



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**PROYECTO DE TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

TEMA:

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS EN BACTERIAS PATÓGENAS *E. COLI*, *SALMONELLA SPP*
Y *LISTERIA MONOCYTOGENES*.**

AUTOR:

FLORES HOLGUIN LUIS EDUARDO

TUTOR:

ING. KATHYA SAYONARA REYNA ARIAS Mgs. SC

MANTA-MANABÍ-ECUADOR

2019

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Los Honorables Miembros del tribunal Examinador luego del debido análisis y su cumplimiento de la Ley aprueban el informe de investigación sobre el tema:
“EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN BACTERIAS PATÓGENAS *E. COLI*, *SALMONELLA SPP* Y *LISTERIA MONOCYTOGENES*”.

Ing. Ángel Prado Cedeño, Mg.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Roy Leonardo Barre Zambrano, Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. María Isabel Mantuano Cusme, Mg

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutor(a) de la Facultad de CIENCIAS AGROPECUARIAS de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, certifico:

Haber dirigido y revisado el trabajo de titulación, cumpliendo el total de 400 horas, bajo la modalidad de tesis, cuyo tema del proyecto es “**Evaluación del efecto inhibitorio de bacterias ácido lácticas en bacterias patógenas *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes***”, el mismo que ha sido desarrollado de acuerdo a los lineamientos internos de la modalidad en mención y en apego al cumplimiento de los requisitos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico, por tal motivo CERTIFICO, que el mencionado proyecto reúne los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometido a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

La autoría del tema desarrollado, corresponde al señor **Luis Eduardo Flores Holguín**, estudiante de la carrera de **Ingeniería Agroindustrial**, período académico 2018-2019, quien se encuentra apto para la sustentación de su trabajo de titulación.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Manta, 18 de febrero de 2019.

Lo certifico,

Ing. KATHYA SAYONARA REYNA ARIAS Mgs. Sc.
Docente Tutor(a)

DECLARACION DE AUTORIA

Yo, Flores Holguín Luis Eduardo, con C.I. 131250541-3, declaro que el presente trabajo de titulación, es de mi autoría, y que los resultados del mismo son auténticos, originales y personales, los textos constantes en el documento que proviene de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Manta, 2019

Flores Holguín Luis Eduardo

C.I: 131250541-3

AGRADECIMIENTO

Agradezco primero a Dios y a mi pilar fundamental mi familia porque gracias a ellos he podido cerrar un ciclo maravilloso y muy grande en mi vida, gracias por todo lo que me han dado y por lo que ahora soy.

Extraordinaria carrera que con mucho orgullo, amor, pasión y respeto representaré.

A mi tutora Ing. Kathya Sayonara Reyna Arias Mgs. Sc, quien es pieza clave en la realización de este trabajo de titulación y es un privilegio contar con su guía y ayuda

Agradezco a la Universidad Laica Eloy Alfaro De Manabí por ser el alma mater que me abrió sus puertas del conocimiento para mí y formarme profesionalmente.

A mi maravillosa Facultad de Ciencias Agropecuaria por aceptarme en su aula del saber en la Carrera de Ingeniería Agroindustrial nido de muchos que como yo eligieron esta

A todos mis maestros de la carrera por sus conocimientos, consejos, confianza y formación.

De igual forma agradezco a mi amiga Ing. Mariuxi Loor, por la ayuda y el conocimiento compartido durante la ejecución de esta tesis y siempre brindarme su apoyo, compañía y palabras de ánimo en todo momento.

DEDICATORIA

El presente trabajo es el esfuerzo cosechado, del cual me siento orgulloso como lo están los seres importantes en mi vida a quien con mucho amor se los dedico.

A Dios quien ha sido mi guía, fortaleza y su mano de fidelidad y amor han estado conmigo hasta el día de hoy.

A mis padres **José Flores Pilligua y Gladys Holguín Lucas**, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis hermanos, **José, Ovidio & Álvaro Flores Holguín**, que siempre han sido mi apoyo incondicional, guiándome por el camino del bien y brindándome la mano cuando la he necesitado.

A mi abuela Ángela Lucas que con sus palabras sabias me han enseñado que cuanto mayor es el esfuerzo, mayor es la gloria, a toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños, propósitos y metas.

A mis grandes amigas y amigos, mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos y porque han estado siempre conmigo en las buenas y malas, gracias por su confianza y respaldo brindado en la Carrera Universitaria.

“La fuerza y el crecimiento llegan solo de la mano de lucha y el esfuerzo continuo”

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio utilizando microcápsulas, con bacterias ácido lácticas *L. lactis spp* y *L. casei* y prebióticos fructosa e inulina en microorganismos patógenos como la *E. coli*, *Salmonella spp* y la *Listeria monocytogenes*. Mediante la prueba de viabilidad se escogió el mejor tratamiento de las bacterias ácidas lácticas encapsuladas en los días 0, 10, 20, 30, *L. casei* con Fructosa 242 UFC/g y *L. lactis ssp* con Inulina 198 UFC/g, a diferencia de las libres que fue disminuyendo su crecimiento. En la eficiencia de las capsulas se obtuvo un porcentaje de 50% hasta 54,81%, presentando formas esféricas y ovoides obteniendo un tamaño de 30, 20 y otras menores de 10µm. En el efecto inhibitorio como mejor resultado fueron los encapsulados de *L. lactis ssp* con Inulina y *L. casei* con fructosa en *E. coli* y *Salmonella spp* con 14,56mm y 14,33 mm respectivamente y *L. casei* con fructosa en *E. coli* y *Salmonella spp* con 13,67 mm 12.44 mm respectivamente. A diferencia de *Listeria monocytogenes* que presentó mayor efecto inhibitorio en *L. casei* con fructosa con 11,22 mm y disminuyó significativamente el efecto inhibitorio con *L. lactis ssp* con Inulina en 8,56 mm.

Palabras clave: Encapsulación, Bacterias ácidas lácticas, Prebiótico, Viabilidad, Eficiencia de capsulas, Efecto inhibitorio

SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the inhibitory effect using microcapsules, lactic acid bacteria *L. lactis spp* and *L. casei* and prebiotics fructose and inulin in pathogenic microorganisms such as *E. coli*, *Salmonella spp* and *Listeria monocytogenes*. The best treatment of the lactic acid bacteria encapsulated on days 0, 10, 20, 30, *L. casei* with Fructose 242 CFU / g and *L. lactis spp* with Inulin 198 CFU / g was chosen using the viability test. The free ones that were decreasing their growth. In the efficiency of the capsules a percentage of 50% up to 54.81% was obtained, presenting spherical and ovoid shapes obtaining a size of 30, 20 and others less than 10µm. In the inhibitory effect as the best result were the encapsulations of *L. lactis spp* with Inulin and *L. casei* with fructose in *E. coli* and *Salmonella spp* with 14.56mm and 14.33 mm respectively and *L. casei* with fructose in *E. coli* and *Salmonella spp* with 13.67 mm 12.44 mm respectively. In contrast to *Listeria monocytogenes*, which showed a greater inhibitory effect in *L. casei* with fructose with 11.22 mm and the inhibitory effect with *L. lactis spp* with Inulin was significantly reduced in 8.56 mm.

Key words: Encapsulation, lactic acid bacteria, prebiotic, viability, capsule efficiency, inhibitory effect

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I..... | |
| 1.1. INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| 1.2. PROBLEMA..... | 17 |
| 1.3. JUSTIFICACIÓN..... | 18 |
| 1.4. OBJETIVOS..... | 19 |
| 1.4.1. Objetivos General..... | 19 |
| 1.4.2. Objetivos Específicos..... | 19 |
| 1.5. HIPÓTESIS..... | 19 |
| CAPÍTULO II..... | |
| MARCO TEÓRICO..... | 20 |
| 1.1. Bacterias ácido lácticas..... | 20 |
| 1.1.1. Clasificación..... | 20 |
| 1.1.2. <i>Lactobacilos casei</i> | 21 |
| 1.1.3. <i>Lactococcus lactis ssp</i> | 21 |
| 1.2. Prebióticos..... | 22 |
| 1.2.1. Fructosa..... | 22 |
| 1.2.2. Inulina..... | 22 |
| 1.3. Encapsulación..... | 23 |
| 1.3.1. Atomización..... | 23 |
| 1.3.2. Gelificación iónica..... | 23 |
| 1.3.3. Extrusión..... | 23 |
| 1.3.4. Coacervación..... | 24 |
| 1.3.5. Entrampamiento en liposomas..... | 24 |
| 1.4. Bacterias patógenas..... | 24 |
| 1.4.1. <i>Escherichia coli</i>..... | 24 |
| 1.4.1.1. Clasificación..... | 25 |
| 1.4.1.2. Patogenia..... | 25 |
| 1.4.2. <i>Salmonella spp</i>..... | 25 |
| 1.4.2.1. Clasificación..... | 26 |
| 1.4.2.2. Patogenia..... | 26 |
| 1.4.3. <i>Listeria monocytogenes</i>..... | 26 |
| 1.4.3.1. Clasificación..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 1.4.3.2. Patogenia | 27 |
| CAPÍTULO III..... | |
| 1.5. METODOLOGÍA..... | 29 |
| 1.6. Factor de estudio..... | 29 |
| 1.7. DISEÑO EXPERIMENTAL | 31 |
| 1.7.1. Tipo de diseño..... | 31 |
| 1.7.2. Análisis estadístico..... | 31 |
| 1.6. TRATAMIENTOS | 33 |
| 1.7. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS..... | 34 |
| CAPÍTULO IV..... | |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 38 |
| CAPÍTULO V..... | |
| CONCLUSIONES | 48 |
| RECOMENDACIONES | 49 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 50 |
| ANEXOS..... | 58 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla N°1. División de géneros de bacterias ácido láctica: | 21 |
| Tabla N° 2. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental N°1 | 32 |
| Tabla N° 4. Tratamientos de estudio del diseño experimental N° 1 | 33 |
| Tabla N° 5. Tratamientos de estudio del diseño experimental N° 2 | 33 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico N° 1. Viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos libres y encapsulados durante 30 días de almacenamiento a una temperatura de 37°C..... | 40 |
| Gráfico N° 2. Resultados estadísticos de la eficiencia de encapsulación. | 43 |
| Gráfico N° 3. Resultados generales del poder inhibitorio de los tratamientos de <i>L. casei</i> con Fructosa y <i>L. lactis</i> con Inulina, en bacterias patógenas <i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> , incubadas a 27°C y evaluadas en 24 horas. | 46 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo N° 1. Obtención de las microcápsulas y almacenadas en cajas Petri. | 58 |
| Anexo N° 2. Películas de almidón de yuca con bacterias ácido lácticas y prebiótico libres. | 58 |
| Anexo N° 3. (SEM) y tamaño de partículas. | 58 |
| Anexo N° 3.1. Tamaño y morfología de las microcápsulas por el microscopio electrónico de barrido. | 59 |
| Anexo N° 4. Halo de bacterias ácido lácticas con prebióticos frente a bacterias patógenas. | 59 |
| Anexo N° 5. Viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos libres durante 30 días de almacenamiento a una temperatura de 37°C. | 60 |
| Anexo N° 6. Viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos encapsulados durante 30 días de almacenamiento a una temperatura de 37°C. | 61 |
| Anexo N° 7. Resultados del efecto inhibitorio de las bacterias <i>L. casei</i> con Fructosa y <i>L. lactis</i> con Inulina encapsuladas en cada uno de los patógenos en estudio <i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp</i> y <i>Listeria monocytigenes</i> evaluadas en 24 horas. | 62 |
| Anexo N° 8. ANOVA de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas libres y encapsulados. | 63 |
| Anexo N° 8.1 Pruebas post hoc. | 64 |
| Anexo N° 9. ANOVA de la eficiencia de encapsulación. | 66 |
| Anexo N° 9.1 Pruebas post hoc. | 67 |
| Anexo N° 10. ANOVA del efecto inhibitorio. | 68 |
| Anexo N° 10.1 Pruebas post hoc. | 69 |

CAPÍTULO I.

1.1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se están presentando enfermedades por el consumo de productos fermentados artesanales por microorganismos que proliferan en el proceso de elaboración, por la falta de medidas preventivas sanitarias e inocuidad en los puntos críticos de transformación del producto, los cuales se contaminan por patógenos como *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, produciendo las principales enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) y constituyendo un problema sanitario y económico de relevancia mundial (Ruiz *et al.* 2017).

En concordancia a la seguridad e inocuidad alimentaria, actualmente se están aplicando tecnologías que trabajan en la reducción de este tipo de contaminación en los alimentos, una herramienta que se usa hoy en día es la encapsulación, aplicado como recubrimiento de pared, generando estabilidad, biodisponibilidad y conservación de viabilidad en microorganismos benéficos permitiendo inhibir patógenos en alimentos (Rodríguez *et al.* 2016).

Uno de los microorganismos benéficos son las bacterias ácido lácticas, que se utilizan para la elaboración de diferentes variedades de productos fermentados artesanales las bacterias ácido lácticas son adicionadas intencionalmente como cultivos indicadores y son utilizados como probióticos que, al ser ingeridos, tiene efectos benéficos para el sistema digestivo (Ramírez 2005).

Dentro de la presente investigación se encapsuló dos tipos de bacterias ácido lácticas, siendo *L. casei*, tipo de bacteria probiótica que previene trastornos intestinales (Silva 2018) y crecen a una temperatura óptima de 37°C (Castro *et al.* 2009) y la *L. lactis ssp*, que tiene propiedades biopreservadoras y algunas cepas son capaces de producir nisina, las cuales son muy utilizadas en industrias

alimentarias; (Salazar *et al.* 2003) y dos prebióticos: la fructosa, como azúcar simple y la inulina también, como carbohidrato de almacenamiento, ambos de cadena corta, reconocidos como oligosacáridos, no digeribles (Pérez *et al.* 2009).

