrepasaba el señalado, los inóculos eran diluidos empleando caldo MRS estéril en base a una regla de tres simple para alcanzar así un inóculo inicial aproximado de  $10^4$  UFC/ml. Así, para la elaboración de las curvas de crecimiento, se tomaron alícuotas de 1 ml a partir del tiempo cero hasta alcanzar la fase estacionaria a las 33 horas de crecimiento, con intervalos de una hora y media hasta las 24 horas de crecimiento y tiempo después con un intervalo de 3 horas. Durante este proceso, para la determinación del crecimiento bacteriano se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  en tubos de solución salina SS al 0.85%, y se utilizó el recuento microbiano en placa de agar MRS incubadas a  $37^\circ\text{C}$  reportando UFC/ml por duplicado en condiciones de microaerofilia durante 48 h para *L. casei* y 72 h para *L. acidophilus*. Para ello, se consideró las placas con número de colonias de 30-300 UFC/ml, para que luego fuesen transformados a valores de logaritmo decimal para el análisis correspondiente (ver anexo 1a).

Cada dato del crecimiento de los lactobacilos (Log UFC/ml) son variables dependientes del tiempo en horas, por lo que fueron introducidos en el modelo de crecimiento de Gompertz modificado de cuatro parámetros de crecimiento [A, b, C, M] (71). Estos se introdujeron en la ecuación correspondiente en el programa CurveExpert 1.4, encontrando la magnitud apropiada para el ajuste de las curvas en la ecuación siguiente;

$$\text{Log } N = A + C e^{-e[-b(x-M)]}$$

Log N = Logaritmo común de la población de los lactobacilos en el tiempo X (Log UFC/ml)

X= Tiempo de incubación, variable independiente (horas)

A= Logaritmo común de la población inicial de lactobacilos (Log UFC/ml)

b= Pendiente de la curva, describe la tasa de crecimiento [1/ h]

C= Logaritmo común de la diferencia entre la población inicial y final (Log UFC/ml)

M= tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud (horas)

e= Número de Euler, exponencial (2,71828)

De acuerdo a los parámetros obtenidos del ajuste del modelo de Gompertz, se calcularon tres descriptores microbiológicos que exponen el comportamiento de los lactobacilos en el medio sustrato expuesto (MRS y MRS-chía); para ello se calcularon la fase de adaptación ( $\lambda$ ), la velocidad máxima de crecimiento exponencial ( $\mu_m$ ) y el tiempo de generación ( $T_g$ ), considerando estos dos últimos como indicadores de estimulación del crecimiento con la adición del sustrato propuesto.

$$\text{Fase de adaptación } (\lambda) = M - \frac{1}{B} + \frac{\log N - A}{(bxC)/\exp(1)} \quad [\text{h}]$$

$$\text{Velocidad máxima de crecimiento exponencial } (\mu_m) = \frac{bxC}{\exp(1)} \quad [(\text{Log UFC/ml}) / \text{h}]$$

$$\text{Tiempo de generación } (T_g) = \exp(1) \times \frac{\log(2)}{b} \times C \quad [\text{h}]$$

#### 4.7. Determinación de parámetros cinéticos de supervivencia de las cepas

La elaboración de curvas de supervivencia de las cepas lácticas a través del tiempo fue realizada según la metodología propuesta por Baeza *et al.*, 2008 (2), con la modificación en los intervalos de tiempo descritos a continuación. Para la reactivación de las cepas respectivas, los cultivos en congelación fueron inoculados en caldo MRS durante 24 horas a 37°C. Después, los cultivos reactivados fueron sembrados en agar MRS para su inmediato uso. Se tomó una asada de 1ml de los cultivos puros y se sembraron en tubos con 10 ml de caldo MRS por 20 horas. Luego de la incubación, estos cultivos fueron agregados a los medios de cultivo-sustrato agua destilada y con la adición de chía e incubados a 37°C en microaerofilia. El blanco de comparación fue agua pura destilada. Los análisis de supervivencia fueron realizados cada 24 horas mediante el método de recuento en placa (UFC/ml) mediante diluciones seriadas de hasta 10<sup>-6</sup> en tubos de SS al 0.85%, y se sembraron por diseminación en agar MRS e incubadas a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia, por duplicado. El tiempo de ensayo fue de 16 días, tomando como días de muestreo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15. Luego de ellos, si hubiese aún crecimiento en el medio correspondiente se seguía tomando los días 17, 19, 21, 23, 25, 27 y

30, de lo contrario se detenía el experimento. Se realizaron por cada medio de cultivo, 3 experimentos de repetición independientes para cada caso. Las placas con número de colonias de 30-300 UFC/ml fueron consideradas en el análisis. Los valores de recuento fueron transformados a valores de logaritmo decimal para el análisis de viabilidad (ver anexo 1b).

De manera similar, para las curvas de supervivencia se utilizó el modelamiento de Gompertz modificado considerando el tiempo de incubación en días, mediante la siguiente ecuación;

$$\text{Log } N = A - C e^{-e[-b(x-M)]}$$

Se calcularon los descriptores microbiológicos que exponen el comportamiento de los lactobacilos en el medio sustrato (agua destilada y chía) en la fase de supervivencia; para ello se calcularon la fase de estacionaria ( $\lambda_e$ ), la velocidad máxima de declinación ( $\mu_{de}$ ) y el tiempo generacional de declinación ( $T_{de}$ ). Considerando solo el primero de ellos junto al tiempo de viabilidad, como indicadores de la supervivencia del lactobacilo en el medio con la adición del sustrato propuesto.

Los tiempos de viabilidad de los lactobacilos ( $T_v$ ) fueron estimados a partir de las ecuaciones de la curvas de supervivencia en los medios de cultivo con agua destilada; y conjuntamente se reportó la concentración final viable ( $C_e$ ) como viabilidad celular en el tiempo de viabilidad calculado. Para considerar un sustrato como prebiótico, la viabilidad de las bacterias sobre ese sustrato debe ser mayor a  $10^6$  UFC/ml (63), se consideró como período máximo de crecimiento experimental ( $T_{ve}$ ) como aquel del día previo a la disminución de la concentración por debajo de  $10^6$  UFC/ml.

#### **4.8. Análisis fisicoquímico de la materia prima**

El perfil de análisis fisicoquímicos de las semillas de chía se realizó en el servicios del laboratorio de Farmacia y Bioquímica – Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se analizaron los siguientes componentes:

- **Determinación de humedad:** la humedad de las semillas de chía se determinó según el método oficial 205.002 para cereales y menestras descrito por la AOAC (1979).

- **Determinación de proteínas:** la concentración de proteínas totales presentes en las semillas de chía se determinaron según el método de Kjeldahl, método oficial NTP 209.045 descrito por la AOAC (1974).
- **Determinación de materia grasa:** la porción de grasas totales presentes en las semillas de chía se determinaron mediante el método de Soxhlet, según método oficial NTP 201.016 descrito por la AOAC (2002).
- **Determinación de fibra cruda:** el porcentaje de fibra cruda en las semillas de chía se determinó a través del método directo, según método oficial NTP 205.003 descrito por la AOAC (2016).
- **Determinación de cenizas:** el porcentaje de cenizas de las semillas de chía se determinó por el método oficial NTP 923\_03.05, descrito por la AOAC (1995).
- **Determinación de carbohidratos:** el porcentaje de carbohidratos de las semillas de chía se determinó por el Método – Análisis de parámetros bioquímicos para la gestión nutricional del Olivo.

#### 4.9. Análisis estadísticos

Los resultados de los parámetros cinéticos de crecimiento y supervivencia se obtuvieron a partir de la elaboración de curvas de crecimiento con el modelo de Gompertz, en el programa CurveExpert 1.4. Para evaluar el ajuste de las curvas según el modelo propuesto se consideró el coeficiente de determinación  $R^2$ , que indica la proporción de la variabilidad total de la variable dependiente siendo explicado por el modelo propuesto; así como el análisis de residuales, ambas corroborarían el ajuste al modelo. Para evaluar la significancia de las diferencias de los descriptores microbiológicos se utilizó la prueba U de Mann Whitney. Se utilizó el programa STATA/IC 14.0 para las pruebas estadísticas así como el programa Excel 2010 para la presentación de las gráficas de las curvas de crecimiento y supervivencia.

## V. RESULTADOS

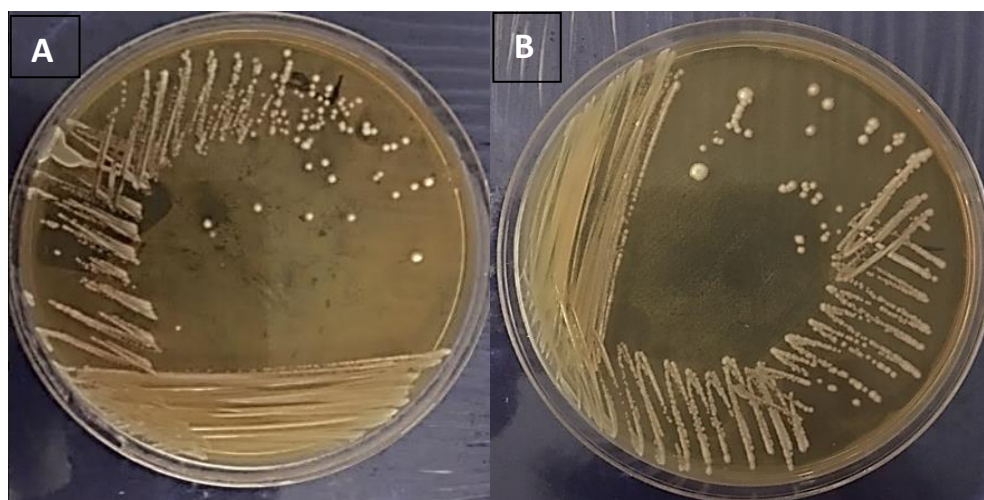
### 5.1. Control de la materia prima

No se evidenció crecimiento de microorganismos que interfirieran con la lectura de los lactobacilos. Sin embargo, algunas de las bolsas de chíá presentaban en el aislamiento de placas de agar TSA la presencia de microorganismos como microflora del sustrato evaluado; situación controlada por la adición de 0.13% ácido acético en los medios agar y caldo MRS (67) antes de los experimentos a realizar.

### 5.2. Reactivación de las cepas

Las cepas *Lactobacillus casei* ATCC 334 en medio MRS presentan colonias pequeñas blanquecinas brillantes, convexas con bordes redondos y enteros, son catalasa y oxidasa negativas. Mientras que *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 presenta colonias medianas traslúcidas con bordes circulares ligeramente irregulares, poco convexas, de bordes rugosos y ásperos, son catalasa y oxidasa negativas (figura 5, anexo 2). La identidad de las cepas se confirmó mediante el método API® 50 CHL en la matriz de carbohidratos y el resultado final a través del programa APIWEB de ambas cepas (anexo 3 y 4). Además, se muestran los certificados de análisis de las cepas en los anexos 17 y 18.

**Figura5.-**OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE COLONIAS DE *Lactobacillus*



Observación del aislamiento individual de las cepas de *Lactobacillus* en placas de agar MRS, luego de la reactivación de los contenedores Kwik-Stik ATCC en medios MRS. A: *Lactobacillus casei* ATCC 334. B: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

### 5.3. Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas

#### 5.3.1. Crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334

Las curvas de crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en los dos casos MRS y MRS-chía iniciaron con un recuento microbiano alrededor de  $10^4$  UFC/ml, en el tiempo 0 horas (ver tabla 4). La fase de latencia de *L. casei* demoró aproximadamente de 2 a 3 horas en ambos medios, lo que indicaría una pronta adaptación en el medio MRS con la adición de chía molida (ver tabla 5).

Durante la fase exponencial, *L. casei* mostró una aceleración de crecimiento en el medio sustrato MRS-chía en comparación al control; la pendiente de la curva presentó mayor inclinación en el medio sustrato por encima del control y alcanzó el tiempo de tasa máxima 36 minutos previos al del medio control (figura 7).

La fase estacionaria mostró un crecimiento máximo de aproximadamente  $10^{10}$  UFC/ml en ambos medios. *L. casei* alcanza la fase estacionaria 1 hora antes en medio MRS-chía con respecto al control (figura 7, anexo 5). Sin embargo, el crecimiento máximo neto fue de aproximadamente de  $10^6$  UFC/ml en ambos medios.

De esta manera, *L. casei* presenta una mayor capacidad de adaptación en el medio MRS con la adición de chía molida, pues mostró un aumento en la velocidad máxima de crecimiento exponencial [16.7 % mayor; 0.06 (log UFC/ml) / h] con relación al medio MRS control. Las diferencias son estadísticamente significativas ( $P=0.02$ ). Asimismo, se observó una disminución en el tiempo de generación [14.1 % menor; 7.5 min] con relación al medio MRS control. Del mismo modo, las diferencias son estadísticamente significativas ( $P=0.02$ , ver tabla 5 y figura 6).

Es decir, la adición de semillas de “chía” como suplemento del medio MRS estimulan el crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334; esto se verifica por los cambios positivos de los descriptores microbiológicos utilizados en este estudio.

**Tabla4.- PARÁMETROS DE GOMPERTZ DEL CRECIMIENTO de *Lactobacillus casei* ATCC 334**

Parámetros	Medios	
	MRS	MRS-chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
<b>A</b>	4.0560 ± 0.0693	4.1639 ± 0.1449
<b>B</b>	0.1497 ± 0.0064	0.1799 ± 0.0110
<b>C</b>	6.1317 ± 0.0976	5.9535 ± 0.0704
<b>M</b>	8.3396 ± 0.0714	7.7427 ± 0.2200

Parámetros de crecimiento de *L. casei* ATCC 334 en los medios MRS (control, azul) y MRS-chía (chía molida, verde); según modelo de Gompertz, obtenidos a partir del programa CurveExpert. A= concentración inicial [log UFC/ml], b= pendiente de la curva de crecimiento [1/h], C= concentración de crecimiento máximo neto [log UFC/ml], y M= tiempo en el cual la tasa de crecimiento es máxima [h]. Datos expresados a partir de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento (promedio ± desviación standard).

**Tabla5.- DESCRIPTORES MICROBIOLÓGICOS DEL CRECIMIENTO de *Lactobacillus casei* ATCC 334**

Descriptores Microbiológicos	Medios	
	MRS	MRS-chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
<b>T<sub>g</sub></b>	0.8921 ± 0.0249	0.7663 ± 0.0549 (*)
<b>μ<sub>m</sub></b>	0.3376 ± 0.0094	0.3941 ± 0.0272 (*)
<b>λ</b>	2.5662 ± 0.1515	2.4484 ± 0.1612

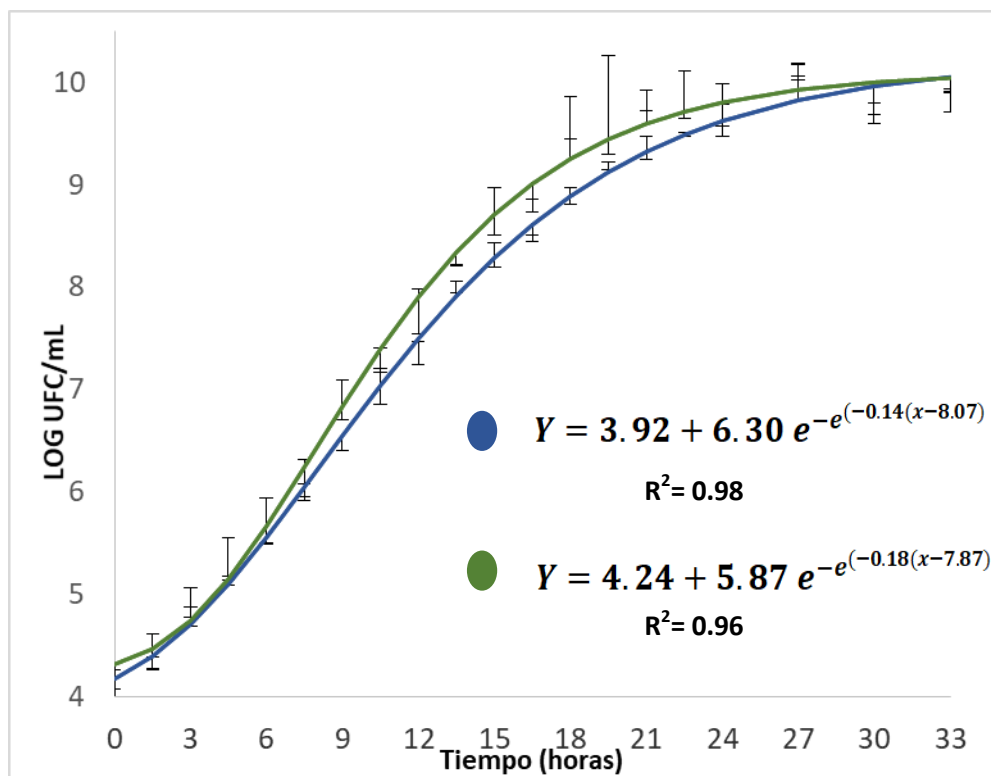
Descriptores microbiológicos del crecimiento de *L. casei* ATCC 334 en los medios MRS (control, azul) y MRS-chía (chía molida, verde). Los datos fueron calculados a partir de los parámetros de la tabla 4. T<sub>g</sub>= tiempo de generación [h], μ<sub>m</sub>=velocidad máxima de crecimiento exponencial [(log UFC/ml) / h] y λ=fase de latencia [h]. Datos expresados a partir de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento (promedio ± desviación standard). Prueba U de Mann-Whitney, significancia de pruebas: (\*) = Diferencia significativa frente a control [*P* < 0.05].