Una vez encapsulado se aplicó los tratamientos a los patógenos: *E. coli*, el cual es la causa más frecuente de infecciones bacterianas incluyendo las del tracto urinario (Geraldine *et al.* 2017) la *Salmonella spp*, genera enfermedades comunes infecciosas y que se presenta en cualquier edad (González *et al.* 2017) y la *Listeria monocytogenes*, como patógeno transmitido por alimentos, capaz de sobrevivir a una amplia condición ambiental.

Siendo el objetivo general de este trabajo, evaluar el efecto inhibitorio de las bacterias ácido lácticas mencionadas anteriormente frente a bacterias patógenas *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, como principales deterioradores del queso fresco.

Por lo que se evaluó inicialmente la viabilidad de las bacterias ácido lácticas ante dos diferentes sustratos: fructosa e inulina, con y sin encapsulación; determinándose posteriormente la eficiencia de encapsulación y su efecto inhibitorio sobre las bacterias patógenas.

En el Capítulo I menciona la problemática que se presenta por el consumo de productos fermentados artesanales, contaminados por microorganismos patógenos *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, en algunas de las etapas de producción, seguido de la justificación donde se plantea que la técnica de encapsulación de bacterias ácido lácticas con prebióticos es una opción dentro de la industria alimentaria, para reducir la contaminación en los alimentos fermentados. En los objetivos se expresa con especificidad las diferentes evaluaciones a realizar dentro del trabajo de investigación para determinar si se cumple o no la hipótesis.

En el Capítulo II se describe en el marco teórico conceptos básicos sobre los términos a usar dentro del documento elaborado. Mientras que en el Capítulo III se da a conocer las metodologías, diseño experimental y tratamientos que se ha planteado para la elaboración del trabajo investigativo.

En cuanto en el Capítulo IV se describe los resultados y discusión obtenidos, con respecto a la viabilidad y eficiencia de la encapsulación de las bacterias ácido lácticas con prebióticos y selección de los mejores tratamientos, para realizar el efecto inhibitorio en las bacterias patógenos *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, comparando los resultados con investigaciones de otros autores.

Por último, en el capítulo V se redacta la conclusión de la investigación realizada, mencionando los datos obtenidos de viabilidad y eficiencia en libres y encapsulados, morfología-tamaño de partícula, el efecto inhibitorio y generado respuesta a la hipótesis planteada, culminando con las recomendaciones para investigaciones futuras en esta rama, bibliografía de las fuentes investigadas, que fundamentan el presente trabajo, y al final del documento los anexos que complementan las estadísticas y el desarrollo de la investigación.

1.2. PROBLEMA

En la actualidad la oferta de alimentos lácteos está en crecimiento por el aporte de nutrientes necesarios para la dieta humana. Estos nutrientes suelen ser alterados por contaminantes introducidos de forma directa o indirecta en la producción; que pueden afectar la salud de una persona o un grupo de personas, y esta realidad es una de las preocupaciones hoy en día, puesto que, al consumir este alimento alterado puede causar intoxicaciones e infecciones alimentarias (Pascual *et al.* 2000). El problema más común que se está presentado es la contaminación de bacterias como, *Salmonella spp*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes*, lo corroboran Guerrero & Velásquez (2016) en su investigación que realizaron en leche sin pasteurizar de la provincia de Manabí que presenta contaminación de *salmonela* y otros patógenos en quesos artesanales y uno de los inconvenientes es que no se realiza un control adecuado en la obtención de la leche que, es destinada a la producción de quesos artesanales y a su vez con el proceso inadecuado del mismo, que le otorga el medio para la proliferación de patógenos en el producto que será consumido por clientes de las diferentes edades de la provincia y del país, así como Rander *et al.* (2017) demuestran, que el queso artesanal es una fuente para la intoxicación por microorganismos patógenos.

En la provincia de Manabí uno de los productos más cotizados es el queso fresco artesanal que se suele elaborar sin controles de producción y medidas técnicas sanitarias pertinentes, que asegure la calidad del producto y la salud al consumidor. Considerando que la contaminación microbiana en el queso fresco artesanal, es una de las principales causas de intoxicación, por la deficiencia de limpieza y desinfección de los materiales, equipos y utensilios utilizados en el proceso de transformación del alimento al producto final, siendo este de interés público por las diferentes intoxicaciones que se pueden dar en nuestro medio.

1.3. JUSTIFICACIÓN

Conociendo que la contaminación en los alimentos en muchos casos, es el resultado de problemas ambientales que se generan por falta de una infraestructura sanitaria, higiene inadecuada, ausencia de buenas prácticas de manejo del producto, materia prima y el rompimiento de la cadena de frío durante el transporte y almacenamiento, que afecta el producto terminado y a su vez genera riesgos para el consumidor (Ruíz 1998).

Y considerando que en la producción láctea se obtienen diferentes productos derivados de la leche de manera artesanal tales como el yogur, manjar, helados, etc., que aportan nutrientes, proteínas, hidratos de carbono, grasas y vitaminas que contribuyen con beneficios a la salud humana de las diferentes etapas, como en la maternidad, en el desarrollo del sistema óseo y en el deporte (Fernández *et al.* 2015; Marino *et al.* 2014); y siendo el queso fresco artesanal uno de estos productos lácteos más cotizado en la provincia de Manabí por sus características organolépticas y nutrientes que favorecen a nuestro cuerpo y a la salud al ingerirlo por ser un alimento que se encuentra dentro de la pirámide alimenticia, es necesario que cuente con normativas de higiene y controles necesarios para su producción.

Por tal motivo es necesario utilizar nuevas tecnologías alimentarias, para que complementen las técnicas de conservación o reduzcan la contaminación causante en los alimentos, como es el caso de los resultados que se muestran en esta investigación.

Colaborando con la reducción de intoxicación alimentaria y mejorando las tecnologías tradicionales de las microempresas de queso fresco que son una fuente de ingresos para el sustento de familias en la provincia de Manabí.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivos General

Evaluar el efecto inhibitorio de bacterias ácido lácticas en bacterias patógenas *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*.

1.4.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis ssp* ante dos diferentes sustratos fructosa e inulina con y sin encapsulación.
2. Determinar la eficiencia de encapsulación de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis ssp* ante dos diferentes sustratos fructosa e inulina.
3. Analizar el efecto inhibitorio de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis ssp*, sobre las bacterias patógenas *E. coli*, *Salmonela* y *Listeria monocytogenes*.

1.5. HIPÓTESIS

Las bacterias ácido lácticas (*L. casei* y *L. lactis ssp*) encapsuladas inhibirán el desarrollo de *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

1.1. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas, las cuales son un grupo de bacterias en forma de cocos o bastones, son gram positivas, catalasas negativas, no esporuladas y por lo general inmóviles (Pardo *et al.* 2015). Desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación; Son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad por acidificar preservando los alimentos de las esporas, sino también por su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados (Klenhamer 1993).

Las tecnologías de productos alimenticios de las bacterias ácido lácticas son: formación de sabores ácidos, inhibición de organismo patógenos, melificación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aroma, producción de gas requerido para la formación de “ojos” en los quesos, proteólisis requerida en la maduración de los quesos (Parra 2010).

1.1.1. Clasificación

Las bacteriocinas, se han clasificado considerando sus propiedades bioquímicas y a sus características genéticas (Klenhamer 1993; Nes *et al.* 1996).

Se los clasifican como anaeróbicas facultativas con un metabolismo estrictamente fermentativo que produce ácido láctico como producto principal de la fermentación de azúcares. Estas bacterias obtienen su energía solo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables que crecen anaeróticamente. La capacidad biosintética de dichas bacterias es limitada y sus requerimientos nutritivos incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Además, es

importante mencionar que tienen alta tolerancia de pH por debajo de 5 la cual le da ventajas competitivas frente a otras bacterias.

Tabla N°1. División de géneros de bacterias ácido láctica:

| Géneros | Especies |
|------------------------|--|
| <i>Lactobacillus</i> | <i>L. bulgaricus, L. helveticus, L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, L. fermenti, L. brevis</i> |
| <i>Streptococcus</i> | <i>S. lactis, S. cremoris, S. thermophilus</i> |
| <i>Pediococcus</i> | <i>P. cerevisiae, P. halophilus</i> |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>L. mesenteroides, L. citrovorum</i> |
| <i>Bifidobacterium</i> | <i>B. bifidum, B. infantis, B. longum, B. adolescentis</i> <i>B. Thermophilum, B. pseudologum</i> |

Fuente: (Ramírez *et al.* 2011).

1.1.2. *Lactobacilos casei*

Son un tipo de bacteria probiótica muy eficaz para equilibrar la microflora intestinal, prevenir los trastornos intestinales, regular el sistema inmune específicamente de la respuesta inmune celular y además posee una potente acción antidiarreica (Todd & Martin 1999). Se encuentra naturalmente en las leches fermentadas, carne, vegetales fermentados, boca e intestino humano y en el ambiente. Se caracteriza por ser Gram positivo, sin motilidad y no formar esporas, posee un metabolismo estrictamente fermentativo con ácido láctico como producto final (Pardo *et al.* 2015).

1.1.3. *Lactococcus lactis ssp*

Es un microbio que fermenta el azúcar de la leche (lactosa) en ácido láctico. Son gram positivos, no móviles y no forman esporas, tiene dos subespecies, *lactis* y *cremoris*, ambas esenciales en la fabricación de muchas variedades de queso y otros productos lácteos fermentados (Todar 2012).

1.2. Prebióticos

Son carbohidratos de cadena corta, algunas veces se los reconoce como oligosacáridos, no son digeribles por las enzimas del epitelio intestinal o de las glándulas anexas debido a su estructura química, y de esta manera llegan al intestino grueso donde alcanzan a estar disponible para la fermentación de las bacterias sacarolíticas (Salazar *et al.* 2003).

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero. Son fundamentalmente fructo y galacto oligosacáridos (Cagigas & Blanco 2002).

1.2.1. Fructosa

La fructosa es un azúcar, así como la glucosa y ambas se reducen fácilmente a sorbitol tanto *in vitro* como *in vivo*; la fructosa difiere por la presencia de un grupo ceto unido al carbono 2 de la molécula, en tanto la glucosa presenta un grupo aldehído en el carbono 1 (Meléndez *et al.* 2007).

1.2.2. Inulina

La Inulina es un fructano polidisperso que consiste en una mezcla de oligómeros y polímeros mayores formados por uniones de fructosil-fructosa. Esta se encuentra en una gran variedad de plantas, pero principalmente en la raíz de la achicoria, banana, cebada, trigo, miel, espárrago. También se encuentra asociada a carbohidratos complejos e insolubles (Olagnero *et al.* 2007).

1.3. Encapsulación

La encapsulación, es una tecnología de micro-empaquetamiento que consiste en el recubrimiento de un material activo o núcleo que puede encontrarse en estado líquido, sólido o gaseoso, con una membrana polimérica semi-permeable de diversos materiales, generando micropartículas, microcápsulas y/o microesferas de tamaños variables (nm a mm) (Gouin 2004; Nazzaro *et al.* 2012; Rathore *et al.* 2013).

La encapsulación puede ocurrir mediante diversos métodos: atomización, gelación iónica, extrusión, emulsión, coacervación, entrapamiento en liposomas, entre los más usados (Gouin 2004; Nazzaro *et al.* 2012).

1.3.1. Atomización

Es un proceso básico que consiste en la transformación de una suspensión o disolución en un material seco particulado mediante la atomización en un medio caliente y seco, este método es utilizado en muchas aplicaciones industriales como en el sector: Alimenticio y farmacéutico (Mondragón *et al.* 2013).

1.3.2. Gelificación iónica

Este método permite encapsular compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos en lo cual se elaboran capsulas desde 1 mm o más dependiendo del elemento que se utilice para para el goteo y la altura (Solis 2016).

1.3.3. Extrusión

Este método es el segundo más usado después del secado por aspersión y consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulaste al forzar una solución a través de una boquilla o pequeñas aberturas generadores de gotas (Sandoval *et al.* 2016).

1.3.4. Coacervación

Es un método químico de separación de fases, consiste en un polímero separado de forma de pequeñas gotas líquidas que constituye el coacervado, forma cápsulas incipientes y se considera como el método original de encapsulación (Castrillón *et al.* 2016).

1.3.5. Entrampamiento en liposomas

Este método consiste en elaborar vesículas que contienen en su interior un medio acuoso encerrado que puede ser por una o más bicapas (Saavedra 2015).

1.4. Bacterias patógenas

1.4.1. *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia* (Bryan *et al.* 2015; Patzi *et al.* 2015). *E. coli* es la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Es raro encontrar cepas comensales asociadas a enfermedad. Pero, existen varios patotipos de *E. coli* implicados en un amplio espectro de enfermedades agrupados en tres síndromes clínicos (Iguchi *et al.* 2009).

La *E. coli* es productora de toxina Shiga, puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7°C y 50°C, a una temperatura óptima de 37°C. Y algunas pueden proliferar

en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4, y en alimentos con una actividad de agua (aw) mínima de 0,95 (OMS 2018).

1.4.1.1. Clasificación

La *E. coli* se clasifica según el síntoma que causa, se ha encontrado cinco grupos de cepas, tales como: *E. coli enterotoxigénica*, *E. coli enteroinvasiva*, *E. coli enteropatógena*, *E. coli enteroagregativa* y la *E. coli enterohemorrágica*, la más importante del grupo por ser causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) en el mundo, por presentar cuadro clínico que causan diarrea no sanguinolenta, provocando complicaciones que ponen en peligro a las personas infectadas principalmente en niños, ancianos y pacientes inmunosuprimidos (Franco *et al.* 2013).