**Figura6.- GRÁFICA DE BARRAS DE DESCRIPTORES MICROBIOLÓGICOS DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei* ATCC 334**



Comparación de descriptores microbiológicos en la determinación de la estimulación del crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334 (log UFC/ml) en el medio MRS-chía frente al control. Barras: velocidad máxima de crecimiento exponencial  $\{([\log \text{ UFC/ml})/ h]$ , verde)}, tiempo de generación (horas, azul). Se muestran las barras de error - desviación standard. Significancia de pruebas: a =Diferencias significativa frente a control [ $P < 0.05$ ].

**Figura7.-CURVA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei* ATCC 334**



Crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en log UFC/ml en el medio MRS y MRS-chía versus el tiempo en horas. Muestras; control: MRS (azul), chía molida: MRS-chía (verde). Estimación de las ecuaciones de Gompertz a partir de CurveExpert. Coeficiente de correlación: MRS, R=0.99 y MRS-chía, R=0.98 Ver detalles de cada parámetro en anexo 6 y de las gráficas en CurveExpert en anexo 7. Parámetros obtenidos a partir de tres repeticiones en conjunto; las barras de error muestran límite inferior y límite superior, según datos experimentales.

### 5.3.2. Crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Las curvas de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en los dos casos MRS y MRS-chía iniciaron con un recuento microbiano alrededor de  $10^4$  UFC/ml en el tiempo 0 horas (ver tabla 6). La fase de latencia de *L. acidophilus* en el medio introducido tomó aproximadamente de 4 a 6 horas, el cual fue similar en ambos medios (ver tabla 7).

Durante la fase exponencial, *L. acidophilus* mostró un crecimiento exponencial levemente mayor del medio MRS-chía en comparación al medio control, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Este presentó una pendiente de curva de pronunciamiento similar en ambos medios y adicionalmente alcanzó un tiempo de tasa máxima semejante en el MRS-chía con relación al control. Después, entró a la fase estacionaria con un crecimiento máximo neto de  $10^5$  UFC/ml, alcanzando aproximadamente  $10^9$  UFC/ml en ambos medios (ver figura 9 y anexo 8).

Sin embargo, *L. acidophilus* con la adición de chía molida presenta una capacidad de adaptación semejante al medio solo MRS. El tiempo de generación ( $P=0.14$ ) y la velocidad máxima de crecimiento exponencial ( $P=0.06$ ) de *L. acidophilus* muestran ser semejantes en ambos medios. En ambos casos, las diferencias no son estadísticamente significativas (ver tabla 7 y figura 8).

Los descriptores microbiológicos para *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 empleados en el presente estudio son similares en cuando el medio es suplementado con semillas de chía y en el medio sin suplementar (figura 8).

**Tabla6.-PARÁMETROS DE GOMPERTZ DEL CRECIMIENTO de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356**

Parámetros	Medios	
	MRS	MRS-chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
<b>A</b>	3.743 ± 0.1202	3.8297 ± 0.0168
<b>B</b>	0.1566 ± 0.0223	0.1759 ± 0.0180
<b>C</b>	5.3957 ± 0.2521	5.3397 ± 0.1014
<b>M</b>	10.7121 ± 0.1486	10.4052 ± 1.7817

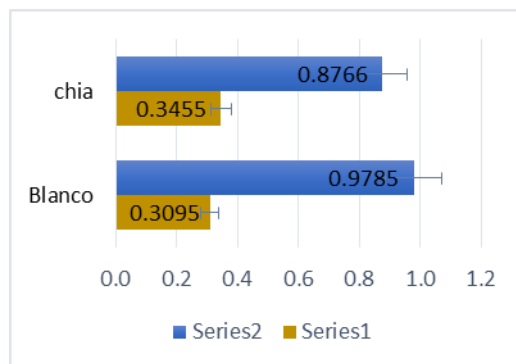
Parámetros de crecimiento de *L. acidophilus* ATCC 4356 en los medios MRS (control, azul) y MRS-chía (chía molida, verde); según el modelo de Gompertz, obtenidos a partir del programa CurveExpert. A= concentración inicial [log UFC/ml], b= pendiente de crecimiento exponencial [1/ h], C= concentración de crecimiento máximo neto [log UFC/ml], y M= tiempo en el cual la tasa de crecimiento es máxima [h]. Datos expresados a partir de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento (promedio ± desviación standard).

**Tabla7.-DESCRIPTORES MICROBIOLÓGICOS DEL CRECIMIENTO de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356**

Descriptores Microbiológicos	Medios	
	MRS	MRS-chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
<b>T<sub>g</sub></b>	0.9785 ± 0.0925	0.8766 ± 0.0807
<b>μ<sub>m</sub></b>	0.3095 ± 0.0293	0.3455 ± 0.0336
<b>λ</b>	4.4748 ± 0.5718	4.8041 ± 1.3510

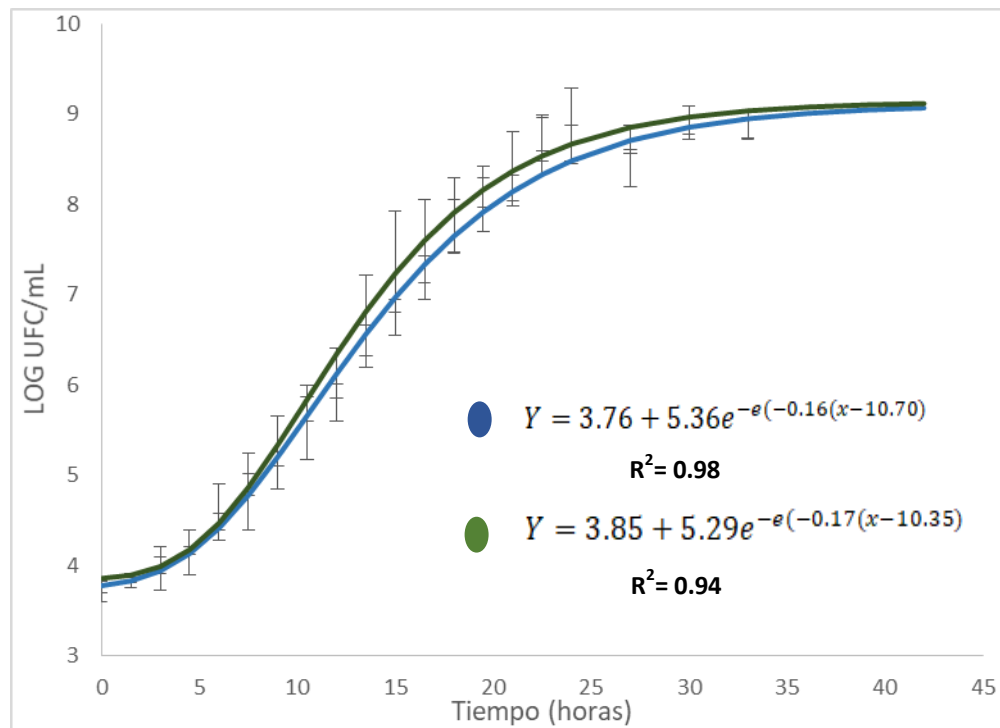
Descriptores microbiológicos del crecimiento de *L. acidophilus* ATCC 4356 en los medios MRS (control, azul) y MRS-chía (chía molida, verde); los datos fueron calculados a partir de los parámetros de la tabla 6. T<sub>g</sub>=Tiempo de generación [h], μ<sub>m</sub>=velocidad máxima de crecimiento exponencial [(log UFC/ml) / h] y λ=fase de latencia [h]. Datos expresados a partir de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento (promedio ± desviación Standard). Prueba U de Mann-Whitney, significancia de pruebas: (\*) = Diferencia significativa frente a control [*P* <0.05].

**Figura8.-** GRÁFICA DE BARRAS DE LOS DESCRIPTORES MICROBIOLÓGICOS DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356



Comparación de descriptores microbiológicos del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (log UFC/ml) en el medio MRS-chía frente al control. Barras: velocidad máxima de crecimiento exponencial  $\{([\log \text{ UFC/ml}]/ \text{ h}], \text{ mostaza}\}$ , tiempo de generación (horas, azul). Se muestran las barras de error - desviación standard. Significancia de pruebas: a =Diferencias significativa frente a control [ $P < 0.05$ ].

**Figura9.-CURVA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 EN MEDIO MRS**



Crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en log UFC/ml en el medio MRS y MRS-chía versus el tiempo en horas. Muestras; control: MRS (azul), chía molida: MRS-chía (verde). Estimación de las ecuaciones de Gompertz a partir de CurveExpert. Coeficiente de correlación: MRS,  $R=0.99$  y MRS-chía,  $R=0.97$ . Ver detalles de cada parámetro en anexo 9 y de las gráficas en CurveExpert en anexo 10. Parámetros obtenidos a partir de tres repeticiones en conjunto; las barras de error muestran límite inferior y límite superior, según datos experimentales.

## 5.4. Determinación de parámetros cinéticos de supervivencia de las cepas

### 5.4.1. Supervivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334

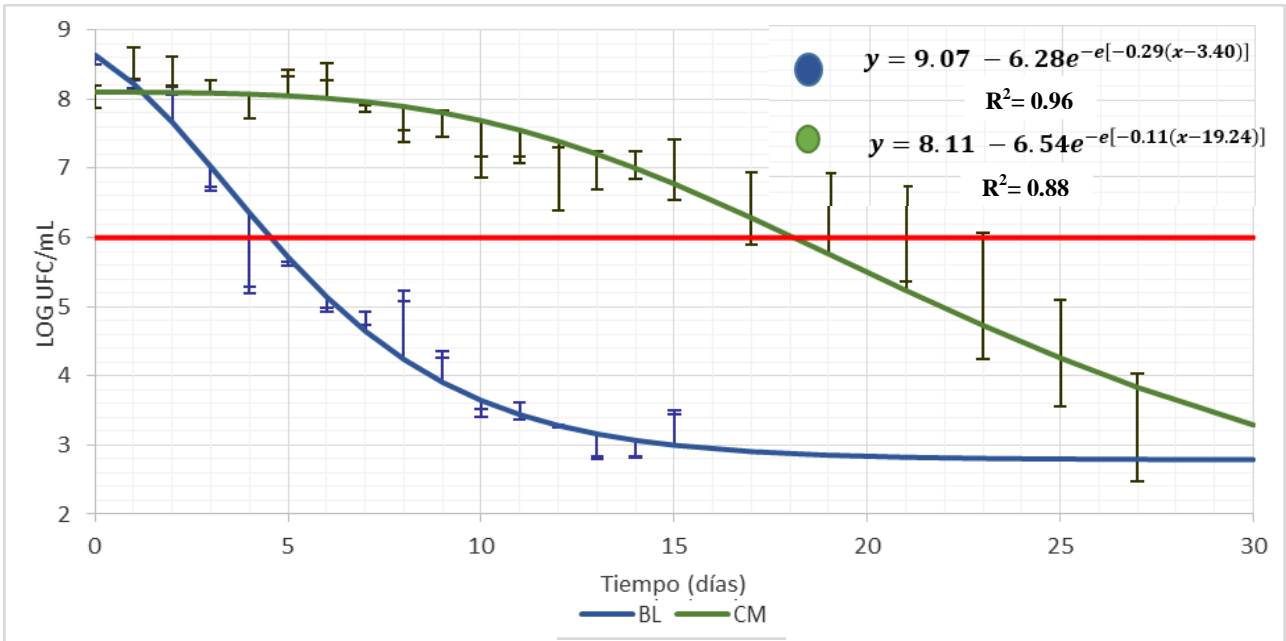
Las curvas de supervivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 iniciaron con una concentración comparablemente similar de  $10^8$  y  $10^9$  UFC/ml en los medios con chía molida y agua destilada, respectivamente (ver figura 10 y tabla 8). Durante la fase de supervivencia, *L. casei* mantiene su concentración por un período de 14.75 días, un lapso de tiempo prolongadamente mayor con relación al control, en el cual no exhibió fase de supervivencia desde el día de partida (ver tabla 9).

Mientras que en la fase de declinación, *L. casei* presenta un incremento en el tiempo en el cual la tasa de declinación es máxima, prolongando 17 días más la permanencia de las concentraciones de crecimiento de la cepa en la adición de chía molida con respecto al control. Del mismo modo, la pendiente de muerte bacteriana disminuyó notablemente en el medio con adición de chía molida respecto al control. De la misma manera, *L. casei* reduce su velocidad máxima de declinación en 38 % en el medio con adición de chía molida con respecto al control. De manera paralela, *L. casei* tarda 7.5 días más en declinar la mitad de la población con relación al control. Por último, las concentraciones finales de declinación disminuyen a valores cercanos a  $10^3$  UFC/ml, con una declinación aproximada aunque variante de  $10^6$  UFC/ml.

La viabilidad de *L. casei* cultivado en un medio con chía molida, se mantiene por encima de  $10^6$  UFC/ml hasta los 19 días (ver tabla 10). La concentración de *L. casei* presenta un tiempo de viabilidad de 15 días más en el medio con chía molida con respecto al control. Las diferencias son estadísticamente significativas ( $P=0.02$ ). De manera experimental, los lactobacilos evidencian un tiempo de viabilidad de 19 días con una concentración viable de  $1.78 \times 10^6$  UFC/ml (ver anexo 11).

Por lo tanto, la adición de semillas de “chía” mantienen las concentraciones de la cepa *Lactobacillus casei* ATCC 334 por sobre  $10^6$  UFC/ml durante 19 días de evaluación en agua destilada.

**Figura10.-CURVA DE SUPERVIVENCIA de *Lactobacillus casei* ATCC 334**



Supervivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en medio agua destilada (azul) y chíá molida (verde) representada en concentración log UFC/ml durante 15 días y 27 días de evaluación de 3 experimentos independientes, respectivamente. Coeficiente de correlación: agua, R=0.98 y chíá, R=0.94. Tiempo de viabilidad de *L. casei* en chíá molida: 18 días (R=0.97) y agua destilada: 4 días (R=0.99). Viabilidad mínima:  $10^6$  UFC/ml (rojo). Se muestran ecuaciones de la fase de supervivencia según modelo de Gompertz, obtenidos a partir de tres repeticiones en conjunto; las barras de error muestran límite inferior y límite superior, según datos experimentales. Detalles de parámetros en anexo 12 y de curvas en CurveExpert en anexo 13.

**Tabla8.- PARÁMETROS DE GOMPERTZ DE LA SUPERVIVENCIA de *Lactobacillus casei* ATCC 334**

PARÁMETROS	Medios	
	Agua	Chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
<b>A</b>	9.0037 ± 0.0872	7.8681 ± 0.2395
<b>B</b>	0.3005 ± 0.0103	0.1969 ± 0.0684
<b>C</b>	6.1556 ± 0.1038	5.9556 ± 0.5765
<b>M</b>	3.4314 ± 0.1105	20.3771 ± 2.8762

Parámetros de supervivencia de *L. casei* ATCC 334 en los medios agua destilada (control, azul) y chía molida (tratamiento, verde) en agua destilada durante 15 y 27 días de incubación respectivamente; según modelo de Gompertz, obtenidos a partir del programa CurveExpert. A= concentración de partida [log UFC/ml], b= pendiente de declinación [1/día], C= concentración máxima neta de declinación [log UFC/ml], y M= tiempo en el cual la tasa de declinación es máxima [días]. Datos expresados a partir de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de decrecimiento (promedio ± desviación standard).

**Tabla9.- DESCRIPTORES MICROBIOLÓGICOS DE LA SUPERVIVENCIA de *Lactobacillus casei* ATCC 334**

DESCRIPTORES MICROBIOLÓGICOS	Medios	
	Agua	Chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
<b>T<sub>de</sub></b>	0.4426 ± 0.0106	0.7575 ± 0.2396
<b>μ<sub>de</sub></b>	0.6804 ± 0.0165	0.4219 ± 0.1170
<b>λ<sub>e</sub></b>	(-)1.0367 ± 0.3494	14.7487 ± 5.0461

Descriptores microbiológicos de la supervivencia de *L. casei* ATCC 334 en los medios agua destilada (control, azul) y chía (tratamiento, verde); durante 15 y 27 días de incubación respectivamente, los datos fueron calculados a partir de los parámetros de supervivencia de la tabla 8. T<sub>de</sub>= tiempo generacional de declinación [días], μ<sub>de</sub>= velocidad máxima de declinación exponencial [(log UFC/ml) / días] y λ<sub>e</sub>= fase de supervivencia [días]. Datos expresados a partir de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento (promedio ± desviación standard).

**Tabla10.- VIABILIDAD de *Lactobacillus casei* ATCC 334**

VIABILIDAD	Medios	
	Agua	Chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
<b>T<sub>v</sub></b>	4.5368 ± 0.0397	19.5774 ± 3.0159(*)
<b>T<sub>ve</sub></b>	4.0000 ± 0.0000	19.0000 ± 4.0000
<b>C<sub>e</sub></b>	6.7100 ± 0.0300	6.2525 ± 0.2556

Estimados de viabilidad de *L. casei* ATCC 334 en los medios agua destilada (control, azul) y chía (tratamiento, verde) en agua destilada durante 15 y 27 días de incubación respectivamente. T<sub>v</sub>= tiempo de viabilidad [días], T<sub>ve</sub>= tiempo de viabilidad experimental [días] y C<sub>e</sub>= concentración viable experimental [log UFC/ml]. Datos obtenidos a partir de 3 repeticiones independientes (promedio ± desviación standard) por cada medio utilizado. El T<sub>v</sub> fue calculado a partir de la ecuación de Gompertz de las curvas de supervivencia de la figura10. Tiempo de viabilidad presenta 3% de diferencia a los resultados obtenidos de manera experimental. Prueba U de Mann-Whitney, significancia de pruebas: (\*) = Diferencia significativa frente a control [*P* <0.05].