1.4.1.2. Patogenia

La *E. coli* se transmite a los alimentos por contaminación cruzada producida en los hogares y restaurantes, durante la preparación de estos (con carne vacuno y otros productos cárnicos, superficies) por el uso de utensilios de cocina contaminados, además es causa de infecciones, los alimentos como son las hamburguesas poco cocidas, el salami curado, la sidra fresca no pasteurizada, el yogur y el queso elaborado por la fermentación de la leche cruda (OMS 2018).

1.4.2. *Salmonella spp*

La *salmonella* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Su tamaño oscila de 0,3 a 1 um x 1,0 a 6,0 um. Son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum* (Linder 1995).

En el ámbito mundial, está asociada con mucha frecuencia a las enfermedades diarreicas, las cuales continúan siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad sobre todo en lactantes, niños y ancianos (Mead *et al.* 1999).

1.4.2.1. Clasificación

En la actualidad el género *Salmonella* consta de sólo dos especies, *S. entérica* y *S. bongori*; la primera está dividida a su vez en seis subespecies: *S. entérica subespecie entérica*, *S. entérica subespecie salamae*, *S. entérica subespecie arizonae*, *S. entérica subespecie diarizonae*, *S. entérica subespecie 188 houtebaey* *S. entérica subespecie indica* (Popoff & Le Minor 1992). *Salmonella spp* es el grupo más complejo de todas las entero bacterias con más de dos mil cuatrocientos serotipos descritos en el esquema Kauffman White, determinados por la composición de los antígenos somáticos (O), flagelares (H), o de superficie Vi(k). *S. entérica subespecie entérica* comprende el 99% de los serotipos aislados de muestras clínicas (Popoff & Le Minor 1992).

1.4.2.2. Patogenia

La dosis infectante generalmente es muy alta, normalmente superior a 10^5 ufc, dependiendo de las características del germen y del huésped (Milgrom & Flanagan 1987; Pons 1976). Las salmonelas penetran por vía oral al ingerir alimentos contaminados. Se multiplican ampliamente en las partes altas del intestino delgado, invadiendo posteriormente intestino grueso, ciego y apéndice, sobre todo en los recodos del colon, donde proliferan abundantemente (Pons 1976).

1.4.3. *Listeria monocytogenes*

Es un bacilo Gram positivo, no esporulado, anaerobio facultativo, produce β -hemólisis en agar sangre de diversos animales, oxidasa negativa, crece entre 2,5°C y 42°C, motilidad positiva (20-25°C) tipo "tumbling" (Curtis *et al.* 2002). *L.*

monocytogenes puede ocasionar dos tipos de síndromes en el hombre. En primer lugar, listeriosis, caracterizado por síntomas y por signos severos en el sistema nervioso y esto se presenta en población vulnerable y en menor medida, el síndrome de tipo gastrointestinal, leve auto limitante, que puede afectar a la población en general (Herrera & Suárez 2012).

1.4.3.1. Clasificación

Es el agente etiológico de la listeriosis, infección alimentaria que se puede clasificar en dos grupos: listeriosis perinatal y listeriosis en el paciente adulto.

La primera es siempre de carácter invasivo. En el adulto la listeriosis puede ser tanto invasiva como no invasiva. La listeriosis invasiva se da en los casos en los cuales la infección inicial en el tejido intestinal se disemina hacia otros tejidos, como útero grávido, sistema nervioso central, sangre o combinaciones de éstos, y se asocia con individuos inmunocomprometidos (Rufo *et al.* 2016).

1.4.3.2. Patogenia

La *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir en el entorno gástrico, colonizar el intestino y cruzar la barrera intestinal, la hemato-encefálica y la materno-fetal. Ha desarrollado mecanismos sofisticados que le permiten invadir y sobrevivir en una amplia variedad de células, incluso en las que normalmente no son fagocíticas, como células epiteliales y endoteliales y hepatocitos (Portnoy 2007; Cossart & Toledo 2008).

Entre los factores de virulencia de *Listeria* se encuentran: las proteínas de superficie internalinas (InA, InB) que favorecen la invasión celular por un mecanismo tipo zipper, en el que la bacteria se hunde progresivamente en la superficie celular; la listeriolisina O y fosfolipasas que permiten lisar y escapar de las vacuolas fagocitarias una vez internalizada en la célula; la proteína polimerizadora de actina,

es necesaria para la motilidad en el citoplasma celular e intercelular; y transportadores de hexosa fosfato que le permiten utilizar azúcares en el citosol celular durante su replicación intracitoplasmática (Wallecha *et al.* 2009).

CAPÍTULO III.

1.5. METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de análisis de alimento, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, ubicado en la ciudad de Manta, Av. Circunvalación - Vía a San Mateo (Latitud 0°57' S y de Longitud 80°42 W y Altitud aproximada de 20 m.s.n.m). en el periodo 2018-2019.

Utilizando como variables de diseño dos tipos de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis ssp*), con y sin encapsulación en dos tipos de prebióticos y midiendo el efecto inhibitorio de los tratamientos encapsulados sobre la cepa de *Salmonella spp.*, *E. coli* y *L. monocytogenes*, este efecto inhibitorio se realizó mediante el método de discos de difusión de acuerdo a CLSI (2009). En un tiempo de análisis de 24 horas.

Los tratamientos en estudio se mantuvieron a temperatura de 27°C durante un mes.

1.6. Factor de estudio

Para la investigación se utilizó dos diseños completamente al azar con un arreglo de diseño Trifactorial 2^{3+1} y otro Bifactorial 2^{2+1}

DISEÑO EXPERIMENTAL N° 1

A. Tipo de bacteria ácido lácticas

- ✓ A1 *Lactobacillus casei*
- ✓ A2 *Lactococcus lactis spp*

B. Tipo de prebióticos

✓ B1 Fructosa

✓ B2 Inulina

C. Encapsulación

✓ C1 Si

✓ C2 No

DISEÑO EXPERIMENTAL N° 2

A. Mejores tratamientos del primer diseño experimental

✓ A1 *Lactobacillus casei* + Fructosa

✓ A2 *Lactococcus lactis spp* + Inulina

B. Microorganismo patógeno

✓ B1 *Salmonella spp*

✓ B2 *E. coli*

✓ B3 *Listeria monocytogenes*

Variable de estudios

Variables independientes

✓ Tipo de bacteria ácido lácticas

✓ Tipo de prebióticos

✓ Encapsulación

✓ Microorganismos patógenos

Variables dependiente

- ✓ Viabilidad de la bacteria ácido lácticas
- ✓ Poder inhibitorio

1.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

1.7.1. Tipo de diseño

En esta investigación se aplicó dos diseños completamente al azar con un arreglo de diseño Trifactorial 2^{3+1} y otro Bifactorial 2^{2+1} , con tres replicas por cada tratamiento, se determinó la viabilidad de libres y encapsulados de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis ssp* con prebióticos (Fructosa e Inulina), seleccionando los mejores tratamientos del primer diseño y permitió a elaborar microcápsulas con bacterias ácido lácticas y con dos diferentes prebióticos (*Lactococcus lactis ssp* con Inulina y *Lactobacillus casei* con Fructosa), para determinar la actividad antimicrobiana en tres tipos de microorganismos patógenos durante 24 horas.

1.7.2. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza ADEVA y la prueba mínima de comparación de acuerdo a Tukey para determinar la viabilidad y eficiencia de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis ssp*) ante dos diferentes prebióticos (Fructosa e Inulina) y la comparación mediante Dunnett para la actividad antimicrobiana, ambos al 5%. Todos los datos fueron analizados por triplicado y procesados por el programa Spss Statistics versión 24.

Tabla N° 2. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental N°1

| Fuente de variación | | G.L |
|---------------------|------------|-----|
| Total | (t*r-1) | 26 |
| Tratamientos | (t-1) | 8 |
| Repetición | r-1 | 2 |
| Factor A | FA-1 | 1 |
| Factor B | FB-1 | 1 |
| Factor C | FC-1 | 1 |
| Internación (AxB) | (FAxFB) | 1 |
| Internación (AxC) | (FAxFC) | 1 |
| Internación (BxC) | (FBxFC) | 1 |
| Internación (AxBxC) | (FAxFBxFC) | 1 |
| Error experimental | (t-1)(r-1) | 16 |

Elaborado por. Flores L. 2019

Tabla N° 3. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental N°2

| Fuente de variación | | G.L |
|---------------------|------------|-----|
| Total | (t*r-1) | 14 |
| Tratamientos | (t-1) | 4 |
| Repetición | r-1 | 2 |
| Factor A | FA-1 | 1 |
| Factor B | FB-1 | 1 |
| Internación (AxB) | (FAxFB) | 1 |
| Control | C-1 | 1 |
| Error experimental | (t-1)(r-1) | 8 |

Elaborado por. Flores L. 2019

$$\text{Coeficiente de variación (\%)} CV = \frac{\sqrt{CM \text{ ERROR}}}{\bar{x}} * 100$$

1.6. TRATAMIENTOS

En la **tabla N° 4**, del diseño experimental N°1 se muestra los 8 tratamientos de las combinaciones de los factores de estudio tales como; A: tipo de bacteria ácido lácticas, B: tipo de prebióticos y C: encapsulación.

Tabla N° 4. Tratamientos de estudio del diseño experimental N° 1

| N° | Tratamientos | Tipo De Bacteria Acido Lácticas | Tipo De Prebióticos | Encapsulación |
|----|--------------|------------------------------------|------------------------|---------------|
| 1 | A1B1C1 | <i>Lactobacillus Casei</i> | Fructosa | Si |
| 2 | A1B2C1 | <i>Lactobacillus Casei</i> | Inulina | Si |
| 3 | A2B1C1 | <i>Lactococcus lactis spp</i> | Fructosa | Si |
| 4 | A2B2C1 | <i>Lactococcus lactis spp</i> | Inulina | Si |
| 5 | A1B1C2 | <i>Lactobacillus Casei</i> | Fructosa | No |
| 6 | A1B2C2 | <i>Lactobacillus Casei</i> | Inulina | No |
| 7 | A2B1C2 | <i>Lactococcus lactis spp</i> | Fructosa | No |
| 8 | A2B2C2 | <i>Lactococcus lactis spp</i> | Inulina | No |

Elaborado por. Flores L. 2019

La **tabla N° 5**, del diseño experimental N°2 se muestra los 6 tratamientos, considerando los tratamientos que obtuvieron mayor viabilidad y eficiencia en el método de encapsulación seleccionados en el primero diseño, combinando los factores de estudio tales como: A mejores tratamientos del primer diseño experimentas y B microorganismos patógenos.

Tabla N° 5. Tratamientos de estudio del diseño experimental N° 2

| N° | Tratamientos | Mejores tratamientos | Microorganismos patógenos |
|----|--------------|---|-------------------------------|
| 1 | A1B1 | <i>Lactobacillus Casei</i> + Fructosa | <i>E. coli</i> |
| 2 | A1B2 | <i>Lactobacillus Casei</i> + Fructosa | <i>Salmonella</i> |
| 3 | A1B3 | <i>Lactobacillus Casei</i> + Fructosa | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| 4 | A2B1 | <i>Lactococcus lactis spp</i> + Inulina | <i>E. coli</i> |
| 5 | A2B2 | <i>Lactococcus lactis spp</i> + Inulina | <i>Salmonella</i> |
| 6 | A2B3 | <i>Lactococcus lactis spp</i> + Inulina | <i>Listeria monocytogenes</i> |

Elaborado por. Flores L. 2019

1.7. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

- **Con prebióticos Activación de las cepas *Lactococcus lactis ssp* y *Lactobacillus Casei* fructosa e inulina.**

En un vaso de precipitación de 500 ml se agregó 2% de bacterias ácidos lácticas y 2% de fructosa y se midió 5 ml de agua destilada en una micropipeta de 1000 µl, se agitó hasta quedar homogénea y posteriormente se incubó por 24 horas a una temperatura de 37°C, en condiciones aeróbica para su activación, este procedimiento se realizó 4 veces con diferentes bacterias ácido lácticas con prebióticos, la metodología se realizó de acuerdo a lo reportado por Martínez *et al.* (2009).

- **Preparación del material de pared**

Se usó 2% de alginato, el cual se colocó en un vaso de precipitación de 500 ml y se agregó 200 ml de agua destilada medida en una probeta, se homogeneizó manualmente con una espátula hasta quedar totalmente disuelto sin grumos y se colocaron las bacterias ácido lácticas con los prebióticos activados en cada vaso de precipitación, la metodología se aplicó de acuerdo a Jiménez (2011).

- **Preparación de la solución reticuladora**

Se añadió en un matraz aforado de 500 ml, 11% de cloruro de calcio y se aforó con agua destilada y se homogenizó, se utilizó el método propuesto por Jiménez (2011).

- **Aspersión por pistola**

El material de pared se colocó en la pistola del compresor, se disparó a una distancia de 20 cm sobre la solución reticuladora con una potencia de 900 watts, con ayuda de un colador de acero de 0.10 mm se realizó las microcápsulas y se dejaron en

reposo por 24 horas, la metodología se aplicó de acuerdo a Jiménez (2011). **ANEXO N° 1.**

- **Suspensión libre de bacterias ácido lácticas**

La elaboración de la película se realizó de acuerdo a Santacruz *et al.* (2015). La suspensión de almidón de yuca (1% p / p) se agitó y se calentó de 25°C a 90°C. Posteriormente la solución se enfrió a 30°C, se homogenizó con una cuchara y se añadió *L. casei* y *L. lactis ssp* con los prebióticos inulina y fructosa libre. Se usó veinte ml de la solución de almidón al 1% (p / v), y *L. casei* y *L. lactis ssp* con prebióticos inulina y fructosa, se transfirió a unas placas petri de 9,5 cm de diámetro y se incubaron durante 24 horas a 60°C. **ANEXO N° 2.**

- **Viabilidad de bacterias ácido láctico libre y encapsulado**

La viabilidad de *L. casei* y *L. lactis ssp* con prebióticos fructosa e inulina encapsulado se realizó a lo largo del almacenamiento a 27°C durante 1 mes (0, 10, 20 y 30 días de almacenamiento).