#### 5.4.2. Supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

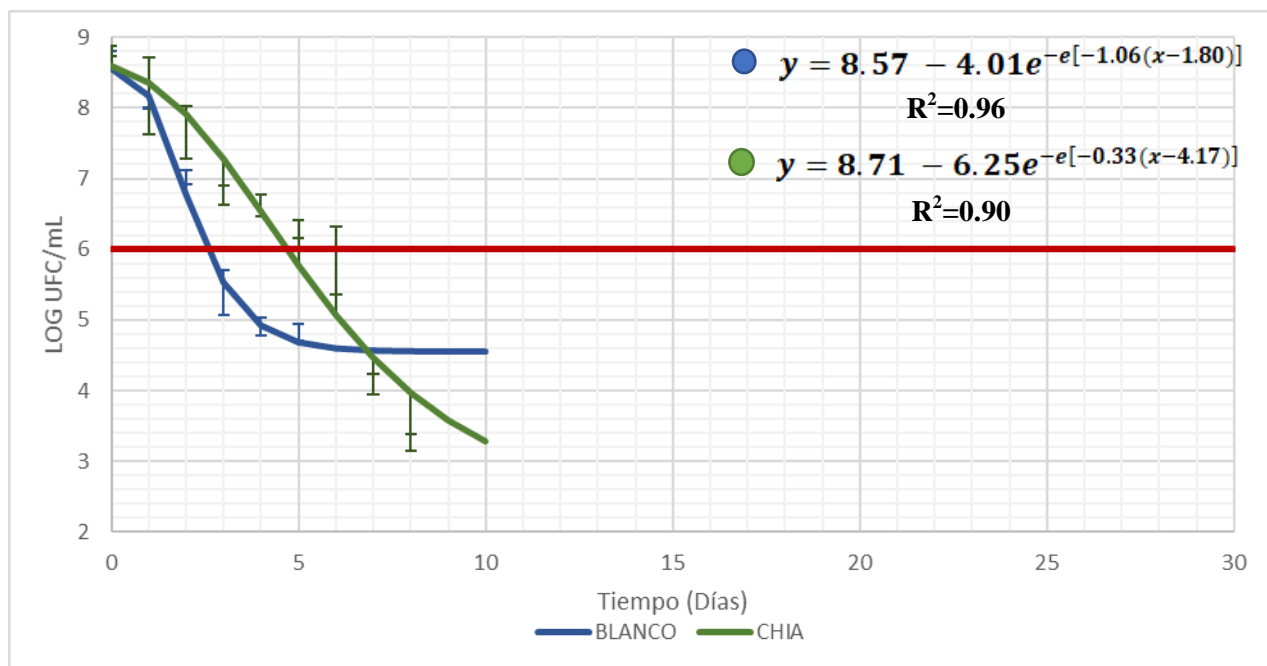
Las curvas de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 iniciaron con una concentración de  $10^8$  UFC/ml en los medios con adición de chía molida y agua destilada, ver tabla 11. Durante la fase estacionaria, *L. acidophilus* solo muestra un período de supervivencia de 1 día en la adición de chía molida equivalente al que se observa en agua destilada (ver figura 11 y tabla 12).

Por otro lado, en la fase de declinación, *L. acidophilus* presenta un ligero incremento en el tiempo en el cual la tasa de declinación se hace máxima, manteniendo 2 días más la supervivencia de la cepa en la adición de chía molida respecto al control. Del mismo modo, se observa una disminución de *L. acidophilus* en la pendiente de curva en la adición de chía molida, donde reduce la velocidad máxima de declinación en un 60 % en la adición de chía molida en relación al control. De manera paralela, *L. acidophilus* tarda 5.1 días más en declinar la mitad de la población en la adición de chía molida con relación al control. Por último, las concentraciones finales de declinación disminuyen a valores por debajo de  $10^5$  UFC/ml, con una declinación neta variante entre  $10^4$  -  $10^6$  UFC/ml.

Así, la viabilidad de *L. acidophilus* cultivado en un medio con adición de chía molida solo alcanza un tiempo de 4.7 días por encima de  $10^6$  UFC/ml (ver tabla 13). Los lactobacilos presentaron 2 días de viabilidad más en el medio con chía, tiempo ligeramente mayor respecto al cultivado en agua destilada. Las diferencias son estadísticamente significativas ( $P=0.02$ ). De igual manera, los lactobacilos muestran un tiempo de viabilidad cercano de 5 días con una concentración viable de  $1.29 \times 10^6$  UFC/ml, ver anexo 14.

Por lo tanto, la adición de semillas de “chía” no mantienen las concentraciones de la cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 por sobre  $10^6$  UFC/ml, más allá de los 4 días de evaluación en agua destilada.

**Figura 11.- CURVA DE SUPERVIVENCIA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356**



Supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en medio agua destilada (azul) y chía molida (verde), representada en concentración log UFC/ml durante 5 y 8 días de evaluación de 3 experimentos independientes, respectivamente. Coeficiente de correlación: agua destilada,  $R=0.98$  y chía molida,  $R=0.95$ . Tiempo de viabilidad de *L. acidophilus* en chía molida: 4 días ( $R=0.97$ ), agua destilada: 2 días ( $R=0.99$ ). Viabilidad mínima:  $10^6$  UFC/ml (rojo). Se muestran ecuaciones de la fase de supervivencia según modelo de Gompertz, obtenidos a partir de tres repeticiones en conjunto; las barras de error muestran límite inferior y límite superior, según datos experimentales. Detalles de parámetros en anexo 15 y de curvas en CurveExpert en anexo 16.

**Tabla11.- PARÁMETROS DE GOMPERTZ DE LA SUPERVIVENCIA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356**

PARÁMETROS	Medios	
	Agua	Chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
<b>A</b>	8.3021 ± 0.2797	8.8054 ± 0.1195
<b>B</b>	1.5994 ± 0.7721	0.3686 ± 0.0705
<b>C</b>	3.6236 ± 0.3383	6.2566 ± 0.3593
<b>M</b>	1.9753 ± 0.2128	4.0112 ± 0.1747

Parámetros de supervivencia de *L. acidophilus* ATCC 4356 en los medios agua destilada (control, azul) y chía molida (tratamiento, verde) en agua destilada durante 5 y 8 días de incubación respectivamente; según modelo de Gompertz, obtenidos a partir del programa CurveExpert. A= concentración de partida [log UFC/ml], b= pendiente de declinación [1/día], C= concentración máxima neta de declinación [log UFC/ml], y M= tiempo en el cual la tasa de declinación es máxima [días]. Datos expresados a partir de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de decrecimiento (mediana ± rango intercuartil).

**Tabla12.- DESCRIPTORES MICROBIOLÓGICOS DE LA SUPERVIVENCIA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356**

DESCRIPTORES MICROBIOLÓGICOS	Medios	
	Agua	Chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
<b>T<sub>de</sub></b>	0.1412 ± 0.0662	0.3548 ± 0.0732
<b>μ<sub>de</sub></b>	2.1321 ± 0.9086	0.8485 ± 0.1284
<b>λ<sub>e</sub></b>	1.3354 ± 0.8584	0.8282 ± 1.3745

Descriptores microbiológicos de la supervivencia de *L. acidophilus* ATCC 4356 en los medios agua destilada (control, azul) y chía molida (tratamiento, verde); en agua destilada durante 5 y 8 días de incubación respectivamente, los datos fueron calculados a partir de las ecuaciones con los parámetros de supervivencia de Gompertz, tabla 11. T<sub>de</sub>= tiempo generacional de declinación [días], μ<sub>de</sub>= velocidad máxima de declinación exponencial [(log UFC/ml) / días] y λ<sub>e</sub>= fase de supervivencia [días]. Datos expresados a partir de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento (mediana ± rango intercuartil).

**Tabla13.-** VIABILIDAD de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

VIABILIDAD	Medios	
	Agua	Chía
	$\bar{X} \pm S$ (n=3)	$\bar{X} \pm S$ (n=3)
$T_v$	$2.4694 \pm 0.1637$	$4.6357 \pm 0.0792$ (* )
$T_{ve}$	$2.0000 \pm 0.0000$	$5.0000 \pm 0.5000$
$C_e$	$6.9754 \pm 0.1039$	$6.3294 \pm 0.1094$

Estimados de viabilidad de *L. acidophilus* ATCC 4356 en los medios agua destilada (control, azul) y chía molida (tratamiento, verde) en agua destilada durante 5 y 8 días de incubación respectivamente.  $T_v$ = tiempo de viabilidad [días],  $T_{ve}$ = tiempo de viabilidad experimental [días] y  $C_e$ = concentración viable experimental [log UFC/ml]. Datos obtenidos a partir de 3 repeticiones independientes (mediana  $\pm$  rango intercuartil) por cada medio utilizado. El  $T_v$  fue calculado a partir de la ecuación de Gompertz de cada curva de supervivencia de la figura11. Tiempo de viabilidad presenta 12% de diferencia a los resultados obtenidos de manera experimental. Prueba U de Mann-Whitney, significancia de pruebas: (\*) = Diferencia significativa frente a control [ $P < 0.05$ ].

### 5.5. Análisis fisicoquímico de la Chía

Las semillas de chía muestran una alta proporción de grasas, presentan una alta concentración de fibra cruda y proteínas en relación a los demás componentes del sustrato. Sin embargo, según los valores de la etiqueta nutricional del producto, los estimados de carbohidratos y fibra cruda, respectivamente son de mayor proporción (ver tabla 14).

**Tabla14.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS SEMILLAS DE CHÍA**

	<b>CHÍA</b>	<b>CHÍA ETIQUETA</b>
<b>Humedad (gr)</b>	1.25 ±0.06	6.20
<b>Cenizas (gr)</b>	4.17 ± 0.17	4.50
<b>Grasas (gr)</b>	30.59 ± 0.58	23.67
<b>Proteínas (gr)</b>	21.76 ± 0.10	16.54
<b>Carbohidratos (gr)</b>	14.80 ± 0.08	42.12
<b>Fibra cruda (gr)</b>	27.43 ± 0.55	34.40

Composición química de las semillas de chía en gramos por una porción de 100 gramos. Datos obtenidos a partir de 3 repeticiones en cada ensayo. Valores teóricos de semillas de chía según etiqueta nutricional del producto. (Promedio ± desviación standard). Se muestran los resultados promedio de los análisis en el anexo 19.

## VI. DISCUSIÓN

Las propiedades nutricionales y preventivas de enfermedades de parte de las semillas de chía (*Salvia hispánica* L.), entre ellas enfermedades cardiovasculares, diabetes y desórdenes inflamatorios y nerviosos (66); sugieren su aplicación como posible alimento funcional, así como también la utilización de las mismas en alimentos simbióticos. En el presente estudio se evalúa el efecto de las semillas de chía molida en el crecimiento de microorganismos como *Lactobacillus* spp para su propuesta en la incorporación de alimentos simbióticos.

Los resultados de esta tesis muestran la propiedad estimulante de las semillas de la chía molida en el crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334. Así, se muestra el mantenimiento de la concentración por sobre  $10^6$  UFC/ml por un tiempo de viabilidad de 19 días. También, logra estimular el crecimiento de *L. casei* ATCC 334 en el aumento de la velocidad máxima de crecimiento exponencial y la disminución del tiempo de duplicación. De esta manera, las semillas de chía molida cumplirían uno de los requisitos necesarios para ser caracterizadas como candidato a una sustancia prebiótica. En el campo alimentario, *L. casei* es capaz de producir metabolitos como ácido láctico y ácido acético que podrían inhibir o regular el crecimiento de bacterias alterantes de la composición química y sensorial, y así prolongar el tiempo de vida útil de aquellos alimentos que la presenten. Además, entre las bondades de esta especie, se encuentran la optimización de las cualidades organolépticas como la producción de compuestos aromáticos en el desarrollo de sabor (84). Es indispensable realizar otras pruebas que apoyen la condición de prebiótico, tales como la tolerancia de esta semilla a condiciones gastrointestinales, es decir, la acidez gástrica y enzimas proteolíticas; así como el potencial “prebiótico” frente a otras cepas de origen patogénico. Además, sería necesario el uso de un mayor número de repeticiones de los ensayos, la procedencia de muestras de diferentes fuentes geográficas así como de variaciones fenotípicas, pues se podría explicar así el efecto prebiótico en una macro escala.

Notablemente, el potencial del efecto de las semillas de chía en el crecimiento de *L. casei* ATCC 334, provendría de los atributos nutritivos del mucílago que exudan las semillas. Desde luego, el mucílago de esta semilla en condiciones de exudación, provee una rica

fuentes de fibra soluble e insoluble, específicamente hemicelulosa y compuestos como el ácido-glucurónico, D-Xilosa y D-Manosa y bajas proporciones de D-arabinosa, D-glucosa y ácido galacturónico (3, 15), siendo un posible agente estimulante del crecimiento de las cepas lácticas. Recientemente, este mucílago fue estudiado estructuralmente en su composición química por una metodología moderna, como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional, en el cual se encontró un compuesto trisacárido, denominado planteosa, del grupo de los oligosacáridos galactosil-sacarosa ( $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-fructofuranosil-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopyranosido), y los cuales están presentes en los granos de trigo, centeno y de legumbres (73). Aún más, la planteosa es un compuesto ya reconocido como un prebiótico, pues promueve el crecimiento de bacterias benéficas e inhiben bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal. Es así como se deslució que la planteosa fue la fuente prebiótica clave del mucílago de las semillas de chía con el efecto estimulante en las cepas lácticas. En efecto, este oligosacárido presenta un 76% de efectividad prebiótica en la capacidad de fuerza aceptora en el metabolismo de los microorganismos beneficiosos (74), es decir, tiene un alto grado de asociación como sustrato con las enzimas lácticas; este porcentaje representa un porcentaje similar en comparación a otras sustancias prebióticas como la celobiosa (72 %) y la lactosa (79 %).

De acuerdo a la composición nutricional, las semillas de chía presentan valores cercanos a los resultados fisicoquímicos obtenidos en este estudio. Similarmente, Jiménez (14), expone que la composición de las semillas de chía, posee una mayor proporción de fibra dietética de 33.0 gr aunque menor en carbohidratos 8.6 gr. Las variaciones entre los estudios, radica principalmente en la variedad de la semilla, lugar geográfico y otros factores agronómicos de las plantas. En conjunto, una propiedad fisicoquímica de las semillas de chía es la alta proporción de fibra dietética, contenido graso y proteínas en su composición; lo cual correlacionaría los resultados sobre la estimulación en el crecimiento de *L. casei*.

En la evaluación de la viabilidad de las cepas lácticas, estas alcanzan un período menor a 30 días de estudio probablemente a la presentación del sustrato, a la disponibilidad de nutrientes existente en el medio, en la concentración de sustrato, en la cantidad del inóculo

de cepa inicial y en las condiciones óptimas de crecimiento de cada cepa. De manera similar a este estudio, se ha realizado la evaluación de viabilidad de *Lactobacillus casei* en un medio con harina de linaza integral que presentó un crecimiento durante los 30 días de incubación a 32°C (2); sin embargo, otros estudios resaltan que *L. casei* presenta una viabilidad de 12 días en medios que contienen harina de Linaza desgrasada por sobre 10<sup>6</sup> UFC/ml incubadas a 32°C aeróbicamente (9). Además, la adición de chía incorporado en un mix de cereales (Trigo, Linaza, chía) y con la adición de cepas probióticas como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus spicheri*; muestra la viabilidad de estas cepas durante el almacenamiento del producto, obteniendo un recuento superior a 10<sup>10</sup> UFC/ml los 30 días de evaluación (57), debido a la presencia de otros sustratos prebióticos participantes como parte de las semillas de linaza y trigo, lo cual posiblemente se explicaría por sinergismo enzimático de ambas cepas lácticas. Asimismo, un estudio indica que el uso del mucílago y proteínas solubles pertenecientes a las semillas de chía aumentan la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* de 10<sup>11</sup> UFC/ml por un periodo de 45 días en condiciones de refrigeración a 4°C (72); lo que nos muestra que la incubación de cepas lácticas en condiciones refrigerantes podría ser un factor de las concentraciones viables en el tiempo.

Comparando la capacidad estimulante de la chía con la de otros sustratos prebióticos utilizados en el crecimiento de *L. casei* es relativamente de mediana a baja debido a los requerimientos nutricionales de otros factores como aminoácidos y vitaminas. Las matrices de Mora (*Rubus glaucus*) con adición de inulina y FOS, impregnadas al vacío y liofilizadas, mostraron tener un efecto prebiótico sobre la viabilidad de *L. casei* ATCC 393 por un periodo de 40 días (60), mientras que la viabilidad de *L. casei* LC-01 con la incorporación de yacón seco permaneció 56 días en almacenamiento (75); debido a la presencia de carbohidratos fermentables como la inulina y fructo-oligosacáridos en las raíces almacenadas de esta planta. Existen otros factores que influyen en la viabilidad y vitalidad probiótica tales como la acidez, producción de peróxido, estrés osmótico y temperatura de almacenamiento (76). La producción de ácido láctico y acético como parte del metabolismo láctico, así como la presencia de oxígeno en el caso de *L. acidophilus* podrían contribuir a una baja viabilidad.

Lo que es más, el mucílago de las semillas de chan (*Hyptis suaveolens* L.), perteneciente a la familia *Lamiaceae*, presenta características prebióticas en el crecimiento de probióticos entre los cuales se encuentran incluidas *L. acidophilus* LA-5 y *L. paracasei* ssp. *Paracasei*. Esto debido a su composición rica en polisacáridos ácidos, como fucosa, xilosa y residuos 4-O-metilglucurónico, y polisacáridos neutrales, galactosa, glucosa y manosa (77). Similarmente, es comparable a la composición del mucílago de la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) que también presenta residuos de polisacáridos de Manosa, Glucosa, Xilosa y Ácido glucurónico.

Durante el crecimiento bacteriano de *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, éstas alcanzan un estado de fase de muerte en el cual la escasez de nutrientes del medio genera la lisis celular real de la población, teniendo como característica la disminución de crecimiento de forma exponencial (53,54). Esta fase se evidencia en la disminución del crecimiento en el medio control- agua destilada, siendo patrón de comparación para el medio chía molida, los cuales alcanzan esta fase de muerte varios días después del consumo hasta la escasez de nutrientes en estos medios. Además, durante las pruebas piloto se observó la presencia de una microflora natural en las semillas de chía; se aislaron colonias y fueron sembradas en caldo y agar MRS, compuesta principalmente por bacilos GRAM+ esporulados, posiblemente del género *Bacillus* spp.; por esta razón existiría la probabilidad del incremento de estos bacilos en los medios con agua excluyendo por competencia microbiana el crecimiento de los lactobacilos en estudio. Aun así, para el proceso de experimentación en la evaluación de parámetros de crecimiento así como en el análisis de supervivencia, se controló el crecimiento de estos microorganismos por la adición de ácido acético y L-cisteína (pH=5.5) al inicio del experimento. Durante el crecimiento, los lactobacilos producen ácido láctico, ácido acético y metabolitos inhibitorios, los cuales por competencia lograban mantener el crecimiento de estos en el tiempo.

Con respecto al metabolismo de los *Lactobacillus*, éstas poseen una capacidad metabólica de compuestos oligosacáridos como: FOS,  $\beta$ GOS, IMO, así como oligosacáridos pertenecientes a la familia a las rafinosas (RFO) (78). La planteosa, un compuesto

perteneciente al grupo de las RFO, podría ser fermentada por los microorganismos probióticos de este estudio así como de otras más especies dentro de este género. En su consumo, los oligosacáridos de las RFO se consideran factores anti-nutritivos, debido a que causa flatulencia dependiente de la dosis y molestias gastrointestinales. Los *Lactobacillus*, logran la conversión de RFO a  $\alpha$ GOS (78), lo que prevendría las molestias intestinales ocasionadas por las RFO sin eliminar sus propiedades prebióticas. También, se liberan residuos de sacarosa, los cuales junto con la glucosa, completan la degradación de RFO a través de enzimas metabólicas de la glucosa (78), es decir, durante el proceso de fermentación lo que podría ocurrir es una compilación enzimática en la asimilación de los nutrientes de chía, como  $\alpha$ -galactosidasas y/o glicosil-hidrolasas. Así, las cepas de este estudio, sobretodo de *Lactobacillus casei* ATCC 334, podrían metabolizar la oligosacáridos del compuesto planteosa.

No obstante, el metabolismo de *Lactobacillus casei* ATCC 334, de naturaleza heterofermentativa, presenta una diversidad de rutas fermentativas con una capacidad adaptativa y enzimática para consumir sustratos y producir lactato, acetato y CO<sub>2</sub>. Por ejemplo, algunas rutas características de esta cepa láctica, se encuentran; de carbohidratos como vía Embden-Meyerhof (hexosas), vías 6-fosfogluconato/fosfoctolasa (pentosas) y metabolismo de galactosa; de aminoácidos, como el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, así como la degradación de valina, leucina e isoleucina, y metabolismo de histidina; y de vitaminas como metabolismo de timinas y de folatos (80); estos aminoácidos y vitaminas presentes en las semillas de chía, por lo que también podrían estar metabolizando estos nutrientes en el presente estudio. Comparativamente, la capacidad fermentativa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, es de naturaleza homofermentativa, produciendo así ácido láctico. A diferencia de *L. casei*, tiene un rango limitado de rutas de fermentación; como el catabolismo de carbohidratos y aminoácidos, aunque también puede utilizar vitaminas como timina y folato para su crecimiento. Este microorganismo, utiliza la glucosa vía Embden-Meyerhof; y entre ciertos azúcares que logra fermentar se encuentran glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y galactosa; y metabolizan galactosa a través de la vía Leloir (81). La galactosa y glucosa presentes en la estructura mucilaginoso de chía como la planteosa, puede incrementar el crecimiento de esta cepa láctica en adición de chía. Sin

embargo, esta mayor variedad de rutas enzimáticas de *L. casei* explicaría su alta capacidad fermentativa en comparación a *L. acidophilus*. Además, la capacidad de fermentación de *L. casei* estaría siendo explicada por la presencia de plántula, aminoácidos y vitaminas presentes en las semillas de chía en presentación como Chía molida.

Durante el crecimiento bacteriano en el medio MRS, se observan en las curvas de los datos experimentales un crecimiento a manera de escaleras; en las curvas de *L. casei*, esto representaría el constante consumo y la adaptación enzimática a los sustratos del medio, pues aparentemente se muestra una fase diafórica al final de la fase exponencial, debido a la escasez de nutrientes en el medio y alcanzando un equilibrio en la fase estacionaria, en anexo 7. Mientras que en las curvas de supervivencia en el anexo 13, las pendientes de concentración máxima de crecimiento podrían ser explicadas debido al uso de distintos sustratos a lo largo del crecimiento de los lactobacilos. A todo esto, el diferente consumo de sustratos a lo largo de las curvas de crecimiento y las curvas de supervivencia, se explicaría por la propiedad de represión catabólica por carbono [RCC] (82), lo cual se esquematiza en las gráficas mostradas debido a la inhibición de la expresión de genes requeridos para la utilización de fuentes de carbono secundarias, siendo causadas por sustratos carbonados como la glucosa.

Así también, la evaluación de parámetros cinéticos de crecimiento fue de utilidad para determinar el efecto de la semilla chía sobre la estimulación del crecimiento de las cepas lácticas. Donde a una mayor velocidad máxima de crecimiento y menor tiempo de duplicación; conduciría al efecto estimulante de la adición de Chía molida frente al control.

La concentración de *Lactobacillus casei* ATCC 334 aumenta en un 0.31 UFC/ml cada hora; y le toma 59 min en generar una nueva duplicación microbiana en la población en un medio con MRS (69), medio en el cual ambos descriptores microbiológicos son cercanos a los encontrados en este estudio. Comparando esto con el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, la tasa de crecimiento de esta cepa es de  $1.0 \text{ h}^{-1}$  y le toma 42 minutos en generar una nueva duplicación microbiana en el medio MRS (79), resultado ligeramente menor al valor obtenido, probablemente a la escasez de aminoácidos y

cofactores enzimáticos en el medio (52), elementos críticos para el crecimiento de *L. acidophilus*.

Sobre la estimación de parámetros cinéticos de crecimiento de bacterias lácticas con adición de un prebiótico, se exhibe un efecto comparable a la adición de raftilosa al 5 % en el crecimiento de *Lactobacillus casei* L1 (83), puesto que el tiempo de duplicación disminuye en un [-13 %] con la adición de prebiótico; efecto mayor incluso a la adición de miel [-9 %]. Considerando que la adición de chía molida en una concentración de 0.25 % presenta un efecto estimulante [-14.1 %] en el crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en MRS. Sin embargo, en el caso *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, los resultados de este estudio tienen una tasa de crecimiento relativamente baja aunque similar al crecimiento en hidrolizados de cebada [ $0.33 \text{ h}^{-1}$ ] (52), debido a que el citado estudio añade la adición de enzimas hidrolizantes en los sustratos y permitiendo una mayor disponibilidad de nutrientes como aminoácidos y vitaminas en el medio.

El crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en un medio MRS con adición de chía molida es similar al crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* en un medio con adición de Inulina de Agave al 1.0% (61), por presentar una velocidad en el crecimiento y tiempo de duplicación de  $1.29 \text{ h}^{-1}$  [+17%] y 47 min [-13%]. Así también, la misma cepa es comparable al crecimiento de *Aerococcus viridans* en un medio con adición de Albedo de Naranja al 1.0% con una velocidad en el crecimiento de  $1.25 \text{ h}^{-1}$  [+14%] y un tiempo de duplicación de 48 min [-12%] (61); cabe resaltar que en el estudio comparado la medición de sustrato prebiótico fue realizado en el medio TPY (Tripticasa Levadura Peptona) + glucosa en la inoculación inicial.

En relación a la aplicación del modelo de Gompertz, cabe resaltar que esta herramienta matemática ha sido de gran utilidad en relación al uso previo al modelo de Monod, puesto que muestra un coeficiente de determinación alto para la explicación de los resultados presentados. Asimismo, los parámetros estimados aportan información relevante acerca del comportamiento de los lactobacilos del estudio en cada fase de la curva y mejorando la precisión del cálculo de los descriptores microbiológicos. Conjuntamente, se recomienda su uso en aquellas evaluaciones de estudios de alimentos con la adición de un sustrato

candidato a prebiótico y en estudios de viabilidad; a pesar de no ser una herramienta sencilla de manejar, se podría utilizar para la comparación homogénea de otros estudios.

Los metabolitos secretados por las bacterias residentes del intestino pueden funcionar como agentes modulantes de la expresión genética influyendo en la reducción del riesgo a contraer enfermedades como cáncer colo-rectal, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, efectos anti-inflamatorios e inmunológicos, e incluso efectos neurológicos (85 -87). El consumo de alimentos con propiedades prebióticas, que adicionalmente presentan nutrientes para el organismo, en conjunto con cepas probióticas, podría estimular la producción de metabolitos beneficiosos, los cuales permitirían alcanzar estrategias terapéuticas, como la administración de alimentos simbióticos en casos de infecciones gastrointestinales, así como para la prevención y tratamiento de distintas enfermedades en el futuro próximo.

## VII. CONCLUSIONES

1. Las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) favorecen el crecimiento y la viabilidad de *Lactobacillus casei* ATCC 334. Sin embargo, las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) no favorecen el crecimiento ni la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.
2. La adición de chía aumenta significativamente la velocidad máxima de crecimiento exponencial de *Lactobacillus casei* en un medio MRS en 16.7 % ( $P<0.05$ ) en comparación al medio control (caldo MRS). Por otro lado, la adición de chía en un medio MRS no muestra cambios en el tiempo de generación de *L. acidophilus* ( $P=0.14$ ) comparación al medio control.
3. La adición de chía disminuye significativamente el tiempo de generación de *Lactobacillus casei* en un medio MRS en 14.1 % ( $P<0.05$ ) en comparación al medio control (caldo MRS). Por otro lado, la adición de chía en un medio MRS no muestra cambios en la velocidad máxima de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ( $P=0.06$ ) en comparación al medio control (caldo MRS).
4. El tiempo de viabilidad de *Lactobacillus casei* es significativamente mayor ( $P<0.05$ ) en un medio con chía en un período de 19 días, en relación al control (agua destilada). En este tiempo muestra una concentración viable de  $1.78 \times 10^6$  UFC/ml. Por otro lado, El tiempo de viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* es de 4 días en un medio con chía ( $P<0.05$ ). En este tiempo muestra una concentración viable de  $1.29 \times 10^6$  UFC/ml (agua destilada).
5. La mayor proporción de fibra cruda y proteínas presentes en las semillas de chía podría estimular el crecimiento de *L. casei* ATCC 334.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

1. Determinar el compuesto prebiótico de la semilla chía (*Salvia hispanica* L.) capaz de estimular el crecimiento de las cepas lácticas propuestas en este estudio.
2. Evaluar la viabilidad del efecto prebiótico de la chía en el crecimiento de otras cepas probióticas y en otras en matrices alimentarias para su comparación.
3. Determinar un perfil de la producción de ácidos grasos de la fermentación de la chía por bacterias lácticas como las evaluadas en este estudio.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases [Internet]. Vol. 916, World Health Organization technical report series. Geneva; 2003. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12768890&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/734F6B31-260B-4545-A8E4-57F7D35DDEB8>
2. Baeza Vallejo MA. Determinación del efecto prebiótico de la harina de semilla de linaza (*Linum usitatissimum* L.), evaluado a través de dos microorganismos probióticos, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en aerobiosis. Universidad Austral de Chile; 2008.
3. Muñoz Hernandez L. Mucilage from Chia Seeds (*Salvia hispanica*): microestructure, physico-chemical, characterization and applications inf food industry. Pontificia Universidad Catolica de Chile; 2012.
4. Sanz Y, Dalmau J. Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea que regula los alimentos funcionales. *Acta Pediatr Española*. 2008;66(1):27–31.
5. Sanz Y, Collado MC, Dalmau J. Probioticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediatr Esp*. 2003;61(9):476–82.
6. Valdivia-López MA, Tecante A. Chia (*Salvia hispanica*): A review of Native Mexican and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2015; 53-71.
7. Shori AB. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2015;4(4):423–31.
8. Dahiya DK, Renuka, Puniya M, Shandilya UK, Dhewa T, Kumar N, et al. Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: A review. *Front Microbiol*. 2017;8(APR):1–17.
9. Ampuero A. Determinación de la capacidad de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* para liberar lignanos a partir de harina de linaza. Universidad Austral de

- Chile; 2011.
10. Jamboonsri W, Phillips TD, Geneve RL, Cahill JP, Hildebrand DF. Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L.-a new w3 source. *Genet Resour Crop Evol.* 2012;59(2):171–8.
  11. Jaramillo Garcés Y. La chía (*salvia hispanica* L.), una fuente de nutrientes para el desarrollo de alimentos saludables. Corporación Universitaria Lasallista; 2013.
  12. Mohd Ali N, Yeap SK, Ho WY, Beh BK, Tan SW, Tan SG. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:9.
  13. Sendra E, Sayas-Barberá ME, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Effect of Food Composition on Probiotic Bacteria Viability. In: *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016. p. 257–69. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128021897000174>
  14. Paula J, Lilia M, Vilma Q. Chemical composition of chia seed, flaxseed and rosehip and its contribution in fatty acids omega-3. *Rev Chil Nutr.* 2013;40(2):155–60.
  15. Lin KY, Daniel JR, Whistler RL. Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydr Polym.* 1994;23(1):13–8.
  16. Aguirre M, Jonkers DMAE, Troost FJ, Roeselers G, Venema K. In vitro characterization of the impact of different substrates on metabolite production, energy extraction and composition of gut microbiota from lean and obese subjects. *PLoS One.* 2014;9(11):1–23
  17. Flores Miranda C. Evaluación Agronómica del cultivo de chía (*Salvia hispánica* L.) con dos densidades de siembra y dos tipos de fertilizante orgánico, en la comunidad de Manzanayocc – Acobamba. Universidad Nacional del Huancavelica; 2017.
  18. Pastor Paredes S. Efecto de seis densidades de siembra en el rendimiento y calidad de *Salvia hispanica* L. CV. Negra en Moche, Trujillo – La libertad. Universidad Nacional de Trujillo; 2015.
  19. Silveira Coelho M., Salas-Mellado MM. Effects of substituting chia (*Salvia*

- hispanica* L.) flour or seeds for wheat flour on the quality of the bread. Food Science and Technology. 2015: 729-736
20. Muñoz LA, Cobos A, Díaz O, Aguilera JM. Chia seeds: microstructure, mucilage extraction and hydration. Journal of Food Engineering. 2012; 216-224.
  21. Vuksan V, Jenkins A, Dias A, Lee A, Jovanovski E, Rogovik A, et al. Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica* L.). Eur J Clin Nutr [Internet]. 2010;64(4):436–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2009.159>
  22. da Silva Marineli R, Soares Moura C, Aguiar Moraes É, Alves Lenquiste S, Barboza Lollo PC, Neder Morato P, et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 $\alpha$  expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. Nutrition. 2015;31(5):740–8.
  23. Urrutia O, Soret B, Insausti K, Mendizabal JA, Purroy A, Arana A. The effects of linseed or chia seed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs. Small Rumin Res [Internet]. 2015;123(2–3):204–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.12.008>
  24. da Silva Marineli R, Alves Lenquiste S, Aguiar Moraes É, Maróstica Jr. MR. Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. Food Res Int. 2015;76:666–74.
  25. Ferrari Felisberto MH, Wahanik AL, Rodrigues Gomes-Ruffi C, Pedrosa Silva Clerici MT, Kil Chang Y, Joy Steel C. Use of chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage gel to reduce fat in pound cakes. LWT - Food Sci Technol. 2015;63(2):1049–55.
  26. Escudero Álvarez E, González Sánchez P. La fibra dietética. Nutr Hosp. 2006;21(SUPPL. 2):61–72.
  27. Olveira Fuster G, Gonzalez-Molero I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica.