Las microcápsulas (0,5 g) que contenían *L. casei* y *L. lactis ssp* con prebióticos fructosa e inulina, se disolvieron en 50 ml (0,8%) de solución de KC y se sembraron partes alícuotas de 500 µl en una placa de agar MRS. Las colonias de *L. casei* y *L. lactis ssp* con prebióticos fructosa e inulina se determinaron de acuerdo con el método de Lu *et al.* (2013) después de la incubación aeróbica a 37°C durante 48 h. El *L. casei* y *L. lactis ssp* con prebióticos fructosa e inulina libre se diluyó en serie 10 veces con solución de KCl y se sembró 500 µl alícuotas en agar MRS. Las colonias de *L. casei* y *L. lactis ssp* se enumeraron de acuerdo con el método de encapsulado.

- **Eficiencia de encapsulación**

La eficiencia de encapsulación (EE) de las microcápsulas, se calculó de acuerdo con Zou *et al.* (2011); Cai *et al.* (2014). Se agregó 1 g de microcapsulas en 50 ml de solución de cloruro de potasio (KCl). La suspensión se homogenizó a 10.000 rpm durante 30s (PT-MR 2100, Kinematica, Suiza) y luego se agitó suavemente en un agitador rotatorio durante 30 minutos. EE de microcápsulas se calculó como: $EE = N/N_0 * 100\%$.

Donde N es el número de células viables liberadas de las microcápsulas y N₀ es el número de células viables en el concentrado de células para la microencapsulación. La enumeración de células viables en microcápsulas o concentrado de células se llevó a cabo a través de una dilución en serie de 10 veces, con sembrado en placas en agar MRS, y contando el número de colonias formadas en las placas después de la incubación anaeróbica a 37 °C durante 48 h (Zhao *et al.* 2015).

- **Análisis morfológico y de tamaño de partículas en microscopía electrónica de barrido**

Las microcápsulas cargadas de bacterias *L. casei* y *L. lactis* y con prebióticos fructosa e inulina, fueron montadas a una porta muestra de láminas de carbón y cinta doble faz de carbón y se realizó un recubrimiento de oro, las muestras se examinaron con un microscopio electrónico (SEM) (BRUKER VEGATE// LMU) a baja presión y un voltaje de aceleración de 20.00 Kv esta metodología se la realizó de acuerdo a lo reportado por Gómez *et al.* (2014). **ANEXO 3.**

- **La actividad antibacteriana de bacterias ácido lácticas en *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.**

La actividad antimicrobiana se determinó de acuerdo con CLSI (2009) y se llevó cabo en la cepa de *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

Los patógenos *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Fueron inoculados en placas de Petri usando medio de cultivo de agar Salmonella-Shigella y se incubó a 37°C durante 1 hora. Los discos de papel de filtro (Fisher Scientific Q8) de 5 mm de diámetro se sumergieron en solución de cloruro de potasio con las microcápsulas. Los discos se colocaron en el centro de una placa petri por triplicado, que contenía *Salmonella spp*, *E.coli* y *Listeria monocytogenes*, e incubaron a 27°C durante 24 horas.

Las zonas de inhibición del crecimiento de bacterias ácido lácticas con prebióticos se midieron después de 24 horas por triplicado de acuerdo a lo propuesto por Santacruz & Castro (2018). **ANEXO 4.**

CAPÍTULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Determinación de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas (*L. casei* y *L. lactis ssp*) con prebióticos (fructosa e inulina), libres y encapsulados.**

En el **Gráfico 1** se puede observar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas con prebióticos libres y encapsulados en los días 0, 10, 20 y 30, en donde los tratamientos libres se observan que existe decrecimiento de colonias de bacterias ácido lácticas (*L. lactis ssp* y *L. casei*) con prebióticos (Fructosa e Inulina); desde el día 0, el *L. lactis* con Inulina en rangos de 12,30 UFC/g y la *L. lactis ssp* con fructosa presenta rangos de 12,10 UFC/g; en cuanto al día 10 se evidencia el poco efecto protector de *L. lactis ssp* con Inulina en rangos de 6,7 UFC/g y la *L. lactis ssp* con fructosa en rangos de 6,8 UFC/g; así mismo en el día 20 y 30, disminuyeron con el pasar del tiempo presentando valores bajos en *L. lactis ssp* con Inulina en rangos de 3,1 UFC/g y la *L. lactis ssp* con fructosa en 3,8 UFC/g.

En la viabilidad libres de las bacterias ácido lácticas (*L. casei* y *L. lactis ssp*) con prebióticos (Fructosa e Inulina) en los 30 días de almacenamiento a 37°C, redujeron casi en su totalidad las unidades de formación de colonias perdiendo el efecto de protección, mismo que concuerdan a lo reportado por De la Cruz & Terán (2013) donde manifiesta, que la viabilidad de la bacteria libre se redujo a las 192 horas perdiendo su capacidad funcional y así mismo expresa Peredo (2013) el cual observo perdida de viabilidad en las bacterias libre utilizando la *L. casei*, en dulces de leche almacenadas en refrigeración, indicando que estas son sensible a alta presión osmótica, lo cual concuerda con lo reportado por González *et al.* (2014) donde, expresa la disminución de la viabilidad en estado libres y esto se debe especialmente a los bajos valores de pH y asimismo manifiesta Santacruz & Castro

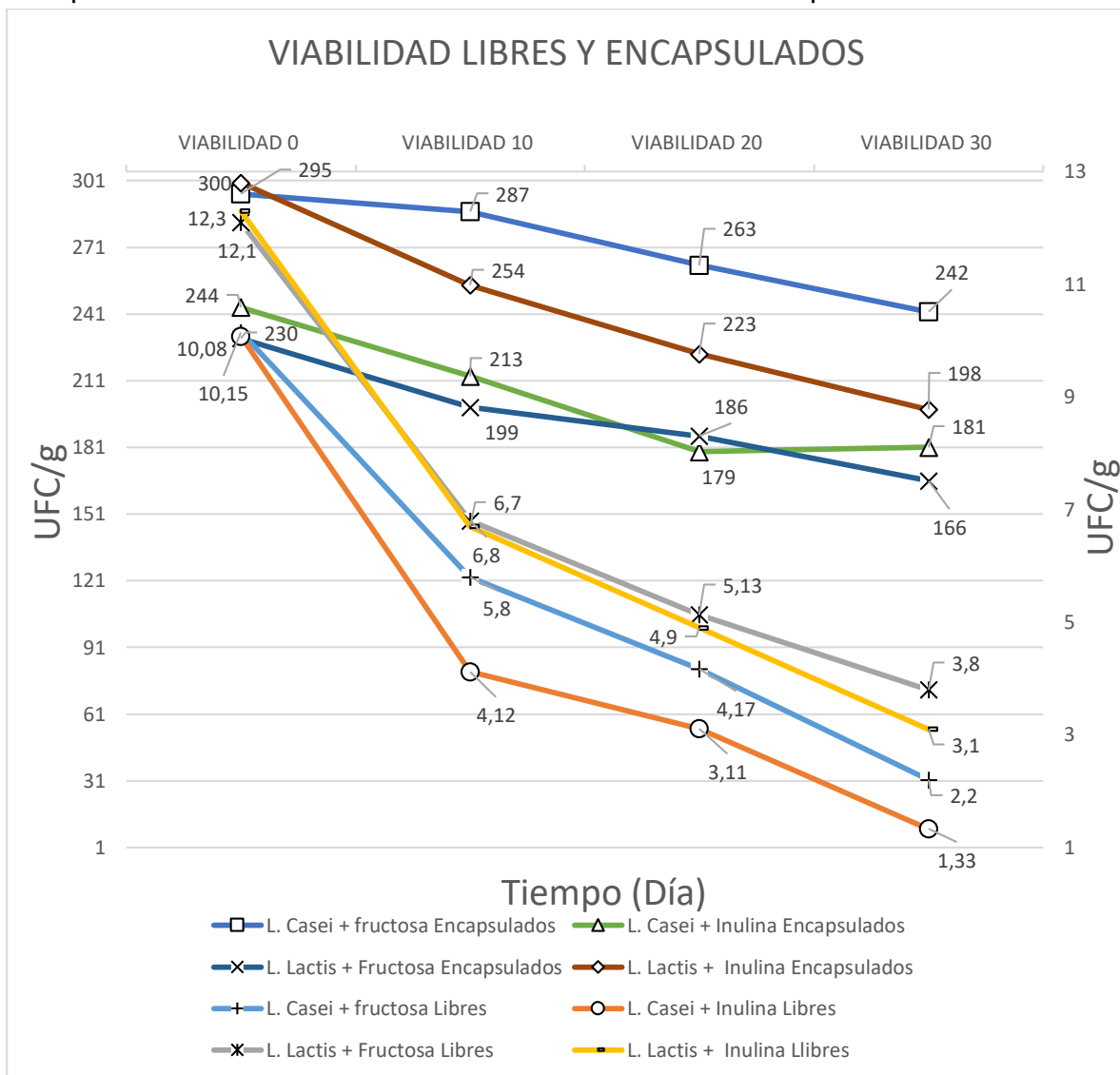
(2018). En donde dice que la viabilidad de las células libres disminuyó a cero a lo largo del almacenamiento después de los 20 días.

A diferencia de las microencapsuladas que evidencia en el día 0, una mayor viabilidad de colonias *L. casei* con Fructosa en rangos de 295 UFC/g y *L. lactis* con Inulina en rangos de 300 UFC/g; en cuanto al día 10, el *L. lactis spp* con Inulina disminuye a 254 UFC/g a diferencia de *L. casei* con fructosa que permanece constante en rangos de 287 UFC/g; en cambio en los días 20 y 30 se mantienen con una ligera disminución *L. casei* con Fructosa en rangos de 242 UFC/g y *L. lactis spp* con Inulina en rangos de 198 UFC/g; los demás se conservan estables en el efecto de formación de colonias.

La viabilidad de las microemcapsulas presentó mejores tratamientos en los 30 días de almacenamientos a 37°C, debido que el alginato brinda beneficios de conservación a las bacterias ácido lácticas con prebióticos en el recubrimiento protegiendo, del medio externo generando estabilidad con el pasar del tiempo, mientras que Mortazavian *et al.* (2007) donde, menciona que la microencapsulación aumenta de manera eficiente la viabilidad de los probióticos, por lo tanto, Montes (2013) expresa que, a pesar a diversos factores como la actividad de agua y su alta higroscopicidad contribuyen a la estabilidad para los microencapsulados durante el almacenamiento y así mismo informa Défaz & Moreira (2017) en su investigación con la microcápsulas que es más resistente por lo que se genera un micro ambiente que brinda protección a cambios externos, así mismo Se observa que, si es significativa la viabilidad de los tratamientos encapsulados. En todos los tratamientos, además se evidencia que si hay diferencias significativas entre ellos.

ANEXO N°8 - ANEXO 8.1.

Gráfico N° 1. Viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos libres y encapsulados durante 30 días de almacenamiento a una temperatura de 37°C.



Elaborado por: Flores L. 2019

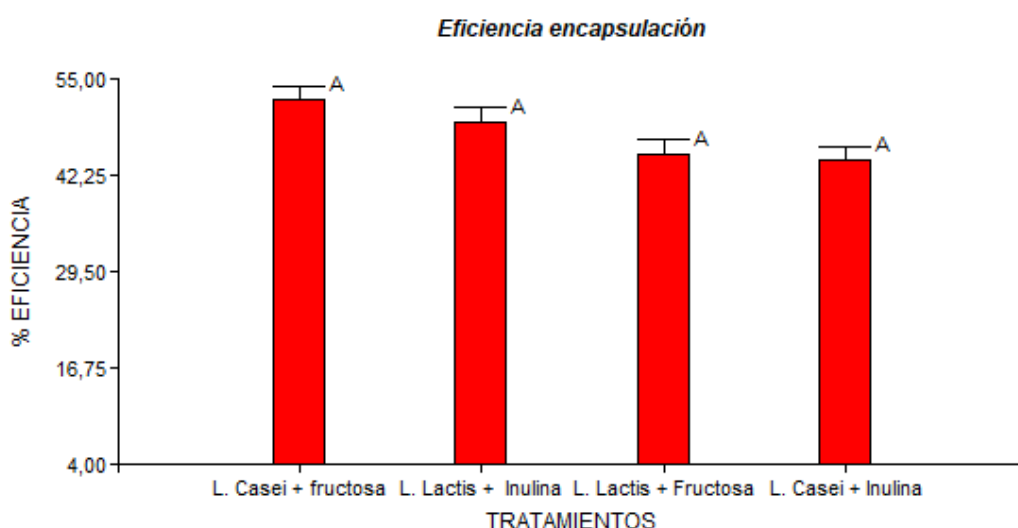
En el **ANEXO N° 5** se observa la viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos libres durante 30 días de almacenamiento a temperatura de 37°C; en donde, el día 0, la *L. lactis spp* con Inulina 12,30 UFC/g y la *L. lactis spp* con fructosa 12,10 UFC/g tienen mayores unidades de formación de colonias (UFC/g); y las demás presentan valores bajos la *L. casei* con inulina 10,08 UFC/g y la *L. casei* con fructosa 10,15 UFC/g; a diferencia del día 10, la *L. lactis spp* con Inulina se obtiene en rangos de 6,7 UFC/g y en *L. lactis spp* con fructosa en rangos de 6,8 UFC/g, presentando una disminución leve en cuanto a los demás tratamientos indican valores bajos la *L. casei* con inulina 4,12 UFC/g y la *L. casei* con fructosa 5,8 UFC/g; y en cambio a los días 20, se observa valores bajos en *L. lactis spp* con Inulina 4,9 UFC/g y en *L. lactis spp* con fructosa en rangos de 5,13 UFC/g a diferencia del día 30, muestran valores bajos de disminución en *L. lactis spp* con Inulina en 3,1 UFC/g y en *L. lactis spp* con fructosa 3,8 UFC/g, en los días posteriores de almacenamiento. La viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos libres disminuye con el pasar de los días perdiendo su efecto protector.

Como se muestra en el **ANEXO N° 6** la viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos encapsulados durante 30 días de almacenamiento, en el cual se observa la viabilidad; en el día 0, el *L. lactis spp* con Inulina 300 UFC/g y *L. casei* con fructosa 295 UFC/g, presenta altas unidades de formación de colonias (UFC/g); y las otras demuestran valores bajos la *L. lactis spp* con Fructosa 230 UFC/g y *L. casei* con Inulina 244 UFC/g; en cambio al día 10, se origina una disminución leve en *L. lactis spp* con Inulina en rangos de 254 UFC/g y en *L. casei* con fructosa en rangos de 287 UFC/g; en cuanto al días 20, en *L. lactis spp* con Inulina en rangos de 223 UFC/g y en *L. casei* con fructosa en rangos de 263 UFC/g; en cambio al día 30, la *L. casei* con fructosa en rangos de 242 UFC/g y la *L. lactis spp* con Inulina en rangos de 198 UFC/g disminuyen significativamente constante las unidades formadoras de colonias (UFC/g), a diferencia de los demás tratamientos que presentan valores bajos en *L. casei* con Inulina en rangos de 181 UFC/g y la *L. lactis spp* con Fructosa en rangos de 166 UFC/g en los días de almacenamiento. La viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos encapsulados se mantienen estables con el pasar de los días con poca disminución de su efecto protector, como podemos observar en el **gráfico N° 1** en el estudio del primer diseño experimental de viabilidad, los tratamientos *L. lactis spp* con Inulina y la *L. casei* con fructosa obtuvieron mejores resultados por su estabilidad durante el tiempo, por lo que fueron seleccionados por presentar mayores unidades de formación de colonias (UFC/g).

- **Resultados de la eficiencia de *Lactobacillus Casei* con fructosa y *Lactococcus lactis ssp* con Inulina.**

En cuanto a la eficiencia de encapsulación de las bacterias ácido lácticas con prebióticos, los resultados no son significativos entre tratamientos ya que presentan porcentajes entre el 50% hasta el 54,81 % a diferencia de los expuestos por Gonzales *et al.* (2013) en donde, las microcápsulas de *L. lactis* obtenidas presentaron un porcentaje de eficiencia más altos (89-94%) y corroborado por Gonzales *et al.* (2015) donde, menciona que el bajo porcentaje obtenido de eficiencia de las microcápsulas es debido a la lenta liberación de las bacterias ácido lácticas producida por la pared gelificada, no permitiendo obtener mayor porcentaje de eficiencia. Como se puede observar en el **Gráfico N° 4 y ANEXO N° 9 – ANEXO 9.1**. La eficiencia obtenida resulto ser de bajo porcentaje debido a que el alginato como empaquetamiento, posee beneficios de conservación y esto influyo en las microcápsulas con las bacterias ácido lácticas y el prebiótico al permitir obtener menores unidades formadoras de colonias.

Gráfico N° 2. Resultados estadísticos de la eficiencia de encapsulación.



Elaborado por: Flores L. 2019

- **Análisis de morfología y tamaño de partículas de las bacterias ácido lácticas encapsulados con prebióticos obtenidas en el microscopio electrónico de barrido (SEM).**

La observación de las microcápsulas mediante SEM microscopio electrónico de barrido, permitió determinar la morfología de los mejores tratamientos microencapsulados según su viabilidad, elaborados de *L. casei* con Fructosa y *L. lactis ssp* con Inulina, donde se observó que presentan forma esféricas y ovoide, estos resultados son similares a los expuesto por González *et al.* (2009) donde, expresa que la forma de las partículas es esferoidal utilizando mezcla de biopoliméricas binarias en la investigación realizada, asimismo informa Castillo *et al.* (2017) que, obtuvo microcápsulas de forma esférica regular presentado se dé aspecto poroso.

La distribución de tamaño de partículas observados en el SEM fue desde 30 μm , 20 μm y otras inferiores a 10 μm , las partículas obtenidas se encuentran dentro de lo reportado por Ferrándiz (2015) coincide, que las microcápsulas presentan un tamaño de 4.7-103 μm en caite de orégano y en secado por atomización la mayoría por debajo de las 10 μm , corroborado por Zain (2016) en donde, encontró partículas de diversos tamaños entre 0 y 50 μm siendo una característica particular en los polvos secados por aspersion. **ANEXO N° 3.1.** La morfología que presentaron las microcápsulas fue esférica y ovoloideas dándose por los diferentes tamaños de las partículas obtenidas influyendo en la estructura de las microcápsulas.

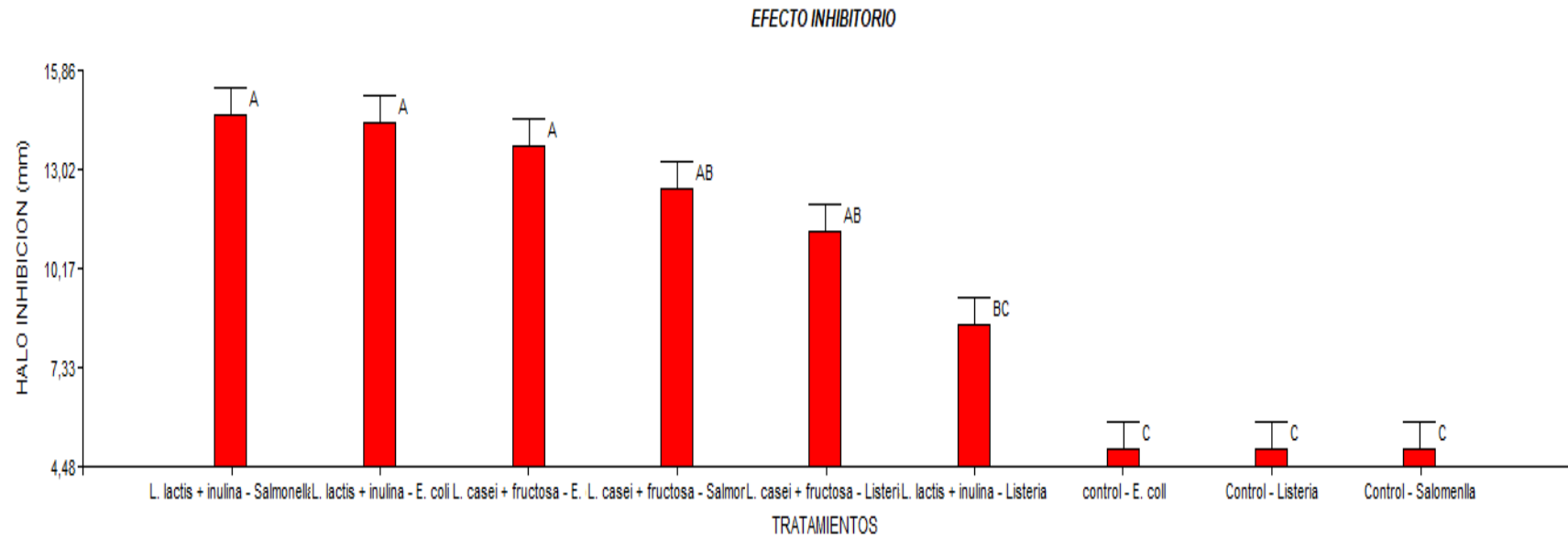
- **Análisis de inhibición microbiana de bacterias ácido lácticas (*L. casei* y *L. lactis ssp*) con prebióticos (Fructosa e Inulina), frente a patógenos *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*.**

En los resultados estadísticos obtenidos en cuanto al efecto inhibitorio de las bacterias ácido lácticas con prebióticos encapsulados, frente a bacterias patógenas

se observa el poder inhibitorio es evidente en las 24 horas, el efecto inhibitorio tuvo mejor resultado con cápsulas de *L. lactis ssp* con Inulina y con *L. casei* con fructosa, en el *E. coli* y en *salmonela spp* siendo el halo de inhibición de 14,56 mm- 13,67 mm y 14,33 mm-12,44 mm en cuanto a la *Listeria monocytogenes* con halo de inhibición de 8,56 mm-11,22 mm, referente al halo de inhibición de 5,00 mm del control, se evidenció valores bajos.

En el efecto inhibitorio se observó que las bacterias ácido lácticas encapsuladas con dos diferentes prebiótico inhiben los microorganismos patógenos; *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en las 24 horas siendo la *Listeria monocytogenes* la más sensible antes las bacterias ácido lácticas con prebióticos, mientras que las otras presentaron más resistencias. En cambio, por lo reportado por Lizcano & Vergara (2008) en donde, el extracto vegetal de *Passiflora manicata*, inhibe el desarrollo de *E. coli* por lo que presenta alteraciones en sitios blandos del patógeno, sin embargo, informa Alarcón *et al.* (2016) en su investigación, en donde obtiene actividad antibacteriana con el extracto Gel-DMSO (Dimetil Sulfóxido), en la *E.coli* mostrando halo de inhibición menor a los obtenidos en la presente investigación (8,5 mm) y con otro tipo de tratamiento utilizando extracto etanólico del mesófilo liofilizado no evidenciando efecto inhibitorio, considerando que existen diferencias en las investigaciones, dependiendo de la resistencia del microorganismo y el tratamiento aplicado; a diferencia a lo investigado por Alonso (2018), que la *L. lactis* N8-r-lecCI, presenta una mayor actividad antimicrobiana con halo de inhibición de (23,09 mm), a diferencia de las demás cepas de *L. lactis* juntos con leucocina C (*L. lactis* N8, *L. lactis* N8-p-lecCI y *L. lactis* NZ 9000-p-lecCI) utilizadas en su investigación que mostraron un excelente efecto inhibitorio en la *Listeria monocytogenes*. Como se muestra en el **gráfico N° 3** de análisis antimicrobiano. **ANEXO N° 10 – ANEXO 10.1**. En cuanto el control realizado con cloruro de potasio, no mostró crecimiento de halo en las 24 horas en los microorganismos patógenos.

Gráfico N° 3. Resultados generales del poder inhibitorio de los tratamientos de *L. casei* con Fructosa y *L. lactis* con Inulina, en bacterias patógenas *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, incubadas a 27°C y evaluadas en 24 horas.



Elaborado por: Flores L. 2019

En el **ANEXO N° 7** se observa los resultados por patógeno investigado, donde el halo de inhibición fue mayor en *E.coli* y *Salmonella spp* con 14,56mm-13,67 mm y 14,33 mm-12,44, aplicando *L. lactis* con Inulina y *L. casei* con Fructosa, pero no presenta diferencia significativa entre tratamientos en ambos patógenos, en el caso de la *Listeria monocytogenes* se observa que presenta inhibición mayor a *L. casei* con Fructosa 11,22 mm disminuyendo significativamente el halo de inhibición en *L. lactis ssp* con Inulina 8,56 mm.

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES

- ✓ Evaluar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas encapsuladas en relación a las bacterias libres en los días 0, 10, 20 y 30 y los mejores tratamientos fueron *L. casei* con Fructosa y *L. lactis* con Inulina, manteniendo su efecto protector en la formación de colonias en el tiempo establecido, a diferencia de las libres que fue disminuyendo.
- ✓ En cuanto a la eficiencia de las bacterias ácido lácticas con prebióticos encapsulación, los tratamientos seleccionados fueron *L. casei* con Fructosa y *L. lactis* con Inulina que presentaron porcentaje de 50% hasta 54,81% en lo que es las formas son esféricas y ovoides que oscila de un tamaño desde 30, 20 y otras inferiores a 10µm.
- ✓ Respecto al efecto inhibitorio los mejores resultados fue el encapsulados con *L. lactis* con Inulina y con *L. casei* con fructosa en *E. coli* con 14,56mm-13,67 mm y en *Salmonella spp* con 14,33 mm-12,44 mm, no presentando diferencia significativa. A diferencia de *Listeria monocytogenes* que presentó mayor efecto inhibitorio con *L. casei* con fructosa con 11,22 mm y disminuyó significativamente el efecto inhibitorio con *L. lactis* con Inulina en 8,56 mm.
- ✓ Por lo tanto, podemos decir que la hipótesis que se planteó al inicio de la investigación, que las bacterias ácido lácticas (*L. casei* y *L. lactis ssp*) encapsuladas si inhiben el desarrollo de *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*.

RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas con prebióticos libres en menor tiempo, para economizar y obtener mejores tratamientos utilizando películas comestibles.
- ✓ Evaluar la eficiencia de las microcápsulas con otro tipo de cobertor y someter a temperatura ambiente para determinar el pH y resistencia que genere las capsulas.
- ✓ Realizar efecto inhibitorio con bacterias ácido lácticas libres y encapsuladas durante 24 y 48 horas aplicados en queso artesanal y determinar los cambios físicos-químicos, microbiológicos y organolépticos.