- Nutr Hosp. 2007;22(SUPPL. 2):26–34.
28. Wessel J J, Bultosa G, Dawa D. Functional Foods: Dietary Fibers, Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics. AbbottNutritionHealthInstitute.org. 2016. p. 11–6.
  29. Oliveira G, González-Molero I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinol y Nutr [Internet]*. 2016;63(9):482–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>
  30. Dey M. Toward a Personalized Approach in Prebiotics Research [Internet]. Vol. 9, *Nutrients*. Brookings; 2017. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/2/92>
  31. Valdovinos MA, Montijo E, Abreu AT, Heller S, González-Garay A, Bacarreza D, et al. Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Rev Gastroenterol México [Internet]*. 2017;23. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0375090616300933>
  32. Holzapfel WH, Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*. 2002; 35: 109-116
  33. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes [Internet]*. 2017 Mar 4;8(2):172–84. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2017.1290756>
  34. Sousa C de, Santos EF dos, Sgarbieri VC. The Importance of Prebiotics in Functional Foods and Clinical Practice. *Food Nutr Sci [Internet]*. 2011;2(2):133–44. Available from: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=4536&#abstract>
  35. FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria [Internet]. Fao & Who. Córdoba; 2001. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Health+and+Nutritional+Properties+of+Probiotics+in+Food+including+Powder+Milk+with+Live+Lac>

tic+Acid+Bacteria#2%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Health+and+Nutrit

36. Slattery J, MacFabe DF, Frye RE. The Significance of the Enteric Microbiome on the Development of Childhood Disease: A Review of Prebiotic and Probiotic Therapies in Disorders of Childhood. *Clin Med insights Pediatr* [Internet]. 2016;10:91–107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27774001>
37. dos Reis SA, da Conceição LL, Siqueira NP, Rosa DD, da Silva LL, Peluzio M do CG. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutr Res* [Internet]. 2017;37:1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2016.11.009><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531716303943>
38. Komatsu S, Yokoyama Y, Nagino M. Gut microbiota and bacterial translocation in digestive surgery: the impact of probiotics. *Langenbeck's Arch Surg* [Internet]. 2017; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00423-017-1577-6>
39. Zamudio L. K, Zavaleta I. A. Estudio del potencial probiótico de Lactobacilos aislados de fuentes naturales. *Cienc Invest*. 2003;6(1):30–5.
40. Calpa-Yamá F, Chaspuengal-Tulcán A. Evaluación in vitro de Lactobacillus casei con características probióticas sobre Yersinia pseudotuberculosis. Universidad de Nariño; 2013.
41. Ganji-Arjenaki M, Rafieian-Kopaei M. Probiotics Are a Good Choice in Remission of Inflammatory Bowel Diseases: A Meta Analysis and Systematic Review. *J Cell Physiol* [Internet]. 2017;(March). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.25911>
42. Zhang Q, Wu Y, Fei X. Effect of probiotics on glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 2016;52(1):28–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010660X15001147>

43. Ohland CL, Mac Naughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010; 298: G807-G819.
44. Ruiz MJ, Colello R, Padola NL, Etcheverría AI. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Rev Argent Microbiol*. 2017;49(2):174–7.
45. Pia Taranto M, Médici M, Font Valdez G. Alimentos funcionales probióticos. *Quim Viva*. 2005;4(1):26–34.
46. Dellaglio F, Dicks L. Designation of ATCC 334 in Place of ATCC 393 (NCDO 161) as the Neotype Strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and Rejection of the Name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al., 1989) - Request for opinion. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1991;41(2):340–2. Available from: <http://ijs.sgmjournals.org/content/41/2/340.short>
47. Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. *Journal of Bacteriology*. 2010; 192(9): 2445-2458.
48. Tsai TL, Li AC, Chen YC, Liao YS, Lin TH. Antimicrobial peptide m2163 or m2386 identified from *Lactobacillus casei* ATCC 334 can trigger apoptosis in the human colorectal cancer cell line SW480. *Tumor Biology*. International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM): 2015.
49. Hansen PA, Mocquot G. *Lactobacillus acidophilus* (Moro) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1970;20(3):325–7.
50. Khalegui M, Kasra R, Yaghoobi MM, Zarkesh-Esfahani SH, Baghizadeh A. Assessment of Bile Salt Effects on S-Layer Production, *slp* Gene Expression and, Some Physicochemical Properties of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010; 20(4): 749-756.
51. Prado M, Palomino MM, Allievi MC, Sanchez C, Ruzal SM. Murein Hydrolase

- Activity in the Surface Layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74(24): 7824-7827.
52. Del Aguila Cortijo JM, Delgado Galvez JL. Evaluación de los hidrolizados de *Chenopodium Quinoa Wildnow* (Quinoa), *Hordeum Vulgare* (Cebada) y el *Glycine Max* (Soya) como sustrato beneficioso para la preparación de un producto nutracéutico a base de *Lactobacillus acidophilus*. Universidad Nacional De Trujillo; 2015.
  53. Bartha R, Atlas R. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4ta edición. Madrid: Pearson Education; 2001.
  54. Madigan M, Martinko J, Parker J. *Biología de los microorganismos*. 10ma edici. Madrid: Prentice-Hall; 2003.
  55. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Introducción a la Microbiología*. 9na edición. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2007.
  56. Gonzáles JP, Sosa MSS. Desarrollo de una bebida probiótica de *Aloe perfoliata* var. Vera (Sábila) utilizando *Lactobacillus casei shirota*. Universidad de El Salvador; 2016
  57. Gautam N, Sharma N. Quality attributes of a novel cereal based probiotic product prepared by using food grade lactic acid bacteria. *Indian J Tradit Knowl*. 2014;13(3):525–30.
  58. Obando C M, Brito C CS, Schöbitz T RP, Baez M LA, Horzella R MY. Viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 durante el almacenamiento de queso cottage. *Vitae*. 2010;17(2):141–8.
  59. Coronado Panta A. Elaboración de la harina de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) y su influencia en el crecimiento de dos bacterias probióticas. 2013;71.
  60. Rodríguez-Barona S, Giraldo GI, Zuluaga YP. Evaluación de la incorporación de fibra prebiótica sobre la viabilidad de *Lactobacillus casei* impregnado en matrices de

- mora (*Rubus glaucus*). *Inf Tecnol*. 2015;26(5):25–34.
61. Díaz-Vela J, Mayorga-Reyes L, Totosaus S A, Pérez-Chabela M de L. Parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas termotolerantes con diferentes fuentes de carbono. *Vitae, Rev la Fac química Farm*. 2012;19(3):253–60.
  62. García Zaragoza E, Moreno Pagán J, García Segovia P. Diseño de una bebida en polvo pre y probiótica a base de lulo (*Solanum quitoense*). 2013;1–22. Available from: <https://riunet.upv.es/handle/10251/27942>
  63. Kechagia M, et al. Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutrition*. 2013; 1-7.
  64. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. *Farmacopea de los Estados Unidos de América: USP 30 Nf 25*. Vol. 1, USP organization. Washington D.C.; 2007. p. 1464.
  65. Acuña C. SA. Evaluación de diferentes concentraciones de chía molida en el crecimiento de la cepa láctica *Lactobacillus casei* ATCC 334. In Lima; 2017. p. 8.
  66. Valdivia-López MA, Tecante A. Chia (*Salvia hispanica*): A Review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2015; 75:53-75.
  67. Da Silva N, Hiroto Taniwaki M, Junqueira VC, Silveira N, da Silva do Nascimento M, Romeiro Gomes R. *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual*. CRC Press, editor. Florida; 2012. 484 p.
  68. Bergey DH, Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 18a ed. Williams & Wilkins, editor. Baltimore: American Society for Microbiology; 1974.
  69. Jurado-Gómez H, Calpa-Yamá F, Chaspuengal-Tulcán A. Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Vet y Zootec [Internet]*. 2014;8(2):15–35. Available from:

<http://200.21.104.25/vetzootec/index.php/component/content/article?id=101>

70. Cedrón J. El modelo de Gompertz y su aplicación en la Seguridad Alimentaria. Universidad de Valladolid; 2016.
71. Zarate Sarapura, Edgar. Aplicacion del modelo cinetico de Gompertz a la interaccion del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* Subsp Lactis en leche. Ciencia y Tecnologia. 2009: 13(1), 34-50.
72. Bustamante M, Oomah BD, Rubilar M, Shene C. Effective Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium infantis encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. Food Chem [Internet]. 2017;216:97–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.019>
73. Xing X, Hsieh YSY, Yap K, Ang ME, Lahnstein J, Tucker MR, et al. Isolation and structural elucidation by 2D NMR of planteose, a major oligosaccharide in the mucilage of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds [Internet]. Carbohydrate Polymers. Elsevier Ltd.; 2017. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717308366>
74. Cote GL, Holt SM. PREBIOTIC OLIGOSACCHARIDES VIA ALTERNANSUCRASE ACCEPTOR REACTIONS. Vol. 1. United States; US 7,182,954 B1, 2007. p. 16.
75. Leone R de S, de Andrade EF, Ellendersen LN, Tais da Cunha A, Chupel Martins AM, Granato D, et al. Evaluation of dried yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as an efficient probiotic carrier of *Lactobacillus casei* LC-01. LWT - Food Sci Technol [Internet]. 2017;75:220–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.027>
76. Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. Int J Food Microbiol [Internet]. 2011;149(3):185–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>

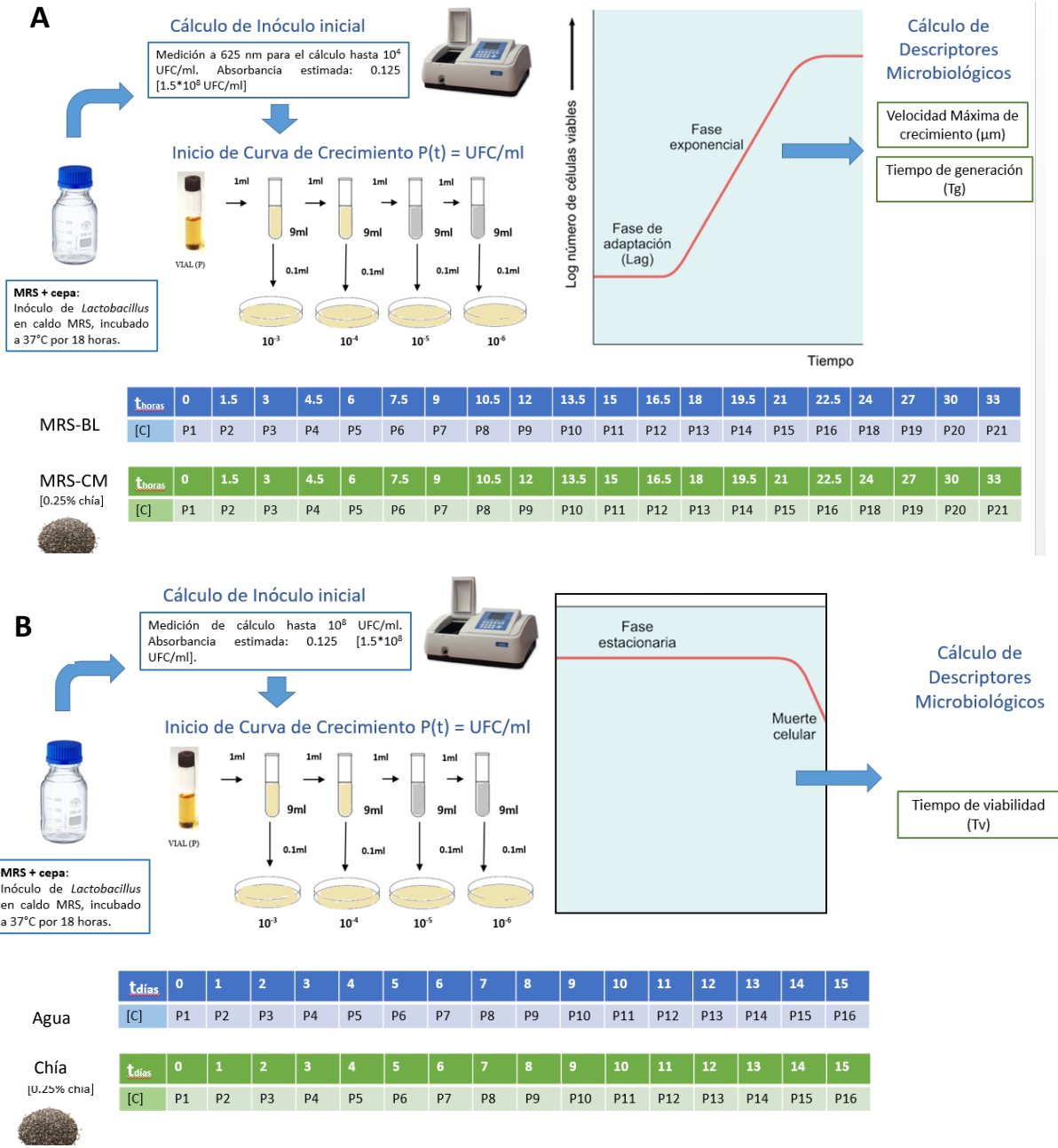
77. Mueller M, Čavarkapa A, Unger FM, Viernstein H, Praznik W. Prebiotic potential of neutral oligo- and polysaccharides from seed mucilage of *Hyptis suaveolens*. *Food Chem* [Internet]. 2017;221:508–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.075>
78. Gänzle MG, Follador R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: A review. *Front Microbiol*. 2012;3(SEP):1–15.
79. Villa-García M, Pedroza-Islas R, San Martín-Martinez E, Aguilar-Frutis M. Espectroscopia de Impedancia: un método rápido y eficiente para el monitoreo del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*. *Rev Mex Ing Química*. 2011;12(1):57–64.
80. BACMAP. *Lactobacillus casei* ATCC 334 [Internet]. Genome Atlas. 2008 [cited 2017 Jul 30]. Available from: <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/392>
81. Srinivas D, Mital BK, Garg SK. Utilization of sugars by *Lactobacillus acidophilus* strains. *Int J Food Microbiol*. 1990;10(1):51–7.
82. Forero A, Sánchez S. Represión Catabólica por Carbono de Bacterias Gram-Positivas: Inteligencia Alimenticia. *Bio Tecnol*. 2008;12(2):24–48.
83. Nagpal R, Kaur A. Synbiotic Effect of Various Prebiotics on In Vitro Activities of Probiotic Lactobacilli. *Ecol Food Nutr* [Internet]. 2011;50(1):63–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gefn20> %5Cn<http://dx.doi.org/10.1080/03670244.2011.539161>
84. Stefanovic E. et al. Genetic, enzymatic and metabolite profiling of the *Lactobacillus casei* group reveals strain biodiversity and potential applications for flavour diversification. *Journal of Applied Microbiology*. 2017; 122(5): 1245-1261.
85. Das UN. Essential fatty acids as possible enhancers of the beneficial actions of probiotics. *Nutrition*. 2002;18(9):786–9.
86. Hullar MAJ, Fu BC. Diet, the gut microbiome, and epigenetics. *Cancer J* [Internet]. 2014;20(3):170–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24855003> %5Cn<http://www.pubmedcentral.ni>

h.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4267719

87. Berni Canani R, Di Costanzo M, Leone L. The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. Clin Epigenetics [Internet]. 2012;4(1):4. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312834/>5Cn<http://www.clinicalepigeneticsjournal.com/content/4/1/4>.
88. Zarate Sarapura, Edgar. Aplicacion del modelo cinetico de Gompertz a la interaccion del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* Subsp Lactis en leche. Ciencia y Tecnologia. 2009: 13(1), 34-50.

## ANEXOS

### Anexo1.- ESQUEMA PARA LA ELABORACION DE CURVAS DEL CRECIMIENTO



**Cálculo de Inóculo inicial**

Medición de cálculo hasta  $10^3$  UFC/ml. Absorbancia estimada: 0.125 [ $1.5 \cdot 10^8$  UFC/ml].



**Inicio de Curva de Crecimiento  $P(t) = \text{UFC/ml}$**



**Cálculo de Descriptores Microbiológicos**

Fase estacionaria

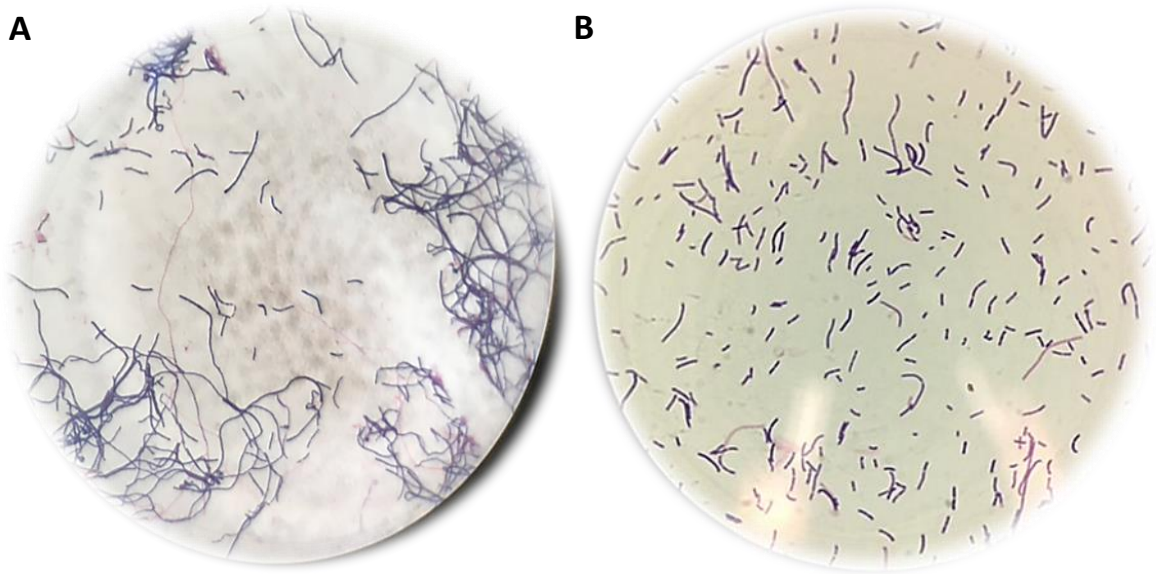
Muerte celular

Tiempo de viabilidad ( $T_v$ )

**MRS + cepa:**  
Inóculo de *Lactobacillus* en caldo MRS, incubado a 37°C por 18 horas.

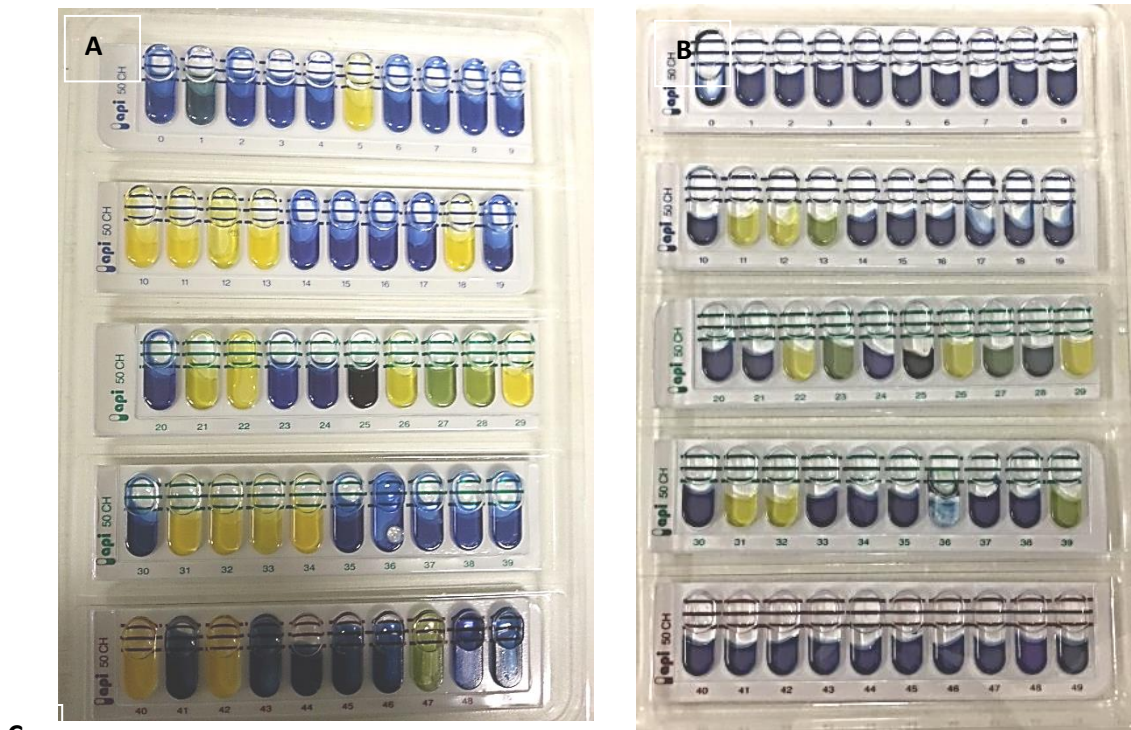
Esquema del recuento en placa de bacterias lácticas (UFC/ml) para la elaboración de curvas con y sin adición de chíia: A) crecimiento y de B) supervivencia. Vial (P): Número de vial tomado en cada punto del tiempo durante la elaboración de la curva. Experimentos realizados por triplicado en cada caso.

## Anexo2.-OBSERVACIÓN MICROOSCÓPICA DE *Lactobacillus*



Observación de las cepas de *Lactobacillus* en un aumento en 1000X mediante técnica de coloración Tinción GRAM. A: *Lactobacillus casei* ATCC 334. Bacilos GRAM + de extremos redondeados dispuestos en cadenas cortas, en pares o individualmente; no esporulados B: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Bacilos GRAM + con bordes redondos dispuestos en cadenas cortas, no esporulados.

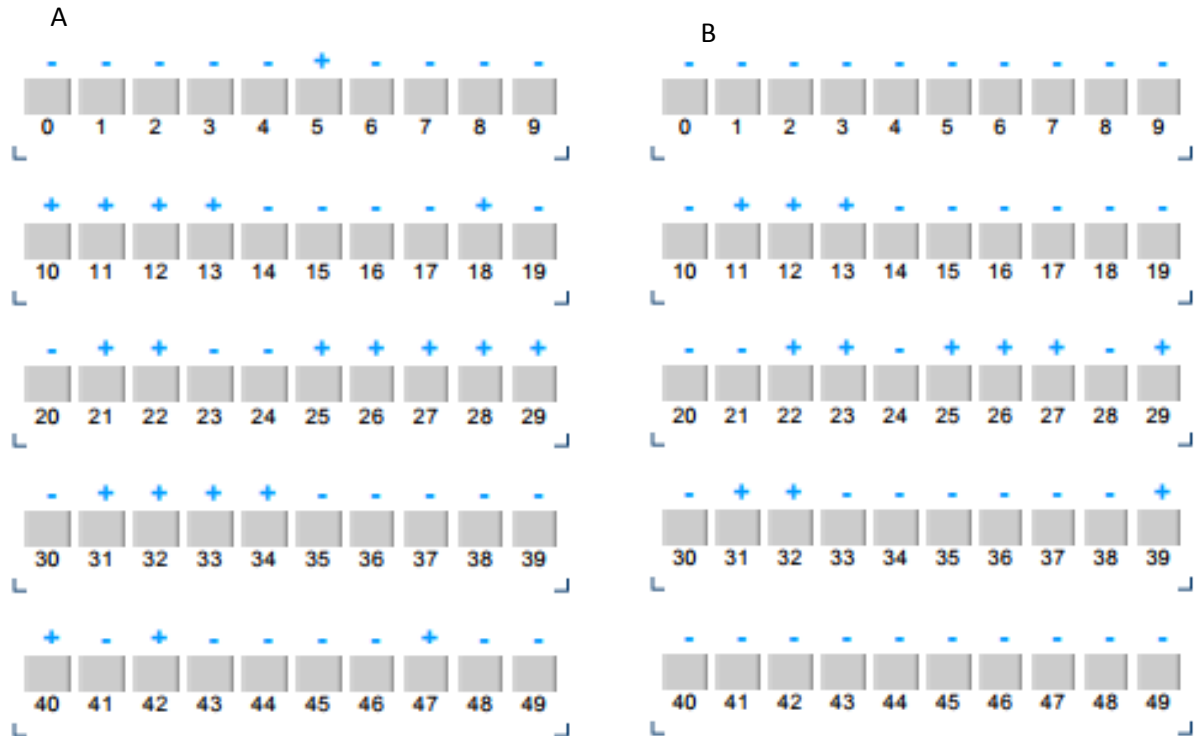
### Anexo3.-IDENTIFICACION DE CEPAS DE LACTOBACILLUS POR API 50CHL



0	Testigo	10	D-Galactosa	20	Metil- $\alpha$ D-manopiranosida	30	D-Melibiosa	40	D-Turanosa
1	Glicerol	11	D-Glucosa	21	N-acetilglucosamina	31	D-Sacarosa	41	D-lixosa
2	Eritrol	12	D-Fructosa	22	Amigdalina	32	Trehalosa	42	D-tagatosa
3	D-Arabinosa	13	D-manosa	23	Arbutina	33	Inulina	43	D-fucosa
4	L-Arabinosa	14	L-Sorbosa	24	Esculina citrato férrico	34	Melezitosa	44	L-fucosa
5	D-Ribosa	15	L-Ramnosaa	25	Salicina	35	Rafinosa	45	D-arabitol
6	D-Xilosa	16	Dulcitol	26	Salicina	36	Almidón	46	L-arabitol
7	L-Xilosa	17	Inositol	27	D-Celobiosa	37	Glicógeno	47	Gluconato potásico
8	D-Adonitol	18	D-manitol	28	D-Maltosa	38	Xilitol	48	2-Cetogluconato potásico
9	Metil- $\beta$ D-xilopiranosida	19	D-Sorbitol	29	D-Lactosa	39	Gentiobiosa	49	5-Cetogluconato potásico

Identificación de las cepas *Lactobacillus* con el sistema API50CHL a través de fermentación de azúcares. La matriz fue incubada a 37 °C en aerobiosis durante 48 horas A) *Lactobacillus casei* ATCC 334, B) *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, C) Perfil de azúcares. La acidificación producida se muestra como el cambio a color Amarillo (+); a excepción del ensayo de esculina (n° 25), de color Negro (+). Número de derecha a izquierda, de arriba para abajo.

**Anexo4.-IDENTIFICACION DE CEPAS DE LACTOBACILLUS EN EL PROGRAMA  
APIWEB**



Identificación de las cepas de *Lactobacillus* con el sistema API50CHL en el programa APIWEB. A) *Lactobacillus casei* ATCC 334. B) *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

**Anexo5.- DATOS DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 EN CALDO**

**MRS**

TIEMPO	MRS (E)	MRS (T)	MRS-chía(E)	MRS-chía(T)
0	4.08	4.17792501	4.22	4.32070669
0	4.08	4.17792501	4.27	4.32070669
0	4.19	4.17792501	3.98	4.32070669
1.5	4.29	4.39903411	4.61	4.47122758
1.5	4.28	4.39903411	4.51	4.47122758
1.5	4.39	4.39903411	4.27	4.47122758
3	4.88	4.71033429	4.90	4.74595758
3	4.78	4.71033429	5.07	4.74595758
3	4.81	4.71033429	4.69	4.74595758
4.5	5.16	5.1037173	5.55	5.15344952
4.5	5.14	5.1037173	5.26	5.15344952
4.5	5.18	5.1037173	5.09	5.15344952
6	5.94	5.55926161	5.86	5.66904403
6	5.51	5.55926161	5.94	5.66904403
6	5.79	5.55926161	5.49	5.66904403
7.5	5.95	6.0508811	6.32	6.24676835
7.5	6.08	6.0508811	6.15	6.24676835
7.5	5.97	6.0508811	5.92	6.24676835
9	6.41	6.55209403	7.10	6.83675279
9	6.40	6.55209403	6.86	6.83675279
9	6.41	6.55209403	6.71	6.83675279
10.5	6.95	7.04017188	7.22	7.39810535
10.5	6.86	7.04017188	7.17	7.39810535
10.5	7.21	7.04017188	7.41	7.39810535
12	7.32	7.49819766	7.98	7.90418999
12	7.25	7.49819766	7.56	7.90418999
12	7.47	7.49819766	7.54	7.90418999
13.5	7.94	7.91539457	8.22	8.34210498
13.5	8.06	7.91539457	8.22	8.34210498
13.5	8.02	7.91539457	8.21	8.34210498
15	8.20	8.28637999	8.98	8.70938409
15	8.43	8.28637999	8.51	8.70938409
15	8.29	8.28637999	8.60	8.70938409
16.5	8.45	8.60994752	8.84	9.01019149
16.5	8.51	8.60994752	8.86	9.01019149
16.5	8.50	8.60994752	8.73	9.01019149

18	8.97	8.88779095	9.86	9.25214841
18	8.92	8.88779095	9.55	9.25214841
18	8.81	8.88779095	9.45	9.25214841
19.5	9.14	9.12339351	10.25	9.44411491
19.5	9.18	9.12339351	9.30	9.44411491
19.5	9.22	9.12339351	9.94	9.44411491
21	9.33	9.32116615	9.93	9.59483849
21	9.24	9.32116615	9.72	9.59483849
21	9.47	9.32116615	9.72	9.59483849
22.5	9.51	9.48583604	10.11	9.71224521
22.5	9.47	9.48583604	9.98	9.71224521
22.5	9.48	9.48583604	9.65	9.71224521
24	9.78	9.62204725	9.48	9.80315018
24	9.83	9.62204725	9.57	9.80315018
24	9.98	9.62204725	9.51	9.80315018
27	10.18	9.82595226	10.17	9.92702722
27	10.02	9.82595226	10.13	9.92702722
27	10.19	9.82595226	10.06	9.92702722
30	9.66	9.96198623	9.80	9.99976449
30	9.60	9.96198623	9.65	9.99976449
30	9.68	9.96198623	9.60	9.99976449
33	9.90	10.0518215	9.71	10.042162
33	9.9	10.0518215	9.94	10.042162
33	9.91	10.0518215	9.85	10.042162

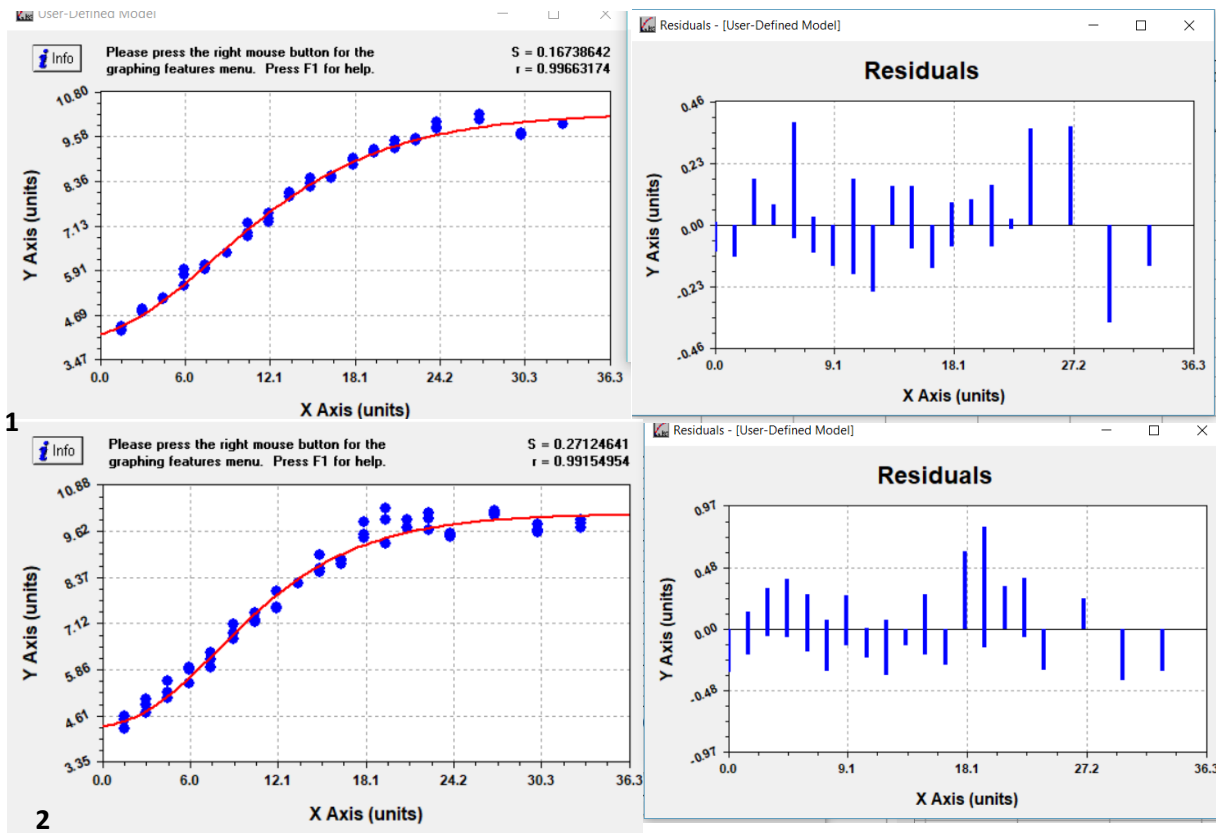
Cinética de crecimiento de *L. casei* ATCC 334 (log UFC/ml) en los medios MRS (control) y MRS-chía (chía molida) en el tiempo en horas. Datos expresados de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento; durante 33 horas de fermentación. E=experimental, T=teórico.

**Anexo6.- PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 EN AMBOS MEDIOS SEGÚN EL MODELO DE GOMPERTZ**

	MRS	MRS-chía
A	3.92361261	4.23538405
B	0.144563771	0.183258012
C	6.297181216	5.865133382
M	8.065997109	7.870229079
S	0.16738642	0.27124641
R	0.99663174	0.99154954
T <sub>g</sub>	0.898873536	0.761313253
μ <sub>m</sub>	0.334896939	0.395408847
λ	2.3182939	2.851622404

Parámetros de crecimiento de *L. casei* ATCC 334 en ambos medios MRS (control, azul) y MRS-chía (chía molida, verde); según modelo de Gompertz, los datos fueron obtenidos a partir del programa Curve Expert. A=concentración inicial [log UFC/ml], b=pendiente de crecimiento exponencial [1/h], C=concentración de crecimiento máxima [log UFC/ml], y M=tiempo en el cual la tasa de crecimiento es máxima [h]. T<sub>g</sub>=Tiempo de generación [h], μ<sub>m</sub>=tasa específica de crecimiento [(log UFC/ml)/ h] y λ=fase de latencia [h]. Se muestra una desviación standard relativamente baja (S) y un coeficiente de correlacion alto (R). Datos expresados a partir de tres repeticiones en conjunto pertenecientes a las curvas de crecimiento.