BIBLIOGRAFIA

1. Alarcón, M; Fraile, S; Michelangeli, F; Contreras, M. & Fernández, R. (2016). Evaluación in vitro de dos extractos de Aloe vera en bacterias patógenas. Rev. Salus.UC. Vol 20. N°3. P 43.
2. Alonso, N. (2018). "Método de detención y control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria". Tesis-Trabajo Fin De Master. Universidad de Oviedo. p 42.
3. Bryan, A; Youngster, I. & McAdam A. (2015). Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. Clin Lab Med. Vol. 35. N° 2. Pp 247-72.
4. Cagigas, A. & Blanco, J. (2002). Prebióticos y Probióticos, Una Relación Beneficiosa. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Rev. Cubana Aliment Nutr. Pp 63-80.
5. Cai, S; Zhao, M; Fang, Y; Nishinari, K; Phillips, O. & Jiang, F. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1. 2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO₃ as calcium sources. Food hydrocolloids. Vol. 39. Pp 295-300.
6. Castillo, S; Alvarado, J; Baez j; Macías, E; Ramírez, P; Candelas, M. & Gallardo, C. (2017). Diseño de microcápsulas de alginato con matriz prebiótica de aloe vera para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum*. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol.2. p 535.
7. Castro, G; Valbuena, E; Bríñez, W; Sánchez, E; Vera, H. & Tovar, Armando. (2009). Comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* para la biopreservación de queso blanco. Rev. Científica. Vol 19. N° 2.
8. Castrillón, P; Vargas, J. & Rendón, D. (2016). Encapsulación de DHA/EPA mediante secado por aspersión: identificación de metodologías de proceso y agentes encapsulantes compatibles. Tesis- Trabajo de grado para optar por el título de Especialistas de Alimentación y Nutrición. Corporación Universitaria Lasallista. Facultad de Ingeniería. Caldas – Antioquia-Colombia. p 25.
9. CLSI. (2009)). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline-Second Edition.Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI document M44–A2.

10. Cossart, P. & Toledo, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and Infection*. Pp 1041-1050.
11. Curtis, M; Castro, N. & Franceschi, O. (2002). *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. Universidad Central de Venezuela. Caracas- Venezuela. *Rev. Scielo*. Alan vol. 52 N°3
12. Défaz, A. & Moreira J. (2017). Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en yogur sin sabor. Tesis- título de ingeniería en Agroindustria alimentaria en el Grado de Académico de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericano, Zamorano Honduras. p.11
13. De la cruz, A. & Terán, A. (2013). Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba. Tesis-título de ingeniería en Agroindustria alimentaria en el Grado de Académico de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericano, Zamorano Honduras. p.12-13
14. Fernández, E; Martínez, J; Martínez, V; Moreno, J; Rodolfo, Y; Hernández, M. & Morán, F. (2015). Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutrición hospitalaria*. Vol.31. N°1. P92.
15. Franco, A; Piedad, A; Ramírez, L; Orozco, M. & Lersy, G. (2013). Determinación de *Escherichia Coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Rev. Vol. 10. N° 1. Pp 1-10.*
16. Ferrándiz, M. (2015). Encapsulación de aceites esenciales funcionales para su aplicación en agricultura. Tesis- Doctoral. Universitat Politècnica de València. p.169.
17. Geraldine, M; Rosadio, A; Raúl, O; Ana, O; Gerardo, C. & Maturrano, L. (2017). Identificación de *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* en cuyes mediante la técnica de PCR múltiple. *Rev. de Investigaciones Veterinarias del Perú*. Vol 28. N° 2. p 412.
18. Gómez, A; Pinotti, A; Tavera, M; Nelson, R; Bertola, N. & Mobili, P. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*. Vol. 64. Pp 560–566.
19. González, R; Pérez, J. & Urbina, N. (2014). Efecto de la Microencapsulación sobre las Propiedades Reológicas y Fisicoquímicas del Yogurt Blando. *Rev. Información tecnológica*. Vol.25. N°6. Pp 45-56.

20. González, M; Patrón, A; Rieumont, J; López, G. & Leopoldo, A. (2009). Estudio de los cambios morfológicos obtenidos con matrices poliméricas de liberación controlada. *Acta Microscopica*, Vol. 18. Pp 371-372.
21. González, R; Salazar, J. & Pérez, J. (2013). Obtaining size-controlled microcapsules by ionic gelation with high and low acyl gellans containing *Lactococcus lactis*. *Rev. Colombia. Biotecnol.* Vol. 15. N° 2. Pp 70-80.
22. González, R; Tarón, A. & Morón, L. (2015). Formación de Microcápsulas de Tamaño Controlado por Gelación Iónica Utilizando Mezclas Biopoliméricas Binarias. *Rev. Información tecnológica.* Vol.26. N° 6. Pp 31-38.
23. González, G; Artés, F. & Fernández, P. (2017). Efecto del sustrato sobre parámetros de inactivación térmica de *Listeria monocytogenes*. Programa de doctorado en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. TAIDA, UPCT. Universidad Politécnica de Cartagena. ed 1 p 48
24. Guerrero, D. & Velásquez, G. (2016). Tesis - Aseguramiento de la inocuidad del queso fresco mediante implementación de procedimientos operativos estandarizados y de saneamiento en la cooperativa agropecuaria Chone-Ltda. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López. Calceta - Ecuador. p 15
25. Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.* Vol. 15. Pp 330-347.
26. Jiménez, E. (2011). Encapsulación de *Lactobacillus paracasei* en una matriz de alginato-almidón a través de: A tomización Coacervación-Lecho fluidizado. Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Alimentarias. Universidad veracruzana-instituto de ciencias básicas. Pp. 28-30.
27. Herrera, F. & Suárez, W. (2012). Aislamiento E Identificación De *Listeria* spp. A Partir De Muestras De Pescado Fresco Expendido En Pamplona (Norte De Santander). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* Vol. 15. N° 2. Pp 257 – 265.
28. Iguchi, A; Thomson, N; Ogura, Y; Saunders, D; Ooka, T; Henderson, I. & Harris, D. (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol.* Vol. 191. N° 1. Pp 347-54.
29. Klenhamer, R. (1993). Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* Vol.12. pp 39-86.
30. Lu, S; Zhe, L; Dan, L; Min, Y; Zhi, Z & Zhen, T. (2013). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and

evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*. Vol. 117. Pp 99–104.

31. Linder, E. (1995). *Toxicología de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 53-65.
32. Lizcano, A. & Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los Extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las Especies vegetales valeriana pilosa, hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y passiflora manicata frente a Microorganismos patógenos y fitopatógenos. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de microbióloga industrial. Pontificia universidad javeriana facultad de ciencias Bogotá D.C. p 84
33. Marino, C; Barrera, C. & Sedó, P. (2014). Beneficios de los lácteos en las diferentes etapas de la vida. *Federación panamericana de lechería*. Vol 9. p3.
34. Martínez, A; Yulán, B; Villafañe, N; Cardozo, C. & Vasek, M. (2009). Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis* bv. *diacetylactis* 166cVCOR. Universidad Nacional del Nordeste-Secretaria General de Ciencia y Técnica. P 1
35. Mead, S; Dietz, McCaig, L; Bresee, C. & Griffin, R. (1999). Food-Related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. Vol. 5. Pp 607-25.
36. Meléndez, G; Pérez, E. & Serralde, A. (2007). Efectos Benéficos Y Deleterios Del Consumo De Fructosa. *Rev. de Endocrinología y Nutrición* Vol. 15. N° 2. Pp 67-74.
37. Milgrom, F. & Flanagan, T. (1987). "Medical Microbiology" In Milgrom and Flanagan. Churchill Livingstone, New York. Vol. 1. Pp 302-305.
38. Mondragón, J; Barba, A & Jarque, J. (2013). El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. Vol 52. N° 4. p 159.
39. Montes, L. (2013). Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* atcc 393 y *Lactobacillus rhamnosus* atcc 9469). Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Bogotá D.C, Colombia. p 47
40. Mortazavian, A; Razavi, H; Ehsani, R. & Shrabvandi, S. (2007). Principios y métodos de microencapsulación de microorganismos probióticos. *Rev. Article. Iranian journal of biotechnology*. Vol. 5. N° 1. Pp 1-18

41. Nazzaro, F; Orlando, P; Fratianni, F. & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* Vol. 23. Pp 182-186.
42. Nes, F; Diep, B; Havarstein, S; Brurberg, I & Eijsink, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* Vol. 70. N°2. Pp 113-128.
43. Olagnero, G; Abad, A; Bendersky, S; Genevoi, C; Granzella, L. & Montonati, M. (2007). Alimentos Funcionales: fibra, prebiótico, prebiótico y simbiótico. *Diaeta (B. Aires).* Vol. 25. N° 121. Pp 20-33.
44. Organización mundial de la salud. (2018). *E. coli.*
45. Pardo, M; Panesso, M. & Sepúlveda, L. (2015). Producción De Ácido Láctico A Partir Del Suero De Leche. *Universidad Nacional de Colombia - Medellín.* Pp. 6-7.
46. Parra, R. (2010). Bacterias acidolácticas: Papel funcional en los alimentos. *Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.* Vol 8 N° 1.
47. Pascual, M; Calderón, V. & Pascual, L. (2000). *Microbiología alimentaria: Metodología Analítica Para Alimentos y bebidas.* 3.-A. Juan Bravo, Ed. Madrid-España. Díaz De Santos, S.A.
48. Patzi, S; Zaidi, M; Pérez, L; Cen, A; Chaussabel, D; Estrada, T. & Diarrheogenic. (2015). *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *Plos Negl Trop Dis.* Vol. 4;9. N°3.
49. Peredo, Z. (2013). Efecto de bacterias ácido lácticas probióticas sobre la estabilidad y las propiedades sensoriales de un dulce de leche de cabra. Tesis- Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias. *Universidad Veracruzana. Instituto de ciencias básicas.* p 45.
50. Pérez, E; Serralde, A. & Meléndez, G. (2009). Efectos benéficos y deletéreos del consumo de fructosa. *Rev. De Endocrinología y Nutrición* Vol. 15. N° 2. p 68.
51. Pons, P. (1976). Gastroenteritis por *Salmonella*. En *Tratado de Patología y Clínica Médica.* Editorial Salvat. Vol. 6. Pp 292-295.
52. Popoff, M. & Le Minor L. (1992). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. *Institute Pasteur. Dr. Roux. París, Francia.*

53. Portnoy, D. (2007). A 20-year perspective on *Listeria monocytogenes*. En: Goldfine H, Shen H, editor. *Listeria monocytogenes*. Pathogenesis and host response. Nueva York: Springer Science. Pp 1-12.
54. Ramírez, M. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis- Lic. Químico En Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. p 1.
55. Ramírez, J; Ulloa, Rosa; Velázquez, M; Ulloa, J. & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Rev. Fuente. No 7. P 6.
56. Rander, N; Menco, M. & Linda, C. (2017). Valoración microbiológica de queso costeño artesanal y evaluación higiénico-locativa de expendios en Córdoba. Colombia. Rev. Salud Pública. Vol 19. N°3. p312
57. Rathore, S; Desai, P; Liew, C; Chan, L. & Heng, P. (2013). Microencapsulation of microbial cells. J. Food. Eng. Vol. 116. Pp 369-381.
58. Rodríguez, R; Rojas, Y; Andrés, F. & Rodríguez, S. (2016). Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. Rev. Biosalud. Vol 15 N° 2. p 107.
59. Rufo, C; Soledad, M. & Brugnini, G. (2016). Ficha_ *Listeria monocytogenes*_para_publicar. *Listeria monocytogenes*. España. pp. 1-7.
60. Ruíz, A. (1998). Tesis doctoral. Estudio estadístico para predecir el tiempo de maduración del queso mancheco, e identificación de la microbiota. España: Universidad De Castilla - La Mancha.
61. Ruiz, M; Colello, R; Padola, L. & Etcheverría, A. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. Rev. Argentina de Microbiología. Vol. 49. N° 2. p 175.
62. Todar, K. (2012). *Lactococcus lactis*: nominated as the Wisconsin State Microbe. Todar's Online Textbook of Bacteriology.
63. Todd, R. & Martin, J. (1999). Selection and de-sign of probiotics. Raleigh (USA): North Carolina State University, Department of Food Science.
64. Saavedra, N. (2015). Desarrollo de una formulación de nano y micropartículas de licopeno extraído por fluidos supercríticos a partir de residuos agroindustriales de tomate (*Lycopersicum esculentum*). Tesis-Trabajo de grado para optar al título de Magister en Innovación Alimentaria y

Nutrición. Corporación Universitaria Lasallista Facultad de Ingeniería. Caldas – Antioquia-Colombia. p 33.

65. Salazar, A; Blanca, C; Montoya, C. & Olga, I. (2003). Importancia De Los Probióticos Y Prebióticos En La Salud Humana. *Vitae*; vol 10, N°2. pp 20-26.
66. Sandoval, V; Cu, T; Peraza, G. & Acereto, P. (2016). Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas. Chapter. p 193.
67. Santacruz, S; Rivadeneira, C. & Castro, M. (2015). Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocolloids*. Vol. 49. Pp 89–94.
68. Santacruz, S. & Castro, M. (2018). Viability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* incorporated to cassava starch edible films and its application to Manaba fresh white cheese. *LWT - Food Science and Technology*. Pp 570-572.
69. Silva, S. (2018). “Obtención de un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles de inulina y *Lactobacillus casei*”. Tesis- Ingeniera En Industrias Pecuarias. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo-Facultad De Ciencias Pecuarias. Ecuador – Chimborazo. p 7.
70. Solis, C. (2016). Comparación de dos materiales encapsulantes por el método de gelificación iónica normal e inversa. *Research*. p 1.
71. Zain, R. (2016). Evaluación de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y sensoriales de microencapsulados de cacao obtenidos por spray drying. Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Bogotá, Colombia. Pp. 1-115.
72. Zou, Q; Zhao, J; Liu, X; Tian, F; Zhang, H; Zhang, H. & Chen, W. (2011). Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *International journal of food science & technology*. Vol. 46. N°8. Pp 1672-1678.
73. Zhao, M; Qu, F; Cai, S; Fang, Y; Nishinari, K; Phillips, G. & Jiang, F. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1. 2686: Correlation between bacteria survivability and physical properties of microcapsules. *Food biophysics*. Vol. 10. N° 3. Pp 292-299.
74. Wallecha A; Driscoll, C; Cesar, M; Rivera, S. & Shahabi, P. (2009). Multiple effector mechanisms induced by recombinant *Listeria monocytogenes* anticancer immunotherapeutics. Molecular determinants of L.

monocytogenes virulence. En: Laskin A, Gadd G, Sariarlani D, editors. Advances in applied microbiology. San Diego: Elsevier. Vol. 66. Pp 1-27.

ANEXOS

Anexo N° 1. Obtención de las microcápsulas y almacenadas en cajas Petri.



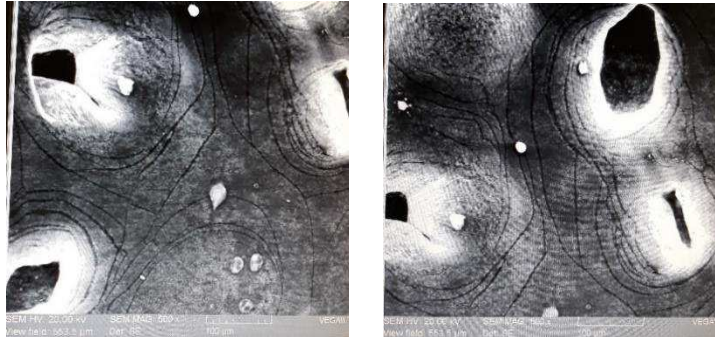
Anexo N° 2. Películas de almidón de yuca con bacterias ácido lácticas y prebiótico libres.



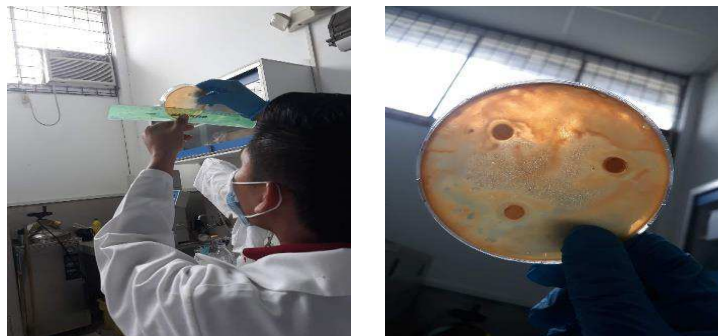
Anexo N° 3. (SEM) y tamaño de partículas.



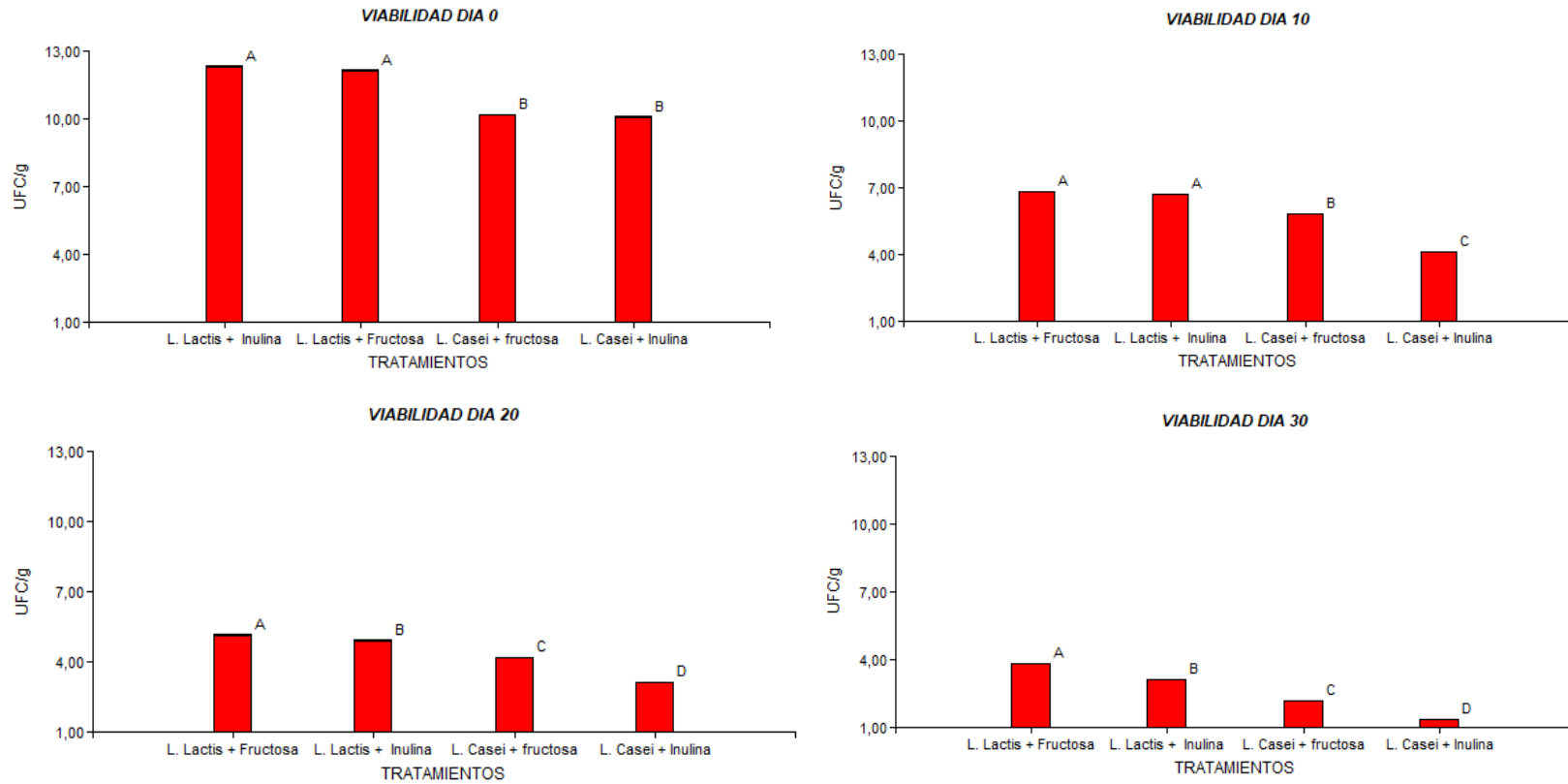
Anexo N° 3.1. Tamaño y morfología de las microcápsulas por el microscopio electrónico de barrido.



Anexo N° 4. Halo de bacterias ácido lácticas con prebióticos frente a bacterias patógenas.

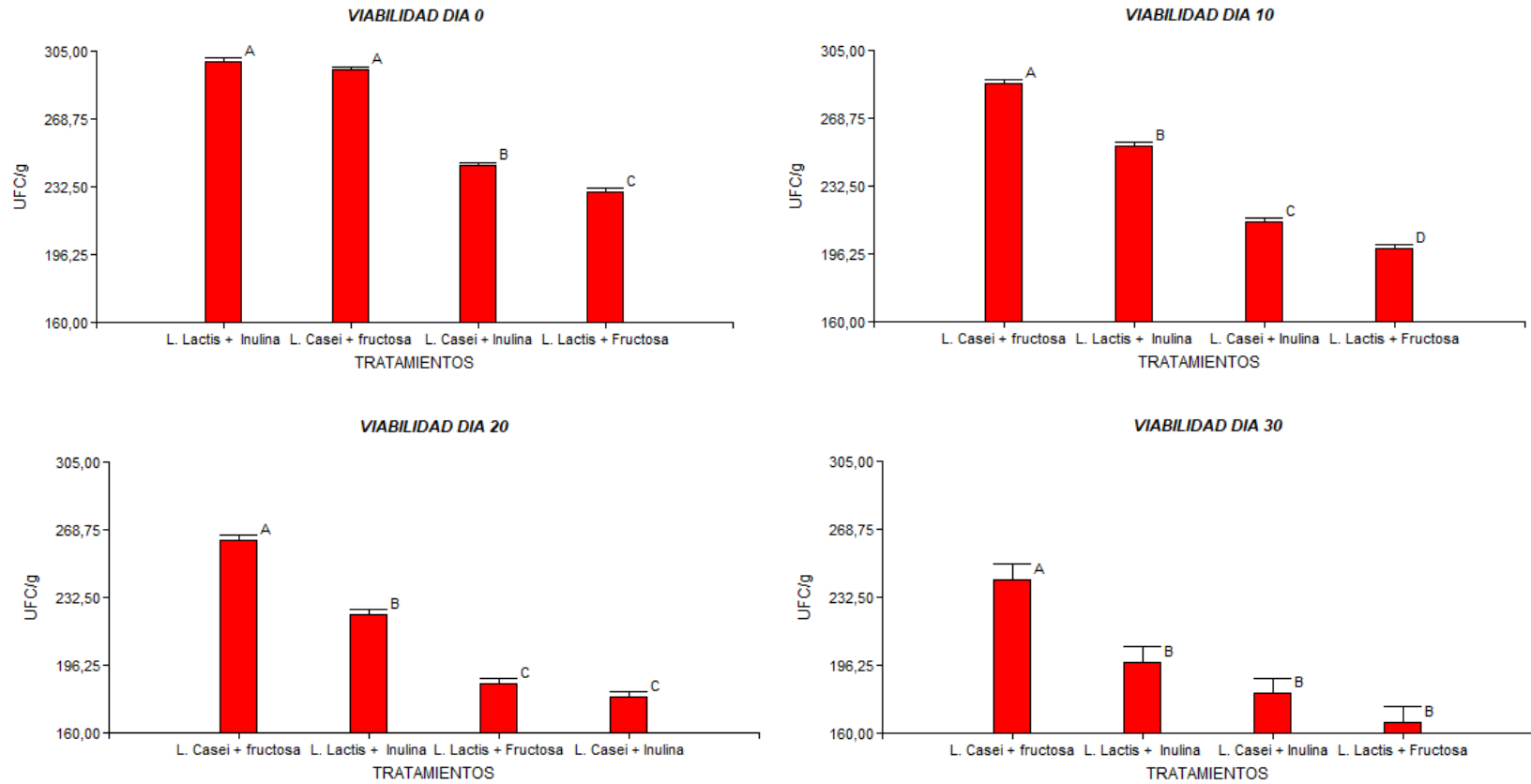


Anexo N° 5. Viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos libres durante 30 días de almacenamiento a una temperatura de 37°C.



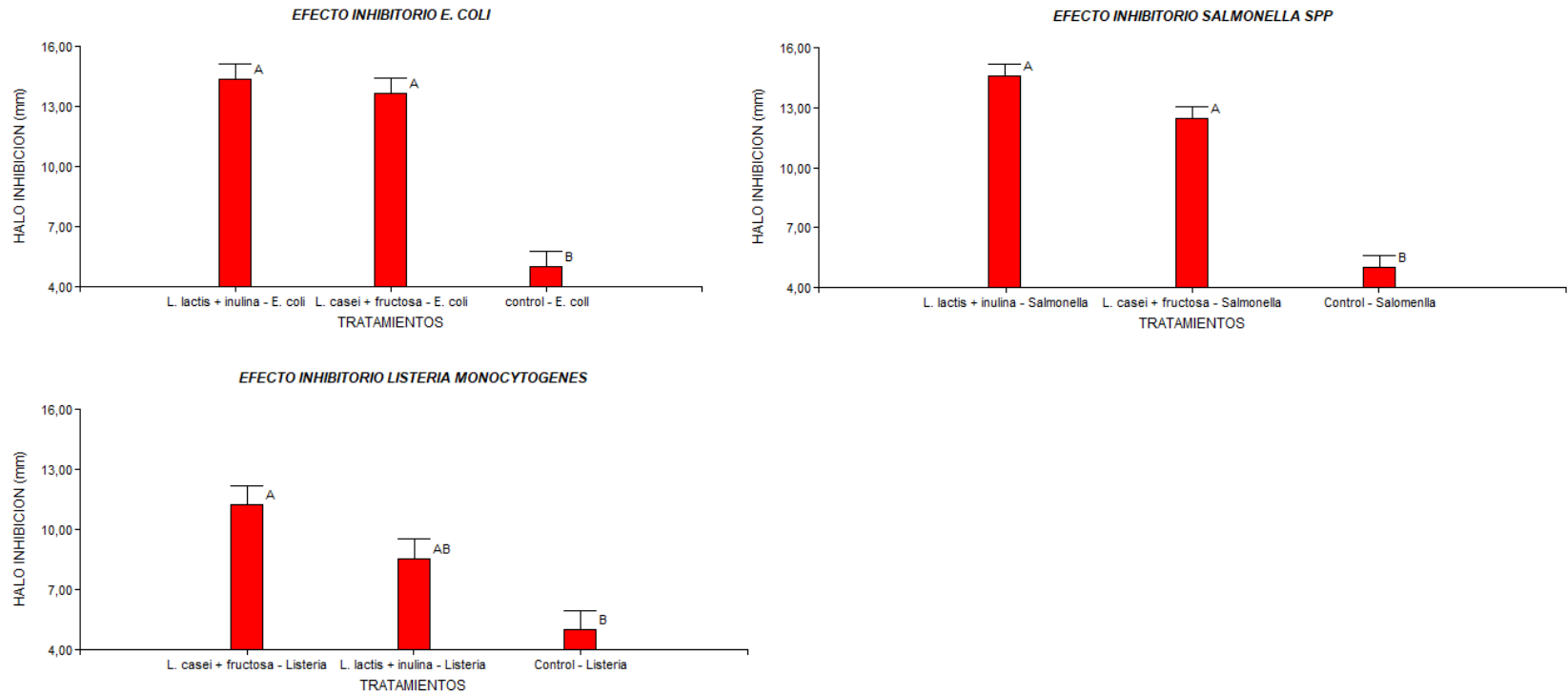
Elaborado por: Flores L. 2019

Anexo N° 6. Viabilidad de bacterias ácido lácticas con prebióticos encapsulados durante 30 días de almacenamiento a una temperatura de 37°C.