## Anexo7.- CURVA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 EN CURVE EXPERT



Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* en el programa CurveExpert 1.4, 1) MRS, 2) MRS-chía, se muestra el ajuste de la curva según modelo de Gompertz con desviación standard de todo el modelo (S) y el coeficiente de correlación de Pearson (R). Los residuales muestran las variaciones en cada punto con respecto al modelo presentado debido a la adaptación enzimática de las bacterias en ambos medios.

**Anexo8.- DATOS DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 EN CALDO MRS**

TIEMPO	MRS (E)	MRS (T)	MRS-chía(E)	MRS-chía(T)
0	3.6283	3.7813606	3.7243	3.86077853
0	3.5965	3.7813606	3.7076	3.86077853
0	3.7817	3.7813606	3.8228	3.86077853
1.5	3.8162	3.83389533	3.9111	3.89805238
1.5	3.7993	3.83389533	3.8865	3.89805238
1.5	3.7634	3.83389533	3.8705	3.89805238
3	4.0737	3.94509285	4.2068	3.9935079
3	3.9164	3.94509285	3.9934	3.9935079
3	4.0986	3.94509285	3.7283	3.9935079
4.5	4.2068	4.13714352	4.4014	4.1799958
4.5	4.1238	4.13714352	4.3222	4.1799958
4.5	4.2148	4.13714352	3.9031	4.1799958
6	4.5797	4.41925969	4.8921	4.47513977
6	4.3891	4.41925969	4.9004	4.47513977
6	4.4149	4.41925969	4.2787	4.47513977
7.5	4.989	4.78363776	5.2528	4.87177946
7.5	4.7781	4.78363776	5.1804	4.87177946
7.5	5.017	4.78363776	4.3891	4.87177946
9	5.1367	5.20855341	5.6021	5.34136027
9	5.1072	5.20855341	5.6580	5.34136027
9	5.2648	5.20855341	4.8451	5.34136027
10.5	5.7032	5.66548836	5.9566	5.84534555
10.5	5.6074	5.66548836	5.9956	5.84534555
10.5	5.8692	5.66548836	5.1761	5.84534555
12	5.8603	6.12628157	6.3829	6.34674667
12	5.9684	6.12628157	6.4174	6.34674667
12	6.0086	6.12628157	5.6021	6.34674667
13.5	6.3617	6.56790944	6.9320	6.81719119
13.5	6.6627	6.56790944	7.2253	6.81719119
13.5	6.3283	6.56790944	6.2041	6.81719119
15	6.8095	6.97445329	7.4306	7.23907279
15	6.8419	6.97445329	7.9217	7.23907279
15	6.9493	6.97445329	6.5502	7.23907279
16.5	7.1303	7.33695306	7.6335	7.6044315
16.5	7.1507	7.33695306	8.0550	7.6044315
16.5	7.4369	7.33695306	6.9444	7.6044315
18	7.4623	7.65212589	7.9685	7.91243955

18	7.4756	7.65212589	8.2933	7.91243955
18	8.0588	7.65212589	7.4698	7.91243955
19.5	7.9754	7.92073475	8.2978	8.16676804
19.5	8.2095	7.92073475	8.4273	8.16676804
19.5	8.29	7.92073475	7.6989	8.16676804
21	8.0791	8.14607308	8.699	8.3734409
21	8.0414	8.14607308	8.8129	8.3734409
21	8.3222	8.14607308	7.9822	8.3734409
22.5	8.574	8.33276581	8.6767	8.5393309
22.5	8.4843	8.33276581	8.9912	8.5393309
22.5	8.9614	8.33276581	8.5966	8.5393309
24	8.4471	8.4859212	9.0000	8.67122744
24	8.6334	8.4859212	9.2889	8.67122744
24	8.8779	8.4859212	8.4771	8.67122744
27	8.6021	8.71143846	8.5682	8.85703873
27	8.2041	8.71143846	8.8751	8.85703873
27	8.2304	8.71143846	8.8481	8.85703873
30	8.8692	8.85773667	8.8512	8.97061809
30	8.9684	8.85773667	8.7160	8.97061809
30	8.7853	8.85773667	9.0863	8.97061809
33	8.9031	8.95130856	8.7324	9.03920113
33	8.959	8.95130856	8.9494	9.03920113
33	8.716	8.95130856	8.7993	9.03920113

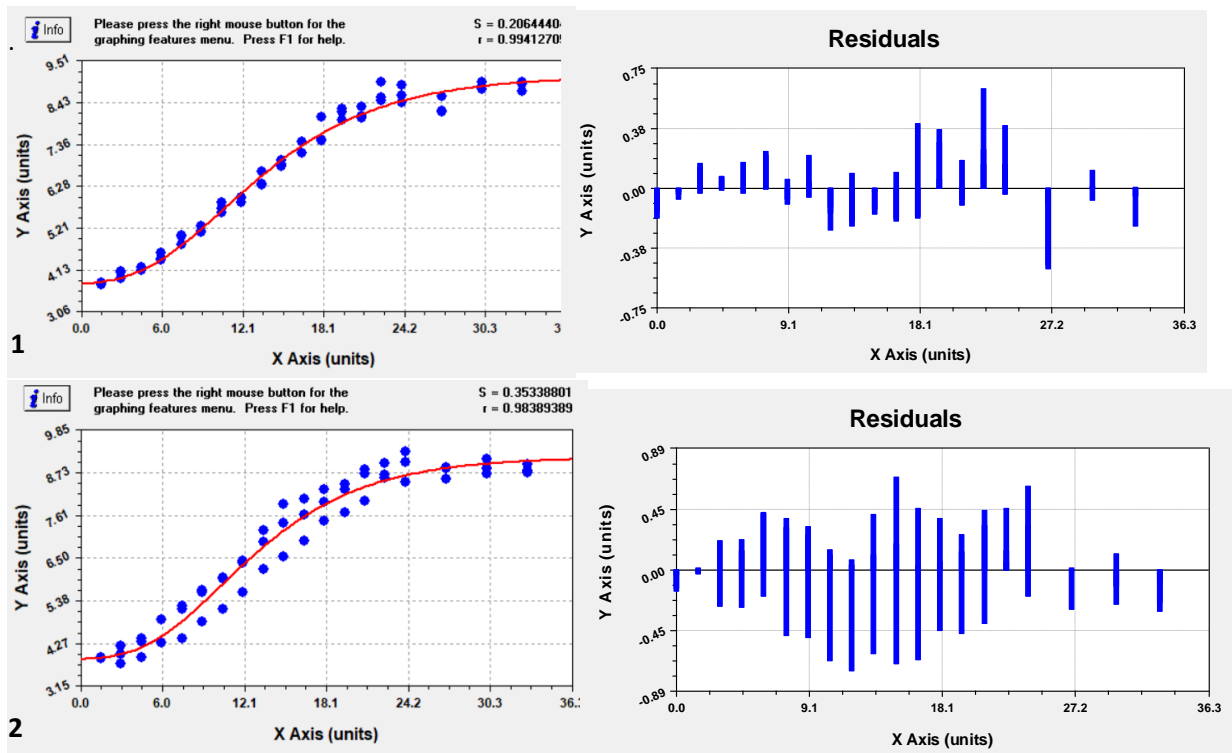
Cinética de crecimiento de *L. acidophilus* (log UFC/ml) en los dos medios MRS (control) y MRS-chía (chía molida) en el tiempo en horas. Datos expresados de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento; durante 33 horas de fermentación. E=experimental, T=teórico.

**Anexo9.- PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 5346 EN AMBOS MEDIOS SEGÚN MODELO DE GOMPERTZ**

	MRS	MRS-chía
A	3.75599654	3.84847762
b	0.15684357	0.17410174
C	5.35486677	5.29236064
M	10.6956905	10.3527213
S	0.20644404	0.35338801
R	0.99412705	0.98389389
T <sub>g</sub>	0.9742914	0.88807921
μ <sub>m</sub>	0.30897327	0.33896751
λ	4.49844956	4.7045883

Parámetros de crecimiento de *L. acidophilus* en ambos medios MRS (control, azul) y MRS-chía (chía molida, verde); según modelo de Gompertz, los datos fueron obtenidos a partir del programa Curve Expert. A=concentración inicial [log UFC/ml], b=pendiente de crecimiento exponencial [1/h], C=concentración de crecimiento máxima [log UFC/ml], y M=tiempo en el cual la tasa de crecimiento es máxima [h]. T<sub>g</sub>=Tiempo de generación [h], μ<sub>m</sub>=tasa específica de crecimiento [(log UFC/ml)/ h] y λ=fase de latencia [h]. Se muestra una desviación standard relativamente baja (S) y un coeficiente de correlación alto (R). Datos expresados a partir de tres repeticiones en conjunto pertenecientes a las curvas de crecimiento.

## Anexo10.- CURVA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 EN CURVE EXPERT



Curva de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en el programa CurveExpert 1.4, 1) MRS y 2) MRS-chía, se muestra el ajuste de la curva según modelo de Gompertz con desviación standard de todo el modelo (S) y el coeficiente de correlación de Pearson (R). Los residuales muestran las variaciones en cada punto con respecto al modelo presentado debido a la adaptación enzimática de las bacterias en cada medio.

**Anexo11.- DATOS DE LA SUPERVIVENCIA DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 EN  
AGUA DESTILADA**

TIEMPO	Agua (E)	Agua (T)	Chía - (E)	Chía - (T)
0	8.5798	8.63902499	7.8692	8.10325743
0	8.5051	8.63902499	8.1959	8.10325743
0	8.5441	8.63902499	8.0864	8.10325743
1	8.1673	8.22373096	8.7559	8.10100571
1	8.1614	8.22373096	8.3711	8.10100571
1	8.2765	8.22373096	8.2856	8.10100571
2	8.0607	7.66772364	8.6128	8.09646255
2	8.1703	7.66772364	8.1931	8.09646255
2	8.1072	7.66772364	8.5315	8.09646255
3	6.7076	7.02388567	8.1903	8.08803426
3	6.6721	7.02388567	8.1072	8.08803426
3	6.7404	7.02388567	8.2625	8.08803426
4	5.2405	6.35549483	8.0531	8.07353294
4	5.2788	6.35549483	7.7634	8.07353294
4	5.1987	6.35549483	7.716	8.07353294
5	5.6232	5.71630488	8.3979	8.05021286
5	5.6532	5.71630488	8.3365	8.05021286
5	5.5911	5.71630488	8.4216	8.05021286
6	4.9494	5.14157292	8.5172	8.01491641
6	4.9823	5.14157292	8.3522	8.01491641
6	4.9191	5.14157292	8.2788	8.01491641
7	4.8451	4.64813998	7.8195	7.96431922
7	4.9294	4.64813998	7.8325	7.96431922
7	4.7404	4.64813998	7.9138	7.96431922
8	5.233	4.23892951	7.5441	7.89523905
8	5.1644	4.23892951	7.3802	7.89523905
8	5.0719	4.23892951	7.3979	7.89523905
9	4.3054	3.90825897	7.8388	7.80495738
9	4.2577	3.90825897	7.4624	7.80495738
9	4.3483	3.90825897	7.6232	7.80495738
10	3.4031	3.64619639	6.8692	7.69150125
10	3.4298	3.64619639	7.1644	7.69150125
10	3.5237	3.64619639	7.1523	7.69150125
11	3.6191	3.4415064	7.1761	7.55384381
11	3.5843	3.4415064	7.0792	7.55384381
11	3.3766	3.4415064	7.1761	7.55384381
12	3.2765	3.28335996	7.3075	7.39200055
12	3.2945	3.28335996	7.238	7.39200055

12	3.2601	3.28335996	6.3979	7.39200055
13	2.8451	3.16216531	6.699	7.20701843
13	2.8195	3.16216531	7.1761	7.20701843
13	2.7993	3.16216531	7.238	7.20701843
14	2.8325	3.06985305	7.238	7.00087197
14	2.8388	3.06985305	7.243	7.00087197
14	2.8261	3.06985305	6.8451	7.00087197
15	3.4425	2.99986012	7.3655	6.77629114
15	3.4786	2.99986012	7.42	6.77629114
15	3.4955	2.99986012	6.5441	6.77629114
17		2.90710797	6.9445	6.28524619
17		2.90710797	6.8129	6.28524619
17		2.90710797	5.9031	6.28524619
19		2.85459354	7.0492	5.76270741
19		2.85459354	6.1461	5.76270741
19		2.85459354	6	5.76270741
21		2.82501524	6.8808	5.2366365
21		2.82501524	5.7685	5.2366365
21		2.82501524	5.3617	5.2366365
23		2.80840399	6.0673	4.73009663
23		2.80840399	4.2833	4.73009663
23		2.80840399	4.2504	4.73009663
25		2.79909027	5.0912	4.25952722
25		2.79909027	3.5563	4.25952722
25		2.79909027	3.6021	4.25952722
27		2.79387294	4.0243	3.83478016
27		2.79387294	2.699	3.83478016
27		2.79387294	2.4771	3.83478016

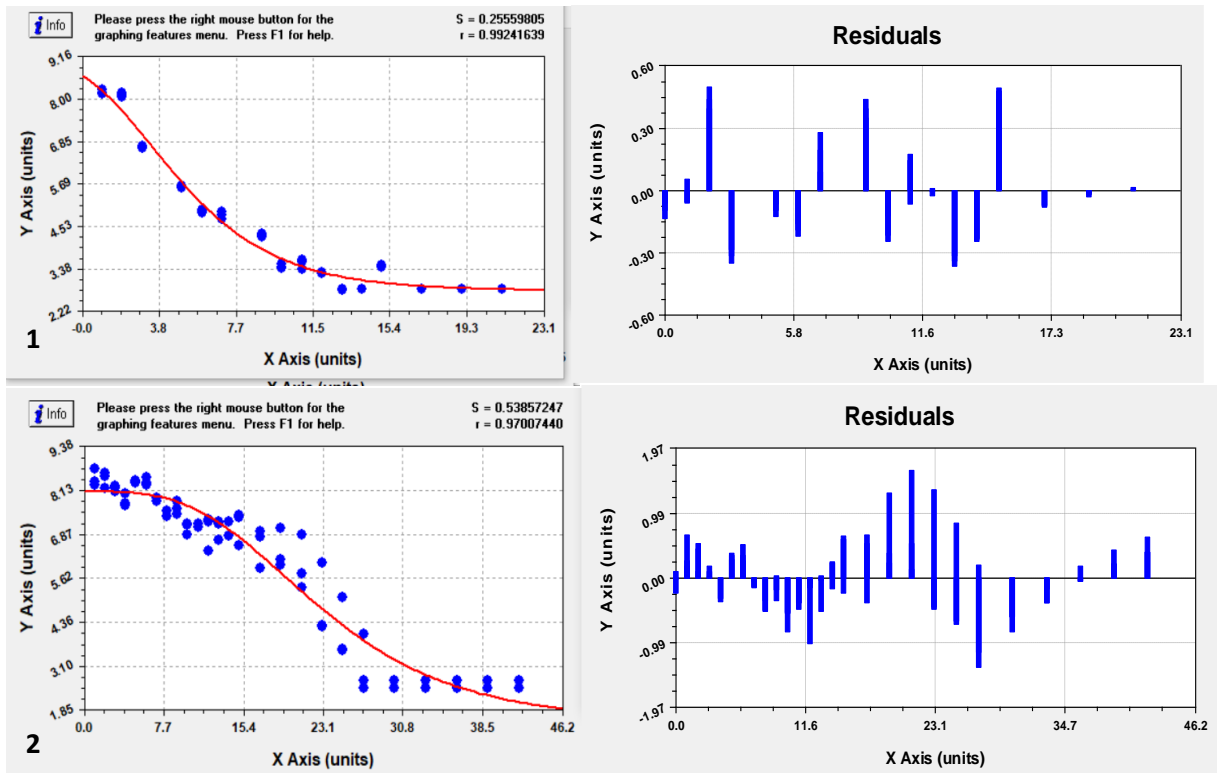
Fase estacionaria y de muerte de *L. casei* (log UFC/ml) en ambos medios agua destilada (control) y chíá molida (tratamiento) en el tiempo en días. Datos expresados de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento; durante 15 y 27 días de incubación, respectivamente. E=experimental, T=teórico.

**Anexo12.- PARÁMETROS DE GOMPERTZ DE SUPERVIVENCIA DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 EN AGUA DESTILADA**

	Agua	Chía
A	9.069314142	8.104901219
b	0.29033115	0.109924732
C	6.28207499	6.538670125
M	3.396773602	19.23922706
S	0.25559805	0.53857247
R	0.99241639	0.9700744
T <sub>de</sub>	0.448649825	1.138464289
μ <sub>de</sub>	0.670968712	0.264417601
λ <sub>e</sub>	-1.307811521	10.12736077
T <sub>v</sub>	4.5461	18.0995
C <sub>v</sub>	6.000101235	6.000011091

Parámetros de muerte de *L. casei* en ambos medios agua destilada (control, azul) y chía (chía molida, verde); según modelo de Gompertz, los datos fueron obtenidos a partir del programa Curve Expert. A=Concentración inicial [log UFC/ml], b=pendiente de decrecimiento exponencial [1/día], C=concentración de crecimiento final [log UFC/ml], y M= Tiempo en el cual la tasa de crecimiento es máxima [días]. T<sub>de</sub>=Tiempo generacional de muerte [días], μ<sub>de</sub>=tasa específica de muerte [log UFC/ml/ días] y λ<sub>e</sub>=fase de supervivencia [días]. T<sub>v</sub>= Tiempo de viabilidad [días] y C<sub>v</sub>=Concentración viable [log UFC/ml]. Datos expresados a partir de tres repeticiones en conjunto pertenecientes a las curvas de crecimiento.