Elaborado por: Flores L. 2019

Anexo N° 7. Resultados del efecto inhibitorio de las bacterias *L. casei* con Fructosa y *L. lactis* con Inulina encapsuladas en cada uno de los patógenos en estudio *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytigenes* evaluadas en 24 horas.



Elaborado por: Flores L. 2019

Anexo N° 8. ANOVA de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas libres y encapsulados.

ANOVA

| VIABILIDAD | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------|------------------|----------------------|----|---------------------|-----------|------|
| V1 | Entre grupos | 404504.270 | 7 | 57786.324 | 18338.655 | .000 |
| | Dentro de grupos | 50.417 | 16 | 3.151 | | |
| | Total | 404554.687 | 23 | | | |
| V10 | Entre grupos | 338466.727 | 7 | 48352.390 | 6238.233 | .000 |
| | Dentro de grupos | 124.016 | 16 | 7.751 | | |
| | Total | 338590.743 | 23 | | | |
| V20 | Entre grupos | 274101.318 | 7 | 39157.331 | 2588.679 | .000 |
| | Dentro de grupos | 242.022 | 16 | 15.126 | | |
| | Total | 274343.340 | 23 | | | |
| V30 | Entre grupos | 124033.675 | 7 | 17719.096 | 1049.985 | .000 |
| | Dentro de grupos | 270.009 | 16 | 16.876 | | |
| | Total | 124303.684 | 23 | | | |

Anexo N° 8.1 Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: VIABILIDAD

| | (I) TRATAMIENTO | (J) TRATAMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Intervalo de confianza al 95% | |
|---------------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|----------------|------|-------------------------------|-----------------|
| | | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| T de Dunnett (bilateral)a | 1.00 | 8.00 | -289.51667* | 1.44938 | .000 | -291.7590 | -287.2744 |
| | 2.00 | 8.00 | -289.58667* | 1.44938 | .000 | -291.8290 | -287.3444 |
| | 3.00 | 8.00 | -287.56667* | 1.44938 | .000 | -289.8090 | -285.3244 |
| | 4.00 | 8.00 | -287.36667* | 1.44938 | .000 | -289.6090 | -285.1244 |
| | 5.00 | 8.00 | -4.66667* | 1.44938 | .028 | -6.9090 | -2.4244 |
| | 6.00 | 8.00 | -55.66667* | 1.44938 | .000 | -57.9090 | -53.4244 |
| | 7.00 | 8.00 | -69.66667* | 1.44938 | .000 | -71.9090 | -67.4244 |
| V10 | 1.00 | 8.00 | -248.20000* | 2.27317 | .000 | -251.7168 | -244.6832 |
| | 2.00 | 8.00 | -249.88000* | 2.27317 | .000 | -253.3968 | -246.3632 |
| | 3.00 | 8.00 | -247.20000* | 2.27317 | .000 | -250.7168 | -243.6832 |
| | 4.00 | 8.00 | -247.30000* | 2.27317 | .000 | -250.8168 | -243.7832 |
| | 5.00 | 8.00 | 33.00000* | 2.27317 | .000 | 29.4832 | 36.5168 |
| | 6.00 | 8.00 | -41.00000* | 2.27317 | .000 | -44.5168 | -37.4832 |
| | 7.00 | 8.00 | -55.00000* | 2.27317 | .000 | -58.5168 | -51.4832 |
| V20 | 1.00 | 8.00 | -218.83000* | 3.17557 | .000 | -223.7429 | -213.9171 |
| | 2.00 | 8.00 | -219.89000* | 3.17557 | .000 | -224.8029 | -214.9771 |
| | 3.00 | 8.00 | -217.87000* | 3.17557 | .000 | -222.7829 | -212.9571 |
| | 4.00 | 8.00 | -218.10000* | 3.17557 | .000 | -223.0129 | -213.1871 |
| | 5.00 | 8.00 | 40.00000* | 3.17557 | .000 | 35.0871 | 44.9129 |
| | 6.00 | 8.00 | -44.00000* | 3.17557 | .000 | -48.9129 | -39.0871 |

| | | | | | | | |
|-----|------|------|-------------|---------|------|-----------|-----------|
| | 7.00 | 8.00 | -37.00000* | 3.17557 | .000 | -41.9129 | -32.0871 |
| V30 | 1.00 | 8.00 | -118.80000* | 3.35416 | .000 | -123.9891 | -113.6109 |
| | 2.00 | 8.00 | -119.67000* | 3.35416 | .000 | -124.8591 | -114.4809 |
| | 3.00 | 8.00 | -117.20000* | 3.35416 | .000 | -122.3891 | -112.0109 |
| | 4.00 | 8.00 | -117.90000* | 3.35416 | .000 | -123.0891 | -112.7109 |
| | 5.00 | 8.00 | -11.00000* | 3.35416 | .025 | -16.1891 | -5.8109 |
| | 6.00 | 8.00 | 71.00000* | 3.35416 | .000 | 65.8109 | 76.1891 |
| | 7.00 | 8.00 | 13.00000* | 3.35416 | .007 | 7.8109 | 18.1891 |

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.5.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Anexo N° 9. ANOVA de la eficiencia de encapsulación

ANOVA

EFICIENCIA

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|----------------------|----|---------------------|-------|------|
| Entre grupos | 127,658 | 3 | 42,553 | 4,235 | ,046 |
| Dentro de grupos | 80,376 | 8 | 10,047 | | |
| Total | 208,033 | 11 | | | |

Anexo N° 9.1 Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: EFICIENCIA

HSD Tukey

| (I) TRATAMIENTOS | (J) TRATAMIENTOS | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Intervalo de confianza al 95% | |
|------------------|------------------|----------------------------|----------------|------|-------------------------------|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1,00 | 2,00 | 8,07333 | 2,58805 | ,056 | -,2145 | 16,3612 |
| | 3,00 | 7,16000 | 2,58805 | ,092 | -1,1278 | 15,4478 |
| | 4,00 | 2,93000 | 2,58805 | ,682 | -5,3578 | 11,2178 |
| 2,00 | 1,00 | -8,07333 | 2,58805 | ,056 | -16,3612 | ,2145 |
| | 3,00 | -,91333 | 2,58805 | ,984 | -9,2012 | 7,3745 |
| | 4,00 | -5,14333 | 2,58805 | ,268 | -13,4312 | 3,1445 |
| 3,00 | 1,00 | -7,16000 | 2,58805 | ,092 | -15,4478 | 1,1278 |
| | 2,00 | ,91333 | 2,58805 | ,984 | -7,3745 | 9,2012 |
| | 4,00 | -4,23000 | 2,58805 | ,413 | -12,5178 | 4,0578 |
| 4,00 | 1,00 | -2,93000 | 2,58805 | ,682 | -11,2178 | 5,3578 |
| | 2,00 | 5,14333 | 2,58805 | ,268 | -3,1445 | 13,4312 |
| | 3,00 | 4,23000 | 2,58805 | ,413 | -4,0578 | 12,5178 |

Anexo N° 10. ANOVA del efecto inhibitorio.

ANOVA

INHIBICION

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|----------------------|----|---------------------|--------|------|
| Entre grupos | 393,498 | 7 | 56,214 | 20,231 | ,000 |
| Dentro de grupos | 52,794 | 19 | 2,779 | | |
| Total | 446,292 | 26 | | | |

Anexo N° 10.1 Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: INHIBICION

| | (I) TRATAMIENTOS | (J) TRATAMIENTOS | Diferencia de | Error estándar | Sig. | Intervalo de confianza al 95% | |
|-----------|------------------|------------------|---------------|----------------|----------|-------------------------------|-----------------|
| | | | medias (I-J) | | | Límite inferior | Límite superior |
| Dunnett C | 1,00 | 2,00 | -,66667 | 1,31839 | | -12,8113 | 11,4779 |
| | | 3,00 | 8,66667 | 1,26125 | | -2,9515 | 20,2849 |
| | | 4,00 | 1,22333 | 1,53100 | | -12,8797 | 15,3264 |
| | | 5,00 | -,88667 | 1,40498 | | -13,8288 | 12,0555 |
| | | 6,00 | 8,66667 | 1,26125 | | -2,9515 | 20,2849 |
| | | 7,00 | 2,44667 | 2,06547 | | -16,5798 | 21,4731 |
| | | 8,00 | 6,88833 | 1,49685 | | -4,9217 | 18,6984 |
| | | 2,00 | 1,00 | ,66667 | 1,31839 | | -11,4779 |
| | 3,00 | 9,33333* | ,38394 | | 5,7966 | 12,8701 | |
| | 4,00 | 1,89000 | ,94901 | | -6,8520 | 10,6320 | |
| | 5,00 | -,22000 | ,72844 | | -6,9301 | 6,4901 | |
| | 6,00 | 9,33333* | ,38394 | | 5,7966 | 12,8701 | |
| | 7,00 | 3,11333 | 1,68013 | | -12,3635 | 18,5902 | |
| | 8,00 | 7,55500* | ,89287 | | 2,6468 | 12,4632 | |
| | 3,00 | 1,00 | -8,66667 | 1,26125 | | -20,2849 | 2,9515 |
| | 2,00 | -9,33333* | ,38394 | | -12,8701 | -5,7966 | |
| | 4,00 | -7,44333 | ,86788 | | -15,4379 | ,5513 | |
| | 5,00 | -9,55333* | ,61904 | | -15,2557 | -3,8509 | |
| | 6,00 | ,00000 | ,00000 | | ,0000 | ,0000 | |

| | | | | | | |
|------|------|-----------|---------|--|----------|---------|
| | 7,00 | -6,22000 | 1,63568 | | -21,2873 | 8,8473 |
| | 8,00 | -1,77833 | ,80610 | | -5,5303 | 1,9736 |
| 4,00 | 1,00 | -1,22333 | 1,53100 | | -15,3264 | 12,8797 |
| | 2,00 | -1,89000 | ,94901 | | -10,6320 | 6,8520 |
| | 3,00 | 7,44333 | ,86788 | | -,5513 | 15,4379 |
| | 5,00 | -2,11000 | 1,06603 | | -11,9299 | 7,7099 |
| | 6,00 | 7,44333 | ,86788 | | -,5513 | 15,4379 |
| | 7,00 | 1,22333 | 1,85166 | | -15,8336 | 18,2802 |
| | 8,00 | 5,66500 | 1,18449 | | -2,7460 | 14,0760 |
| 5,00 | 1,00 | ,88667 | 1,40498 | | -12,0555 | 13,8288 |
| | 2,00 | ,22000 | ,72844 | | -6,4901 | 6,9301 |
| | 3,00 | 9,55333* | ,61904 | | 3,8509 | 15,2557 |
| | 4,00 | 2,11000 | 1,06603 | | -7,7099 | 11,9299 |
| | 6,00 | 9,55333* | ,61904 | | 3,8509 | 15,2557 |
| | 7,00 | 3,33333 | 1,74890 | | -12,7769 | 19,4436 |
| | 8,00 | 7,77500* | 1,01637 | | 1,3261 | 14,2239 |
| 6,00 | 1,00 | -8,66667 | 1,26125 | | -20,2849 | 2,9515 |
| | 2,00 | -9,33333* | ,38394 | | -12,8701 | -5,7966 |
| | 3,00 | ,00000 | ,00000 | | ,0000 | ,0000 |
| | 4,00 | -7,44333 | ,86788 | | -15,4379 | ,5513 |
| | 5,00 | -9,55333* | ,61904 | | -15,2557 | -3,8509 |
| | 7,00 | -6,22000 | 1,63568 | | -21,2873 | 8,8473 |
| | 8,00 | -1,77833 | ,80610 | | -5,5303 | 1,9736 |
| 7,00 | 1,00 | -2,44667 | 2,06547 | | -21,4731 | 16,5798 |
| | 2,00 | -3,11333 | 1,68013 | | -18,5902 | 12,3635 |
| | 3,00 | 6,22000 | 1,63568 | | -8,8473 | 21,2873 |

| | | | | | | | |
|---------------------------------------|------|------|-----------|---------|------|----------|---------|
| | | 4,00 | -1,22333 | 1,85166 | | -18,2802 | 15,8336 |
| | | 5,00 | -3,33333 | 1,74890 | | -19,4436 | 12,7769 |
| | | 6,00 | 6,22000 | 1,63568 | | -8,8473 | 21,2873 |
| | | 8,00 | 4,44167 | 1,82352 | | -10,7321 | 19,6154 |
| | 8,00 | 1,00 | -6,88833 | 1,49685 | | -18,6984 | 4,9217 |
| | | 2,00 | -7,55500* | ,89287 | | -12,4632 | -2,6468 |
| | | 3,00 | 1,77833 | ,80610 | | -1,9736 | 5,5303 |
| | | 4,00 | -5,66500 | 1,18449 | | -14,0760 | 2,7460 |
| | | 5,00 | -7,77500* | 1,01637 | | -14,2239 | -1,3261 |
| | | 6,00 | 1,77833 | ,80610 | | -1,9736 | 5,5303 |
| | | 7,00 | -4,44167 | 1,82352 | | -19,6154 | 10,7321 |
| T de Dunnett (bilateral) ^b | 1,00 | 8,00 | 6,88833* | 1,17869 | ,000 | 3,4325 | 10,3442 |
| | 2,00 | 8,00 | 7,55500* | 1,17869 | ,000 | 4,0991 | 11,0109 |
| | 3,00 | 8,00 | -1,77833 | 1,17869 | ,581 | -5,2342 | 1,6775 |
| | 4,00 | 8,00 | 5,66500* | 1,17869 | ,001 | 2,2091 | 9,1209 |
| | 5,00 | 8,00 | 7,77500* | 1,17869 | ,000 | 4,3191 | 11,2309 |
| | 6,00 | 8,00 | -1,77833 | 1,17869 | ,581 | -5,2342 | 1,6775 |
| | 7,00 | 8,00 | 4,44167* | 1,17869 | ,008 | ,9858 | 7,8975 |

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

b. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.