### Anexo13.- CURVA DE SUPERVIVENCIA DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 EN CURVE EXPERT



Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* en el programa CurveExpert 1.4, 1) agua destilada y 2) chíá molida; se muestra el ajuste de la curva según modelo de Gompertz con desviación standard de todo el modelo (S) y el coeficiente de correlación de Pearson (R). Los residuales muestran las variaciones en cada punto con respecto al modelo presentado debido a la adaptación enzimática bacteriana en los medios.

**Anexo14.- DATOS DEL SUPERVIVENCIA DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356  
EN AGUA DESTILADA**

TIEMPO	Agua – (E)	Agua – (T)	Chía – (E)	Chía – (T)
0	8.5378	8.56174282	8.7818	8.59620333
0	8.7959	8.56174282	8.8779	8.59620333
0	8.6021	8.56174282	8.7364	8.59620333
1	8.0086	8.17362539	8.716	8.35769431
1	7.9890	8.17362539	7.6335	8.35769431
1	7.9890	8.17362539	8.6335	8.35769431
2	6.9754	6.77506633	8	7.91446509
2	6.9112	6.77506633	7.2822	7.91446509
2	7.1189	6.77506633	8.0212	7.91446509
3	5.2516	5.53382296	6.7924	7.2827241
3	5.7033	5.53382296	6.6284	7.2827241
3	5.0682	5.53382296	6.8921	7.2827241
4	4.7993	4.92599624	6.6435	6.53996445
4	5.0334	4.92599624	6.4594	6.53996445
4	4.7818	4.92599624	6.7818	6.53996445
5	4.7597	4.68774631	6.3802	5.78014952
5	4.9370	4.68774631	6.415	5.78014952
5	4.7118	4.68774631	6.1614	5.78014952
6		4.60147545	5.3617	5.07712117
6		4.60147545	6.3294	5.07712117
6		4.60147545	5.8865	5.07712117
7		4.57109146	3.9541	4.47197676
7		4.57109146	4.243	4.47197676
7		4.57109146	4.0792	4.47197676
8		4.56049329	3.2304	3.97744943
8		4.56049329	3.3892	3.97744943
8		4.56049329	3.1461	3.97744943
9		4.55680895		3.58811279
9		4.55680895		3.58811279
9		4.55680895		3.58811279
10		4.55552962		3.28968572
10		4.55552962		3.28968572
10		4.55552962		3.28968572

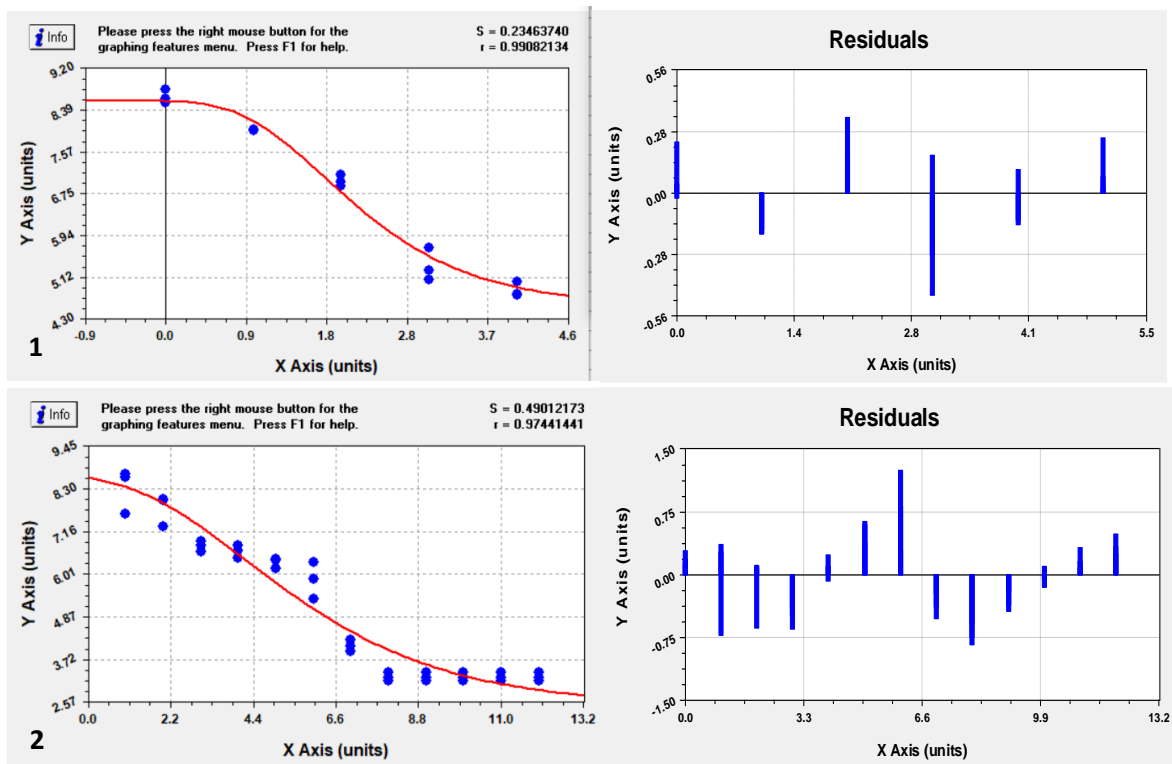
Fase estacionaria y de muerte de *L. acidophilus* (log UFC/ml) en ambos medios agua destilada (control) y chía molida (tratamiento) en el tiempo en días. Datos expresados de tres repeticiones independientes pertenecientes a las curvas de crecimiento; durante 5 y 8 días de incubación, respectivamente. E=experimental, T=teórico, Curva de Gompertz.

**Anexo15.- PARÁMETROS DE SUPERVIVENCIA DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 EN AMBOS MEDIOS SEGÚN MODELO DE GOMPERTZ**

	Agua	Chía
A	8.56671029	8.70814759
B	1.05837366	0.3336615
C	4.01186072	6.25164093
M	1.79636611	4.17167708
S	0.2346374	0.49012173
R	0.99082134	0.97441441
T <sub>de</sub>	0.19271671	0.3922872
μ <sub>de</sub>	1.56203366	0.76737145
λ <sub>e</sub>	0.59987078	0.71793452
T <sub>v</sub>	2.5579	4.7064
C <sub>v</sub>	7.0018	6.3189

Parámetros de muerte de *L. acidophilus* en ambos medios agua destilada (control, azul) y chía (chía molida, verde); según modelo de Gompertz, los datos fueron obtenidos a partir del programa Curve Expert. A=concentración inicial [log UFC/ml], b=pendiente de decrecimiento exponencial [1/día], C=concentración de crecimiento final [log UFC/ml], y M=tiempo en el cual la tasa de crecimiento es máxima [días]. T<sub>de</sub>=tiempo de generación de muerte [días], μ<sub>de</sub>=tasa específica de muerte [(log UFC/ml)/ días] y λ<sub>e</sub>=fase supervivencia [días]. T<sub>v</sub>= Tiempo de viabilidad [días], y C<sub>v</sub>=concentración viable [log UFC/ml]. Datos expresados a partir de tres repeticiones en conjunto pertenecientes a las curvas de crecimiento.

## Anexo16.- CURVA DE SUPERVIENCIA DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 EN CURVE EXPERT




Curva de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en el programa CurveExpert 1.4, 1) Agua destilada y 2) chía molida; se muestra el ajuste de la curva según modelo de Gompertz con desviación standard de todo el modelo (S) y el coeficiente de correlación de Pearson (R). Los residuales muestran las variaciones en cada punto con respecto al modelo presentado debido a la adaptación enzimática de las bacterias en los medios.

Anexo17.-CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE *Lactobacillus casei* ATCC 334



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Lactobacillus casei <b>Catalog Number:</b> 0546 <b>Lot Number:</b> 546-18 <b>Reference Number:</b> ATCC® 334™* <b>Purity:</b> > 99.9% of Total Pellet CFU <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2018/10/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2017/1/9
---	---

Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> Small, circular, convex, entire edge, pale white, glistening. <b>Microscopic Features:</b> Gram positive rods with rounded ends, singly, in pairs and short chains.	<b>Medium:</b> CNA <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> Vitek CBC (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative (1) Vancomycin (30 mcg - Disk Susceptibility): resistant (no zone) (1) Purple Broth w/Rhamnose: negative  <div style="text-align: center;">                           Amanda Kuperus                          Quality Control Manager                          AUTHORIZED SIGNATURE                     </div>

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for Instructions, Intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

Microbiologics

bioMerieux Customer: 1012555  
System #: 521711

Laboratory Report

Printed Jan 9, 2017 08:07 CST  
Printed by: cmc

Isolate Group: 548 16-1

Bench: CC

Card Type: CBC Testing Instrument: 000017919CE3 (15220)

Bionumber: 21373327416010  
Organism Quantity:

<b>Comments:</b>	


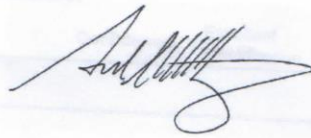
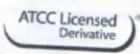

<b>Identification Information</b>	<b>Card:</b> CBC	<b>Lot Number:</b> 246382220	<b>Expires:</b> Jun 1, 2017 13:00 CDT
	<b>Completed:</b> Dec 16, 2016 17:11 CST	<b>Status:</b> Final	<b>Analysis Time:</b> 8.25 hours
<b>Selected Organism</b>	95% Probability <b>Lactobacillus paracasei</b> Bionumber: 21373327416010		<b>Confidence:</b> Low discrimination
<b>SRF Organism</b>			
<b>Analysis Organisms and Tests to Separate:</b>			
Low Discrimination Organism			
Lactobacillus paracasei IRHAMNOSE(0),			
Lactobacillus rhamnosus IRHAMNOSE(100),			
<b>Analysis Messages:</b>			
<b>Contraindicating Typical Biopattern(s)</b>			
Lactobacillus paracasei APPA(96),			
Lactobacillus rhamnosus CIT(24),			

<b>Biochemical Details</b>																	
2	APPA	-	4	dGAL	+	5	ODC	-	6	PheA	+	7	ARG	-	8	PVATE	-
9	BGAL	+	10	PYRA	+	11	SUCT	-	12	TyrA	+	13	dGLU	+	17	BGLU	+
18	dMAL	(+)	19	dMAN	+	21	BXYL	-	22	O/129 R	+	23	ProA	+	26	LIP	-
27	AMAN	-	30	dMLZ	+	31	URE	-	33	SAC	+	35	dTRE	+	36	CIT	+
37	BGURi	-	40	ILATk	-	41	AGLU	+	43	dSOR	+	44	AGAL	-	46	GlyA	-
47	dMLT	-	50	dRIB	+	51	MTE	+	52	IGLM	-	53	OPS	-	54	BdFUC	-
56	CMT	+	59	2KG	-	61	ESC	(-)	62	ELLM	-	64	dXYL	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01  
MIC Interpretation Guideline:  
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:  
AES Parameter Last Modified:

**Anexo18.- CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356**

	
<b>Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release</b>	
<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Lactobacillus acidophilus <b>Catalog Number:</b> 0243 <b>Lot Number:</b> 243-38 <b>Reference Number:</b> ATCC® 4356™* <b>Purity:</b> > 99.9% of Total Pellet CFU <b>Recovery:</b> N/A (Pellet is grown in MRS broth) <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2018/9/30 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Tracy A Blenker <b>Release Date:</b> 2016/11/15
<b>Macroscopic Features:</b> Two colony types are present. The predominant colonies are medium to large, circular to slightly irregular, low convex, erose edge and rough; the other type is small, circular, convex, entire edge and smooth. Colonies are translucent and weakly alpha hemolytic.	<b>Performance</b> <b>Medium:</b> CNA <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>Microscopic Features:</b> Gram positive rods with rounded ends, occurring singly, in pairs, and in short chains.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative PCR Screen for Group B Streptococcus: negative
<b>ID System:</b> Vitek CBC (1) See attached ID System results document.	 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE
<small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small>	
<small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small>	
<small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small>	
<small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small>	
	<small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small>
	<small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small>
TESTING CERT #2655.01	

Microbiotics

Laboratory Report

Printed Nov 8, 2016 07:51 CST  
Printed by: tab

Customer: 1012555  
Item #: 521711

Plate Group: 243 38-1

Bench: TB

Card Type: CBC Testing Instrument: 000017919CE3 (15220)

Bionumber: 11171103404610  
Organism Quantity:

Comments:	


Identification Information	Card: CBC	Lot Number: 246382220	Expires: Jun 1, 2017 13:00 CDT
	Completed: Nov 4, 2016 16:29 CDT	Status: Final	Analysis Time: 8.00 hours
Selected Organism	99% Probability <b>Lactobacillus acidophilus</b>		Confidence: Excellent identification
	Bionumber: 11171103404610		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			

Biochemical Details																	
2	APPA	+	4	dGAL	-	5	ODC	-	6	PheA	+	7	ARG	-	8	PVATE	-
9	BGAL	+	10	PYRA	-	11	SUCT	-	12	TyrA	+	13	dGLU	+	17	BGLU	+
18	dMAL	+	19	dMAN	-	21	BXYL	-	22	O/129 R	+	23	ProA	-	26	LIP	-
27	AMAN	-	30	dMLZ	-	31	URE	-	33	SAC	+	35	dTRE	+	36	CIT	-
37	BGURi	-	40	ILATk	-	41	AGLU	+	43	dSOR	-	44	AGAL	-	46	GlyA	-
47	dMLT	-	50	dRIB	-	51	MTE	+	52	IGLM	-	53	OPS	+	54	BdFUC	+
56	CMT	+	59	2KG	-	61	ESC	-	62	ELLM	-	64	dXYL	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01  
MIC Interpretation Guideline:  
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:  
AES Parameter Last Modified:

## Anexo19.- ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE GRANOS DE CHÍA

 <b>CAYETANO HEREDIA</b>	<b>SECCIÓN DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS</b>	<b>Versión: 001.2017.2</b>
	<b>LABORATORIO DE FARMACIA</b>	<b>División: Lab. Ensayo</b>
	<b>INFORME DE ENSAYO</b>	<b>Pag: 1 de 1</b>

**INFORME DE ENSAYO**

**SOLICITANTE: SAMANTHA ALISSA ACUNA CARMEN**

**\*ANÁLISIS PROXIMAL**

**MUESTRA:**

- **SEMILLA DE CHIA**

**ANÁLISIS A REALIZAR: COMPOSICIÓN CENTESIMAL**

SEMILLA DE CHIA
CARBOHIDRATOS
PROTEÍNAS
HUMEDAD
CENIZAS
FIBRA
GRASAS

**RESULTADOS:**

SEMILLA DE CHIA	PORCENTAJE (%)
CARBOHIDRATOS	14.80
PROTEÍNAS	21.76
HUMEDAD	1.25
CENIZAS	4.17
FIBRA	27.43
GRASAS	30.59

### **MÉTODOS DE REFERENCIA**

\*TECNICAS USADAS SEGÚN: NTP-INDECOPI Y ARTICULOS CIENTIFICOS

\* AOAC 923.03 18th. Ed. 1995. **CENIZAS**

\*NTP 205.002. 1979. Cereales y Menestras. **DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.**

\*NTP 209.045:1974. **PROTEINAS TOTALES.**

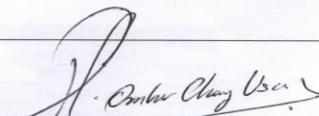
\*SAN EUFRASIO MARTÍNEZ B, MORA RODRÍGUEZ J, CASADO MUÑOZ C, DÍAZ AGUILAR R, DÍAZ AGUILAR A. ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA LA GESTIÓN NUTRICIONAL DEL OLIVO. [INTERNET]. 2017 [CITED 2 FEBRUARY 2017];. AVAILABLE FROM:

[HTTPS://WWW.RESEARCHGATE.NET/PROFILE/MARIA\\_DEL\\_CARMEN\\_CASADO\\_MUNOZ/PUBLICATION/317684751\\_ANALISIS\\_DE\\_PARAMETROS\\_BIOQUIMICOS\\_PARA\\_LA\\_GESTION\\_NUTRICIONAL\\_DEL\\_OLIVO/LINKS/5948C9C0ACA272F02E0B0EC8/ANALISIS-DE-PARAMETROS-BIOQUIMICOS-PARA-LA-GESTION-NUTRICIONAL-DEL-OLIVO.PDF](https://www.researchgate.net/profile/Maria_Del_Carmen_Casado_Munoz/publication/317684751_ANALISIS_DE_PARAMETROS_BIOQUIMICOS_PARA_LA_GESTION_NUTRICIONAL_DEL_OLIVO/LINKS/5948C9C0ACA272F02E0B0EC8/ANALISIS-DE-PARAMETROS-BIOQUIMICOS-PARA-LA-GESTION-NUTRICIONAL-DEL-OLIVO.PDF)

**CARBOHIDRATOS TOTALES**

\*NTP 205.003:2016. **DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA**

\* NTP 201.016 2002 **GRASA TOTAL**

  
**Bach. Q.F. Omhär Chávez Usca**  
**Sección de Ciencias Farmacéuticas**